

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

**Étude des mécanismes d'approvisionnement des précurseurs  
lipidiques des rhamnolipides et caractérisation mutationnelle de  
l'enzyme RhIA de *Pseudomonas aeruginosa*.**

Par  
Carlos Eduardo Dulcey Jordan

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

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne,  
Examineur externe,  
Examineur externe,  
Directeur de recherche,  
Codirecteur de recherche,

Dr. Richard Villemur, INRS-IAF  
Dr. Christian Salesse, Université Laval  
Dr. Marc Beauregard, UQTR  
Dr. Nicolas Doucet, INRS-IAF  
Dr. Éric Déziel, INRS-IAF

## Résumé

Les composés surfactants présentent un intérêt industriel élevé dans la société moderne étant donné les nombreuses applications qui en découlent. En effet, considérant les applications variées des surfactants dans les domaines pharmaceutiques, alimentaires, cosmétiques, textiles, agricoles, de la papeterie, pétroliers et des produits ménagers, entre autres, il est facile d'imaginer la panoplie d'utilisations possibles de ces composés dans une myriade de produits de consommation quotidienne. Sans équivoque, vu les multiples utilisations possibles des surfactants et grâce à leur versatilité, l'industrie pour ces composés bénéficie d'un marché mondial de plusieurs milliards de dollars. Ce marché est bien consolidé et en croissance en raison de l'augmentation de l'industrialisation dans les pays du tiers monde, de la diversification des produits, de l'amélioration générale du niveau de vie dans plusieurs pays et de la croissance continue de la population mondiale. À la demande mondiale des surfactants, s'ajoute le fait que la production de ces composés consomme également de très grandes quantités de matières premières pétrochimiques et de graisses naturelles. Par ailleurs, l'utilisation massive de surfactants dans les produits domestiques comme les détergents et les cosmétiques, et leur dispersion subséquente dans les systèmes aquatiques, sont des raisons qui plaident fortement en faveur du remplacement des surfactants synthétiques conventionnels par des composés plus écologiques. Cette transition implique, notamment, le développement de molécules plus facilement biodégradables et moins toxiques. D'autre part, les raisons qui justifient la recherche de surfactants de remplacement ne sont pas seulement environnementales. En effet, les prévisions de consommation soulèvent aussi des préoccupations d'ordre économique étant donné que la concurrence entre les différents secteurs d'utilisation des hydrocarbures s'intensifie et que l'approvisionnement en ressources pétrolières brutes devient de plus en plus difficile. De nouvelles recherches s'orientent donc peu à peu vers l'étude de molécules d'origine microbienne de faible toxicité; ces molécules présenteraient des propriétés surfactives comparables tout en permettant d'obtenir des produits plus respectueux de l'environnement d'une qualité égale ou supérieure aux surfactants conventionnels. Il s'agit somme toute de recherches complexes qui sont encore dans leurs premiers balbutiements et donc dans des stades de développement préliminaires.

La production industrielle de surfactants microbiens constitue donc une alternative pour favoriser le développement durable au sein d'une société globalisée qui fait face aux défis des changements climatiques et de la diminution de la biodiversité, ainsi qu'aux défis liés à l'insécurité alimentaire et énergétique au niveau mondial.

Depuis la découverte des rhamnolipides en 1946, ces composés d'origine bactérienne sont devenus un sujet de recherche et de nombreuses études leurs sont consacrées. Ces recherches visent notamment la caractérisation de leur structure, leur diversité, leur biosynthèse, leurs propriétés physicochimiques, leur production industrielle et leurs applications potentielles. Toutefois, en dépit de leurs excellentes propriétés comme agents surfactants et leur innocuité pour l'homme et l'environnement, les rhamnolipides ne représentent à l'heure actuelle qu'une faible part du marché global de surfactants. En effet, la convergence de plusieurs facteurs est déterminante dans le coût de production élevé de ces glycolipides, ce qui demeure le principal élément limitant leur utilisation à grande échelle. Ces facteurs incluent aussi les coûts des matières premières et la faible productivité cellulaire. L'optimisation de ces facteurs est d'une grande importance pour diminuer les coûts globaux et accroître la disponibilité de ces biosurfactants à des coûts compétitifs.

En tant que biologiste, je m'intéresse au potentiel du génie métabolique et du génie des protéines pour augmenter le rendement de production des rhamnolipides est attrayant. Cependant, les mécanismes métaboliques impliqués dans leur production chez les bactéries restent encore mal compris, limitant ainsi la mise en place de stratégies d'optimisation efficaces. Par ailleurs, le manque de caractérisation structurale des enzymes impliquées limite l'emploi d'approches par génie des protéines, telle l'optimisation rationnelle de ces enzymes.

L'objectif principal de cette thèse est d'accroître les connaissances pour atteindre une meilleure compréhension du mécanisme de biosynthèse du précurseur lipidique des rhamnolipides, ce qui pourrait faciliter la conception de nouvelles approches permettant de diriger le flux de carbone vers la synthèse de ces glycolipides. Le sujet est abordé du point de vue métabolique (le mécanisme d'approvisionnement des acides gras) et du point de vue protéomique (identification de motifs nécessaires à la reconnaissance du substrat par RhIA, une enzyme clé dans la synthèse du précurseur lipidique des rhamnolipides chez les bactéries *Pseudomonas* et *Burkholderia*).

Le premier chapitre présente une brève introduction au sujet des rhamnolipides. Cette revue de littérature inclut différents aspects généraux comme leur découverte, leur diversité structurale, les microorganismes producteurs, leurs fonctions biologiques, leurs propriétés surfactives et les applications potentielles dans les procédés industriels et dans les produits de consommation quotidienne.

Le deuxième chapitre aborde la problématique des mécanismes distincts proposés pour la canalisation des acides gras vers la biosynthèse de rhamnolipides. Dans ce chapitre, deux modèles, qui sont sujets à controverse, sur l'implication de la  $\beta$ -oxydation dans la biosynthèse des rhamnolipides ont été étudiés, soient les modèles proposés par Zhang *et al.* (2012) et Abdel-Mawgoud *et al.* (2014). Les résultats présentés dans ce chapitre apportent des évidences supportant le modèle postulé par Abdel-Mawgoud *et al.* (2014) selon lequel un intermédiaire de la  $\beta$ -oxydation ayant une chaîne aliphatique de dix carbones est dirigé vers la synthèse de rhamnolipides. Cependant, le mécanisme connectant les deux voies métaboliques n'a pu être élucidé. Fait intéressant, un nouveau mécanisme qui peut être éventuellement impliqué dans l'initiation de la synthèse *de novo* des acides gras chez *Pseudomonas aeruginosa* a été découvert. Ce mécanisme conférerait un avantage métabolique qui faciliterait le développement cellulaire dans un milieu contenant des acides gras à chaîne de longueur moyenne.

Le troisième chapitre aborde la caractérisation de l'enzyme RhIA de *P. aeruginosa* par une approche mutationnelle. Cette étude apporte des précisions importantes sur un motif qui est impliqué dans l'interaction protéine-substrat, ce qui permet de moduler la sélectivité de l'enzyme. Ces résultats constituent une base pour des études ultérieures visant l'amélioration de l'efficacité catalytique de l'enzyme et la production de congénères de rhamnolipides aux propriétés distinctes.

## Abstract

Surface-active compounds have a high industrial interest in modern society due to their numerous associated applications. Indeed, considering the many applications of surfactants in different fields (pharmaceutical, food, cosmetics, textile, paints, agricultural, paper, oil recovery and cleaning, among others), it is possible to imagine the great extent of the use of these compounds in a variety of everyday consumer products. Unsurprisingly, with the substantial and versatile use of surfactants, this industry benefits from a multi-billion dollar global market. This market is well-consolidated and is increasing due to the growth of industrialization in third world countries, product diversification, general improvement of living standards and continued population growth. In addition to the global demand for surfactants, production of these compounds also consumes very large quantities of petrochemical raw materials and natural fats. Furthermore, the massive use of surfactants in household products such as detergents and cosmetics, and their subsequent disposal in aquatic systems, are a strong motivation to replace conventional synthetic surfactants with environmentally friendly compounds. This transition notably involves the development of molecules that are more easily biodegradable and less toxic. On the other hand, the reasons justifying the search for replacement surfactants are therefore not only environmental, but also include consumption forecasts that raise economic concerns as competition between the various hydrocarbon exploitation sectors intensifies and the supply of crude oil resources becomes more difficult to access. New research is gradually moving towards the study of molecules of biological origin exhibiting lower toxicity, provided that these molecules have comparable surfactant properties, in order to obtain products more respectful of the environment with comparable or higher quality than conventional surfactants. This is a complex task that is still in its early stages of development.

Microbial biosurfactant industrial production is an attractive technology, encouraging and supporting sustainable development within a globalized society, particularly in the face of global challenges such as climate changes, loss of biodiversity, and food and energy security concerns.

The discovery of rhamnolipids in 1946 launched a line of research that has since become particularly active, notably aimed at characterization of structural diversity, biosynthesis pathways, and physicochemical properties, along with industrial production optimization and application development. However, in spite of their excellent surfactant properties and their

safety for humans and the environment, rhamnolipids still account for only a discrete proportion of the surfactants global market. Higher production costs of rhamnolipids with respect to synthetic surfactants hamper their large-scale exploitation; this is influenced by several factors, especially the costs and availability of raw material and the ability of strains to reach high production yields. Thus, investigation of such factors is important to minimize production costs.

As a biologist, the potential of metabolic and protein engineering to achieve higher rhamnolipid production yields is very attractive. Nevertheless, understanding metabolic mechanisms by which rhamnolipids are synthesized is the key to design effective metabolic strategies. Moreover, the lack of structural characterization of proteins involved in the rhamnolipid biosynthesis pathway, limits the use of protein evolution approaches.

The aim of this research work was to expand our knowledge of the rhamnolipid precursor biosynthesis mechanism, in order to provide new insights for the design of strategies allowing to increase the carbon flux toward the glycolipid pathway. This issue was addressed through two different perspectives; a metabolic study of the fatty acid supply pathway for the biosynthesis of rhamnolipids and a mutational characterization of RhIA, a key enzyme involved in the biosynthesis of the lipid precursor of rhamnolipids.

Chapter one is a short overview of rhamnolipids. This literature review includes various aspects related to rhamnolipid discovery, structural diversity, producing bacteria, biological roles, surfactant properties and potential applications in the industrial field as well as in daily consumer products.

Chapter two investigates the challenges of two different models, wherein fatty acids are used within the rhamnolipid biosynthesis pathway. These models were proposed by Zhang *et al.* (2012) and Abdel-Mawgoud *et al.* (2014) and remain a controversial discussion topic today. The results presented provide more evidence for the implication of a  $\beta$ -oxidation intermediate metabolite having an aliphatic chain length of ten carbons. Nevertheless, the shunt mechanism of this intermediate toward rhamnolipid synthesis still remains unidentified. Interestingly, an unknown mechanism potentially playing a role in *de novo* fatty acid synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* was brought to light, a further evidence of the metabolic versatility of this bacterium which could allow its development in a medium size fatty acid chain environment.

Chapter three concentrates on RhIA characterization from *P. aeruginosa* using a mutational approach. This study provides important details concerning a putative motif involved

in protein-substrate interactions allowing modulation of substrate selectivity. These results provide a basis for further thoughts to improve catalytic efficacy and design specific surfactant glycolipids.

## Remerciements

*Avant toute chose, je tiens à témoigner ma gratitude :*

*aux Professeurs Nicolas Doucet et Éric Déziel qui m'ont accepté dans leur équipe de recherche et pour la confiance qu'ils ont placée en moi pour le développement de ce projet. J'ai bien apprécié leur direction et encadrement, leur disponibilité, leur soutien scientifique, leur patience, leurs apports et leurs conseils professionnels. Qu'ils trouvent ici l'expression de toute ma gratitude pour avoir accepté d'être mes directeurs de recherche et pour avoir encouragé le développement de mon esprit scientifique. Que cet apprentissage soit la base d'une carrière scientifique qui nous permettra de mieux comprendre le monde du vivant.*

*aux Professeurs Christian Salesse, Marc Beauregard et Richard Villemur, pour avoir gentiment accepté d'évaluer ma thèse.*

*ma reconnaissance s'adresse aux assistants de recherche Marie-Christine Groleau, Myriam Létourneau et Sylvain Milot, ainsi qu'aux collègues Servane Le Guillouzer, Anissa Brahami, Thays Oliveira, Arvin Nickzad et Yossef López pour leur support technique et scientifique qu'ils m'ont apporté.*

*je remercie mes collègues des laboratoires Doucet et Déziel pour leurs apports scientifiques.*

*à ma famille, à qui je dois des encouragements les plus précieux, merci d'avoir toujours eu confiance en moi, et de m'avoir accompagné aussi affectueusement dans ce défi. Je vous dédie mon projet de doctorat.*

*merci à toutes les personnes qui ont participé de près comme de loin au développement de ce projet de recherche.*

*Encore une fois, merci.*

## Table des matières

Résumé .....	III
Abstract.....	V
Remerciements .....	VI
Table des matières .....	VII
Liste des figures .....	X
Liste des tableaux .....	XIII
Liste des abréviations.....	XV
1 Chapitre 1.....	22
1.1 Introduction .....	23
1.2 Les biosurfactants .....	25
1.3 Les rhamnolipides .....	27
1.3.1 Propriétés tensioactives des rhamnolipides.....	30
1.3.2 Biosynthèse de rhamnolipides chez <i>P. aeruginosa</i> .....	32
1.3.3 Synthèse des acides 3-(3-hydroxyalcanoyloxy)alcanoïques (HAA) .....	33
1.3.4 Rôle biologique des rhamnolipides.....	42
1.3.5 Applications biotechnologiques potentielles des rhamnolipides.....	46
1.3.6 Enjeux de la production de rhamnolipides .....	47
1.4 Objectifs du projet de recherche.....	51
2 Chapitre 2 .....	53
2.1 Introduction .....	54
2.1.1 Métabolisme des glucides chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	54
2.1.2 La $\beta$ -oxydation favorise la production des rhamnolipides .....	58
2.1.3 La $\beta$ -oxydation fournit des précurseurs lipidiques pour la biosynthèse des HAA ..	58
2.1.4 Implication des ACP de <i>P. aeruginosa</i> dans la production des rhamnolipides .....	66
2.2 Problématique.....	67
2.3 Hypothèse.....	68
2.4 Objectifs du chapitre.....	69
2.5 Contributions à ce travail de recherche .....	69
2.6 Méthodologie et approche globale.....	69
2.7 Matériel et méthodes.....	70
2.7.1 Souches et plasmides .....	70

2.7.2	Conditions de culture.....	70
2.7.3	Production de rhamnolipides en milieu isotopique et analyse spectrométrique ....	71
2.7.4	Construction des plasmides pCD10 à pCD15 .....	71
2.7.5	Expression et purification des protéines recombinantes .....	73
2.7.6	Synthèse des holo-ACP .....	74
2.7.7	Acylation de l'ACP <i>in vitro</i> .....	76
2.7.8	Analyses effectuées par MALDI-TOF MS.....	77
2.7.9	Construction des mutations délétères chez <i>P. aeruginosa</i> .....	77
2.7.10	Analyse des HAA et des rhamnolipides par LC-MS.....	79
2.7.11	Analyse des HAQ par LC-MS/MS.....	79
2.7.12	Synthèse du <i>R</i> -3-hydroxydécanoyl-CoA.....	80
2.7.13	Essai d'acylation de l'AcpP1 avec le <i>R</i> -hydroxydécanoyl-CoA à partir d'un extrait cellulaire clarifié d'un mutant <i>rhIA</i> <sup>-</sup> de <i>P. aeruginosa</i> .....	84
2.7.14	Essai de production des HAA et des rhamnolipides dans un extrait cellulaire d'un mutant <i>rhIA</i> <sup>-</sup> de <i>P. aeruginosa</i> complémenté avec une construction <i>-rhIA/rhIB</i> .....	84
2.8	Résultats.....	87
2.8.1	Caractérisation préliminaire de la voie de la $\beta$ -cétoacyl-synthase III codée par <i>fabH3</i> .....	87
2.8.2	Étude préliminaire pour l'identification de mécanismes métaboliques alternatifs pour l'approvisionnement de précurseurs lipidiques pour la synthèse des HAA chez le triple mutant PA14 $\Delta$ <i>fabH3</i> $\Delta$ <i>rhIYZ</i> à l'aide d'un marquage isotopique .....	89
2.8.3	FabH3 affecte la disponibilité métabolique d'octanoyl-CoA .....	99
2.8.4	Recherche d'enzymes de type acyl-CoA:ACP transacylases chez PA14 .....	104
2.9	Discussion et perspectives.....	113
2.9.1	Rôle de l'activité $\beta$ -cétoacyl-ACP synthase codée par <i>PA14_fabH3::TnPhoA</i> dans la production des rhamnolipides.....	113
2.9.2	Les acides gras C <sub>8</sub> et le C <sub>12</sub> affectent différemment la production de rhamnolipides chez PA14.....	115
2.9.3	FadD6 présente une activité acyl-CoA:ACP transacylase .....	117
2.10	Matériel supplémentaire .....	121
3	Chapitre 3 .....	129
3.1	Introduction .....	130
3.1.1	Mécanisme catalytique de RhIA .....	130
3.1.2	Conformation structurale de la RhIA.....	132
3.2	Problématique.....	133

3.3	Hypothèse.....	134
3.4	Objectifs du chapitre.....	134
3.5	Méthodologie et approche globale.....	135
3.6	Article soumis.....	137
3.7	Résumé.....	139
3.8	Abstract.....	140
3.9	Introduction .....	141
3.10	Results .....	144
3.10.1	Substrate selectivity of RhIA from <i>P. aeruginosa</i> and <i>B. glumae</i> .....	144
3.10.2	Substrate selectivity in RhIA .....	146
3.10.3	Exploring potential active-site residues that increase the catalytic efficiency of RhIA <sub>Pa</sub> .....	153
3.10.4	Targeting residues 132-210 as a promising strategy to increase or modulate the catalytic activity of RhIA.....	153
3.10.5	Combinatorial amino acid substitutions .....	156
3.11	Discussion.....	157
3.12	Materials and methods .....	161
3.12.1	Homology modeling of RhIA <sub>Pa</sub> .....	161
3.12.2	Normal Mode Analysis .....	161
3.12.3	Selection of target residue positions and structural exploration of the RhIA mutants .....	162
3.12.4	Bacterial strains, plasmids, and growth media.....	162
3.12.5	Rhamnolipid production in <i>P. aeruginosa</i> .....	163
3.12.6	Rhamnolipid production in <i>B. glumae</i> .....	163
3.12.7	Site-directed mutagenesis of <i>rhIA</i> <sub>Pa</sub> .....	163
3.12.8	Quantification of free intracellular 3-hydroxyfatty acids in <i>P. aeruginosa</i> .....	164
3.12.9	Construction of the <i>rhIA</i> <sub>BG</sub> / <i>rhIB</i> <sub>Pa</sub> hybrid operon.....	165
3.12.10	Construction of chimeric <i>rhIA</i> genes.....	165
3.12.11	Randomized combinations of selected <i>rhIA</i> <sub>Pa</sub> amino acid substitutions .....	166
3.12.12	RL quantification based on the orcinol assay .....	166
3.12.13	Detection and quantification of HAAs and RLs by LC/MS.....	167
3.13	Acknowledgments .....	168
3.14	Conflict of interest .....	168
3.15	Supplementary material .....	169

4	Conclusion générale du projet.....	184
	Annexes.....	189
4.1	Annexe 1. Criblage de conditions de cristallogénèse de RhIA de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	190
4.1.1	Production de RhIA recombinante.....	190
4.1.2	Optimisation de la production de RhIA chez <i>E. coli</i> .....	192
4.1.3	Purification de RhIA.....	193
4.1.4	Criblage des conditions de cristallogénèse de RhIA.....	196
4.1.5	Perspectives pour les études structurales de RhIA.....	197
5	Références.....	200

## Liste des figures

### Chapitre 1

Figure 1.1. Représentation schématique d'un système binaire de milieux denses non-miscibles stabilisé par l'action d'un surfactant.....	23
Figure 1.2. Structure moléculaire du premier rhamnolipide identifié.....	27
Figure 1.3. Profil de fragmentation des ions isomères $[(C_8-C_{10})-H]^-$ et $[(C_{10}-C_8)-H]^-$ par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).....	30
Figure 1.4. Modèle de synthèse enzymatique des rhamnolipides impliquant trois réactions séquentielles. ....	32
Figure 1.5. Synthèse <i>de novo</i> des acides gras servent d'intermédiaires <i>R</i> -3-hydroxyacyl-ACP pour la synthèse des HAA selon le modèle proposé par Zhu et Rock (2008). ....	34
Figure 1.6. Voie de biosynthèse du L-rhamnose à partir du glucose.....	35
Figure 1.7. Schéma représentant le système de <i>quorum sensing lux</i> de <i>Vibrio fischeri</i> . ....	37
Figure 1.8. Premier modèle proposé pour la régulation de la production de rhamnolipides chez <i>P. aeruginosa</i> . ....	38
Figure 1.9. Schéma simplifié de l'activation/répression en cascade des systèmes de quorum sensing <i>las</i> , <i>rhl</i> et <i>pqs</i> et leur répercussion sur l'expression des gènes impliqués dans la production de rhamnolipides.....	39
Figure 1.10. Modèle du système à deux composantes NtrB/NtrC permettant l'activation en cascade de la transcription des gènes cibles incluant le petit ARN NrsZ. ....	41
Figure 1.11. Modèle du complexe <i>rhIA</i> -NrsZ permettant l'activation de la traduction de l'ARNm de <i>rhIA</i> .....	41
Figure 1.12. Modèle du système de transduction de signal GacA/RsmA chez <i>P. aeruginosa</i> PAO1. ....	42

### Chapitre 2

Figure 2.1. Métabolisme des sucres chez les bactéries du genre <i>Pseudomonas</i> par la voie d'Entner-Doudoroff.....	55
Figure 2.2. Mécanisme proposé pour la dégradation des acides gras <i>via</i> la $\beta$ -oxydation chez <i>P. aeruginosa</i> . ....	57
Figure 2.3. Modèle de biosynthèse de rhamnolipides proposé par Zhang <i>et al.</i> (2012). ....	59
Figure 2.4. Étapes de la synthèse enzymatique <i>in vitro</i> de <i>R</i> -3-hydroxydécanoyle-ACP comme précurseur lipidique des HAA à partir de l'octanoyle-CoA et du malonyl-ACP. ....	60
Figure 2.5. Modèle expliquant la distribution isotopique observée lorsque l'acide dodécanoïque deutéré ( $C_{12}-d_{23}$ ) est utilisé comme seule source de carbone. ....	62
Figure 2.6. Schéma représentant les deux marquages plus abondants observés des dilipides $C_{10}-C_{10}$ lorsqu'une culture de <i>P. aeruginosa</i> est effectuée en utilisant l'acide dodécanoïque- $12,12,12-d_3$ et le glucose- $^{13}C_6$ comme seules sources de carbone. ....	63

Figure 2.7. RhIY et RhIZ sont impliquées dans la biosynthèse de rhamnolipides en contrôlant l'approvisionnement des précurseurs lipidiques.....	64
Figure 2.8. Modèle d'approvisionnement métabolique des précurseurs lipidiques pour la synthèse des HAA proposé par Abdel-Mawgoud <i>et al.</i> (2014b).....	65
Figure 2.9. Schéma représentant la biosynthèse du C <sub>4</sub> -HSL par RhII.....	67
Figure 2.10. Modèle proposé pour la synthèse du précurseur R-3-hydroxyacyl-ACP à partir du <i>trans</i> -2-énoyl-CoA, un intermédiaire de la $\beta$ -oxydation. ....	68
Figure 2.11. Chromatogramme de la purification de RhIA. ....	75
Figure 2.12. Schéma de la synthèse de l'holo-ACP.....	75
Figure 2.13. Chromatogramme de l'acide R-3-hydroxydécanoïque obtenu à partir de l'hydrolyse de rhamnolipides.....	81
Figure 2.14. Spectre de masse de l'acide R-3-hydroxydécanoïque avec le fragmentogramme de l'ion mère 332.22 u.a.....	82
Figure 2.15. Spectre de masse du R-3-hydroxydécanoyl-CoA synthétisé à partir de l'acide R-3-hydroxydécanoïque.....	83
Figure 2.16. Chromatogramme montrant un pic correspondant à la production de RR-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub> ( <i>m/z</i> 649.5) chez un mutant <i>rhIA</i> <sup>-</sup> complémenté avec le plasmide pAS23 en milieu minimal supplémenté avec de l'acide octadécanoïque comme seule source de carbone.....	85
Figure 2.17. Rendement de production de rhamnolipides chez les mutants PA14_ <i>fabH3</i> ::Tn <i>phoA</i> et PA14_ <i>fabH3</i> ::Tn <i>phoA</i> $\Delta$ <i>rhIYZ</i> en comparaison avec PA14.....	87
Figure 2.18. Spectres de masse de deux surnageants de PA14 montrant l'abondance relative des ions pseudomoléculaires des rhamnolipides détectés.....	90
Figure 2.19. Spectres de masse obtenus à partir des surnageants de PA14 et du mutant PA14_ <i>fabH3</i> ::Tn <i>PhoA</i> $\Delta$ <i>rhIYZ</i> dans des cultures effectuées en milieu MSM-acide dodécanoïque-12,12,12- <i>d</i> <sub>3</sub> (20 mM).....	92
Figure 2.20. Spectre de masse obtenu de la fragmentation de l'ion <i>m/z</i> de 509.....	93
Figure 2.21. Spectre de masse obtenu de l'analyse du surnageant du PA14 en utilisant le MSM-glucose <sup>13</sup> C <sub>6</sub> et acide dodécanoïque-12,12,12- <i>d</i> <sub>3</sub> comme sources de carbone.....	94
Figure 2.22. Spectre de masse observé lors de la fragmentation du précurseur <i>m/z</i> 515 par MS/MS.....	95
Figure 2.23. Spectre de masse obtenu de l'analyse du surnageant du mutant PA14_ <i>fabH3</i> ::Tn <i>PhoA</i> $\Delta$ <i>rhIYZ</i> en utilisant le milieu MSM-glucose <sup>13</sup> C <sub>6</sub> et acide dodécanoïque-12,12,12- <i>d</i> <sub>3</sub> comme sources de carbone.....	97
Figure 2.24. Spectre de masses produit de la fragmentation du précurseur <i>m/z</i> 527 par MS/MS.....	97
Figure 2. 25. Production des HAQ chez le mutant PA14_ <i>fabH3</i> ::Tn <i>PhoA</i> en comparaison avec PA14 en milieu riche.....	100
Figure 2.26. Cinétique de production des rhamnolipides chez le mutant <i>pqsC</i> <sup>-</sup> en comparaison avec PA14.....	101
Figure 2.27. Production de rhamnolipides chez PA14 en présence d'acide octanoïque ou dodécanoïque comme seule source de carbone.....	103

Figure 2.28. Production de rhamnolipides chez les mutants PA14_13110::TnMrT7 ( <i>fadD6</i> ), PA14_09660::TnMrT7, PA14_35940::TnMrT7 et PA14_31470::TnMrT7 en comparaison avec PA14. ....	106
Figure 2.29. Spectre de masse obtenu lors de l'acylation de l'AcpP1 de <i>P. aeruginosa</i> avec un groupement décanoyle et FadD6. ....	108
Figure 2.30. Résultats de la réaction d'acylation de l'AcpP1 dans un extrait cellulaire clarifié. ....	110
Figure 2.31. Chromatogramme de la phase non polaire des lysats cellulaires supplémentés avec l'holo-AcpP1 et le <i>R</i> -3-OH-C <sub>10</sub> -CoA. ....	112
Figure 2.32. Schéma du modèle proposé pour la synthèse des rhamnolipides chez le mutant <i>fabH3_rhlYZ</i> en supplémentation avec le glucose- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> et l'acide dodécanoïque-12,12,12- <i>d</i> <sub>3</sub> (C <sub>12</sub> - <i>d</i> <sub>3</sub> ). ....	116
Figure 2.33. Schéma de l'implication de FadD6 dans l'approvisionnement de l'intermédiaire C <sub>10</sub> vers la voie FAS II <i>via</i> son activité acyl-CoA:ACP transacylase (en rouge). ....	120

### Figures supplémentaires

Figure supplémentaire 2.1. Biosynthèse de molécules de signalisation du système de <i>quorum sensing pqs</i> avec l'incorporation de l'octanoyl-CoA. ....	125
Figure supplémentaire 2.2. Alignement de séquences peptidiques de l'enzyme AasS et FadD6. ....	126
Figure supplémentaire 2.3. Schéma de la réaction d'acylation d'une molécule d'ACP avec FadD6. ....	127
Figure supplémentaire 2.4. Schéma de l'approche d'acylation de l'ACP dans un extrait cellulaire. ....	127
Figure supplémentaire 2.5. Schéma de l'approche de synthèse des HAA et des rhamnolipides dans un extrait cellulaire. ....	128

### Chapitre 3

Figure 3.1. Représentation schématique de la formation d'un complexe acyl-enzyme. ....	130
Figure 3.2. Représentation schématique de la synthèse enzymatique d'un dilipide. ....	131
Figure 3.3. Schéma de la complémentation croisée des mutants <i>rhlA</i> de <i>P. aeruginosa</i> et <i>B. glumae</i> . ....	135
Figure 3.4. Diagramme de flux de l'approche d'évolution semi-rationnelle globale utilisée pour l'exploration de l'enzyme RhlA au site actif. ....	136
Figure 3.5. 3-hydroxyfatty acids consumed by RhlA <sub>Pa</sub> and RhlA <sub>Bq</sub> upon cross complementation assays with strains PA14_ <i>rhlA</i> :: <i>TnMrT7</i> and BGR1Δ <i>rhlA</i> (WT operon <i>rhlA</i> <sub>Pa</sub> / <i>rhlB</i> <sub>Pa</sub> and hybrid operon <i>rhlA</i> <sub>Bq</sub> / <i>rhlB</i> <sub>Pa</sub> ). ....	145
Figure 3.6. RhlA <sub>Pa</sub> homology modeling procedure and validation. ....	148
Figure 3.7. Single-site mutagenesis of putative active-site residues in RhlA <sub>Pa</sub> . ....	149
Figure 3.8. Selectivity performance of the RhlA chimeric proteins. ....	152
Figure 3.9. Catalytic performance of RhlA <sub>Pa</sub> mutants after an extensive cap-domain mutagenesis exploration. ....	155

Figure 3.10. Kinetics of rhamnolipids production of the upgraded variants of *rhIA* under the metabolic pressure of PA14\_*rhIA*::TnMrT7. .... 156

### Supplementary figures

Figure S1. Proposed hydroxyacyl esterification mechanism catalyzed by RhIA. .... 175

Figure S2. Second validation round of the best ranking homology models of RhIA<sub>Pa</sub>. .... 176

Figure S3. Gene expression evaluation of RhIA variants in *P. aeruginosa* PA14\_*rhIA*::MrT7. .... 177

Figure S4. Multiple sequence alignment of RhIA homologs. .... 178

Figure S5. Strategy for construction of *rhIA*<sub>Pa-H-1</sub>, *rhIA*<sub>Pa-H-2</sub>, and *rhIA*<sub>Pa-H-3</sub> chimeric genes. .... 179

Figure S6. Strategy for construction of the *rhIA*<sub>Bg</sub>/*rhIB*<sub>Pa</sub> hybrid operon. .... 180

Figure S7. SCOP active-site access channel extraction from 8 distinct members of the canonical  $\alpha/\beta$  hydrolase superfamily. .... 181

Figure S8. Strategy for random combination of selected *rhIA*<sub>Pa</sub> amino acid substitutions. .... 182

Figure S9. Conformational exchange of the putative cap-domain in RhIA. .... 183

### Annexes

Figure A1.1. Détails des constructions pCD16 et pCD17 au niveau du site de clonage. .... 191

Figure A1.2. Détails de la construction pCD18. .... 191

Figure A1.3. Expression de *rhIA* sous différentes conditions chez *E. coli*. .... 193

Figure A1.4. Profil des protéines obtenues de la purification de RhIA par chromatographie d'affinité. .... 194

Figure A1.5. Profil des protéines obtenues par tamisage moléculaire de RhIA. .... 195

Figure A1.6. Méthode de cristallisation de goutte assise. .... 196

## Liste de tableaux

### Chapitre 1

Tableau 1.1. Classification générale des surfactants selon la nature chimique du groupement hydrophile.....	24
Tableau 1.2. Principaux glycolipides d'origine microbienne rapportés dans la littérature. ....	26
Tableau 1.3. Quelques espèces bactériennes chez lesquelles des congénères de rhamnolipides ont été identifiés à l'aide de méthodes analytiques.....	29
Tableau 1.4. Réduction de la tension interfaciale hydrocarbure/eau à l'aide d'un extrait de rhamnolipides en comparaison avec un surfactant anionique synthétique.....	31
Tableau 1.5. Applications potentielles des rhamnolipides.....	47
Tableau 1.6. Compagnies qui commercialisent des rhamnolipides.....	48

### Chapitre 2

Tableau 2.1. Concentrations d'antibiotiques utilisées dans les cultures bactériennes en mg/L. .	71
Tableau 2.2. Milieux de culture utilisés pour les différentes expériences effectuées.....	72
Tableau 23. Phosphopantéthéinylation des ACP de <i>P. aeruginosa</i> .....	76
Tableau 24. Acylation des ACP de <i>P. aeruginosa</i> . ....	77
Tableau 2.5. Ions pseudomoléculaires recherchés lors de l'analyse des HAA et des rhamnolipides par LC-MS.....	79
Tableau 2.6. Ions pseudomoléculaires recherchés lors de l'analyse des HAQ par LC-MS/MS. .	80
Tableau 2.7. Conditions utilisées pour les tests de production des HAA et des rhamnolipides dans un extrait cellulaire.....	86
Tableau 2.8. Profil de congénères des HAA et des rhamnolipides produits par un mutant PA14_ <i>fabH3</i> ::Tn <i>PhoA</i> . ....	89
Tableau 2.9. Assignment des ions de mono-rhamnolipides produits chez PA14 et PA14_ <i>fabH3</i> ::Tn <i>PhoA</i> $\Delta$ <i>rhlYZ</i> en utilisant l'acide dodécanoïque-12,12,12- <i>d</i> <sub>3</sub> comme seule source de carbone. ....	93
Tableau 2.10. Profil de fragmentation obtenu par MS/MS des ions majoritaires observés dans les cultures de PA14 effectuées avec les sources de carbone C <sub>12</sub> , C <sub>12</sub> - <i>d</i> <sub>3</sub> et glucose- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> avec C <sub>12</sub> - <i>d</i> <sub>3</sub> . ....	96
Tableau 2.11. Profil de fragmentation obtenu par MS/MS des ions majoritaires observés dans les cultures de PA14 effectuées avec les sources de carbone C <sub>12</sub> - <i>d</i> <sub>3</sub> et glucose- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> avec C <sub>12</sub> - <i>d</i> <sub>3</sub> . ....	98
Tableau 2.12. Profil de congénères des HAA et des rhamnolipides produits par un mutant <i>pqsC</i> . ....	101
Tableau 2.13. Pourcentage d'acide gras incorporé dans les congénères des HAA et des rhamnolipides en utilisant l'acide gras C <sub>8</sub> et C <sub>12</sub> comme seules sources de carbone.....	104
Tableau 2.14. Enzymes acyl-CoA synthétases identifiées chez PA14 par homologie de séquence avec l'enzyme AasS de <i>Vibrio harveyi</i> B392. ....	105

Tableau 2.15. Valeurs de <i>m/z</i> obtenues lors de l'acylation de l'AcpP1 par l'enzyme purifiée FadD6. ....	107
---	-----

### Tableaux supplémentaires

Tableau supplémentaire 2.1. Souches utilisées dans cette étude.....	121
Tableau supplémentaire 2.2. Plasmides utilisés dans cette étude. ....	122
Tableau supplémentaire 2.3. Amorces utilisées dans cette étude. ....	123
Tableau supplémentaire 2.4. Alignement de type PSI-BLAST de la séquence peptidique de FadD6. ....	124

### Chapitre 3

Table 3.1. GC/MS analysis of free 3-hydroxy fatty acids from a PA14_ <i>rhIA</i> ::TnMrT7 strain in early stationary growth phase. ....	144
---	-----

### Supplementary tables

Table S1. Scoring functions obtained for the best ranking RhIA <sub>Pa</sub> models calculated by homology modeling.....	169
Table S2. Catalytic performance of RhIA of <i>P. aeruginosa</i> upon the substitution of non-conserved residues on the cap-domain (relative to RhIA of <i>B. glumae</i> ). ....	170
Table S3. Rhamnolipid congener pattern observed upon expression of RhIA <sub>Pa</sub> -A182P/RhIB <sub>Pa</sub> variant with respect to RhIA <sub>Pa</sub> -WT/RhIB <sub>Pa</sub> in a BGR1Δ <i>rhIA</i> mutant. ....	170
Table S4. Catalytic performance of RhIA <sub>Pa</sub> after mutations explored in this study.....	171
Table S5. Bacterial strains used in this study. ....	172
Table S6. Plasmids used in this study. ....	173
Table S7. Primers used in this study. ....	174

### Annexes

Tableau A1.1. Plasmides utilisés pour l'étude des conditions de production de RhIA sous forme recombinante. ....	192
Tableau A1.2. Conditions d'expression évaluées pour <i>rhIA</i> chez <i>E. coli</i> dans un milieu LB. ....	192
Tableau A1.3. Optimisation des conditions de solubilisation de RhIA. ....	195

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

$^{13}\text{C}$	Carbone-13
3OH-C <sub>10</sub>	Acide <i>R</i> -3-hydroxydécanoïque
3OH-C <sub>10</sub> -CoA	<i>R</i> -3-hydroxydécanoyl-Coenzyme A
ACP	Protéine porteuse d'acyle
AHL	Acyl homosérine lactone
AMP	Adénosine monophosphate
ATP	Adénosine triphosphate
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate
CMC	Concentration micellaire critique
C <sub>4</sub> -HSL	Butanoyl homosérine lactone
C <sub>6</sub> -CoA	Héxanoyl-Coenzyme A
C <sub>8</sub> -CoA	Octanoyl-Coenzyme A
C <sub>10</sub> -CoA	Décanoyl-Coenzyme A
3-oxo-C <sub>12</sub> -HSL	<i>N</i> -(3-oxododécanyloyl)-L-homosérine lactone
CL/SM ou LC/MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
CoA	Coenzyme A
C-terminal	Carboxy-terminal
- <i>d</i> ou D	Deutérium
Da	Dalton
DTT	Dithiothréitol
dTDP	Deoxythymidine diphosphate
DO <sub>600</sub> ou OD <sub>600</sub>	Densité optique à une longueur d'onde de 600 nm
EDTA	Acide éthylène diamine tétra acétique
EtCl	Ethyl chloroformate
FAS II	Voie métabolique de synthèse <i>de novo</i> des acides gras
FPLC	Chromatographie liquide rapide de protéines
FS	Fraction soluble
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée avec la spectrométrie de masse
HAA	Acide 3-(3-hydroxyalcanoyloxy)alcanoïque
HAQ	4-hydroxy-2-alkylquinoline
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HHQ ou HHQ <sub>C7</sub>	4-hydroxy-2-heptylquinoline
HNQ	4-hydroxy-2-nonylquinoline
HPLC-CAD	Chromatographie en phase liquide à haute performance couplée avec un détecteur d'aérosols chargés
HQNO ou HQNO <sub>C7</sub>	4-hydroxy-2-heptylquinoline- <i>N</i> -oxyde
HQNO <sub>C9</sub>	4-hydroxy-2-nonylquinoline- <i>N</i> -oxyde
HSL	Homosérine lactone
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
IRTF	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolts
LB	Bouillon LB ( <i>Lysogeny Broth</i> )
LC-QTOF-MS	Chromatographie en phase liquide couplé avec la spectrométrie de masse en tandem Quadripôle-Temps de vol
LPS	Lipopolysaccharides
<i>m/z</i>	Rapport masse sur charge
MALDI-TOF MS	Spectrométrie de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol.
MASCOT	Logiciel conçu pour l'interprétation des données de spectrométrie de masse en identités de protéines
mN/m	Millinewton/mètre
MNR	Résonance magnétique nucléaire
MRM	Spectrométrie de masse en tandem de type Multiple Reaction Monitoring
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
np	non-polaire
<i>N</i> -terminal	Amino-terminal
O/N	Toute la nuit (Overnight)
pb	Paires de bases
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PMN	Lymphocytes polymorphonucléaires
P <sub>lac</sub>	Promoteur lactose
PP <sub>i</sub>	Pyrophosphate
ppm	Parties par million
PQS	<i>Pseudomonas</i> Quinolone Signal. (3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline)

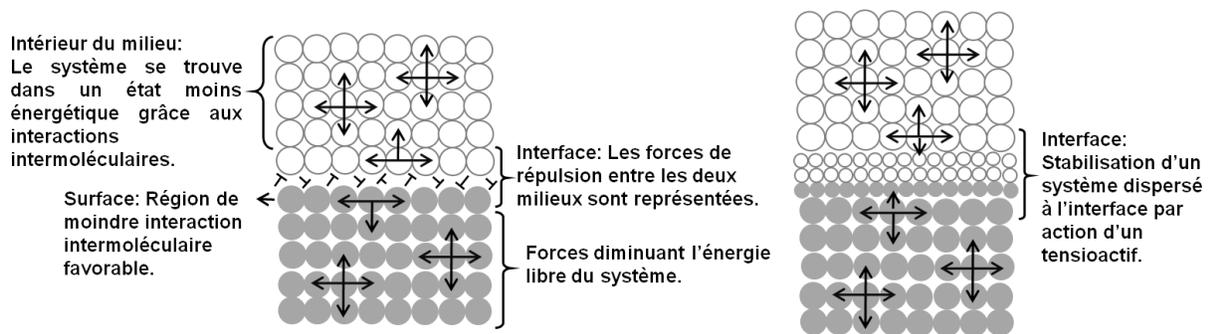
PQS <sub>C9</sub>	3,4-dihydroxy-2-nonylquinoline
P <sub>T7</sub>	Promoteur T <sub>7</sub>
QS	<i>Quorum sensing</i>
RL(s)	Rhamnolipide (s)
rpm	Rotations par minute
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate sodique
TEA	Triéthylamine
THF	Tétrahydrofurane anhydre
TFA	Acide trifluoroacétique
TLC	Chromatographie en couche mince
TSB	Bouillon tryptone soja
CLUP ou UPLC	Chromatographie en phase liquide ultra performante
V	Volts

# Chapitre 1

## Généralités sur les rhamnolipides

## 1.1 Introduction

Les surfactants (de l'anglais : *surface-active agent*), surfactifs, ou agents surfactants, sont des molécules amphiphiles contenant dans leur structure un groupement hydrophobe et un groupement hydrophile. Cette caractéristique structurale leur permet d'interagir simultanément, avec des milieux non-miscibles, par exemple, typiquement en s'accumulant à l'interface entre des molécules polaires et non-polaires. Les interactions intermoléculaires d'un surfactant à l'interface résultent en une diminution de l'énergie libre à la surface des milieux, favorisant la stabilisation du système et permettant la formation de solutions colloïdales (Fig. 1.1) (Pletnev, 2001).



**Figure 1.1. Représentation schématique d'un système binaire de milieux denses non-miscibles stabilisé par l'action d'un surfactant.**

À gauche le système dispersé, à droite le système stabilisé par un surfactant (Pletnev, 2001).

Les surfactants, dont la plupart sont d'origine pétrochimique —principalement dérivés du kérosène (source de paraffines, oléfines, alkyl benzènes, etc) et de l'éthylène— sont présents dans une ample variété de produits de consommation quotidienne (Myers, 2005). En effet, les surfactants possèdent une grande diversité structurale, une caractéristique qui est à la base de leurs différentes propriétés physico-chimiques, permettant ainsi plusieurs applications, notamment en tant qu'agents détergents, moussants, émulsifiants, dispersants et même antiseptiques (Falbe, 2012, Myers, 2005). Parmi ces différences structurales, on peut signaler, par exemple, une partie non-polaire, composée d'une chaîne hydrocarbonée de longueur variable (linéaire ou ramifiée), qui peut avoir différents degrés d'insaturation, et le groupement polaire ou hydrophile qui définit les surfactants comme non-ioniques, anioniques, cationiques ou amphotères (Tableau 1.1) (Myers, 2005). Mis à part l'aspect appliqué, l'analyse du marché global des surfactants effectuée par la compagnie de recherche de marchés Ceresana ([www.ceresana.com](http://www.ceresana.com)), donne une indication de l'ampleur du marché des produits chimiques de

type surfactants. En effet, une analyse publiée en 2017 par Ceresana ([www.ceresana.com](http://www.ceresana.com)) évoque un chiffre d'affaires mondial de près de 31 milliards USD pour l'année 2016, avec une prévision de croissance moyenne dans le marché de 3,1 % annuellement, des chiffres qui démontrent un marché constant et solide. D'après le même rapport, une augmentation de la consommation mondiale de surfactants d'environ 2,1 % est prévue annuellement jusqu'en 2024.

**Tableau 1.1. Classification générale des surfactants selon la nature chimique du groupement hydrophile.**

Groupement hydrophile	Description
Anionique	Le groupement hydrophile est chargé négativement, par exemple : carboxylate ( $\text{RCOO}^- \text{M}^+$ ), sulfate ( $\text{ROSO}_3^- \text{M}^+$ ), sulfonate ( $\text{RSO}_3^- \text{M}^+$ ) et phosphate ( $\text{ROPO}_3^- \text{M}^+$ ). $\text{M}^+$ est un hydrogène ( $\text{H}^+$ ), un métal alcalin ( $\text{Li}^+$ , $\text{Na}^+$ , etc) ou une base organique.
Cationique	Le groupement hydrophile est chargé positivement, par exemple : les ammoniums quaternaires ( $\text{R}_4\text{N}^+ \text{X}^-$ ). $\text{X}^-$ est un halogène ( $\text{Br}^-$ , $\text{Cl}^-$ , etc).
Non-anionique	Le groupement hydrophile n'est pas chargé. Sa solubilité dans l'eau dérive d'une haute polarité conférée par un polyoxyéthylène (POE ou $\text{R-OCH}_2\text{CH}_2\text{O-}$ ), ou un polyol incluant des sucres (R-polyol).
Amphotérique	La molécule peut contenir une charge positive et une charge négative, par exemple : les sulfobétaïnes ( $\text{RN}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ ).

Tableau inspiré de Myers (2005).

Par ailleurs, la consommation croissante de surfactants d'origine pétrochimique et oléochimique soulève des préoccupations environnementales puisqu'ils ne sont pas tous complètement biodégradables et leur bioaccumulation dans les milieux aquatiques peut avoir des effets nocifs et toxiques pour les écosystèmes (Lechuga *et al.*, 2016). En effet, les risques environnementaux des surfactants sont déterminés en fonction de la  $\text{CE}_{50}$  (concentration efficace médiane) et de la  $\text{CL}_{50}$  (concentration létale médiane) (UE Directive No. 67/548/CEE, 1967), des valeurs qui dépendent de la concentration finale atteinte dans le milieu aquatique. La bioaccumulation des surfactants dépend, en effet, des conditions de biodégradation et de la complexité de leur structure chimique. Ainsi par exemple, la biodégradation de surfactants comme les alkylbenzènes sulfonates linéaires (*linear alkylbenzene sulfonates*, LABS), les alcools éthoxylés (*alcohol ethoxylates*, AE), les alcools gras éthoxylés (*alcohol ether ethoxylates*, AEE), les alkyl-phénols éthoxylés (*alkylphenol ethoxylates*, APE) et le chlorure de diméthylammonium (*dimethylammonium chloride*, DAC), en condition anaérobie est moins efficace qu'en condition aérobie (Ying, 2006). Par ailleurs, la dégradation de certains

surfactants produit des métabolites persistants ayant un effet toxique plus important que le composé d'origine, comme c'est le cas pour le nonylphénol polyéthoxylé NPEO-R<sub>9</sub>E<sub>9.5</sub> (Jurado *et al.*, 2009). D'autre part, il y a des préoccupations vis-à-vis de l'impact écologique des surfactants lorsque les boues d'épuration traitées sont transférées dans le sol, comme par exemple, les effets sur l'adsorption, l'humidification et la sédimentation (Myers, 2005).

En général, la demande accrue des surfactants et les préoccupations environnementales qui en découlent, suscitent la recherche et le développement de produits « verts », des produits doux, non toxiques et biodégradables obtenus à partir de matières premières renouvelables. Face à cette problématique, les biosurfactants constituent une alternative pour satisfaire la demande croissante de produits plus doux pour l'utilisateur final et moins potentiellement dommageables pour l'environnement.

## 1.2 Les biosurfactants

Les biosurfactants sont des molécules d'origine biologique dérivées de plantes ou produits par une variété de microorganismes (Mukherjee & Das, 2010, Tmáková *et al.*, 2016). En comparaison avec leurs homologues synthétiques, les biosurfactants exhibent une moindre toxicité et une biodégradabilité accrue, tout en préservant une stabilité sous des conditions extrêmes de température, pH et salinité (Mukherjee *et al.*, 2006). D'après leur composition chimique, les biosurfactants sont classés comme des glycolipides, des lipopeptides, des acides gras, des phospholipides et des surfactants polymériques. Le groupement hydrophobe des biosurfactants correspond usuellement à un acide gras ou un dérivé, et la partie hydrophile peut être un peptide, un sucre, un groupement carboxylique ou un groupement ester (Maier, 2003). Considérant l'aspect commercial, d'après un rapport récemment publié par Research and Markets ([www.researchandmarkets.com](http://www.researchandmarkets.com)), le marché mondial des biosurfactants a été estimé à 4,20 milliards USD pour l'année 2017, ce qui représente seulement près de 13 % du marché total des surfactants. En effet, le coût de production des biosurfactants étant plus élevé que leurs homologues synthétiques, il est difficile pour ces composés de se tailler une place concurrentielle sur le marché. Toutefois, puisque l'utilisation de substrats peu dispendieux constitue un facteur important pour favoriser la compétitivité des biosurfactants, beaucoup d'études se sont portées sur l'utilisation de produits résiduels agricoles et industriels comme sources de carbone pour la fermentation microbienne, tels des sous-produits riches en sucres (Rane *et al.*, 2017), en glycérol (Silva *et al.*, 2010) ou en huiles végétales, parmi d'autres

possibilités (Makkar *et al.*, 2011). Évidemment, la revalorisation de sous-produits industriels pour la production de biosurfactants serait attrayante à condition qu'un rendement favorable soit atteint à moindre coût.

Selon la littérature, parmi la grande variété des composés biologiques ayant des propriétés surfactantes, les glycolipides constituent les molécules les plus étudiées. Dans cette famille, très diverse, on trouve principalement des glycolipides simples comme les lipides de sophorose, de rhamnose, de tréhalose, de cellobiose et de mannose (Tableau 1.2).

**Tableau 1.2. Principaux glycolipides d'origine microbienne rapportés dans la littérature.**

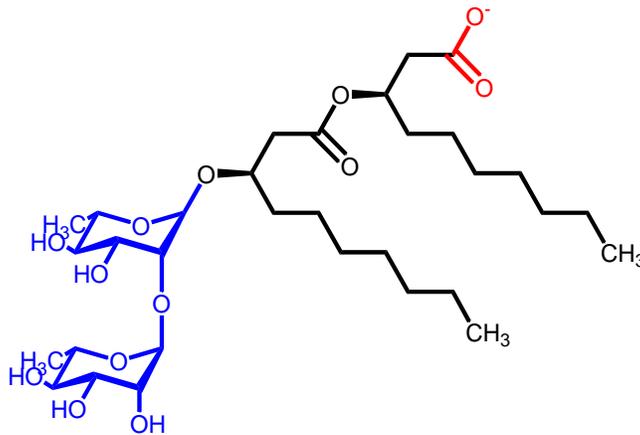
Type de glycolipide	Composition	Microorganismes producteurs	Références
Lipide de sophorose	Un disaccharide sophorose lié à un acide gras hydroxylé au niveau de l'avant dernier carbone.	Principalement par des levures comme <i>Candida bombicola</i> , <i>Candida magnoliae</i> , <i>Candida apicola</i> , <i>Candida bogoriensis</i> et <i>Starmerella bombicola</i> .	Kurtzman <i>et al.</i> (2010). Van Renterghem <i>et al.</i> (2018)
Lipide de rhamnose	Une ou deux unités de rhamnose liées à des acides gras hydroxylés.	Principalement par des bactéries des phyla Proteobacteria, Deinococcobacteria et Actinobacteria. Ex. <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Burkholderia</i> spp.	Abdel-Mawgoud <i>et al.</i> (2010)
Lipide de tréhalose	Un disaccharide tréhalose couplé à des acides mycoliques.	Principalement par des bactéries à Gram positif, riches en GC comme les actinomycètes. Ex. <i>Mycobacterium</i> spp., <i>Nocardia</i> spp. et <i>Corynebacterium</i> spp.	Asselineau & Asselineau (1978)
Lipide cellobiose	Un disaccharide cellobiose lié au groupement $\omega$ -hydroxyle de l'acide 15,16-dihydroxyhexadécanoïque ou de l'acide 2,15,16-trihydroxyhexadécanoïque.	Principalement par des levures basidiomycètes comme <i>Cryptococcus humicola</i> et <i>Pseudozyma fusiformata</i> .	Kulakovskaya <i>et al.</i> (2009)
Lipide mannose	Une molécule de mannosylérythriol liée à un acide gras au niveau du mannose.	Principalement par des levures basidiomycètes comme <i>Pseudozyma aphidis</i> .	Rau <i>et al.</i> (2005)

Du fait de la problématique environnementale en conséquence de l'utilisation accrue de surfactants polluants, des solutions de rechange doivent s'imposer, et les rhamnolipides sont en train de gagner du terrain. Particulièrement, les facteurs qui jouent en faveur du développement biotechnologique des rhamnolipides sont leurs excellentes propriétés tensioactives et leur innocuité. Au regard de ces propriétés les rhamnolipides pourraient être utilisés dans une variété d'applications potentielles, incluant l'industrie pétrolière, la biorestauration, l'agriculture,

le domaine cosmétique, les aliments et le domaine pharmaceutique (Chen *et al.*, 2017, Randhawa & Rahman, 2014).

### 1.3 Les rhamnolipides

Les rhamnolipides (RL) sont des glycolipides produits par peu d'espèces bactériennes, principalement par les genres *Pseudomonas* sp. et *Burkholderia* sp. (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010). Ces molécules ont été découvertes par Bergström en 1946 dans le surnageant de cultures de *Pseudomonas pyocyanea*, renommée *P. aeruginosa*, une bactérie à Gram négatif appartenant à l'embranchement  $\gamma$ -Proteobacteria. Les rhamnolipides ont été rapportés comme étant des acides pyolipiques, qui sont des molécules qui se distinguent par la présence d'un sucre, le rhamnose, et d'un lipide, l'acide  $\beta$ -hydroxydécanoïque (Bergström *et al.*, 1946). Leur structure chimique fut élucidée par Jarvis et Johnson en 1949. Il s'agissait, en effet, d'une molécule composée de deux unités de L-rhamnose liées à deux unités d'acide  $\beta$ -hydroxydécanoïque par une liaison O-glycosidique (Jarvis & Johnson, 1949). Les deux unités de rhamnose étaient unies par une liaison  $\alpha$ -1,2-glycosidique (Fig. 1.2) (Edwards et Hayashi, 1965).



**Figure 1.2. Structure moléculaire du premier rhamnolipide identifié.**

Ce composé est le (R)-3-((R)-3-[2-O-( $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl]oxydécanyl)oxydécanoate, simplifié dans cette thèse comme Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>. En bleu, les deux unités de rhamnose; en noir, les deux unités d'acides gras; en rouge, l'ion carboxylate rendant la molécule anionique.

La production de rhamnolipides a été également observée chez quelques espèces bactériennes appartenant aux phyla Proteobacteria, Deinococcobacteria et Actinobacteria (Tableau 1.3). La détection de la production de biosurfactants microbiens est souvent basée sur des méthodes indirectes comme, par exemple, la mesure de la tension de surface, la tension interfaciale, la concentration de rhamnose, l'activité hémolytique et l'activité émulsifiante (Heyd *et al.*, 2008). Toutefois, ces méthodes n'apportent pas des preuves suffisantes pour confirmer les souches productrices, puisque la structure chimique des molécules tensioactives ne peut pas être vérifiée. Ainsi, l'affiliation des souches rapportées comme étant productrices peut être parfois inexacte.

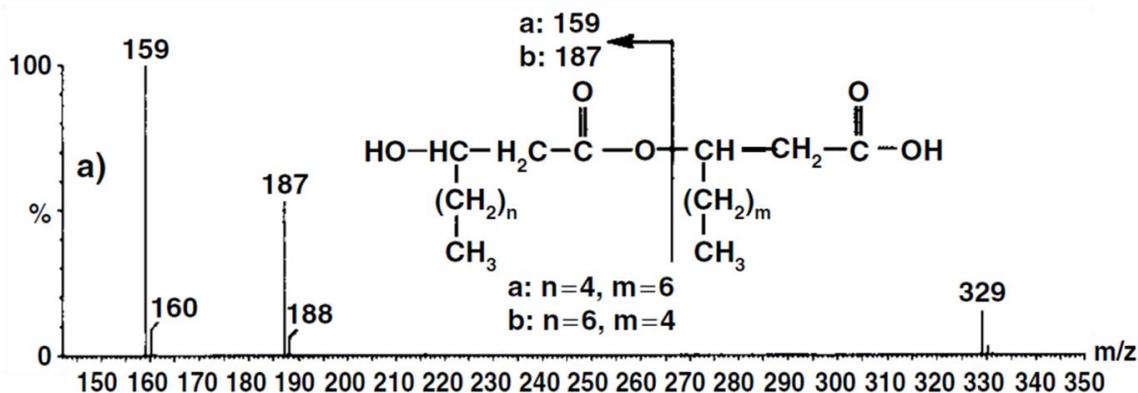
Par ailleurs, le développement de différentes méthodes analytiques pour l'étude des rhamnolipides a permis de mettre en évidence la grande diversité structurale de ces molécules (Tableau 1.3). Ainsi, depuis la découverte des rhamnolipides, une trentaine de congénères ont été identifiés chez *P. aeruginosa* en utilisant des milieux de culture avec différentes sources de carbone (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010). Ces congénères présentent une grande variabilité, principalement au niveau de la longueur des chaînes aliphatiques ( $C_8 - C_{12}$ ). Le nombre d'unités de rhamnose peut varier aussi, comportant une ou deux et même rarement trois unités (Hisatsuka *et al.*, 1971). D'autres différences, quoique moins fréquentes, se trouvent au niveau du nombre d'unités d'acides gras et de leur degré d'insaturation (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010).

La spectrométrie de masse (MS) constitue une méthode puissante pour l'identification de la structure de différents congénères des rhamnolipides (Déziel *et al.*, 2000b, Pajarron *et al.*, 1993). En particulier, la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) a permis l'identification, de façon sélective, d'un seul type de molécule, permettant de différencier des isomères de position. La fragmentation de la partie lipidique des rhamnolipides, l'acide  $\beta$ -hydroxyacyl- $\beta$ -hydroxyalcanoïque en mode ion-négatif a lieu au niveau de la liaison O-alkyle, conférant une charge sur le groupement hydroxy terminal de la molécule (Déziel *et al.*, 2003). Ce mécanisme de fragmentation produit des ions qui sont spécifiques à chaque isomère. Ainsi, la proportion relative de chaque isomère peut être facilement déduite selon l'intensité de l'ion pseudomoléculaire et son profil de fragmentation. Par exemple, les isomères  $C_8-C_{10}$  et  $C_{10}-C_8$ , qui partagent l'ion pseudomoléculaire  $m/z$  329, produisent par fragmentation les ions  $[(C_8)-H]^-$  ( $m/z$  159) et  $[(C_{10})-H]^-$  ( $m/z$  187), respectivement (Fig. 1.3) (Lépine *et al.*, 2002a).

**Tableau 1.3. Quelques espèces bactériennes chez lesquelles des congénères de rhamnolipides ont été identifiés à l'aide de méthodes analytiques.**

Souche	Phyla ou embranchement	Longueur de la chaîne aliphatique	Méthode analytique	Références
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> * 57RP	γ-Proteo bacteria	Principalement C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	LC-MS	Déziel <i>et al.</i> (2000b).
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> PCL			IRTF, LC-MS	Oliveira <i>et al.</i> (2009).
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> * NRRL-59190		Principalement C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub>	LC-MS	(Gunther <i>et al.</i> , 2005).
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> NRRL B-59190		Principalement C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	MS	Rooney <i>et al.</i> (2009). Hoskova <i>et al.</i> (2015)
<i>Enterobacter asburiae</i> NRRL B-59189			MALDI-TOF-MS	Rooney <i>et al.</i> (2009).
<i>Pantoea stewartii</i> * NRRL B-59187				
<i>Enterobacter hormaechei</i> NRRL B-59185				
<i>Burkholderia plantarii</i> * DSM 9509	β-Proteo bacteria	Principalement C <sub>14</sub> -C <sub>14</sub>	LC-MS	Hörmann <i>et al.</i> (2010).
<i>Burkholderia thailandensis</i> * E264			LC-MS	Dubeau <i>et al.</i> (2009).
<i>Burkholderia pseudomallei</i> * NCTC 10274			LC-QTOF-MS	Irorere <i>et al.</i> (2018).
<i>Burkholderia glumae</i> * AU6208			GC-MS	Häußler <i>et al.</i> (1998).
<i>Burkholderia kururiensis</i> KP23		LC-MS	Costa <i>et al.</i> (2011).	
<i>Dietzia maris</i> * As-13-3	Actino bacteria	Principalement C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	MS	Tavares <i>et al.</i> (2013).
<i>Thermus thermophilus</i> HB8	Deinococco bacteria	C <sub>8</sub> à C <sub>14</sub>	LC-MS, MNR	Wang <i>et al.</i> (2014).
<i>Thermus</i> sp. CCM 2842		Principalement C <sub>16</sub>	IRTF, LC-MS	Pantazaki <i>et al.</i> (2010).
			GC-MS, MNR	Rezanka <i>et al.</i> (2011).

\*Espèces bactériennes chez lesquelles les gènes impliqués dans la biosynthèse de rhamnolipides ont été identifiés.



**Figure 1.3. Profil de fragmentation des ions isomères [(C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>)-H]<sup>-</sup> et [(C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub>)-H]<sup>-</sup> par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).**

Ces deux isomères présentent un  $m/z$  de 329, les valeurs de  $m/z$  résultant de la fragmentation (MS/MS) différent, ce qui permet leur identification. Spectre de masse tiré de Lépine *et al.* (2002a).

Principalement deux méthodes de séparation chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse sont utilisées en laboratoire pour identifier les différents congénères de rhamnolipides dans des mélanges et les quantifier, la chromatographie liquide (LC-MS et LC-MS/MS) et la chromatographie en phase gazeuse (GC-MS). Une méthode analytique utilisant un système de chromatographie en phase liquide ultra performant couplé à la spectrométrie de masse (UPLC-MS/MS) s'avère plus efficace pour l'analyse des congénères et la quantification des rhamnolipides en comparaison avec les méthodes LC-MS/MS conventionnelles, ceci en raison d'une résolution chromatographique accrue, une très grande vitesse d'analyse et une haute sensibilité (Rudden *et al.*, 2015). D'autres méthodes analytiques moins utilisées sont la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF, la résonance magnétique nucléaire <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C 2D (RMN), la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) (Heyd *et al.*, 2008) et la chromatographie en phase liquide à haute performance couplée avec un détecteur d'aérosols chargés (HPLC-CAD) (Behrens *et al.*, 2016).

### 1.3.1 Propriétés tensioactives des rhamnolipides

La structure chimique des rhamnolipides (Fig. 1.2) met en évidence leur caractère amphiphile, d'une part polaire, dû aux groupements hydroxyles du rhamnose, et d'autre part non-polaire, en raison des chaînes hydrophobes des acides gras. De plus, l'ion carboxylate lui confère une charge négative, ce qui rend la molécule anionique. En raison de leur caractère

amphiphile, les rhamnolipides ont la propriété de modifier la tension superficielle entre deux surfaces non miscibles, permettant la formation d'émulsions. Cependant, la diminution de la tension de surface de l'eau, la tension interfaciale huile/eau ainsi que la concentration micellaire critique (CMC) dépendent de plusieurs facteurs tels que la concentration du surfactant, la composition du mélange de congénères, la température, la pression atmosphérique, le pH et la force ionique du système (concentration en NaCl, MgCl<sub>2</sub>, etc) (Mendes *et al.*, 2015).

De façon indicative, selon un rapport publié par Abdel-Mawgoud *et al.* (2009), un mélange de rhamnolipides obtenu de *P. aeruginosa* Bs20 (concentration 13.4 mg/L) peut abaisser la tension de surface de l'eau de 72 mN/m à 30 mN/m. Par ailleurs, selon une étude comparative rapportée par Mendes *et al.* (2015), un extrait purifié de rhamnolipides (0.15 g/L) obtenu de *P. aeruginosa* PA1 réduit la tension interfaciale pétrole/eau de 21 mN/m à 1 mN/m alors que le dodécylsulfate de sodium (SDS), un surfactant anionique, réduit la tension interfaciale à 7 mN/m à une concentration de 10 g/L. Des valeurs comparatives de diminution de la tension interfaciale hydrocarbures/eau sont présentées dans le tableau 1.4.

**Tableau 1.4. Réduction de la tension interfaciale hydrocarbure/eau à l'aide d'un extrait de rhamnolipides en comparaison avec un surfactant anionique synthétique.**  
Modifié de Mendes et collaborateurs (2015).

Hydrocarbures	Tension interfaciale du mélange hydrocarbure/eau	Surfactant	
		Extrait de RL purifié* (0.15 g/L)	SDS (10 g/L)
Toluène	32.50 ± 0.37 mN/m	3.95 ± 0.47 mN/m	2.63 ± 0.14 mN/m
n-heptane	43.23 ± 1.35 mN/m	3.54 ± 0.16 mN/m	1.33 ± 0.03 mN/m
Octane	47.17 ± 0.13 mN/m	1.11 ± 0.03 mN/m	1.31 ± 0.05 mN/m
Hexadécane	47.95 ± 0.87 mN/m	0.70 ± 0.11 mN/m	1.85 ± 0.89 mN/m

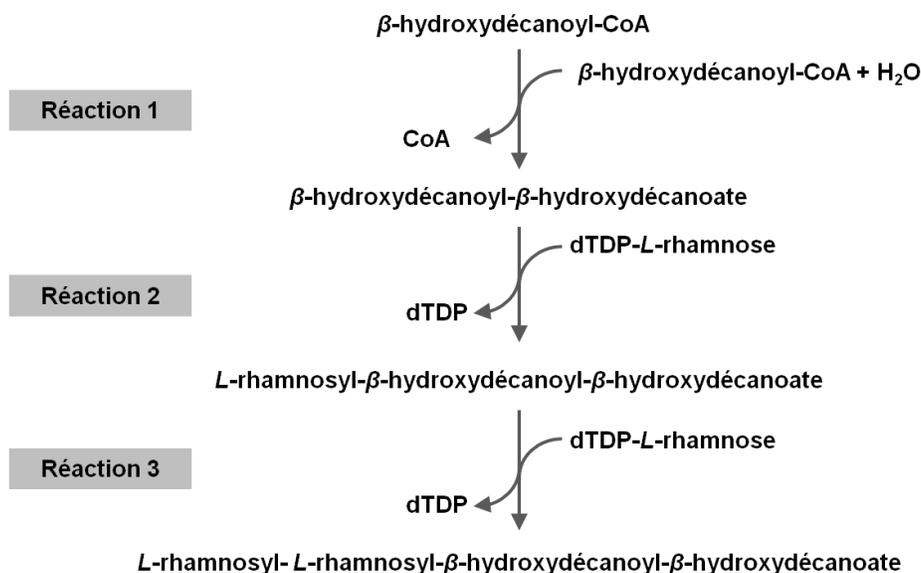
\*Extrait au solvant obtenu d'un surnageant de *P. aeruginosa* PA1.

Par ailleurs, les rhamnolipides présentent une faible concentration micellaire critique (CMC). Dans une solution aqueuse les rhamnolipides forment des micelles lors qu'ils atteignent une concentration qui peut osciller entre 5 à 230 mg/L, dépendamment de la pureté du mélange et du profil de congénères (Nitschke *et al.*, 2005, Paulino *et al.*, 2016, Zhao *et al.*, 2018). Comparativement, un mélange purifié de rhamnolipides de *P. aeruginosa* PA1 présente une

CMC de 25,7 mg/L, une valeur qui est cent fois plus faible que le CMS du SDS, qui est de 2.56 g/L (Mendes *et al.*, 2015).

### 1.3.2 Biosynthèse de rhamnolipides chez *P. aeruginosa*

Depuis la découverte de la structure chimique des rhamnolipides, plusieurs études ont été effectuées afin d'élucider leur mécanisme de biosynthèse. En 1963, Burger *et al.* ont démontré que la synthèse de rhamnolipides constitue un processus impliquant des réactions séquentielles de transfert d'un groupement glycosyle sur un précurseur lipidique. Les auteurs ont proposé un mécanisme enzymatique comportant trois réactions. Une première réaction permettant l'estérification de deux unités d'acide  $\beta$ -hydroxydécanoïque activées par la coenzyme A, donnant un dimère, l'acide  $\beta$ -hydroxydécanoïl- $\beta$ -hydroxydécanoïque. Cette étape était suivie d'une réaction de glycosylation dont le dimère lipidique condensant une molécule de dTDP-L-rhamnose, ce qui produit un mono-rhamnolipide. Et finalement, une réaction de couplage d'une deuxième unité de rhamnose pour obtenir un di-rhamnolipide (Fig. 1.4). Les tests enzymatiques effectués par Burger *et al.* ont permis de suggérer que le mécanisme enzymatique de glycosylation impliquait des rhamnosyltransférases spécifiques de localisation membranaire. Cependant, ces enzymes n'ont pas été identifiés lors de ces études.



**Figure 1.4. Modèle de synthèse enzymatique des rhamnolipides impliquant trois réactions séquentielles.** Modifié de Burger *et al.* (1963).

### 1.3.2.1 Rhamnosyltransférase I

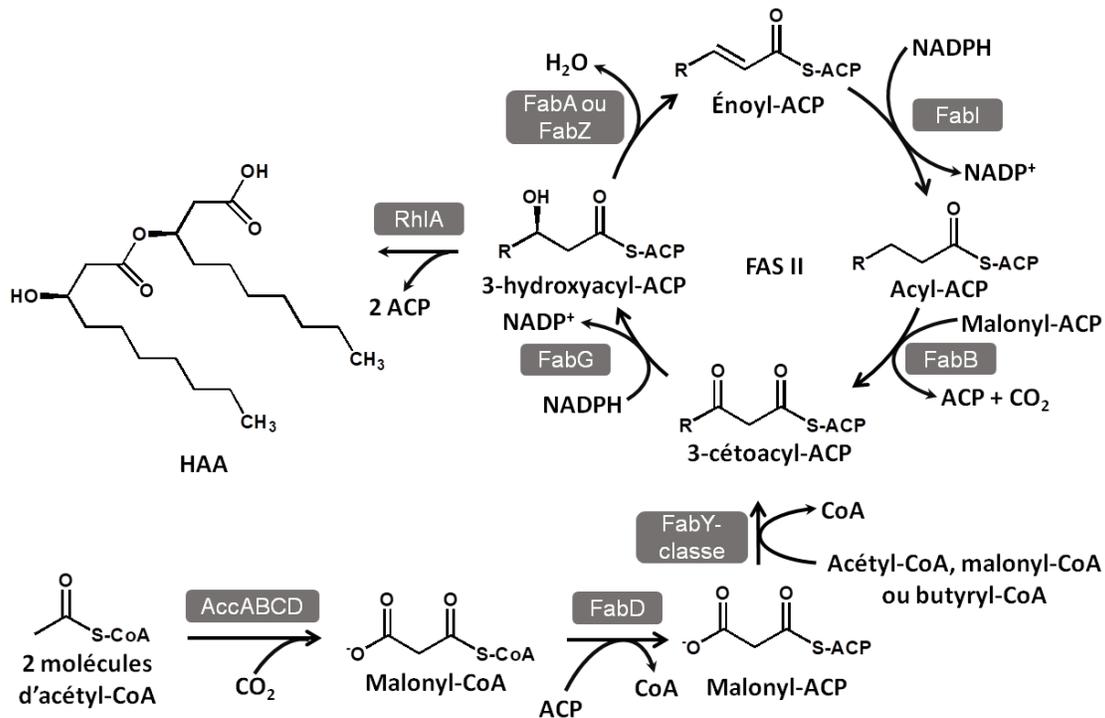
En 1994, lors d'une mutagenèse aléatoire par transposon chez *P. aeruginosa*, trois gènes essentiels pour la biosynthèse de rhamnolipides ont été identifiés et nommés *rhIA*, *rhIB* et *rhIR*. Les gènes *rhIA* et *rhIB* sont organisés sous forme d'opéron bicistronique. Le gène *rhIA*, codant une protéine de 32 kDa avec une séquence putative de signal, suggérait une localisation périplasmique, tandis que *rhIB*, codant une protéine de 47 kDa, avec au moins deux domaines membranaires putatifs, suggérait une localisation transmembranaire (Ochsner *et al.*, 1994). Par ailleurs, lors de cette étude, les auteurs ont observé que la surexpression de l'opéron *rhIAB* chez *P. aeruginosa* conduisait à une production de rhamnolipides significativement plus élevée que la surexpression exclusive du gène *rhIB*. Sur la base de ces observations, les auteurs ont proposé une hypothèse selon laquelle RhIA et RhIB étaient des sous-unités peptidiques formant un seul complexe enzymatique, la rhamnosyltransférase I (Ochsner *et al.*, 1994). Toutefois, une étude publiée récemment a montré que RhIB accomplit son rôle catalytique indépendamment de l'assistance de RhIA pour sa stabilisation (Wittgens *et al.*, 2017).

Le développement d'une méthode analytique de chromatographie liquide et de spectrométrie de masse (LC-MS) pour l'étude des rhamnolipides a permis également la détection des acides 3-(3-hydroxyalcanoyloxy)alcanoïques (HAA) dans le surnageant des cultures de *P. aeruginosa* (Lépine *et al.*, 2002a). Il s'agit, notamment, des précurseurs lipidiques de rhamnolipides, tel qu'ils avaient été postulés par Burger et collaborateurs 40 ans plus tôt en 1963. Une étude ultérieure a révélé que la production des HAA et des rhamnolipides est absente dans un mutant *rhIA*<sup>-</sup>, ce qui associe le rôle de RhIA surtout à la biosynthèse du précurseur lipidique des rhamnolipides plutôt qu'au transfert du rhamnose en soi (Déziel *et al.*, 2003). Au contraire, un mutant *rhIB*<sup>-</sup> produit des HAA, mais pas de rhamnolipides, ce qui confirme que le transfert de la première molécule de rhamnose sur une molécule de HAA constitue le rôle exclusif de RhIB (Déziel *et al.*, 2003).

### 1.3.3 Synthèse des acides 3-(3-hydroxyalcanoyloxy)alcanoïques (HAA)

Les acides gras hydroxylés des HAA possèdent exclusivement une stéréo-isomérisation *R* (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014b). Puisque la voie de biosynthèse *de novo* des acides gras (FAS II, de l'anglais *fatty acid synthesis II*) produit des intermédiaires qui exhibent exclusivement cette stéréo-isomérisation, il a donc été suggéré que la voie FAS II constituerait la source des acides gras hydroxylés utilisés par RhIA comme substrats. Zhu et Rock (2008) ont démontré *in vitro* que

l'enzyme RhIA recombinante purifiée utilise directement des  $\beta$ -hydroxyacyl-ACP pour la synthèse des HAA et non des  $\beta$ -hydroxyacyl-CoA (Zhu & Rock, 2008a). Ces données appuyent l'hypothèse selon laquelle la voie FAS II constitue la source des intermédiaires lipidiques des rhamnolipides (Fig. 1.5). Il est donc évident que RhIA ne constitue pas une rhamnosyltransférase, mais plutôt une 3-(3-hydroxyalcanoyloxy)alcanoate (HAA) synthase.



**Figure 1.5. Synthèse *de novo* des acides gras servant d'intermédiaires R-3-hydroxyacyl-ACP pour la synthèse des HAA selon le modèle proposé par Zhu et Rock (2008).**

Adapté de Yuan *et al.* (2012). AccABCD : acétyl-CoA carboxylase, FabD: malonyl-CoA:ACP transacylase. FabY-classe :  $\beta$ -cétoacyl synthase de domaine KASI/KASII. FabB et FabF :  $\beta$ -cétoacyl-ACP synthases. FabG:  $\beta$ -cétoacyl-ACP réductase NADPH-dépendante. FabA, FabZ:  $\beta$ -hydroxyacyl-ACP déshydratases. FabI: énoyl-ACP réductase NADH-dépendante. RhIA: 3-(3-hydroxyalcanoyloxy)alcanoate (HAA) synthase. HAA: acide 3-(3-hydroxyalcanoyloxy)alcanoïque.

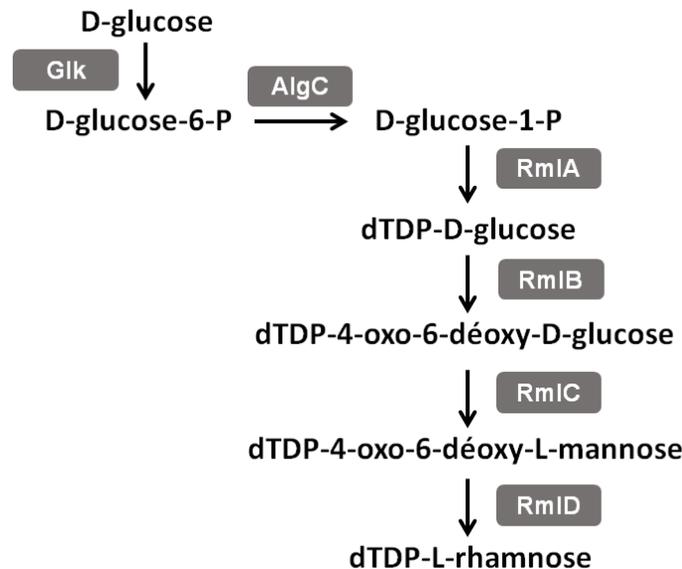
### 1.3.3.1 Rhamnosyltransférase II

Lors d'une étude basée sur l'homologie de séquences, un gène codant une deuxième rhamnosyltransférase a été identifié chez *P. aeruginosa*, le gène *rhIC*. Les gènes *rhIC* et PA1131 se trouvent organisés sous forme d'opéron bicistronique. RhIC (rhamnosyltransférase II) constitue une protéine putativement membranaire et est directement responsable de la deuxième réaction de glycosylation dans la biosynthèse de rhamnolipides, permettant ainsi la

synthèse de di-rhamnolipides (Rahim *et al.*, 2001). Concernant la protéine codée par PA1131, aucun rôle n'a pas pu encore lui être attribué, ni dans la production ni dans la sécrétion des rhamnolipides (Wittgens *et al.*, 2017).

### 1.3.3.2 Synthèse du rhamnose

Chez *P. aeruginosa*, il existe quatre gènes qui sont respectivement des homologues de *rfbB*, *rfbD*, *rfbA* et *rfbC* d'*E. coli*, responsables de la biosynthèse du L-rhamnose, un composant de l'antigène O chez cette bactérie (Stevenson *et al.*, 1994). En effet, l'opéron *rmIBDAC* de *P. aeruginosa* code les protéines RmlA, RmlB, RmlC et RmlD. Ces protéines sont responsables de synthétiser le dTDP-L-rhamnose (Fig. 1.6), qui constitue le substrat principal des rhamnosyltransférases RhlB et RhlC, et le groupement glucidique des lipopolysaccharides (LPS) de *P. aeruginosa* (Rahim *et al.*, 2000).



**Figure 1.6. Voie de biosynthèse du L-rhamnose à partir du glucose.**

Inspiré de Rahim *et al.* (2000). Glk: Glucokinase, AlgC: Phosphomannomutase. RmlA: Glucose-1-phosphate thymidylyltransférase. RmlB: dTDP-D-glucose 4,6-déhydratase. RmlC: dTDP-4-déhydrorhamnose 3,5-épimérase. RmlD: dTDP-4-déhydrorhamnose réductase.

Par ailleurs, l'expression de l'opéron *rmIBDAC* est principalement régulée par le système de *quorum sensing rhl* (voir section 1.3.3.4) et le facteur  $\sigma^S$  (RpoS), un facteur de transcription associé à la régulation génique durant la phase stationnaire. D'autre part, la présence d'un

promoteur P2 semble contribuer à une expression basale de l'opéron, ce qui favoriserait le flux de rhamnose pour la synthèse essentielle des LPS (Aguirre-Ramirez *et al.*, 2012, Rahim *et al.*, 2000).

### 1.3.3.3 La production de rhamnolipides est contrôlée par le *quorum sensing* chez *P. aeruginosa*

Afin de comprendre le mécanisme de régulation de la synthèse de rhamnolipides chez *P. aeruginosa*, il est nécessaire de réviser le concept de *quorum sensing* (QS). Un système de *quorum sensing* constitue un mécanisme permettant la régulation de l'expression génique en fonction de la densité cellulaire de la population bactérienne (Fuqua *et al.*, 1994, Kaplan & Greenberg, 1985). Deux systèmes de *quorum sensing* connus chez *P. aeruginosa* sont organisés de manière similaire au système *lux* chez *Vibrio fischeri*. Le système *lux* requiert une protéine LuxI responsable de la synthèse de molécules de signalisation de la famille des acyl-homosérine-lactones (AHL), et d'une protéine LuxR, agissant comme régulateur transcriptionnel. Le système de *quorum sensing lux* se distingue par la production et la sécrétion des AHL, qui s'accumulent au fur et à mesure que la densité cellulaire locale augmente. Une fois un seuil critique de concentration atteint, les AHL agissent comme des auto-inducteurs, liant le régulateur de transcription LuxR à l'intérieur des cellules. L'activation de LuxR résulte en une activation de la transcription de l'opéron *lux*, permettant ainsi la mise en place d'une boucle d'auto-induction positive. Les protéines de type LuxR sont également impliquées dans l'activation et/ou la répression de l'expression de gènes bien précis dans l'ensemble de la communauté bactérienne (Fig. 1.7). De cette façon, le *quorum sensing* conduit les cellules d'une population à adopter un comportement coopératif, permettant leur adaptation aux changements des conditions environnementales (Galloway *et al.*, 2011). En général, le *quorum sensing* est impliqué dans la régulation de l'expression d'une large variété de phénotypes, tels que la virulence, la bioluminescence, la conjugaison bactérienne, la symbiose, la motilité, la production d'antibiotiques, la sporulation et la formation de biofilms, entre autres (Camilli & Bassler, 2006).

Chez *P. aeruginosa*, la modulation de l'expression génique *via* le *quorum sensing* est essentiellement attribuée à trois systèmes de régulation, les systèmes *las*, *rhl* et *pqs*. Ces trois systèmes de *quorum sensing* fonctionnent de façon interdépendante, ce qui permet de réguler l'expression de gènes de manière successive au cours des différentes étapes du processus infectieux (Juhás *et al.*, 2005). Notamment, l'activation et la répression séquentielle de ces

systèmes affecte directement ou indirectement la production des rhamnolipides (Lee & Zhang, 2015).

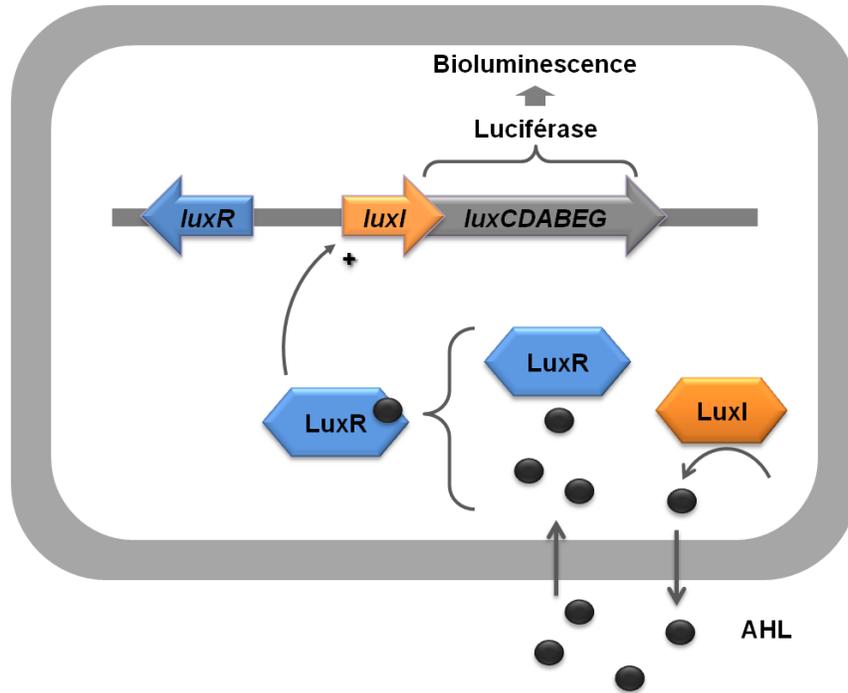
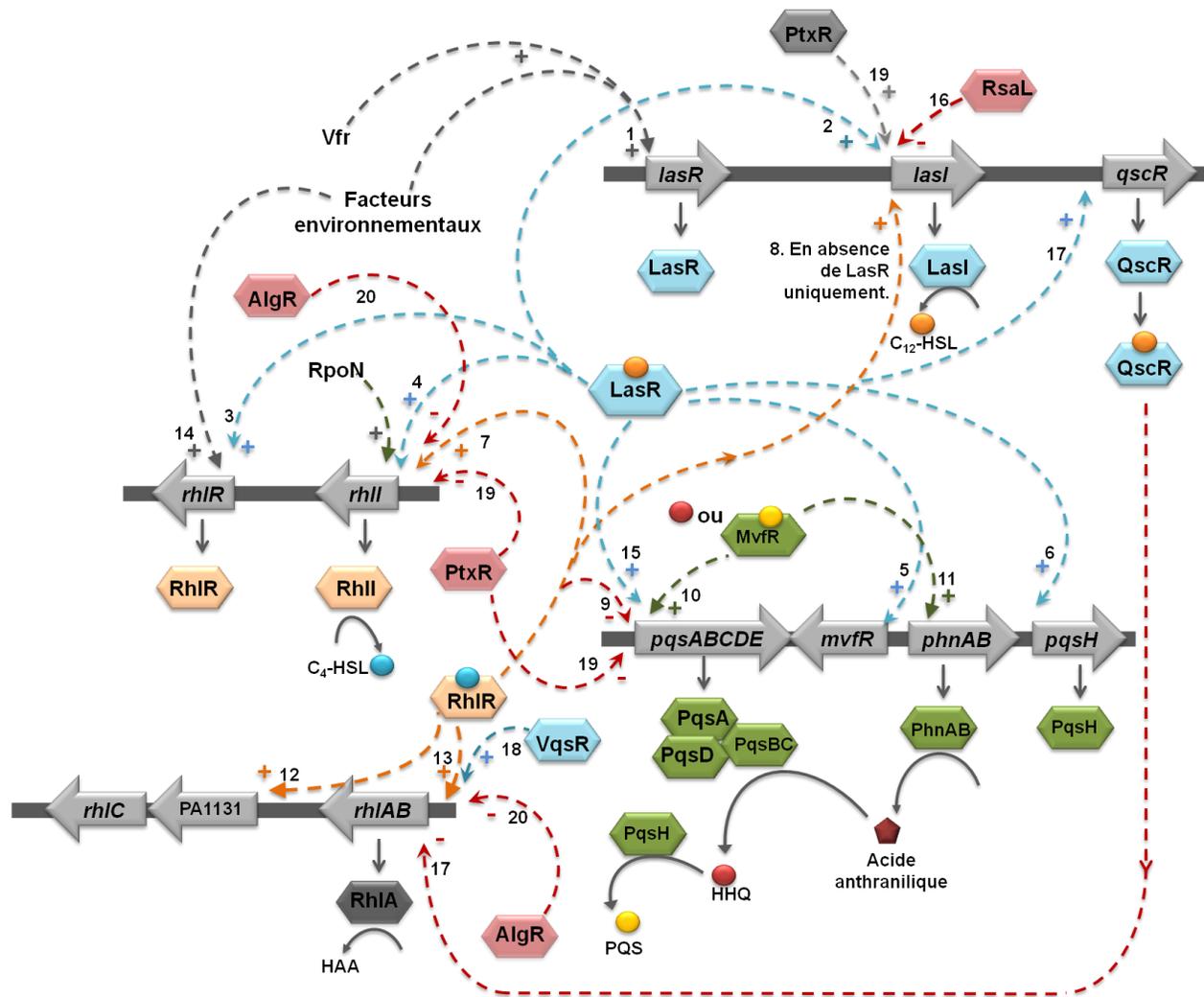


Figure 1.7. Schéma représentant le système de *quorum sensing lux* de *Vibrio fischeri*. Adapté de Galloway (2011). AHL : acyl-homosérine-lactone.

### 1.3.3.4 Implication du *quorum sensing* dans la régulation de l'expression des gènes clés de la biosynthèse de rhamnolipides

La découverte du gène *rhlI* dans le groupe de gènes *rhl*, un homologue de *luxI*, a permis d'élucider le mécanisme de régulation de l'expression de l'opéron *rhlAB*, qui est essentiellement attribué au *quorum sensing*. D'ailleurs, le couple RhlI/RhlR ayant une homologie de séquence avec LuxI/LuxR, appartient à la famille des systèmes de *quorum sensing* de type *lux* (Ochsner & Reiser, 1995). Ochsner et Reiser (1995) ont mis en évidence un modèle selon lequel RhlI est responsable de la synthèse d'un autoinducteur liant le régulateur RhlR, le *N*-butanoyl-homosérine-lactone (C<sub>4</sub>-HSL) (Pearson *et al.*, 1995). Une fois RhlR activé par l'autoinducteur, il active la transcription de plusieurs gènes cibles, dont *rhlI* et l'opéron *rhlAB* (Fig. 1.8) (Ochsner & Reiser, 1995). Également, le système *rhl* contrôle l'expression de *rhlC* (Rahim *et al.*, 2000) et de l'opéron *rmlBDAC* (Aguirre-Ramirez *et al.*, 2012), permettant ainsi l'expression des gènes clés dans la biosynthèse des rhamnolipides.





**Figure 1.9. Schéma simplifié de l'activation/répression en cascade des systèmes de quorum sensing *las*, *rhl* et *pqs* et leur répercussion sur l'expression des gènes impliqués dans la production de rhamnolipides.**

L'opéron *rml* n'a pas été considéré afin de simplifier le schéma. Inspiré de Dekimpe & Déziel (2009) et Abdel-Mawgoud *et al.* (2011). Des références d'appui sont citées pour chaque étape du processus: 1 (Albus *et al.*, 1997, Duan & Surette, 2007, Kim *et al.*, 2005, van Delden *et al.*, 2001), 2 (Pesci *et al.*, 1997), 3 (Ochsner & Reiser, 1995, Pesci *et al.*, 1997), 4 (de Kievit *et al.*, 2002), 5 (Pesci *et al.*, 1999, Xiao *et al.*, 2006), 6 (Gallagher *et al.*, 2002), 7 (Latifi *et al.*, 1996), 8 (Dekimpe & Déziel, 2009), 9 (McGrath *et al.*, 2004, Xiao *et al.*, 2006), 10 (McGrath *et al.*, 2004, Xiao *et al.*, 2006), 11 (Déziel *et al.*, 2005), 12 (Rahim *et al.*, 2000), 13 (Ochsner & Reiser, 1995), 14 (Duan & Surette, 2007, van Delden *et al.*, 2001), 15 (McGrath *et al.*, 2004). Vfr : Virulence factor regulator (Albus *et al.*, 1997); RpoN : Facteur sigma  $\sigma^{54}$  (Thompson *et al.*, 2003), 16 (Rampioni *et al.*, 2009), 17 (Lequette *et al.*, 2006), 18 (Juhas *et al.*, 2004), 19 (Carty *et al.*, 2006) et 20 (Morici *et al.*, 2007).

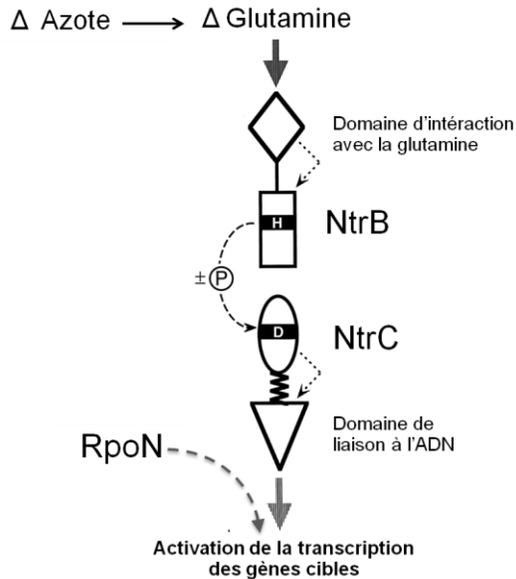
Mis-à-part l'aspect génétique, il est important de signaler l'influence de facteurs environnementaux dans la régulation de la production de rhamnolipides. En effet, l'activation des systèmes *las* et *rhl* est aussi associée au mécanisme de réponse stricte chez *P. aeruginosa* (Medina *et al.*, 2003, van Delden *et al.*, 2001). En particulier, sous des conditions limitantes en fer, l'expression de *lasIR* et *rhIIR* est augmentée (Duan & Surette, 2007), et

conséquemment, cela favorise une augmentation de la synthèse de rhamnolipides (Glick *et al.*, 2010). De même, la production de rhamnolipides peut être augmentée ou réduite en fonction de la source d'azote présente dans le milieu. Enfin, alors que l'ammonium, la glutamine, l'asparagine et l'arginine sont des composés ayant un effet inhibiteur, le nitrate, le glutamate et l'aspartate favorisent leur production (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2011).

### 1.3.3.5 Des régulateurs post-transcriptionnels de la biosynthèse des rhamnolipides

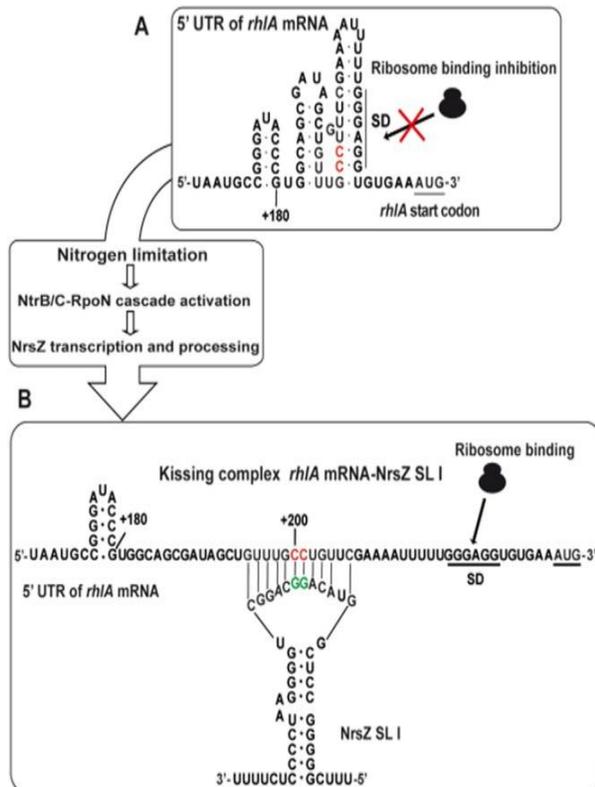
*P. aeruginosa* peut moduler la synthèse de rhamnolipides aussi au niveau post-transcriptionnel en utilisant des petits ARN non-codants. Le petit ARN NrsZ (de l'anglais *nitrogen-regulated sRNA*) est induit dans des conditions limitantes en azote par le système à deux composants NtrB/NtrC en concert avec le facteur sigma RpoN (Wenner *et al.*, 2014). RpoN est un régulateur transcriptionnel global impliqué dans le métabolisme de l'azote, l'assimilation du carbone, le transport de nutriments, la motilité cellulaire et le *quorum sensing* (Potvin *et al.*, 2008). Sous des conditions limitantes en azote, le niveau intracellulaire de glutamine diminue et ceci déclenche l'activité histidine kinase de NtrB, permettant son auto-phosphorylation et le transfert d'un groupement phosphate vers son régulateur de réponse NtrC, qui à son tour lie des séquences d'ADN spécifiques pour activer leur transcription (Kustu *et al.*, 1989) (Fig. 1.10). Au contraire, le niveau intracellulaire de glutamine augmente sous un excès d'azote, activant l'activité phosphatase de NtrB conduisant à son auto-déphosphorylation (Dixon & Kahn, 2004).

Un autre système à deux composants impliqué dans la modulation de la synthèse de rhamnolipides est le système GacA/GacS. GacA active l'expression des petits ARN *rsmZ* et *rsmY*. Ces molécules à leur tour interagissent avec RsmA provoquant son inhibition. RsmA est un régulateur post-transcriptionnel modulant l'expression de fonctions impliquées dans la transition entre le style de vie en biofilm et planctonique, incluant notamment la synthèse des rhamnolipides (Voie figure 1.12) (Heurlier *et al.*, 2004). Le mécanisme permettant la régulation post-transcriptionnelle de *rhIA* par le petit ARN NrsZ est expliqué dans la figure 1.11.



**Figure 1.10. Modèle du système à deux composantes NtrB/NtrC permettant l'activation en cascade de la transcription des gènes cibles incluant le petit ARN NrsZ.**

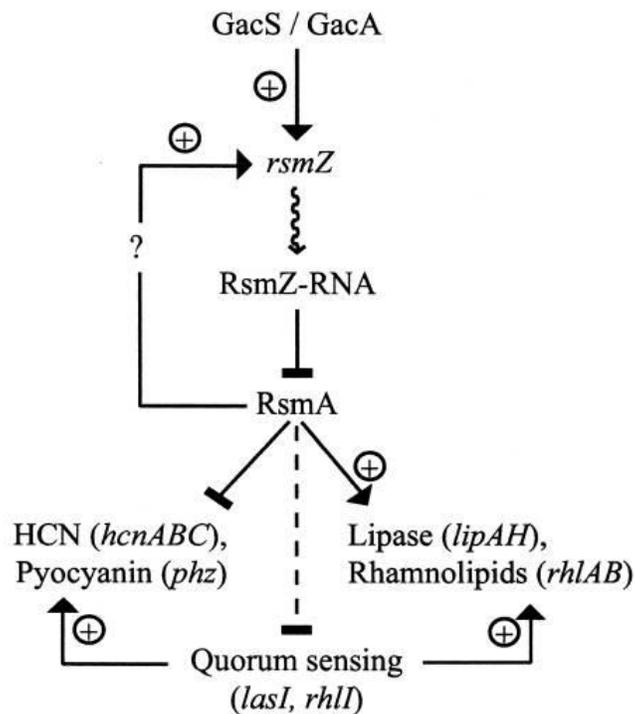
Figure modifiée de Caren Chang et Richard C. Stewart - Plant Physiology.



**Figure 1.11. Modèle du complexe *rhIA*-NrsZ permettant l'activation de la traduction de l'ARNm de *rhIA*.**

A. EN absence de NrsZ, la traduction de *rhIA* est réprimée par l'autoformation d'une structure secondaire inhibitrice sur la région 5' (5' UTR) de l'ARNm. La formation de cette structure secondaire séquestre la séquence Shine-Dalgarno inhibant la liaison au ribosome, ce qui empêche la traduction de l'ARNm de *rhIA*. B. Sous des conditions limitantes en azote, NrsZ est induit par la cascade NtrB/C-RpoN et devient transformé en petits ARN fonctionnelles formant des structures de type tige-boucle (NrsZ SL I, II, III). Ces molécules s'hybrident avec la séquence complémentaire de la boucle (GUACAGGCAGGC) de la région 5'UTR de *rhIA* formant un « kissing complex ». Cette hybridation permet la déformation de la structure inhibitrice initiale sur la région 5'UTR de l'ARNm de *rhIA* libérant la région Shine-Dalgarno pour la liaison avec le ribosome et permettant ainsi l'activation de la traduction. Figure tirée de Wenner et al., 2014.

Une autre protéine interférant avec la production de rhamnolipides est GidA, qui favorise la production de RhlR mais au niveau post-transcriptionnel, favorisant ainsi l'activation de la transcription de *rhlA* (Gupta *et al.*, 2009).



**Figure 1.12. Modèle du système de transduction de signal GacA/RsmA chez *P. aeruginosa* PAO1.** L'expression de l'ARN non-codant RsmZ dépend de GacA. La fonction de RsmZ est d'inhiber l'action de RsmA. RsmA active l'expression de RsmA créant un circuit d'autorégulation négative. RsmA contrôle de façon négative les systèmes de *quorum sensing* dépendants des AHL de même que de nombreux gènes dépendants du *quorum sensing*. Ces gènes sont contrôlés indirectement au niveau transcriptionnel *via* le *quorum sensing* mais aussi probablement au niveau traductionnel. La production de rhamnolipides est contrôlée de façon positive par RsmA, indépendante du contrôle du *quorum sensing*. Figure tirée de Heurlier *et al.* 2004.

### 1.3.4 Rôle biologique des rhamnolipides

La production de rhamnolipides semble jouer des rôles biologiques multiples chez les bactéries productrices, principalement en tant que facteur de motilité cellulaire, de facteur de virulence et d'agent antimicrobien.

Au vu du fait que la biodisponibilité de composés dérivés du pétrole, par exemple, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (en anglais : *polycyclic aromatic hydrocarbon*, PAH), s'avère limitée à cause de leur faible solubilité dans l'eau et à leur adsorption à des particules du sol, il est prévu que l'action des surfactants sur ces molécules facilite leur désorption et leur

solubilisation, favorisant ainsi leur biodégradation (Miller, 1995, Zhu & Aitken, 2010). Sur la base de ce concept, il a été couramment considéré que les rhamnolipides pourraient jouer un rôle médiateur, facilitant le contact entre les microorganismes et les hydrocarbures, favorisant ainsi leur assimilation. Cette hypothèse a été appuyée par le fait que certaines bactéries, comme *P. aeruginosa*, possèdent l'habilité de produire des biosurfactants pendant leur croissance en présence de substrats hydrophobes incluant des hydrocarbures (Déziel *et al.*, 1996, Niepa *et al.*, 2017, Zhang *et al.*, 2005). Parallèlement, les rhamnolipides ont la propriété de diminuer la tension interfaciale, facilitant la solubilisation des composés hydrophobes (Koch *et al.*, 1991a, Zhang *et al.*, 2005, Zhang & Miller, 1995), et ont la capacité de modifier les propriétés de la surface cellulaire, augmentant ainsi l'hydrophobicité de la membrane, ce qui permettrait d'augmenter la surface de contact entre les cellules et la source de carbone (Zhang & Miller, 1994).

Du point de vue appliqué, ce concept est devenu une alternative potentielle pour augmenter la biodisponibilité des hydrocarbures dans des environnements contaminés et augmenter ainsi l'efficacité de biodégradation (Miller, 1995, Zhang *et al.*, 2005). En effet, au cours des dernières années, la supplémentation de sols contaminés aux hydrocarbures avec des rhamnolipides et leur effet sur la biodégradation de ces composés a constitué le sujet principal de plusieurs études (Maier & Soberon-Chavez, 2000). Toutefois, des résultats très variables obtenus remettent en question le rôle biologique des rhamnolipides dans l'assimilation de ce type de composés (Chrzanowski *et al.*, 2012b). En définitive, une meilleure compréhension des interactions entre les bactéries, les rhamnolipides et les substrats hydrophobes est nécessaire afin de considérer l'exploitation potentielle des rhamnolipides en biorestauration (Chrzanowski *et al.*, 2012b).

#### **1.3.4.1 Rôle des rhamnolipides dans la motilité cellulaire**

La surproduction de rhamnolipides est directement corrélée avec des conditions nutritives limitantes (sauf en limitation d'une source de carbone) (Guerra-Santos *et al.*, 1986a). Plus particulièrement, au début de la phase de croissance stationnaire, lorsque les concentrations d'azote, de fer et/ou de phosphore diminuent, la production de rhamnolipides augmente (Arino *et al.*, 1996, Manresa *et al.*, 1991, Mulligan & Gibbs, 1989). L'action tensioactive des biosurfactants et la présence d'au moins un flagelle fonctionnel sont deux facteurs essentiels permettant la propulsion des bactéries sur une surface semi-solide. Ce

déplacement est un comportement multicellulaire coordonné, et est connu comme une motilité de type *swarming* (Fraser & Hughes, 1999, Kearns, 2010). Chez *P. aeruginosa*, les rhamnolipides et leurs précurseurs HAA agissent comme agents mouillants permettant ce type de motilité (Déziel *et al.*, 2003, Kohler *et al.*, 2000, Tremblay *et al.*, 2007). Dans le cas d'un stress nutritionnel, il est possible que les bactéries migrent vers les sources d'éléments limitants, associant la motilité de type *swarming* à une fonction biologique voulant favoriser la survie cellulaire en permettant la colonisation des niches plus riches, notamment, lorsque les bactéries se développent sur un milieu semi-solide (hypothèse proposée dans Tremblay et Déziel, 2010).

#### **1.3.4.2 Rôle des rhamnolipides dans la formation du biofilm**

Beaucoup de microorganismes expérimentent une transition entre deux modes de vie différents. Le mode de vie planctonique, caractérisé par le développement cellulaire dans un environnement liquide ou semi-liquide dans lequel les bactéries peuvent adopter une motilité de type *swimming* ou *swarming*, respectivement, et le mode de vie sessile, caractérisé par la formation d'une communauté multicellulaire, non-motile, sous forme de biofilm (Chang, 2017, Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Bien que les biofilms se trouvent souvent attachés à des surfaces biotiques ou inertes (Bakke *et al.*, 1984, Donlan, 2002), des biofilms formés par des agrégats cellulaires non-adhérés ont été également rapportés *in vivo* (Alhede *et al.*, 2011, Bjarnsholt *et al.*, 2009). Au sein d'un biofilm, les agrégats cellulaires se trouvent enrobés d'une matrice polymérique hautement hydratée, principalement formée de polysaccharides, lipides, acides nucléiques, et d'autres molécules qui sont secrétées par la communauté bactérienne ou recyclés à partir de l'environnement cellulaire (Rasamiravaka *et al.*, 2015). Particulièrement, un biofilm mature est une structure complexe, ayant des cavités internes, des filaments qui se prolongent vers l'extérieur et des canaux de transport, qui permettent le flux de nutriments, de métabolites et d'oxygène (Joo & Otto, 2012). La vie en biofilm constituerait le mode de vie privilégié des microorganismes leur conférant divers avantages, comme une tolérance accrue aux antibiotiques et au système immunitaire de l'hôte (Costerton *et al.*, 1999, Stewart, 2002). De plus, la haute densité cellulaire au sein du biofilm, apporte aux bactéries des avantages physiologiques et métaboliques significatifs comme, par exemple, la communication cellulaire, la coopération métabolique et le transfert génétique, ce qui favoriserait la survie des microorganismes (Hausner & Wuertz, 1999, Parsek & Greenberg, 2000). Cependant, lorsqu'un stress nutritionnel survient dans le biofilm, les bactéries doivent induire des mécanismes de survie et la dispersion cellulaire à partir du biofilm; ceci constitue un mécanisme favorisant la

colonisation d'une nouvelle niche écologique (Diaz-Salazar *et al.*, 2017). Chez *P. aeruginosa*, les rhamnolipides jouent un rôle majeur dans le développement du biofilm; ils sont notamment impliqués dans les étapes de formation, dans le développement de son architecture mature et dans le détachement cellulaire (Boles *et al.*, 2005, Davey *et al.*, 2003, Lequette & Greenberg, 2005, Pamp & Tolker-Nielsen, 2007).

#### **1.3.4.3 Les rhamnolipides comme facteurs de virulence**

*P. aeruginosa* cause autant des infections aiguës que chroniques. Ce pathogène opportuniste est particulièrement connu pour infecter des individus atteints de la fibrose kystique ou présentant un système immunitaire affaibli (Kang *et al.*, 2003, Murray *et al.*, 2007, Sadikot *et al.*, 2005). Cette bactérie est aussi souvent associée à des endocardites, otites, rhinosinusites, caries, ostéomyélites, infections chirurgicales et à des infections chroniques chez les patients avec des cathéters et des implants (Bodey *et al.*, 1983).

Bien que les rhamnolipides ne soient pas des métabolites essentiels pour la croissance (ce sont des métabolites secondaires), ils constituent un facteur important pour le développement du biofilm chez *P. aeruginosa* ainsi que pour le détachement cellulaire, favorisant ainsi la tolérance aux agents antimicrobiens et la dispersion de l'infection chez l'hôte, respectivement. En somme, la production de rhamnolipides renforce la virulence de *P. aeruginosa* (Zulianello *et al.*, 2006). Ces glycolipides sont impliqués dans la première étape de colonisation par *P. aeruginosa* en altérant la structure de l'épithélium respiratoire et favorisant ainsi l'invasion par les bactéries (Zulianello *et al.*, 2006). Il serait donc possible que ce mécanisme de colonisation fonctionne de façon similaire lors du développement d'autres infections typiquement causées par cette bactérie. Lorsqu'une population bactérienne se développe en formant une niche infectieuse, la production des différents facteurs de virulence au sein de cette population favorise l'activation de la réponse du système immunitaire de l'hôte, incluant la migration des leucocytes polymorphonucléaires (PMN) vers le site d'infection (Sadikot *et al.*, 2005). Des études suggèrent que la présence des PMN déclenche une production accrue de toxines par le biofilm bactérien, y compris des rhamnolipides, ces derniers induisant la nécrose des PMN (Alhede *et al.*, 2009, Jensen *et al.*, 2007, Van Gennip *et al.*, 2009). Cette destruction des PMN génère une inflammation accrue, ce qui stimule d'autant plus la migration des PMN. La communauté bactérienne tire avantage de cette situation en utilisant l'ADN relâché par les PMN pour construire davantage le biofilm et ainsi augmenter sa résistance (Chiang *et al.*, 2013).

#### 1.3.4.4 Les rhamnolipides comme agents antimicrobiens

Les rhamnolipides produits chez *P. aeruginosa* présentent de l'activité antimicrobienne contre une ample diversité de microorganismes, incluant des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, parmi lesquelles se retrouvent des espèces ayant une résistance accrue aux antibiotiques comme *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*, ainsi que des champignons pathogènes opportunistes comme *Candida albicans* et *Candida neoformans* (Haba *et al.*, 2003). Le rôle antimicrobien des rhamnolipides est principalement attribué à une altération de la composition et de la structure de la membrane cellulaire des microorganismes, ce qui conduit à des changements des propriétés de la membrane, souvent néfastes pour les cellules.

Des effets différents sont observés sur les cellules dépendamment de la concentration de rhamnolipides utilisée. Les effets directement observés incluent le relâchement de protéines membranaires et périplasmiques, un retard de croissance et des changements de morphologie cellulaire (Sotirova *et al.*, 2008). Ces changements semblent être plus importants chez les bactéries à Gram positif que chez les bactéries à Gram négatif, (Sotirova *et al.*, 2008). En effet, la présence des LPS chez les bactéries à Gram négatif confère une protection anti-perméable accrue face aux agents surfactants (Snyder & McIntosh, 2000). Le mécanisme d'action des rhamnolipides sur les membranes cellulaires n'est pas bien connu; toutefois, les rhamnolipides possèdent une structure chimique similaire aux phospholipides membranaires (ils sont amphiphiles), ce qui leur permettrait de s'insérer dans la bicouche lipidique, provoquant ainsi une déstabilisation de la structure et par conséquent une augmentation de la perméabilité de la membrane. Il semble que la perméabilisation de la membrane cellulaire semblerait induire la solubilisation des lipides membranaires et la formation de pores, permettant ainsi d'expliquer les altérations observées (Sotirova *et al.*, 2008).

#### 1.3.5 Applications biotechnologiques potentielles des rhamnolipides

Au cours des trente dernières années, plusieurs études ont tenté d'approfondir les connaissances sur les différentes propriétés des rhamnolipides et d'explorer des applications potentielles dans divers contextes industriels. Par exemple, les rhamnolipides pourraient offrir une méthode alternative efficace et écologique pour faciliter l'extraction du pétrole brut de sites difficilement accessibles (en anglais : *enhanced oil recovery*, EOR). Par ailleurs, le fait que les rhamnolipides, contrairement aux surfactants anioniques comme le SDS, n'affectent pas

l'intégrité structurale ni fonctionnelle de plusieurs enzymes d'importance industrielle, comme les cellulases, les phospholipases et les  $\alpha$ -amylases, constitue un avantage certain pour les applications industrielles utilisant ces enzymes (Madsen *et al.*, 2015).

Ainsi, leurs excellentes propriétés physicochimiques et leur haute biodégradabilité ont certainement conféré aux rhamnolipides une grande popularité dans le monde des biosurfactants. Quelques exemples des applications potentielles des rhamnolipides sont présentés dans le tableau 1.5.

**Tableau 1.5. Applications potentielles des rhamnolipides.**

Industrie/Secteur	Application potentielle	Références
Biorestauration	Solubilisation des hydrocarbures facilitant la biodégradation par les microorganismes.	Pacwa-Plociniczak <i>et al.</i> (2011).
Industrie pétrolière	Amélioration de l'extraction du pétrole brut trappé (récupération assistée des hydrocarbures RAH), diminution de la viscosité du pétrole facilitant son transport.	De Almeida <i>et al.</i> (2016).
Pharmaceutique	Comme agent antimicrobien ou agent antiviral. Traitement des ulcères de la peau.	Cortes-Sanchez Ade <i>et al.</i> (2013). Remichkova <i>et al.</i> (2008). Piljac <i>et al.</i> (2008).
Cosmétique	Dans le traitement de la peau brûlée et dans les traitements cosmétiques de la peau, comme agent émulsifiant et mouillant.	DeSanto (2011).
Alimentaire	Comme agent de préservation, agent stabilisant et émulsifiant. Comme source de <i>L</i> -rhamnose.	Nitschke and Costa (2007).
Détergents et nettoyeurs	Comme agent surfactant et nettoyant dans des produits détergents domestiques et industriels. Comme agent nettoyant dans des shampoings et savons.	Parry <i>et al.</i> (2013).
Nanobiotechnologie et nanoparticules	Production de nanoparticules pour l'administration ciblée de médicaments.	Muller <i>et al.</i> (2017). Kumar <i>et al.</i> (2010).
Agriculture	Comme agent mouillant dans des biopesticides et comme agent antimicrobien pour le contrôle biologique de phytopathogènes.	Sachdev and Cameotra (2013).

### 1.3.6 Enjeux de la production de rhamnolipides

En 2014, une quarantaine de brevets concernaient la production de rhamnolipides et leur utilisation à des fins spécifiques (Sekhon Randhawa & Rahman, 2014). Cependant, seules quelques compagnies commercialisent ces bioproduits (Tableau 1.6). Un ensemble complexe

de facteurs interdépendants explique la difficulté de faire évoluer la production de rhamnolipides du stade de la recherche en laboratoire à celui de la production à grande échelle au niveau commercial. Notamment, le coût de production de ces composés est considérablement plus élevé que les surfactants conventionnels, ce qui place ces bioproduits dans une position concurrentielle nettement défavorable. Plusieurs facteurs militent en ce sens: les coûts des matières premières, la disponibilité de bioprocédés appropriés et le rendement de production des souches (Mukherjee *et al.*, 2006). En fonction de ces contraintes, plusieurs stratégies ont été investiguées afin de diminuer les coûts de production des rhamnolipides.

Compte tenu du fait que les matières premières peuvent représenter jusqu'à 50 % du coût de production des biosurfactants et que le rendement de conversion à partir de cultures effectuées dans des fermentateurs peut varier de 0,1 à 0,62 g RL/g de substrat (Muller *et al.*, 2012), il est impératif d'utiliser des sources de carbone peu coûteuses. À cet égard, diverses études ont évalué la revalorisation des sous-produits industriels et agricoles comme étant une alternative environnementale favorable, capable d'approvisionner des quantités importantes de matières premières issues de la biomasse à des prix abordables. Principalement, les sous-produits dérivés des huiles végétales et les effluents riches en composés fermentables comme les mélasses et le glycérol (un sous-produit de la fabrication de biodiesel), représentent les sources de carbone les plus utilisées dans les études (Banat *et al.*, 2014, Eraqi *et al.*, 2016).

**Tableau 1.6. Compagnies qui commercialisent des rhamnolipides.**

Nom de la compagnie	Pays	Référence
TeeGene Biotech Ltd	UK	<a href="http://www.teegene.co.uk">www.teegene.co.uk</a>
AGAE Technologies LLC	USA	<a href="http://www.agaetech.com">www.agaetech.com</a>
Jeneil Biosurfactant Co. LLC	USA	<a href="http://www.jeneilbiotech.com">www.jeneilbiotech.com</a>
Rhamnolipid Companies, Inc.	USA	<a href="http://www.rhamnolipid.com">www.rhamnolipid.com</a>
TensioGreen	USA	<a href="http://www.tensiogreen.com">www.tensiogreen.com</a>
Biotensidon	Allemagne	<a href="http://www.biotensidon.de">www.biotensidon.de</a>
Natsurfact	USA	<a href="http://www.natsurfact.com">www.natsurfact.com</a>

En ce qui a trait au bioprocédé industriel, deux étapes critiques dans le diagramme de flux de la production des rhamnolipides sont largement considérées dans les études d'optimisation : la méthode de fermentation et la récupération et purification du produit final.

Parmi les méthodes de fermentation utilisées, on retrouve la culture en milieu solide (Camilios Neto *et al.*, 2008), la culture en fermenteur alimentée (Chen *et al.*, 2007, Zhu *et al.*, 2012), la culture semi-continue avec cellules immobilisées (Jeong *et al.*, 2004), et la culture continue dans des conditions limitantes (Guerra-Santos *et al.*, 1986b, Soares *et al.*, 2016). Certes, ces technologies sont à la base des développements nécessaires pour mettre au point des bioprocédés plus efficaces et compétitifs en termes de coûts. Néanmoins, la capacité de biosynthèse des souches constitue le troisième facteur-clé, objet d'optimisation par les biologistes.

La recherche de souches naturellement surproductrices des rhamnolipides et surtout le développement de nouvelles souches productrices par des approches d'évolution dirigée et de génie génétique sont des avenues prometteuses (Chong & Li, 2017, Dobler *et al.*, 2016, Lovaglio *et al.*, 2015). Les premières expressions hétérologues des gènes *rhlAB* de *P. aeruginosa* ont été effectuées par Ochsner *et al.* 1995 sur trois espèces bactériennes. Lors de cette étude, la production de rhamnolipides a été essayée chez les souches *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* et *E. coli* (Ochsner *et al.*, 1995). Particulièrement, l'intérêt d'utiliser des souches productrices autres que *P. aeruginosa* est associé à la pathogénicité de cette bactérie pour l'homme, tant d'un point de vue de préservation de la santé publique que l'utilisation de mesures de biosécurité plus strictes dans le bioprocédé au détriment des coûts de production. Ainsi, l'utilisation de *P. aeruginosa* ne constitue pas un choix idéal pour une production industrielle à grande échelle. Toutefois, les rendements de production de rhamnolipides observés chez d'autres souches non-pathogènes pour l'homme, comme *Burkholderia glumae* (Costa *et al.*, 2011) ou *Pseudomonas chlororaphis* (Gunther *et al.*, 2005), sont relativement inférieurs en comparaison avec *P. aeruginosa*, qui reste malgré tout à ce jour la seule espèce commercialement utilisée pour la production de rhamnolipides (Chong & Li, 2017).

Parmi les souches alternatives étudiées, *P. putida* KT2440 est souvent utilisée comme un modèle pour l'optimisation de la production hétérologue de rhamnolipides (Tiso *et al.*, 2016, Wittgens *et al.*, 2017, Wittgens *et al.*, 2011). Particulièrement, dans les différents études, l'approche de génie génétique est souvent limitée exclusivement à l'expression hétérologue de l'opéron *rhlAB* de *P. aeruginosa* (Beuker *et al.*, 2016, Wigneswaran *et al.*, 2016, Wittgens *et al.*, 2017), ce qui correspond à une conception pertinente, sans être pour autant déterministe, en considérant que le mécanisme d'approvisionnement des précurseurs pour la biosynthèse de ces glycolipides et le mécanisme de régulation de l'expression génétique de voies métaboliques

concernées ne sont souvent pas considérés dans ces approches. Par ailleurs, récemment les gènes *rhlAB* de *Burkholderia glumae* ont été exprimés efficacement chez *P. putida* (Wittgens *et al.*, 2018a). Fait intéressant, cette étude a montré que *P. putida* peut produire des rhamnolipides ayant une longueur de chaîne aliphatique de variabilité majeure comparativement à *P. aeruginosa*, ce qui est prometteur du point de vue appliqué, puisque la diversification des mélanges de rhamnolipides permettrait l'obtention de différentes propriétés physicochimiques. Malgré tout, à l'heure actuelle, les niveaux de production atteints chez les souches recombinantes restent inférieurs comparativement à *P. aeruginosa*.

L'optimisation du flux métabolique de précurseurs au sein de la souche productrice constitue une perspective d'avenir pour la production industrielle de rhamnolipides. Lovaglio *et al.* (2015) ont proposé une stratégie de génie métabolique pour augmenter la productivité et réduire les coûts de production des rhamnolipides. L'approche proposée consiste en la manipulation des voies métaboliques pour rediriger le flux de carbone et/ou la délétion de gènes imposant une régulation négative. Toutefois, le défi majeur d'une telle approche de génie métabolique demeure la nécessité d'avoir une compréhension suffisante de la complexité du réseau de régulation de l'expression génétique contrôlant la biosynthèse de ces bioproduits, ainsi qu'une compréhension du fonctionnement des voies métaboliques impliquées dans l'approvisionnement de leurs précurseurs.

## 1.4 Objectifs du projet de recherche

Ce projet comporte deux objectifs qui sont développés dans les deux chapitres qui suivent cette introduction :

- i. **Étude du mécanisme d’approvisionnement des précurseurs lipidiques pour la synthèse de rhamnolipides.** Au cours des dernières années, la mise en évidence de l’implication de la  $\beta$ -oxydation dans l’approvisionnement des précurseurs lipidiques pour la synthèse de rhamnolipides a, dans une certaine mesure, occupé l’avant-scène dans la recherche visant la compréhension de la biosynthèse de ces bioproduits. Cette découverte constitue, entre autres, un point d’importance pour la conception de nouvelles stratégies métaboliques et pour la construction de nouvelles souches de production hétérologue. Toutefois, la façon dont les intermédiaires métaboliques de la  $\beta$ -oxydation sont canalisés vers la biosynthèse des HAA demeure encore spéculative. Étant donné l’importance que représente la compréhension de ce phénomène pour de futurs développements biotechnologiques pour les rhamnolipides, ce premier objectif consiste à élucider le mécanisme de canalisation en question.
  
- ii. **Étude mutationnelle de l’enzyme RhIA pour augmenter l’efficacité catalytique et la modulation de la sélectivité de l’enzyme.** Bien que la majorité des études publiées cherchent à optimiser la production de rhamnolipides *via* la modification des sources nutritionnelles, par l’optimisation du bioprocédé ou par expression hétérologue, il faut considérer que d’autres alternatives comme le génie des protéines n’a pas encore été explorée. En particulier, le manque d’information structurale et fonctionnelle sur les protéines impliquées dans la biosynthèse de rhamnolipides et le manque de méthodes de criblage à haut débit, constituent des éléments limitant l’ingénierie de ces protéines. Ce deuxième objectif consiste donc à identifier préliminairement des éléments structuraux de l’enzyme RhIA qui sont impliqués dans la modulation de la sélectivité de l’enzyme et à identifier des résidus potentielles pour l’amélioration de l’activité catalytique de RhIA.



# Chapitre 2

**Étude du mécanisme  
d'approvisionnement des acides  
gras hydroxylés pour la  
biosynthèse des HAA, les  
précurseurs lipidiques des  
rhamnolipides.**

## 2.1 Introduction

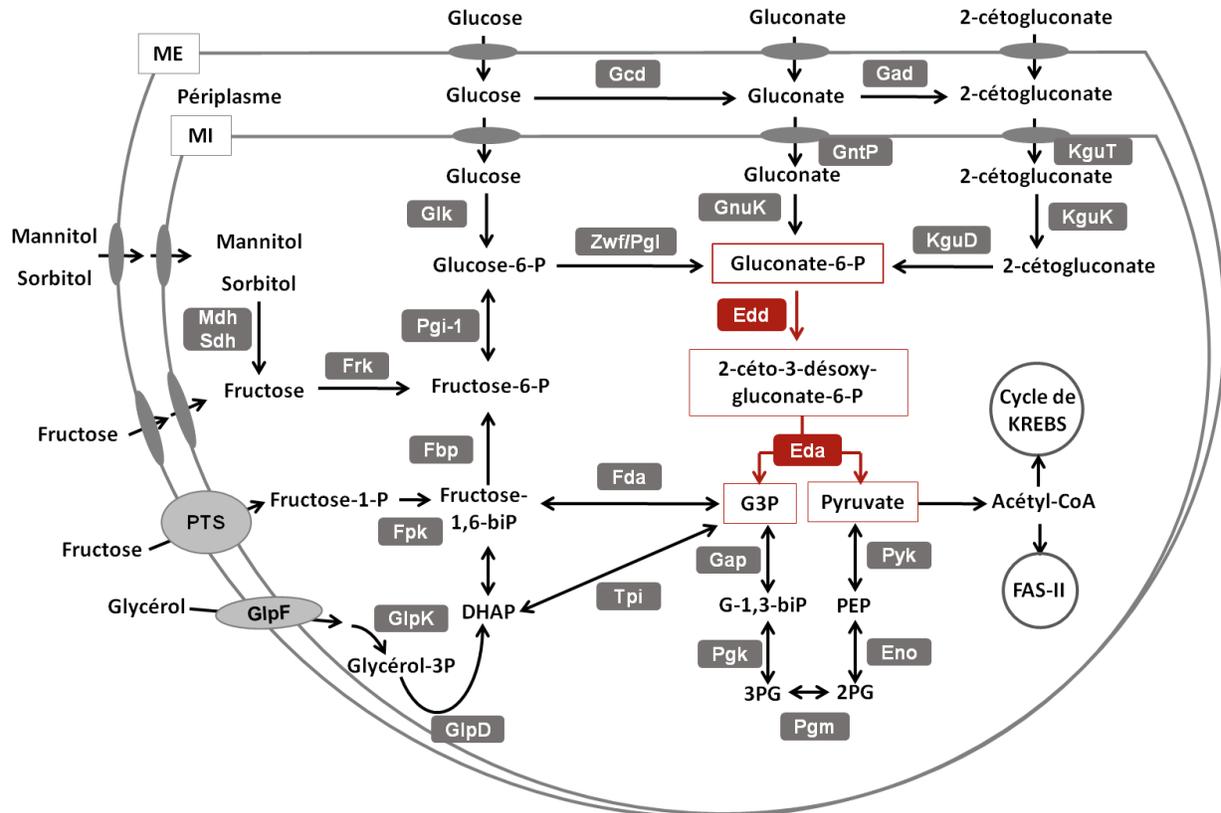
### 2.1.1 Métabolisme des glucides chez *Pseudomonas aeruginosa*

En général, les bactéries du genre *Pseudomonas* utilisent peu de glucides comme source de carbone, principalement, le glucose, le gluconate, le 2-cétogluconate, le fructose et le mannitol, indiquant un spectre réduit en comparaison avec *E. coli*, qui peut utiliser entre autres le glucose, le gluconate, le fructose, le galactose, le saccharose, le maltose, le lactose, l'arabinose, le tréhalose, le sorbitol, le mannitol et le galactitol (Del Castillo *et al.*, 2008). Chez *P. aeruginosa*, le catabolisme des monosaccharides et leurs dérivés n'emprunte pas la voie d'Embden-Meyerhof en raison du manque d'un gène codant pour une enzyme de type 6-phosphofructokinase (Claridge, 1953, Tiwari & Campbell, 1969). Cette bactérie utilise plutôt la voie d'Entner-Doudoroff ou voie du 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate (Fig. 2.1) (Cuskey *et al.*, 1985, Lessie & Phibbs, 1984, Temple *et al.*, 1990).

Le mécanisme de biosynthèse des rhamnolipides a été fréquemment étudié en utilisant comme source de carbone des molécules qui utilisent des voies cataboliques autres que la  $\beta$ -oxydation, en particulier, le glucose (Rahim *et al.*, 2001), le gluconate (Campos-Garcia *et al.*, 1998), le mannitol (Déziel *et al.*, 1999, Déziel *et al.*, 2003) et le glycérol (Hauser & Karnovsky, 1954, 1957). Tel que mentionné plus haut, les sucres chez *P. aeruginosa* sont métabolisés par la voie d'Entner-Doudoroff, tandis que le métabolisme du glycérol requiert des enzymes codées par le régulon *glp* qui facilitent son transport et sa conversion en glyceraldéhyde-3-phosphate (G3P) (Schweizer & Po, 1996). Le G3P constitue un métabolite intermédiaire des voies glycolytiques qui peut ultérieurement être recyclé dans le cycle glycolytique central ou poursuivre son oxydation jusqu'au pyruvate (Fig. 2.1) (Banerjee, 1989, Lessie & Phibbs, 1984).

Particulièrement, dans un contexte d'infection pulmonaire, *P. aeruginosa* doit mettre en place diverses stratégies d'adaptation. Ceci implique l'ajustement des voies métaboliques pour ainsi assimiler des nutriments disponibles dans l'environnement de l'hôte. Dans ce contexte, la phosphatidylcholine, un constituant majeur du surfactant pulmonaire (Bernhard *et al.*, 2001), a été signalé comme une source potentielle de nutriments utilisée par *P. aeruginosa* lors du processus infectieux dans le poumon (Son *et al.*, 2007). En effet, l'hydrolyse enzymatique d'une molécule de phosphatidylcholine fournit deux sources principales de carbone, deux acides gras à chaîne longue et une molécule de glycérol, des composés qui sont facilement utilisés par cette bactérie. De plus, chez *P. aeruginosa*, la phosphatidylcholine induit, *in vivo* et *in vitro*, l'expression d'une trentaine de gènes impliqués dans la dégradation lipidique et leur

assimilation, incluant des phospholipases et des lipases ainsi que des enzymes du métabolisme des acides gras (*fadD1*, *fadD2*, *fadA5* et *fadB5*), du glycérol (*glp*) et de la choline (*bet*) (Son *et al.*, 2007).



**Figure 2.1. Métabolisme des sucres chez les bactéries du genre *Pseudomonas* par la voie d'Entner-Doudoroff.**

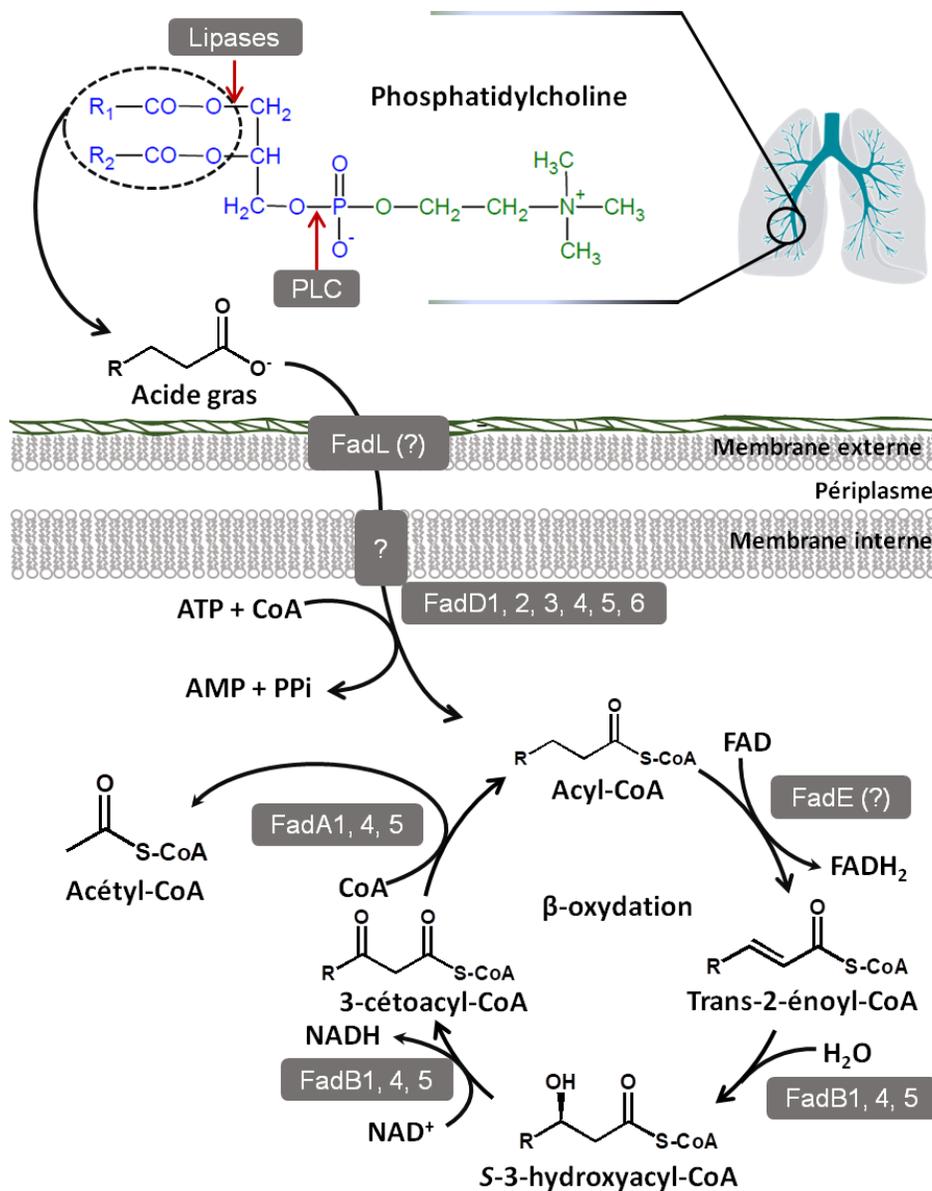
La voie d'Entner-Doudoroff est indiquée en rouge. Figure modifiée de Temple *et al.* (1990). Gcd : Glucose déshydrogénase, Gad : Gluconate déshydrogénase, Mdh : Mannitol déshydrogénase, Sdh : Sorbitol déshydrogénase, Glk : Glucokinase, Zwf : Glucose-6-phosphate déshydrogénase, GnuK : Gluconokinase, KguK : 2-cétogluconate kinase, KguD : 2-cétogluconate-6-phosphate réductase, Edd : 6-phosphogluconate déshydratase, Eda : 2-céto-3-déoxy-6-phosphogluconate aldolase, Pgi : Glucose-6-phosphate isomérase, Fbp : Fructose-1,6-biphosphatase, Fda : Fructose-1,3-biphosphate aldolase, Fpk : Fructose-1-phosphate kinase, Frk : Fructokinase, PTS : Système de transport phosphotransférase de fructose, GntP : Transporteur de gluconate, KguT : Transporteur 2-cétogluconate, Tpi : Triose phosphate isomérase, Gap : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, Pkg : 3-phosphoglycérate kinase, Pgm : Phosphoglycérate mutase, Eno : Énolase, Pyk : Pyruvate kinase, PEP : Phosphoénol-pyruvate, G3P : Glycéraldéhyde-3-phosphate, G-1,3-biP : Glycéraldéhyde-1,3-biphosphate, 3PG : 3-Phosphoglycérate, 2PG : 2-Phosphoglycérate, GlpF : Glycerol diffusion facilitator, GlpK : Glycérol kinase cytoplasmique, GlpD : glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase, DHAP : Dihydroxyacétone phosphate, MI : Membrane interne, ME : Membrane externe.

Il est à noter que l'activation de mécanismes permettant l'assimilation des acides gras dans un site d'infection contribue à la virulence de *P. aeruginosa* puisque, *via* la  $\beta$ -oxydation, la bactérie arrive à s'approvisionner pour son métabolisme cellulaire, ce qui résulte en une augmentation de la densité bactérienne et de la production de molécules de signalisation incluant des facteurs de virulence. Cependant, malgré la contribution de la  $\beta$ -oxydation à la

virulence de *P. aeruginosa* (Kang *et al.*, 2010), cette voie métabolique n'est pas complètement caractérisée. Présentement, le mécanisme proposé pour la dégradation des acides gras chez cette bactérie est surtout basé sur la  $\beta$ -oxydation d'*E. coli*, où la fonction des gènes *fadL*, *fadD*, *fadE* et *fadBA* a bien été élucidée (Black, 1988, Black & DiRusso, 1994, Black *et al.*, 1992, Campbell & Cronan, 2002, Pramanik *et al.*, 1979).

Concernant la régulation de la  $\beta$ -oxydation chez *E. coli*, FadR agit comme régulateur transcriptionnel des gènes *fadL*, *fadD*, *fadE* et *fadBA*, tandis que chez *P. aeruginosa*, aucun régulateur central de type FadR n'a été identifié. Seuls les gènes *fadE* et *fadBA5* sont régulés par le senseur d'acides gras PsrA (Kang *et al.*, 2008, Wells *et al.*, 2017).

Par ailleurs, lors de la découverte de six homologues de *fadD* (Kang *et al.*, 2010, Zarzycki-Siek *et al.*, 2013), il a été suggéré que la présence de multiples acyl-CoA synthétases contribuerait à une dégradation différentielle des acides gras étroitement associée à la dégradation de composés lipidiques comme les terpènes acycliques dérivés des plantes (Kang *et al.*, 2010, Zarzycki-Siek *et al.*, 2013). Cette versatilité remarquable n'est pas surprenante compte tenu du fait que *P. aeruginosa* possède 6 à 8 fois plus de gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras que *E. coli* (Stover *et al.*, 2000), ce qui suggère un niveau de complexité plus important des mécanismes d'assimilation et de dégradation des composés lipidiques. Visiblement, cette apparente redondance génétique semble être à la base d'une meilleure capacité métabolique à utiliser les acides gras comme source de nutriments, conférant ainsi une meilleure habileté d'adaptation à un environnement riche en ces composés (Fig. 2.2) (Son *et al.*, 2008).



**Figure 2.2. Mécanisme proposé pour la dégradation des acides gras via le  $\beta$ -oxydation chez *P. aeruginosa*.**

Le mécanisme est basé sur le  $\beta$ -oxydation d'*E. coli*. Modifié de Kang *et al.* (2010) et Zarzycki-Siek *et al.* (2013). La phosphatidylcholine est clivée par la phospholipase C (PLC) de *P. aeruginosa*. Cette bactérie possède trois PLC (codées par les gènes *plcH*, *plcN* et *plcB*) (Barker *et al.*, 2004). Le diglycéride obtenu peut être hydrolysé par des lipases comme LipA et LipH, dont l'expression est induite par la présence d'acide gras  $C_{16}$  (Son *et al.*, 2007). Les acides gras libérés seraient transportés à travers la membrane externe par une enzyme de type FadL (Black, 1988). Le transport des acides gras à travers la membrane interne serait médiée par un mécanisme impliquant une protéine de type FadD (Dirusso & Black, 2004). Les acides gras sont activés en acyl-CoA par FadD1, 2, 3, 4, 5 ou 6 (Zarzycki-Siek *et al.*, 2013). FadE catalyse la première réaction de la  $\beta$ -oxydation, la déshydrogénation de l'acyl-CoA en 2-énoyl-CoA (Campbell & Cronan, 2002). Un homologue de *fadE* a été récemment identifié chez *P. aeruginosa* (Wells *et al.*, 2017). FadB possède deux activités catalytiques, énoyl-CoA hydratase et 3-hydroxyacyl-CoA épimérase. Cette enzyme catalyse la formation de 3-oxoacyl-CoA à partir d'énoyl-CoA via le L-3-hydroxyacyl-CoA (Yang *et al.*, 1988). FadA: catalyse la dernière réaction du cycle permettant l'obtention de l'acétyl-CoA à partir du 3-céto-acyl-CoA (Binstock *et al.*, 1977). Cinq opérons *fadBA* ont été identifiés chez *P. aeruginosa*. Cependant, seulement *fadBA1*, 4 et 5 semblent impliqués dans le métabolisme d'acides gras à chaîne moyenne et longue (Kang *et al.*, 2008, Son *et al.*, 2008, Sun *et al.*, 2014).

### 2.1.2 La $\beta$ -oxydation favorise la production des rhamnolipides

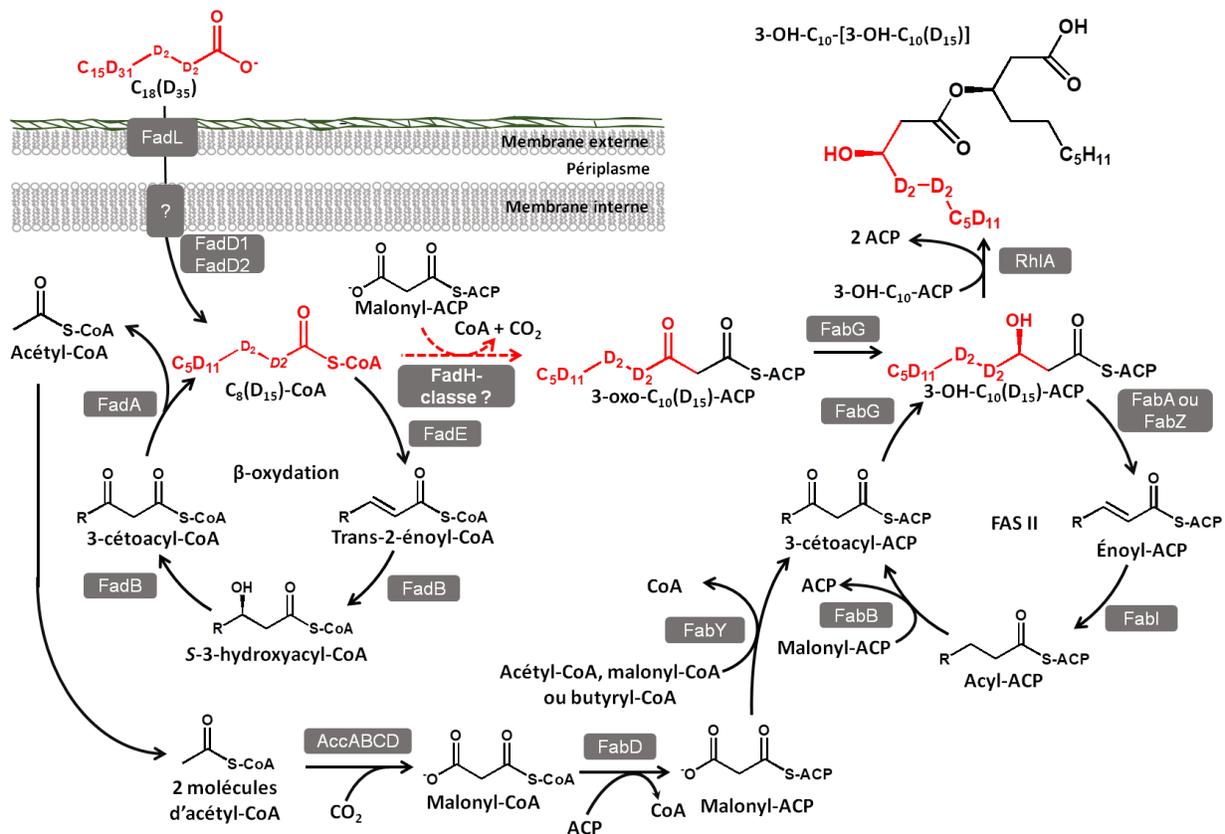
Plusieurs études ont mis en évidence un lien métabolique direct entre la  $\beta$ -oxydation et la synthèse des rhamnolipides. Par exemple :

- i. la production de rhamnolipides est augmentée lorsque le milieu de culture est supplémenté avec des acides gras qui sont métabolisés *via* la  $\beta$ -oxydation (Hori *et al.*, 2002, Zhang *et al.*, 2012),
- ii. la supplémentation avec des acides gras comportant un nombre impair de carbone produit des rhamnolipides ayant un nombre de carbones pair et impair (Hori *et al.*, 2011, Irerere *et al.*, 2018), et
- iii. un mutant *fadD2* présente une diminution de la production de rhamnolipides (Kang *et al.*, 2010). En effet, FadD1, D2, D3, D4, D5 et D6 sont des acyl-CoA synthétases impliquées dans l'activation des acides gras par condensation de la coenzyme-A, une étape nécessaire pour que les acides gras puissent être métabolisés *via* la  $\beta$ -oxydation (Fig. 2.2) (Kang *et al.*, 2010, Zarzycki-Siek *et al.*, 2013). En conséquence, si cette première étape d'activation est bloquée, le flux de carbone vers la  $\beta$ -oxydation est diminué, ainsi que l'approvisionnement des composés intermédiaires qui sont détournés vers d'autres voies métaboliques.

### 2.1.3 La $\beta$ -oxydation fournit des précurseurs lipidiques pour la biosynthèse des HAA

Récemment, deux articles ont rapporté des études sur la biosynthèse de rhamnolipides sous des conditions stimulant la voie de la  $\beta$ -oxydation. Premièrement, Zhang *et al.* (2012) ont suivi l'oxydation des acides gras et leur incorporation dans les rhamnolipides dans une culture de *P. aeruginosa* supplémentée avec du glucose et de l'acide octadécanoïque complètement marqué au deutérium ( $C_{18}D_{35}$ ) comme les seules sources de carbone. L'analyse des congénères de rhamnolipides par spectrométrie de masse a suggéré qu'ensemble la voie FAS II et la  $\beta$ -oxydation, contribuaient à l'approvisionnement des précurseurs lipidiques pour la biosynthèse de rhamnolipides. En effet, cette conclusion dérive du fait que la distribution du deutérium dans une chaîne carbonée de rhamnolipides suit principalement deux patrons. Le premier patron correspondait à l'incorporation d'un ou deux deutériums ( $-d_1$  ou  $-d_2$ ) dans une chaîne carbonée Rha- $C_{10}$ - $C_{10}$  alors que le deuxième présentait l'incorporation de 15 deutériums ( $-d_{15}$ ). Or, si le  $C_{18}D_{35}$  est complètement métabolisé par la  $\beta$ -oxydation en acétyl-CoA, l'utilisation

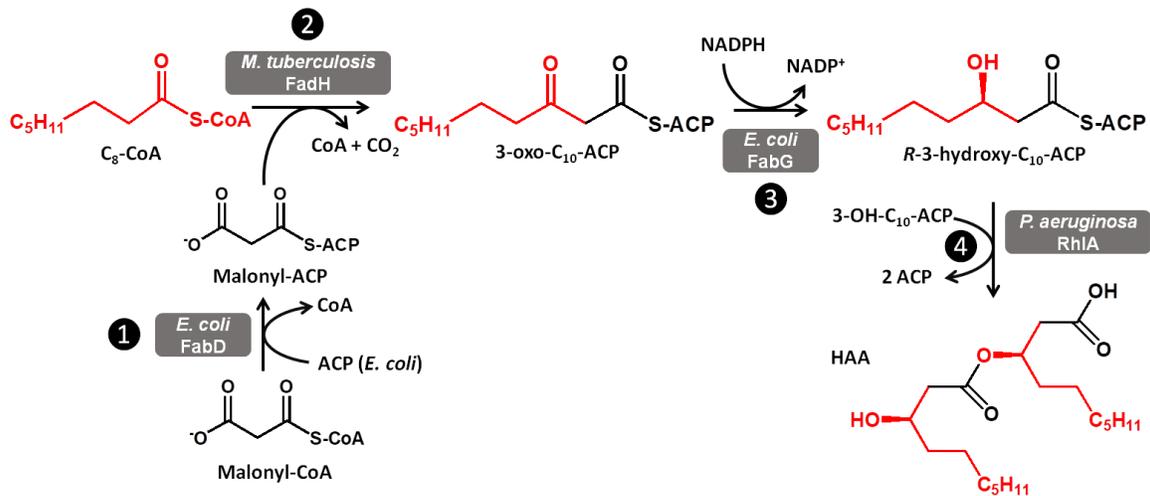
de celui-ci par la voie FAS II donnerait des isotopologues ayant incorporé de 0 à 8 deutériums, ce qui correspondrait avec le premier patron de congénères observés expérimentalement. En conséquence le deuxième patron observé ne pouvait pas provenir de la voie FAS II mais probablement de la  $\beta$ -oxydation. Afin d'expliquer le marquage  $C_{10}(d_{15})$  observé, les auteurs ont proposé l'existence d'un mécanisme de pontage permettant aux intermédiaires acyl-CoA de la  $\beta$ -oxydation de passer à la voie FAS II. Plus spécifiquement, l'intermédiaire devrait être le  $C_8$ -CoA (Fig. 2.3). En effet, la condensation d'une molécule d'octanoyl-CoA avec une molécule de malonyl-ACP par une enzyme putative de type FabH (3-oxoacyl-[ACP] synthase 3) donnerait un 3-cétodécanyl-ACP, un intermédiaire de la voie FAS II qui serait ultérieurement converti en 3-hydroxydécanyl-ACP par FabG pour finalement être utilisé par RhlA pour la synthèse des HAA. Aussi, la détection d'autres congénères comme le  $C_{10}$ - $C_{10}(d_{30})$ ,  $C_{10}$ - $C_{12}(d_{15})$ ,  $C_{10}$ - $C_{12:1}(d_{15})$ ,  $C_{10}$ - $C_{12}(d_{16})$ ,  $C_{10}$ - $C_{12}(d_{17})$ ,  $C_{10}$ - $C_{12}(d_{30})$  et  $C_{10}$ - $C_{12}(d_{31})$  pouvait s'expliquer par le même mécanisme postulé (Zhang *et al.*, 2012).



**Figure 2.3. Modèle de biosynthèse de rhamnolipides proposé par Zhang *et al.* (2012).**

Une enzyme hypothétique de type FabH permettrait de détourner le  $C_8$ -CoA de la  $\beta$ -oxydation vers la voie FAS II. Ceci expliquerait le marquage  $C_{10}$ - $C_{10}(d_{15})$  observé lorsque l'acide  $C_{18}d_{35}$  et le glucose deutéré sont utilisés comme sources de carbone exclusives. Modifié de Zhang *et al.* (2012).

Bien que le mécanisme enzymatique proposé par les auteurs n'ait pas été démontré expérimentalement dans le cadre de leur étude, une approche enzymatique similaire a déjà été utilisée pour la synthèse *in vitro* du précurseur *R*-3-hydroxydécanyl-ACP, permettant ainsi la synthèse de HAA (Fig. 2.4) (Zhu & Rock, 2008a). Toutefois, une autre alternative enzymatique pourrait expliquer le marquage observé lors de l'étude effectuée par Zhang *et al.* (2012). Ainsi, le transfert du groupement acyle de la coenzyme A (notamment à partir d'un C<sub>8</sub>-CoA) à une molécule d'ACP (de l'anglais *acyl carrier protein*) par une enzyme de type acyl-CoA:ACP transacylase permettrait la migration des composés de la  $\beta$ -oxydation à la voie FAS II. Néanmoins, des enzymes dotées de ce rôle catalytique n'ont pas été encore identifiées chez *P. aeruginosa*.



**Figure 2.4. Étapes de la synthèse enzymatique *in vitro* de *R*-3-hydroxydécanyl-ACP comme précurseur lipidique des HAA à partir de l'octanoyl-CoA et du malonyl-ACP.**

En rouge, l'incorporation de l'octanyle dans la molécule de HAA, inspiré du mécanisme proposé par Zhu & Rock (2008). Réaction 1: conversion de malonyl-CoA en malonyl-ACP par l'enzyme FabD d'*E. coli*. Réaction 2: Condensation du C<sub>8</sub>-CoA avec le malonyl-ACP par l'enzyme FadH de *M. tuberculosis*. Réaction 3: Réduction du 3-oxodécanyl-ACP en 3-hydroxydécanyl-ACP par l'enzyme FabG d'*E. coli*. Réaction 4: Estérification de deux unités de 3-hydroxydécanyl-ACP par RhlA de *P. aeruginosa*.

### 2.1.3.1 Une $\beta$ -cétocoacyl synthase détourne le C<sub>8</sub>-CoA vers la voie FAS II

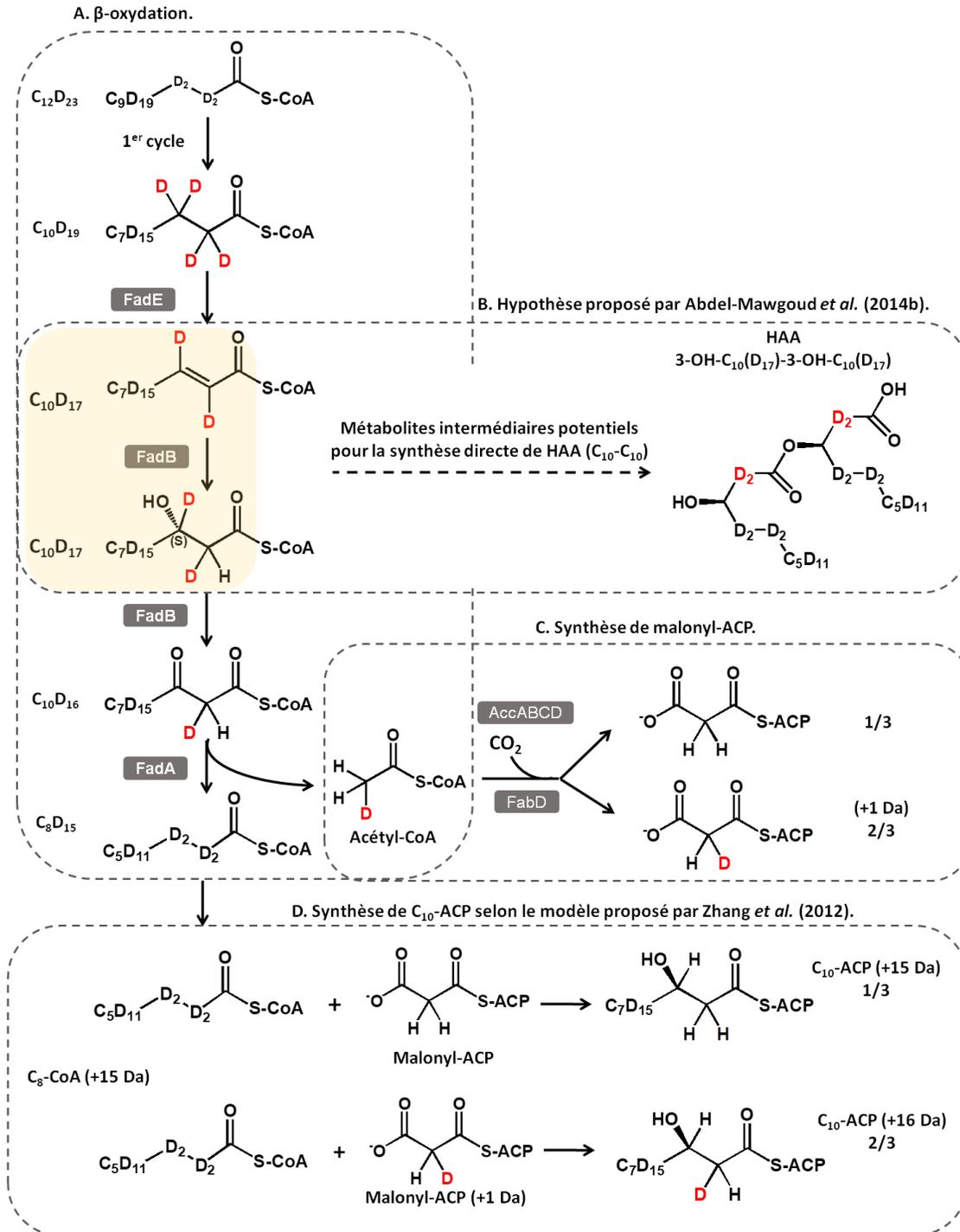
Parallèlement, une étude concernant la synthèse d'acides gras chez *P. aeruginosa* a confirmé l'hypothèse proposée par Zhang *et al.* (2012) selon laquelle il existe un mécanisme de pontage permettant le transfert de métabolites intermédiaires de la  $\beta$ -oxydation vers la voie FAS II. En effet, Yuan *et al.* (2012) ont rapporté que le défaut de croissance observé chez un mutant

*fabY* de *P. aeruginosa* peut être contourné par supplémentation du milieu de culture avec de l'acide décanoïque, ce qui suggérerait un mécanisme compensatoire. Notamment, cette compensation a été observée par supplémentation avec des acides gras à 8 carbones et plus longs. Lors de cette étude, les auteurs ont identifié le gène PA3286 (PA14\_21540 chez PA14) codant pour une  $\beta$ -cétol-ACP synthase III, nommée plus tard FabH3 (Boechat *et al.*, 2013), qui serait responsable de ce détournement. En fait, FabH3 utilise principalement le C<sub>8</sub>-CoA pour catalyser sa condensation avec le malonyl-ACP produisant ainsi le 3-cétodécanyl-ACP, un intermédiaire clé de la voie FAS II qui est capable de ravitailler la cellule pour tous ses besoins en acides gras, incluant la biosynthèse d'acides gras saturés et insaturés, ainsi que le groupement 3-hydroxyacyl des LPS (Yuan *et al.*, 2012a). À cet égard, le C<sub>8</sub>-CoA constituerait un métabolite intermédiaire clé dans la  $\beta$ -oxydation. Toutefois, aucune analyse n'a pour l'instant été réalisée pour déterminer si FabH3 a une implication directe sur la production des HAA.

### 2.1.3.2 Utilisation directe des intermédiaires de la $\beta$ -oxydation pour la synthèse des HAA

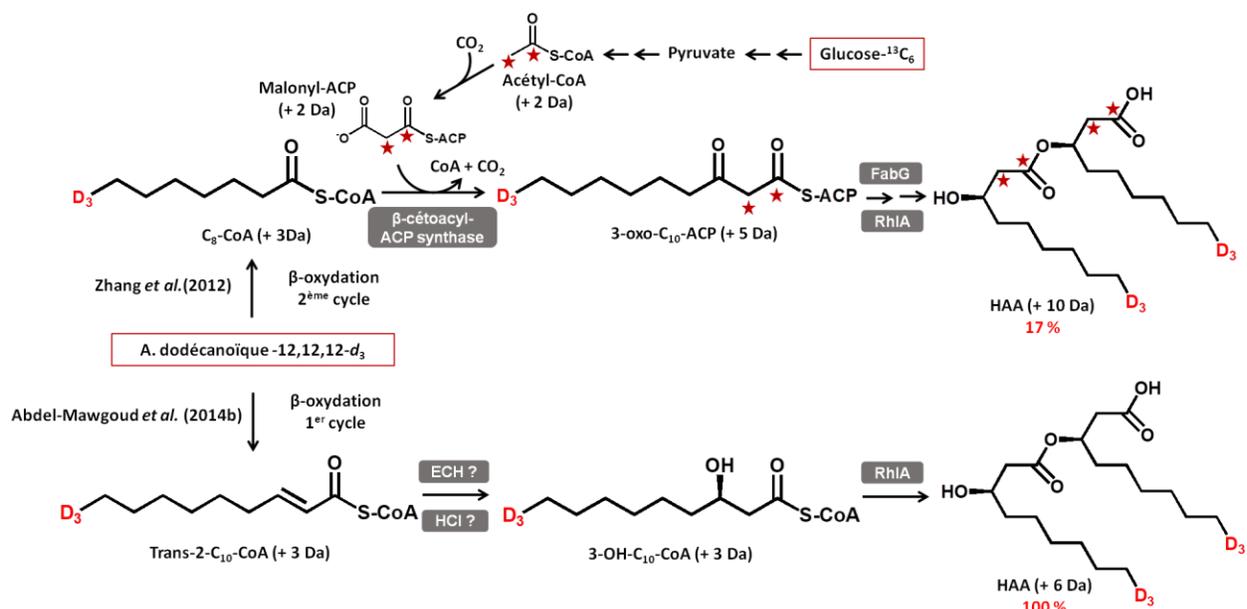
Abdel-Mawgoud *et al.* (2014b) ont également investigué la contribution de la  $\beta$ -oxydation comme source directe de précurseurs lipidiques pour la biosynthèse de rhamnolipides chez *P. aeruginosa*. D'une part, cette étude a montré que l'inhibition de la  $\beta$ -oxydation avec l'acide 2-bromooctanoïque (2-Br-C<sub>8</sub>) réduit d'environ 50% la biosynthèse des HAA et des rhamnolipides. D'autre part, lorsque l'acide dodécanoïque complètement marqué au deutérium (C<sub>12</sub>-d<sub>23</sub>) en combinaison avec du glucose-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> sont utilisés comme sources de carbone exclusives, le marquage isotopique des HAA a révélé que des intermédiaires de la  $\beta$ -oxydation entrent directement dans la synthèse des HAA sans recours essentiel à la voie FAS II (Fig. 2.5 et 2.6). Bien que les deux études présentées (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014b, Zhang *et al.*, 2012) suggèrent l'implication de la  $\beta$ -oxydation dans la biosynthèse des rhamnolipides, il existe des différences radicales dans leurs observations et conclusions respectives, particulièrement en ce qui concerne le marquage des isotopologues observé et la canalisation des intermédiaires de la  $\beta$ -oxydation vers la biosynthèse des HAA.

Lors de la supplémentation avec l'acide dodécanoïque deutéré (C<sub>12</sub>-d<sub>23</sub>) comme seule source de carbone, Abdel-Mawgoud *et al.* (2014b) ont observé que le marquage de chaque unité de 3-hydroxydécanoate des HAA correspondait majoritairement à +17 Da, indiquant qu'un métabolite intermédiaire de l'oxydation du C<sub>10</sub>-CoA était directement utilisé pour la synthèse des dilipides sans passer par la voie FAS II.



**Figure 2.5. Modèle expliquant la distribution isotopique observée lorsque l'acide dodécanoïque deutéré (C<sub>12</sub>-d<sub>23</sub>) est utilisé comme seule source de carbone.**

Adapté d'Abdel-Mawgoud *et al.* (2014b). A. Distribution du marquage isotopique pendant un cycle d'oxydation du C<sub>10</sub>-CoA (+19 Da). B. L'hypothèse proposée par Abdel-Mawgoud *et al.* (2014b) selon laquelle un métabolite intermédiaire de l'oxydation du C<sub>10</sub>-CoA pourrait contribuer directement à la biosynthèse de HAA, ce qui expliquerait le marquage isotopique des chaînes carbonées de +17 Da. C. La biosynthèse du malonyl-ACP à partir de l'acétyl-CoA (+1 Da) produit pendant l'oxydation complète du C<sub>12</sub>-d<sub>23</sub>-CoA. D. La biosynthèse des C<sub>10</sub>-ACP selon le modèle de pontage proposé par Zhang *et al.* (2012) qui expliquerait la présence des HAA avec des chaînes carbonées ayant un marquage +15 Da et +16 Da.



**Figure 2.6. Schéma représentant les deux marquages plus abondants observés des dilipides C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> lorsqu'une culture de *P. aeruginosa* est effectuée en utilisant l'acide dodécanoïque-12,12,12-*d*<sub>3</sub> et le glucose-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> comme seules sources de carbone.**

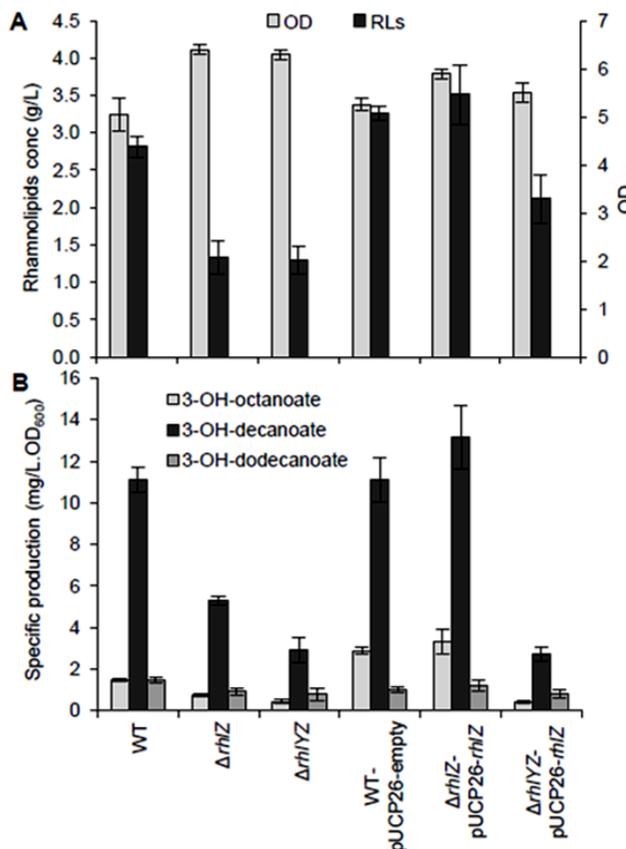
D'après les observations d'Abdel-Mawgoud *et al.* (2014b). ECH : Énoyl-CoA hydratase. HCl : 3-hydroxyacyl-CoA isomérase. Les astérisques en rouge représentent les carbones <sup>13</sup>C.

Par contre, un marquage indiquant un possible passage des intermédiaires par la voie FAS II a également été observé (+15 Da et +16 Da) avec une abondance relative respective de 43% et 26% par rapport à l'intensité du marquage +17 Da (Fig. 2.5) (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014b). Par ailleurs, lors de l'étude effectuée par Zhang *et al.* (2012), des isotopologues C<sub>10</sub>(D<sub>17</sub>) ont été aussi détectés, mais avec une participation relative de seulement 20%. La différence de marquage observée lors de ces deux études reste inexpliquée. Or, il est possible que plusieurs mécanismes d'approvisionnement des précurseurs lipidiques pour la biosynthèse des HAA coexistent.

### 2.1.3.3 Canalisation de l'intermédiaire de la $\beta$ -oxydation vers la biosynthèse des rhamnolipides

Les 3-hydroxyalcanoates des HAA possèdent une chiralité de type *R* exclusivement. Si des molécules intermédiaires de la  $\beta$ -oxydation, comme le *trans*-2-énoyl-CoA ou le *S*-3-hydroxyacyl-CoA, sont détournées pour la synthèse des HAA, celles-ci doivent subir une conversion vers la forme *R*-hydroxyacyle afin de devenir un substrat de la RhlA. En effet, il existe plusieurs gènes prédits codant des énoyl-CoA hydratases mais aucun gène prédit codant une

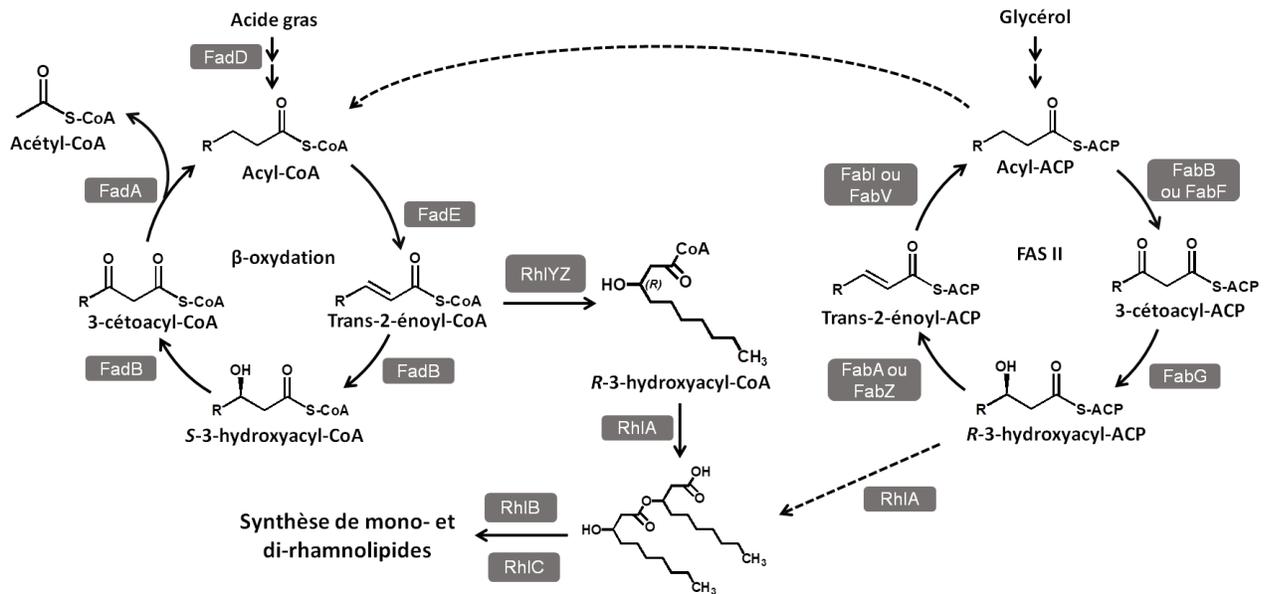
épimérase n'a été identifié au sein du génome bactérien de *P. aeruginosa* (Winsor *et al.*, 2011). Une étude utilisant une approche mutationnelle effectuée par Abdel-Mawgoud *et al.* (2014b) a permis d'identifier trois gènes codant des ényol-CoA hydratases/isomérases (ECH/I). Ces gènes ont été nommés *rhIK*, *rhIY* et *rhIZ*, les deux derniers étant organisés sous forme d'opéron. La délétion de ces gènes aboutit à une diminution de la production de rhamnolipides de 35, 56 et 54%, respectivement. Toutefois, chez un mutant *rhIZ*, la production des rhamnolipides peut être rétablie par complémentation avec un plasmide exprimant de façon constitutive le gène *rhIZ* (Fig. 2.7). Des expériences effectuées *in vitro* avec des protéines purifiées ont confirmé que RhIY et RhIZ forment un complexe enzymatique stable où RhIZ accomplit l'activité ECH/I spécifique en *R*, transformant le 2-décényl-CoA en *R*-3-hydroxydécényl-CoA, un composé ayant la même chiralité que celle des HAA et des rhamnolipides (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014b). De plus, l'expression de l'opéron *rhIYZ* est contrôlée par les systèmes de *quorum sensing las* et spécialement *rhl* (Abdel-Mawgoud, 2014), ce qui appuie l'idée que *rhIYZ* fasse partie intégrante de l'ensemble des gènes impliqués dans l'expression d'enzymes clés pour la biosynthèse des précurseurs des rhamnolipides.



**Figure 2.7. RhIY et RhIZ sont impliquées dans la biosynthèse de rhamnolipides en contrôlant l'approvisionnement des précurseurs lipidiques.**

A. Les mutant  $\Delta rhIYZ$  et  $\Delta rhIZ$  réduisent de façon similaire la production de rhamnolipides. La complémentation du mutant  $\Delta rhIYZ$  avec *rhIZ* rétablit partiellement la production de rhamnolipides. B. RhIYZ est le fournisseur principal de 3-hydroxyalcanoates ( $C_{10\pm 2}$ ) chez PA14. Cultures effectuées en milieu MSM-glycérol à 34°C. L'analyse a été effectuée par GC/MS. Figure tirée d'Abdel-Mawgoud *et al.* (2014b).

À la lumière de ces évidences, Abdel-Mawgoud *et al.* (2014b) ont proposé un modèle métabolique pour l'approvisionnement des précurseurs des HAA (Fig. 2.8). D'après ce modèle, la synthèse des HAA comporterait deux étapes : la première étape impliquant la production d'un *R*-3-hydroxyacyl-CoA par le complexe RhIYZ, et la deuxième étape, qui consiste en la dimérisation de deux acides gras hydroxylés donnant un HAA au moyen d'une catalyse par RhIA. Essentiellement, ce mécanisme propose que l'acide gras hydroxylé activé par la coenzyme A constitue le précurseur lipidique final pour la synthèse des HAA. Toutefois, cette proposition est en contradiction avec l'étude effectuée *in vitro* par Zhu & Rock (2008a) selon laquelle le substrat de RhIA est activé par l'ACP et non par la coenzyme A.



**Figure 2.8. Modèle d'approvisionnement métabolique des précurseurs lipidiques pour la synthèse des HAA proposé par Abdel-Mawgoud *et al.* (2014b).**

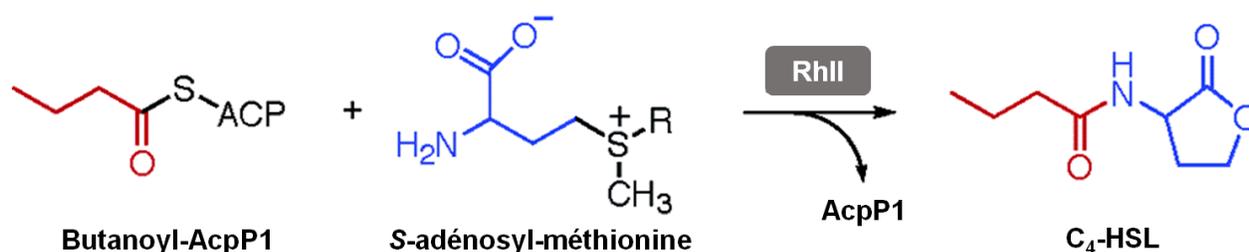
Modifié d'Abdel-Mawgoud *et al.* (2014b). En utilisant un acide gras comme source de carbone, l'intermédiaire *trans*-2-énoyl-CoA est produit au cours de la  $\beta$ -oxydation. Si la source de carbone est un composé soluble comme le glycérol, la voie FAS-II permet la synthèse des acides gras qui sont transférés vers la  $\beta$ -oxydation. Dans les deux cas, le *trans*-2-énoyl-CoA est hydraté par une énoyl-CoA hydratase spécifique pour la chiralité R (RhIYZ) pour former un *R*-3-hydroxyacyl-CoA, qui agit comme le précurseur lipidique direct pour la synthèse des HAA par RhIA, et pour la synthèse de rhamnolipides par RhIB et RhIC. Bien que moins significatif, un précurseur lipidique fourni par la voie FAS II pourrait aussi contribuer à la biosynthèse des rhamnolipides.

#### 2.1.4 Implication des ACP de *P. aeruginosa* dans la production des rhamnolipides

*P. aeruginosa* possède trois cadres de lecture ouverts codant des protéines porteuses d'acyle (ACP), soit AcpP1 (PA2966), AcpP2 (PA1869) et AcpP3 (PA3334), respectivement. Parmi ces trois ACP, le gène *acpP1* est essentiel pour la croissance de *P. aeruginosa* et ne peut pas être enlevé. Par contre, des mutations délétères des gènes *acpP2* et *acpP3* n'affectent ni la croissance, ni la composition des phospholipides membranaires (Ma *et al.*, 2017). Les observations de Ma *et al.* (2017) ont montré que seulement les intermédiaires acyl-AcpP1 sont des substrats pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse d'acides gras (FAS II). Par ailleurs, ces chercheurs ont investigué le rôle des trois ACP dans la biosynthèse des métabolites secondaires, qui requiert un approvisionnement en acides gras sous forme d'acyl-ACP. En particulier, la production des molécules de signalisation des systèmes de *quorum sensing las* (3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL), *rhl* (C<sub>4</sub>-HSL) et *pqs* (3,4-dihydroxy-2-heptyl quinoline), ainsi que la production de rhamnolipides a été étudiée chez les simples mutants PAO1Δ*acpP1*::*acpP<sub>Ec</sub>*, PAO1Δ*acpP2*, PAO1Δ*acpP3* et le double mutant PAO1Δ*acpP2*Δ*acpP3*. La délétion des gènes *acpP2* et *acpP3*, seuls ou ensemble, n'affecte pas la production de ces molécules, alors que l'échange allélique du gène *acpP1* par le gène *acpP* d'*E. coli* (PAO1Δ*acpP1*::*acpP<sub>Ec</sub>*) montre des réductions significatives pour les molécules de signalisation investiguées. Par ailleurs, chez le mutant PAO1Δ*acpP1*::*acpP<sub>Ec</sub>* la motilité de type *swarming* est abolie et ce phénotype peut être restauré par l'addition des molécules de signalisation C<sub>4</sub>-HSL ou 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL.

Par ailleurs, le rôle de l'AcpP1 de *P. aeruginosa* dans la biosynthèse du C<sub>4</sub>-HSL a aussi été confirmé *in vitro*. Raychaudhuri *et al.* (2005) ont en effet montré que seulement l'AcpP1 constitue la source du groupement acyle dans la réaction catalysée par RhlI (Fig. 2.9). Basé sur ces observations, les auteurs confirment l'implication exclusive de l'AcpP1 dans la biosynthèse des molécules de signalisation du système de *quorum sensing rhl*, ce qui contribue indirectement à l'établissement des phénotypes qui découlent de l'activation de ce système.

Puisque la production de rhamnolipides est principalement sous le contrôle du système de *quorum sensing rhl*, la diminution de la production de rhamnolipides chez le mutant PAO1Δ*acpP1*::*acpP<sub>Ec</sub>* est probablement liée à un effet indirect de la diminution de la biosynthèse du C<sub>4</sub>-HSL. En effet, ce signal module l'activation du régulateur RhlR et la transcription des gènes clés dans la biosynthèse des rhamnolipides. Toutefois, étant donné qu'une molécule d'ACP fournit le groupement acyle pour la synthèse des HAA (Zhu & Rock, 2008a), il est probable qu'un acyl-AcpP1 soit aussi un substrat directement utilisé par RhlA.



**Figure 2.9. Schéma représentant la biosynthèse du C<sub>4</sub>-HSL par RhII.**

Schéma modifié de Raychaudhuri *et al.* (2005). Une molécule de butanoyl-AcpP1 fournit le groupement acyle, et le S-adenosyl-méthionine fournit l'homosérine lactone.

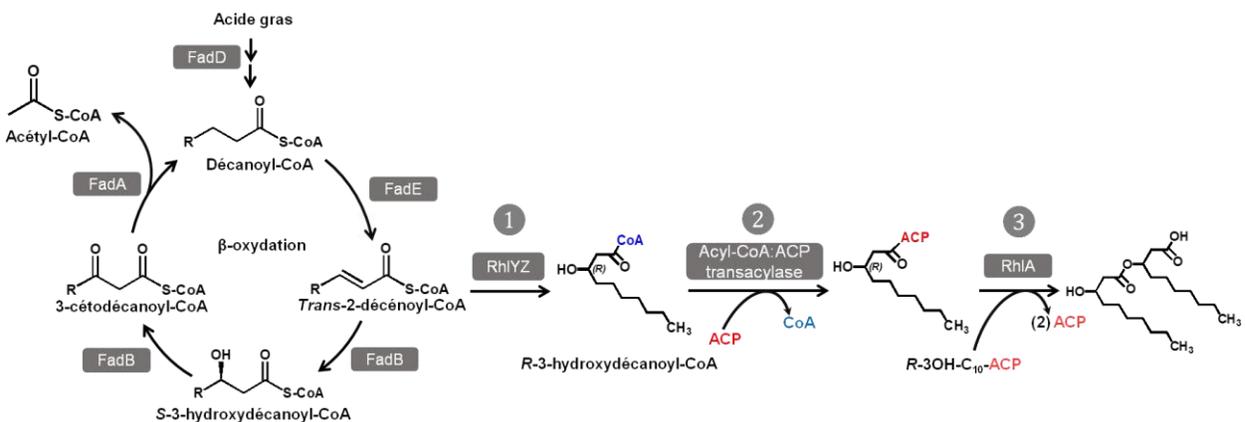
## 2.2 Problématique

L'augmentation de l'utilisation de produits biodégradables dans différents secteurs industriels confère une importance accrue à la production de biosurfactants. Particulièrement, l'intérêt biotechnologique des rhamnolipides encourage la réalisation de nombreuses études visant principalement le développement de méthodes de production plus efficaces, à moindres coûts (Chong & Li, 2017). La biosynthèse des rhamnolipides à partir des HAA a été caractérisé chez la bactérie *P. aeruginosa*. Cependant, le mécanisme métabolique permettant le flux d'acides gras vers la biosynthèse des HAA n'est pas complètement élucidé. Évidemment, une meilleure compréhension de ce mécanisme est nécessaire afin d'investiguer des méthodes plus efficaces pour la production de rhamnolipides et/ou des HAA chez les bactéries productrices.

Les études effectuées par Zhang *et al.* (2012) et Abdel-Mawgoud *et al.* (2014b) ont démontré que la  $\beta$ -oxydation joue un rôle central dans la biosynthèse des rhamnolipides. Indépendamment de la source de carbone utilisée, la  $\beta$ -oxydation constitue la principale source d'acides gras pour la synthèse des HAA. Cependant, les deux études mentionnées (Abdel-Mawgoud *et al.* 2014b; Zhang *et al.* 2012) ont postulé des mécanismes différents pour le transfert des intermédiaires lipidiques à partir de la  $\beta$ -oxydation. Pourtant, aucune de ces études n'a complètement confirmé la biosynthèse des HAA par les mécanismes enzymatiques proposés. En conséquence, des études enzymatiques supplémentaires sont nécessaires afin de caractériser le processus de transfert des intermédiaires de la  $\beta$ -oxydation vers la synthèse des rhamnolipides.

## 2.3 Hypothèse

Les évidences montrant que la  $\beta$ -oxydation est la source directe des précurseurs lipidiques des rhamnolipides et que ces précurseurs se trouvent activés sous forme de -ACP nous a mis face au défi d'élaborer une explication mécanistique de la canalisation du *R*-3-hydroxyacyl-CoA dérivé de l'activité énoyl-CoA isomérase/réductase de RhlYZ vers la biosynthèse des HAA. La biosynthèse des HAA *via* l'approvisionnement direct des précurseurs de la  $\beta$ -oxydation est un mécanisme enzymatique à trois étapes. En effet, la première réaction requiert une activité énoyl-CoA hydratase/isomérase pour la conversion du 2-énoyl-CoA en *R*-3-hydroxyacyl-CoA (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014b). Dans la deuxième réaction, une enzyme de type acyl-CoA:ACP transacylase (encore inconnue) transfère le groupement *R*-3-hydroxyacyle de la coenzyme A à une molécule d'ACP, permettant ainsi de générer le précurseur final, le *R*-3-hydroxyacyl-ACP qui est utilisé lors de la troisième réaction par RhlA pour la synthèse des HAA (Fig. 2.10) (Zhu & Rock, 2008a). Chez *P. aeruginosa*, il existe un mécanisme alternatif pour l'activation de la voie FAS II à partir d'un intermédiaire de la  $\beta$ -oxydation. Ce rôle est essentiellement attribué à une enzyme  $\beta$ -cétoacyl-ACP synthase rapportée par Yuan *et al.* (2012). Cependant, à l'heure actuelle, aucun gène codant une acyl-CoA:ACP transacylase n'a été identifié dans le génome de cette bactérie. Puisque des enzymes capables de lier les acyl-CoA à chaîne aliphatique moyenne ( $C_8$ - $C_{14}$ ) à l'ACP a été identifiée chez d'autres bactéries comme, par exemple, l'enzyme AasS de *Vibrio harveyi* B392 (Jiang *et al.*, 2010), il est possible que cette activité catalytique soit présente chez *P. aeruginosa*, utilisant des acides gras hydroxylés comme substrat, ce qui validerait le mécanisme enzymatique proposé (Fig. 2.10).



**Figure 2.10. Modèle proposé pour la synthèse du précurseur *R*-3-hydroxyacyl-ACP à partir du *trans*-2-énoyl-CoA, un intermédiaire de la  $\beta$ -oxydation.**

Une enzyme acyl-CoA:ACP transacylase est nécessaire pour catalyser la deuxième réaction, le transfert du groupement acyle hydroxylé à une molécule d'ACP.

## 2.4 Objectifs du chapitre

L'objectif principal de ce chapitre est de caractériser la manière dont les intermédiaires de la  $\beta$ -oxydation deviennent le substrat de RhIA pour la synthèse des HAA chez *P. aeruginosa*. Les objectifs spécifiques du chapitre consistent à :

- i. Déterminer l'implication de FabH3 dans la synthèse des rhamnolipides.
- ii. Déterminer si FabH3 affecte la disponibilité métabolique de l'octanoyl-CoA.
- iii. Déterminer si l'octanoyl-CoA est préférentiellement utilisé pour la synthèse des HAA par rapport au dodécanoyl-CoA.
- iv. Identifier des enzymes putatives ayant potentiellement une activité acyl-CoA:ACP transacylase au sein du génome de *P. aeruginosa*.
- v. Déterminer si l'AcpP1 peut être acylé avec le *R*-3-OH-C<sub>10</sub>-CoA.
- vi. Déterminer si l'excès de *R*-3-OH-C<sub>10</sub>-CoA dans un extrait cellulaire de PA14 abouti à la synthèse des HAA.

## 2.5 Contributions à ce travail de recherche

Sous la direction du Dr. Éric Déziel, Carlos Dulcey a produit l'hypothèse, les objectifs et a conçu entièrement la méthodologie pour la réalisation de ce chapitre. Toutes les expériences présentées dans ce chapitre et l'analyse des résultats ont été réalisés par Carlos Dulcey. La synthèse du *R*-3-OH-C<sub>10</sub>-CoA et les analyses effectuées par MALDI TOF-MS ont été réalisés avec le support technique de l'assistante de recherche Myriam Letourneau. Toutes les figures présentées dans ce chapitre ont été produites par Carlos Dulcey.

## 2.6 Méthodologie et approche globale

Dans un premier temps, nous allons évaluer l'hypothèse posée par Zhang *et al.* (2012) selon laquelle une enzyme de type  $\beta$ -cétol-ACP synthase comme FabH3 est nécessaire pour la synthèse des HAA à partir du C<sub>8</sub>-CoA provenant de la  $\beta$ -oxydation. Pour ce faire, nous allons quantifier et comparer la production de rhamnolipides chez le mutant

PA14\_ *fabH3*::Tn*PhoA* avec PA14. Afin de déterminer si FabH3 et RhIYZ sont les seules voies d'approvisionnement des précurseurs pour la synthèse des HAA nous allons aussi vérifier si la production de rhamnolipides peut être complètement bloquée chez le triple mutant PA14\_ *fabH3*::Tn*PhoA*Δ\_ *rhIYZ*. Ensuite, en faisant un repérage isotopique à l'aide de sources de carbone marquées nous allons évaluer l'existence d'autres mécanismes métaboliques permettant l'approvisionnement des précurseurs des HAA.

Parallèlement, une étude comparative par homologie de séquence de l'enzyme AasS de *Vibrio harveyi* B392 sera effectuée afin d'identifier des enzymes potentielles de type acyl-CoA:ACP transacylase chez *P. aeruginosa*. L'implication de gènes codant ces enzymes sur la production des rhamnolipides sera également investiguée. Finalement, afin de vérifier notre hypothèse selon laquelle une molécule d'ACP peut être acylée à partir d'un acide gras hydroxylé, des tests enzymatiques d'acylation et de synthèse de HAA seront effectués *in vitro*.

## **2.7 Matériel et méthodes**

### **2.7.1 Souches et plasmides**

La souche modèle utilisée pour le développement de cette étude est *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14. Les tableaux supplémentaires 2.1 et 2.2 reprennent respectivement la liste de souches et des plasmides utilisés.

### **2.7.2 Conditions de culture**

Les milieux de culture utilisés ont été supplémentés avec une concentration appropriée d'antibiotiques au besoin (Tableau 2.1). Sauf indication contraire, les cultures bactériennes ont été incubées à 37°C dans un tambour rotatif TC-7 roller drum (New Brunswick, USA) à 90-110 rotations/minute.

Les conditions utilisées pour les différences expériences réalisées en milieu liquide sont présentées dans le tableau 2.2.

**Tableau 2.1. Concentrations d'antibiotiques utilisées dans les cultures bactériennes en mg/L.**

Souche	Carbénicilline		Kanamycine		Tétracycline		Triclosan	
	Agar	Bouillon	Agar	Bouillon	Agar	Bouillon	Agar	Bouillon
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	250-300	250-300	400	400	125	75	25	25
<i>Escherichia coli</i>	50-100	50-100	30-50	30-50	15-20	15-20	20	20

### 2.7.3 Production de rhamnolipides en milieu isotopique et analyse spectrométrique

La production de rhamnolipides a été effectuée dans 4 mL de milieu MSM supplémenté avec une source de carbone appropriée. Les cultures ont été effectuées à 34°C sous agitation dans un tambour rotatif TC-7 roller drum (New Brunswick, USA) avec 90-110 rotations/minute, pendant 48 h. Un volume de 500 µL de culture a été dilué dans 500 µL de méthanol, un aliquot de 10 µL de standard interne, l'acide 16-hydroxyhexadécanoïque, est ajoutée à une concentration de 2000 ppm et centrifugé à 12000 x g pendant 15 minutes. 40 µL de surnageant a été utilisé pour l'analyse LC/MS en mode négatif selon le protocole de la section 3.12.5.

Pour l'analyse MS/MS, les paramètres utilisés sont : Potentiel sur le capillaire (kV) 3.00, potentiel sur le cône (V) 25, température du bloque chauffant 150°C, température de la buse pour déshydrater 100°C, gaz de collision pour générer les ions filles – de l'argon avec un débit de 0,35 mL/min, l'énergie de collision est de 20 (V) pour toute la liste des ions mère utilisés, résolution utilisée du balayage des basses et hautes masses est de 10,0 et le balayage (recherche des ions filles) est de 130 u.a. à 730 u.a.

### 2.7.4 Construction des plasmides pCD10 à pCD15

Pour la production des protéines recombinantes, l'expression génique a été assistée à l'aide du promoteur T7. Les amorces utilisées pour générer les constructions sont listées dans le tableau supplémentaire 2.3. Les séquences nucléotidiques sont tirées du site [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com). Les constructions plasmidiques ont été maintenues chez *E. coli* DH5α. Toutes les constructions générées ont été vérifiées par séquençage. Sauf indication contraire, l'expression de protéines recombinantes a été effectuée chez la souche *E. coli* BL21(DE3).

**Tableau 2.2. Milieux de culture utilisés pour les différentes expériences effectuées.**

Expérience	Milieu	Composition	Conditions de culture
Biologie moléculaire.	Bouillon lysogénique (LB - Difco™).	10 g/L tryptone, 5 g/L extrait de levure, 10 g/L NaCl, pH 7.0.	37°C sous agitation jusqu'à 24 h.
Production de rhamnolipides en milieu minimal.	Milieu de sels minéraux MSM-glycérol.	15 g/L glycérol, 0.9 g/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0.7 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.1 g/L CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O, 0.4 g/L MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O, 2 g/L NaNO <sub>3</sub> , 2 mL/L solution d'éléments traces (TES), pH 7 ± 0.1.  Composition du TES: 2 g/L FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O, 1.5 g/L MnSO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O, 0.6 g/L (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> •4H <sub>2</sub> O.	34°C sous agitation jusqu'à 144 h.
Production des HAQ en milieu riche.	Bouillon de soya tryptique (TSB - Difco™).	17 g/L tryptone, 3 g/L soytone, 2.5 g/L glucose, 5 g/L NaCl. pH 7.3 ± 0.2.	37°C sous agitation jusqu'à 12 h.
Production de rhamnolipides et des HAQ avec supplémentation avec l'acide octanoïque ou l'acide décanoïque.	Milieu de sels minéraux M9-Acide gras (C <sub>8</sub> ou C <sub>10</sub> )	20 mM acide octanoïque ou 20 mM acide décanoïque, 2 mM MgSO <sub>4</sub> , 0.1 mM CaCl <sub>2</sub> , 100 µM FeSO <sub>4</sub> , 200 mL/L solution de sels.  Solution de sels : 64 g/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O, 15g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2.5 g/L NaCl, 5g/L NH <sub>4</sub> Cl.	37°C sous agitation jusqu'à 36 h.
Tests enzymatiques avec des extraits cellulaires de <i>P. aeruginosa</i> avec supplémentation avec l'acide octadécanoïque.	Milieu de sels minéraux MSM-acide octadécanoïque.	30 mM acide octadécanoïque, 0.9 g/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0.7 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.1 g/L CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O, 0.4 g/L MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O, 2 g/L NaNO <sub>3</sub> , 2 mL/L solution d'éléments trace, pH 7 ± 0.1.  Composition du TES: 2 g/L FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O, 1.5 g/L MnSO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O, 0.6 g/L (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> •4H <sub>2</sub> O.	37°C sous agitation jusqu'à 144 h.
Étude des voies métaboliques alternatives pour l'approvisionnement de précurseurs lipidiques pour la synthèse de HAA avec des sources de carbone marquées aux isotopes.	Milieu MSM-glucose ou glucose- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> .	Milieu MSM supplé avec 15 g/L glucose ou glucose- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> .	34°C sous agitation jusqu'à 72 h.
	Milieu MSM-acide dodécanoïque ou acide dodécanoïque-12,12,12- <i>d</i> <sub>3</sub> .	Milieu MSM supplé avec 20 mM acide dodécanoïque ou acide dodécanoïque-12,12,12- <i>d</i> <sub>3</sub> .	34°C sous agitation jusqu'à 72 h.
	Milieu MSM-glucose-acide dodécanoïque (naturel ou isotopique)	Milieu MSM supplé avec 15 g/L glucose (ou glucose- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ) et 20 mM acide dodécanoïque (ou acide dodécanoïque-12,12,12- <i>d</i> <sub>3</sub> ).	34°C sous agitation jusqu'à 72 h.

Pour la production des protéines AcpP1, AcpP2 et AcpP3 de *P. aeruginosa*, les plasmides pCD10, pCD11 et pCD12, respectivement, ont été construits. Les gènes codant ces protéines (PA14\_25670, PA14\_40310 et PA14\_20940, voir tableau supplémentaire 2.2) ont été clonés dans le plasmide pET28a en utilisant les sites de restriction *NcoII/HindIII* avec une étiquette d'hexa-histidines en position C-terminale.

L'enzyme AcpH (ACP hydrolase) de *P. aeruginosa* a été utilisée pour hydrolyser les acyl-ACP et holo-ACP en apo-ACP. Cette protéine n'a pas été purifiée. Pour la production recombinante de cette protéine, le gène PA14\_56600 a été cloné dans le plasmide pET28a dans les sites *NcoI/EcoRI* sans étiquette. Cette construction a produit le plasmide pCD13 (voir tableau supplémentaire 2.2).

L'enzyme AcpS (phosphopantéthéinyl-transférase) de *P. aeruginosa* a été utilisée pour transférer le groupement 4-phosphopantéthéine de la coenzyme A à l'apo-ACP, donnant un holo-ACP. Pour la production recombinante de cette protéine, le gène PA14\_49340 a été cloné dans le plasmide pET22b(+) dans les sites *NdeI/HindIII* avec une étiquette de hexa-histidines en position C-terminale. Cette construction a produit le plasmide pCD14. Cette protéine a été produite chez la souche *E. coli* Origami™(DE3).

Le gène PA14\_13110 codant l'enzyme FadD6 de *P. aeruginosa* a été cloné dans le plasmide pET16b aux sites de restriction *NdeI/BamHI* avec une étiquette de 10 histidines en position N-terminale. Cette construction a produit le plasmide pCD15 voir tableau supplémentaire 2.2).

### **2.7.5 Expression et purification des protéines recombinantes**

La production des protéines recombinantes a été réalisé selon le protocole suivant : 1 L de milieu LB (sans antibiotique) a été inoculé avec 10 mL de pré-culture d'une souche d'*E. coli* portant le plasmide à exprimer. La culture est incubée à 37°C, à 300 rpm, pendant 2 à 3 h. Lorsque la DO<sub>600</sub> atteint une valeur de 0,5, l'incubation est poursuivie à 15-16 °C jusqu'à DO<sub>600</sub> de 0,8-1,0 (à peu près 1 h à 300 rpm). Ensuite, l'induction est effectuée avec de l'IPTG (Isopropyl-1-thio-D-galactopyranoside) à une concentration finale de 0,1 mM et l'incubation est poursuivie pendant 18 h dans les mêmes conditions. La biomasse est récupérée par

centrifugation à 8000 x g et lavée une fois avec 80 mL d'une solution de PBS (137 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.7 mM KCl, pH 7.4). La biomasse est conservée à -20 °C.

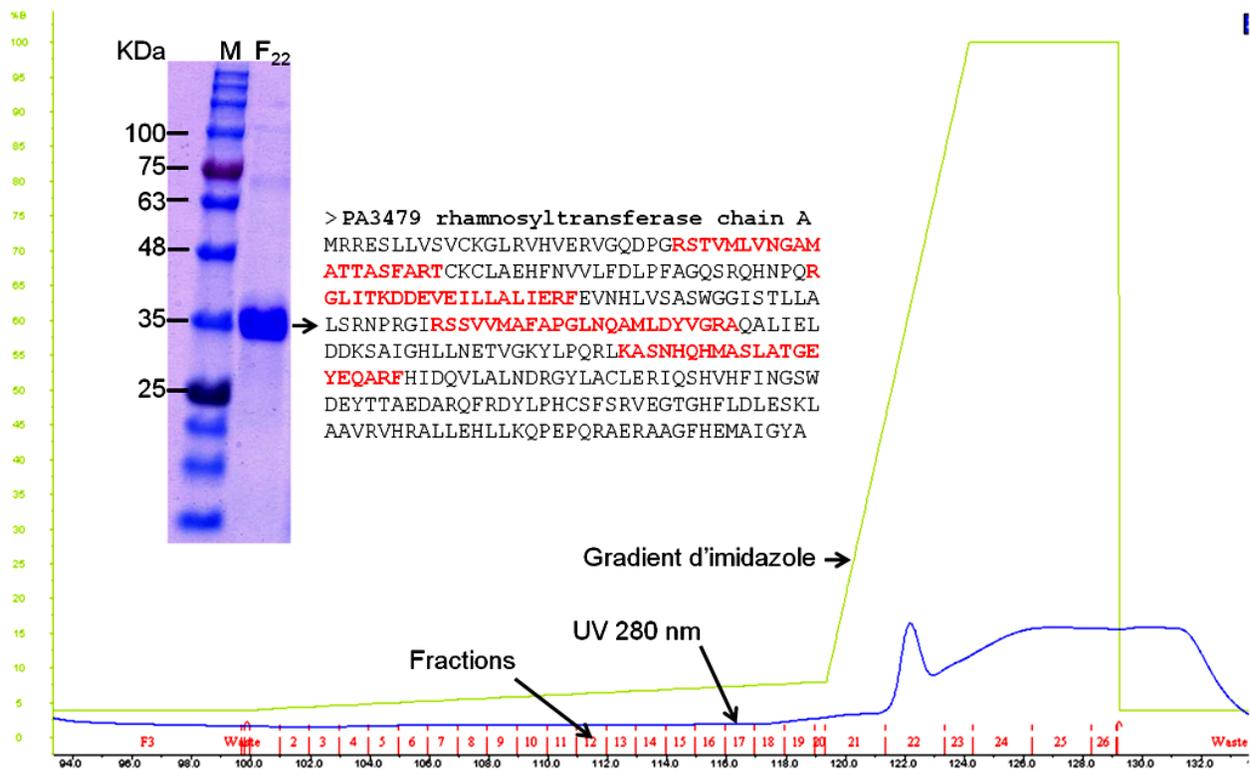
Pour la lyse cellulaire, la biomasse est resuspendue dans 70 mL de tampon de lyse (20 mM HEPES, 0,5 M NaCl, 20 mM imidazole, 1 mM dithiothréitol, pH 8.0). La lyse est effectuée par 5 – 6 cycles de sonication sur glace (Branson sonifier 450, Duty cycle : 30%, Output control : 8). Chaque cycle correspond à 4 périodes de 10 sec de sonication séparées par des intervalles de 10 sec. Une pause de 5 minutes entre les cycles est respectée afin d'éviter l'échauffement du lysat.

La fraction cytoplasmique est séparée par centrifugation à 40 000 x g pendant 1 h à 4°C et filtrée avec une membrane de cellulose de pores de 0,2 µm. Les protéines recombinantes sont purifiées par chromatographie d'affinité en utilisant une colonne Ni-sépharose HisTrap<sup>TM</sup> HP 1 mL (GE Healthcare) en utilisant un système FPLC ÄKTApurifier (GE Healthcare). Les protéines sont éluées en utilisant un gradient d'imidazole 40 mM – 500 mM (Fig. 2.11). Les fractions contenant les protéines sont analysées par électrophorèse SDS-PAGE dans un gel d'acrylamide 12 %. Les protéines purifiées sont dialysées contre un tampon 20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 20 mM EDTA, 10 % glycérol, pH 8,0, pendant 18 h. Après la dialyse les AcpP1, AcpP2 et AcpP3 ont été stockés à 4°C; toutes les autres protéines (RhIA, AcpS, AasS et FadD6) ont été stockés à -80°C. Les résultats de purification des ACP, AcpS et FadD6 sont similaires à celui de la figure 2.11.

### 2.7.6 Synthèse des holo-ACP

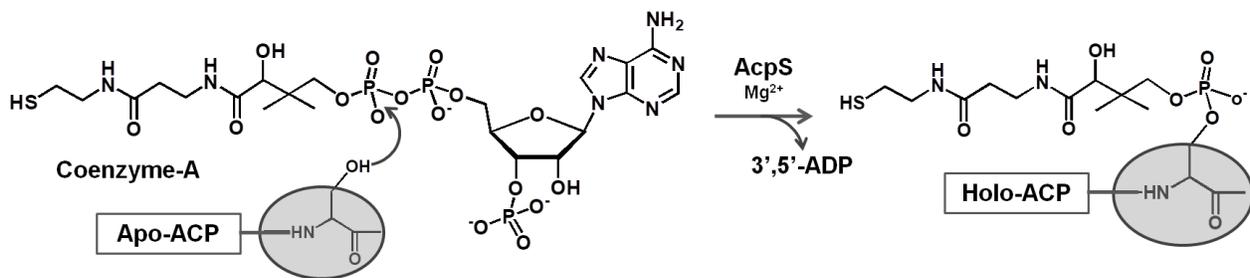
Les ACP purifiées ont été convertie de façon enzymatique en holo-ACP par transfert du groupement 4-phosphopantéthéine à partir de la coenzyme A (Fig. 2.12).

La réaction a été effectuée à 37°C pendant 2 h dans un volume de 50 µL dans un tampon 0,1 M Tris-HCl pH 8.8: 1 mM coenzyme A, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM dithiothréitol, 10 mM ATP, 100 µM ACP purifié, 1 µM AcpS purifiée (Ma *et al.*, 2017). La réaction a été vérifiée en suivant le transfert d'une masse de 340 Da par MALDI-TOF-MS (Tableau 2.3) (Barekzi *et al.*, 2004).



**Figure 2.11. Chromatogramme de la purification de RhIA.**

Chromatogramme montrant le pic d'élué de la protéine 6His-RhIA (N-terminal) dans la fraction 22 (F<sub>22</sub>) à une concentration d'environ 100 mM d'imidazole. Cette figure montre l'analyse de la F<sub>22</sub> sur un gel SDS-PAGE avec une bande principale à environ 35 KDa. Cette bande a été découpée, préparée par digestion tryptique et soumise à analyse peptidique par spectrométrie de masse. L'analyse protéomique a confirmé l'identité de RhIA avec un score de 331, un score >65 indique une probabilité d'identité élevée à une valeur de  $P < 0,05$  (Mascot Analysis). Les peptides identifiés lors de cette analyse sont marqués en rouge.



**Figure 2.12. Schéma de la synthèse de l'holo-ACP.**

Transfert du groupement 4-phosphopantéthéine à partir de la coenzyme-A. La réaction est catalysée par l'enzyme AcpS de *P. aeruginosa*. Modifié de Finking *et al.* (2002).

**Tableau 23. Phosphopantéthéinylation des ACP de *P. aeruginosa*.**

L'analyse MALDI-TOF-MS démontre le transfert du groupement phosphopantéthéine sur les apo-ACP de *P. aeruginosa* par l'AcpS.

Substrat	Avant réaction (apo-ACP) ( <i>m/z</i> )		Après phosphopantéthéinylation				Forme obtenue
			Résultat attendu ( <i>m/z</i> )		Résultat obtenu ( <i>m/z</i> )		
	[M+H] <sup>+</sup>	[M+2H] <sup>2+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	[M+2H] <sup>2+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	[M+2H] <sup>2+</sup>	
<b>AcpP1-6His</b> (MW Natif = 10230) (MW – Mét* = 10099)	10102,00	5050.79	10439	5219	10441.64	5219.35	holo-AcpP1
<b>AcpP2-6His</b> (MW = 10436)	10441.60	5221.24	10776	5388	10776.96	5387.34	holo-AcpP2
<b>AcpP3-6His</b> (MW = 10352)	10355.63	5179.05	10692	5346	10693.34	5347.50	holo-AcpP3

\*-Mét indique l'absence du premier résidu méthionine en *N*-terminal, qui est connu pour être clivé (Kutchma *et al.*, 1999).

### 2.7.7 Acylation de l'ACP *in vitro*

Basé sur les protocoles de Jiang *et al.* (2006) et Ma *et al.* (2017), la réaction d'acylation des ACP avec l'octanoyle a été effectuée à 37°C pendant 2 h dans un volume de 50 µL dans un tampon 0,1 M Tris-HCl, pH 8.8 avec 1 mM coenzyme A, 1 mM octanoyl-CoA, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM dithiothréitol, 10 mM ATP, 100 µM apo-ACP purifiée, 1 µM AcpS purifiée et 1 µM AasS purifiée. La réaction a été vérifiée en suivant le transfert d'une masse de 466 Da (340 du groupement 4-phosphopantéthéine et 126 de l'octanoyle) par MALDI-TOF-MS (Tableau 2.4).

**Tableau 24. Acylation des ACP de *P. aeruginosa*.**

L'analyse MALDI-TOF-MS démontre le transfert du groupement acyle sur les AcpP1, l'AcpP2 et l'AcpP3 de *P. aeruginosa* par AaS de *V. harveyi*.

Substrat	Avant réaction (Forme Apo-ACP) ( <i>m/z</i> )		Après acylation				Forme obtenue
			Résultat obtenu ( <i>m/z</i> )		Résultat Attendu ( <i>m/z</i> )		
	[M+H] <sup>+</sup>	[M+2H] <sup>2+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	[M+2H] <sup>2+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	[M+2H] <sup>2+</sup>	
<b>AcpP1-6His</b> (MW Natif = 10230) (MW – Mét* = 10099)	10102.00	5050.79	10567.30	5284.53	10565	5283	C <sub>8-1Met</sub> -AcpP1
<b>AcpP2-6His</b> (MW = 10436)	10441.60	5221.24	10905.53	5452.20	10902	5452	C <sub>8</sub> -AcpP2
<b>AcpP3-6His</b> (MW = 10352)	10355.63	5179.05	10693.34	5347.50	10691	5346	C <sub>8</sub> -AcpP3

\*-Mét indique l'absence du premier résidu méthionine en *N*-terminal, qui est connu pour être clivé (Kutchma *et al.*, 1999).

### 2.7.8 Analyses effectuées par MALDI-TOF MS

Les analyses MALDI-TOF MS ont été effectuées avec un système Bruker Microflex LRF (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) équipé du logiciel Compass 3.1. Les acquisitions ont été effectuées en mode ions positifs. Les échantillons ont été préparés dans l'eau jusqu'à l'obtention d'une concentration optimale pour l'ionisation, c'est-à-dire une concentration maximale de 10 µM pour les ACP. Cette préparation a été diluée dans 10 volumes d'une solution matrice d'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique (10 mg/ml dans 50% acétonitrile/H<sub>2</sub>O 0.1% TFA). Un volume de 2 µL a été utilisé pour l'analyse. Les paramètres d'acquisition ont été les suivants: source d'ions No 1 : 19,5 kV; source d'ions No 2 : 18,05 kV; lentille : 7,0 V; pulse d'extraction d'ions : 240 ns; détecteur : 1,905 kV. Chaque spectre a été obtenu avec approximativement 200 décharges d'un laser à cartouche d'azote de 60 Hz fixé à 337 nm en faisant varier l'intensité du laser selon le signal obtenu.

### 2.7.9 Construction des mutations délétères chez *P. aeruginosa*

Pour générer des délétions spécifiques au sein du génome de *P. aeruginosa*, la méthode d'échange allélique développée par Hmelo *et al.* (2015) a été utilisée. Des régions d'environ

1000 pb situées en 5' et 3' du gène ciblé ont été amplifiées et fusionnées. Seulement le codon ATG du gène ciblé a été conservé entre les deux régions flanquées. L'amplicon obtenu a été cloné dans le plasmide pEX18Ap, générant un vecteur d'échange allélique qui a été transformé chez la souche *E. coli* SM10. Les étapes ultérieures concernant la conjugaison chez *P. aeruginosa*, la recombinaison homologue et la vérification de la délétion sont présentées dans la section suivante.

### 2.7.9.1 Construction du triple mutant PA14\_ *fabH3*::Tn*phoA*Δ*rhIYZ*

Les gènes *rhIYZ* (PA14\_54640 et PA14\_54660) ont été supprimés chez le mutant PA14\_ *fabH3*::Tn*phoA* (Km<sup>R</sup>) en utilisant un mutant par transposon provenant de la banque non-redondante de mutants de PA14 (Liberati *et al.*, 2006).

Conjugaison : Un volume de 400 µL d'une culture d'*E. coli* SM10(pEX18ApGW\_54640::54660\_Gm<sup>R</sup>\_FRT) (Abdel-Mawgoud, 2014), à une valeur de DO<sub>600</sub> de 2.0 a été mélangée doucement avec 200 µL d'une culture PA14\_ *fabH3*::Tn*phoA* (Kn<sup>R</sup>) ayant la même valeur de DO<sub>600</sub>. Le mélange a été centrifugé à 2000 rpm pendant 2 min et lavé avec 1 mL de bouillon LB stérile. La biomasse a été resuspendue dans 50 µL de bouillon LB et inoculée au centre d'une gélose LB (sans antibiotique). La culture a été incubée à 37°C pendant 18 h.

Première recombinaison homologue : La biomasse a été récupérée avec un écouvillon stérile et resuspendue dans 1 mL de bouillon LB supplémenté avec de la carbénicilline à 300 mg/L (sélection des transconjugants) et du triclosan à 25 mg/L (contre-sélection de *E. coli*). 100 µL d'une dilution 10<sup>-1</sup> ont été étalés sur une gélose LB avec de la carbénicilline à 300 mg/L et du triclosan à 25 mg/L et incubés à 37°C pendant 18 h.

Sélection des cellules viables porteuses du mérodipléide : 10 clones ont été repiqués sur une gélose LB (recette sans NaCl) supplémenté avec du sucrose 10 % (p/v) et, en parallèle, sur une gélose LB contenant de la carbénicilline à 300 mg/mL, de même que dans 5 mL d'un bouillon LB sans antibiotique. Des clones qui ont poussé sur le milieu avec carbénicilline mais pas sur le milieu avec du sucrose ont été sélectionnés.

Deuxième recombinaison : 100 µL d'une dilution 10<sup>-4</sup> et 10<sup>-5</sup> des clones sélectionnés ont été étalés sur une gélose LB avec 10% sucrose (sans antibiotique) et incubés à 37 °C pendant 18 h. La confirmation de la deuxième recombinaison a été effectuée en repiquant 30 clones sur

une gélose LB (recette sans NaCl) supplémentée avec du sucrose 10 %, et en parallèle, sur une gélose LB contenant de la carbénicilline à 300 mg/mL. Seuls les clones qui ont poussé sur le milieu avec du sucrose (perte de *sacB*) ont été sélectionnés pour poursuivre la confirmation par la technique de colonie PCR. Un séquençage des produits de PCR de ces clones positifs a été effectué (les amorces sont listées dans le tableau supplémentaire 2.3).

### 2.7.10 Analyse des HAA et des rhamnolipides par LC-MS

L'étude de la production des HAA et des rhamnolipides dans le surnageant des cultures bactériennes a été effectuée par une méthode de LC-MS en mode ion-négatif développée par Déziel *et al.* (2000). La méthode est présentée à la section 3.12.5. Les ions pseudomoléculaires observés le plus fréquemment sont listés dans le tableau 2.5.

**Tableau 2.5. Ions pseudomoléculaires recherchés lors de l'analyse des HAA et des rhamnolipides par LC-MS.**

Congénère	<i>m/z</i> recherchés selon le nombre d'unités de rhamnose sur la molécule		
	0	1	2
C <sub>8</sub> -C <sub>8</sub>	301.3	447.3	593.5
C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub> ou C <sub>10</sub> -C <sub>8</sub>	329.3	475.4	621.6
C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	357.3	503.4	649.5
C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub> ou C <sub>12</sub> -C <sub>10</sub>	385.3	531.4	677.5
C <sub>12</sub> -C <sub>12</sub>	413.6	559.7	705.5

### 2.7.11 Analyse des HAQ par LC-MS/MS

La détection et la quantification de la production des HAQ dans le surnageant des cultures bactériennes a été effectuée par une méthode de CL-SM/SM en mode ion-positif. Sauf indication contraire, la détermination de la croissance bactérienne a été estimée dans toutes les cultures en utilisant la DO<sub>600</sub>. Des échantillons de 400 µL de culture ont été pris à des intervalles réguliers et mélangés avec 400 µL d'une solution de méthanol contenant 5 ppm de 5,6,7,8-tétradeutéro-HHQ-d4 (*m/z* 248.2 > 163.1) et 7 ppm de 5,6,7,8-tétradeutéro-PQS-d4 (*m/z* 264.2 > 179.3) comme standards internes. Après une centrifugation de 10 min à 10 000 x *g*, 20 µL du surnageant ont été directement injectés pour une séparation chromatographique en phase

inverse effectuée avec un système HPLC Waters 2795 (Waters, Mississauga, ON) équipé d'une colonne Kinetex® C<sub>8</sub> (2,6 µm, 100Å, 4.6 mm x 100 mm). La séparation s'est effectuée en suivant un gradient non-linéaire d'acétonitrile et d'eau contenant 1% acide acétique à un débit de 400 µL/min. Gradient d'acétonitrile: 20% pendant 3 min, gradient de 1 min pour atteindre 70%, gradient de 5 min jusqu'à 85% et gradient de 1 min pour arriver à 100%. La détection moléculaire a été effectuée par couplage direct avec un spectromètre de masse triple quadrupole Quattro Premier XE (Micromass), équipé d'un système d'ionisation par électronébulisation en mode ion-positif. La quantification des HAQ a été obtenue par *Multiple reaction monitoring* (MRM) avec les paramètres de fragmentation étant fixés à 21 V et 30 V pour le cône et la cellule de collisions, respectivement. La liste d'ions recherchés est présentée dans le tableau 2.6.

Tableau 2.6. Ions pseudomoléculaires recherchés lors de l'analyse des HAQ par LC-MS/MS.

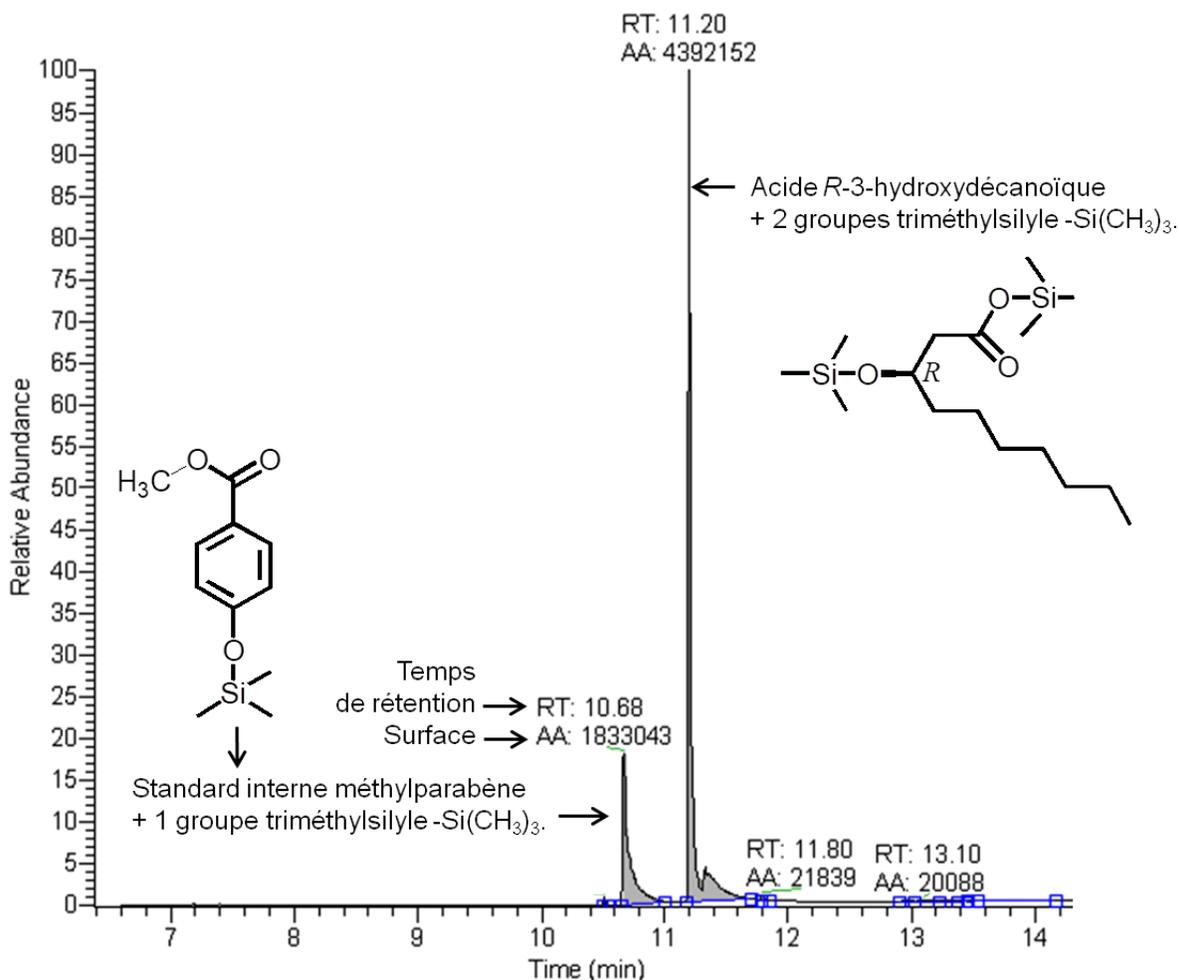
Molécule	<i>m/z</i> recherchés	
	[M+H] <sup>+</sup> mère	[M+H] <sup>+</sup> fille
HHQ <sub>C7</sub>	224.3	159.1
HQNO <sub>C7</sub>	260.2	175.3
PQS <sub>C7</sub>	260.2	175.3
HNQ <sub>C9</sub>	272.2	159.1
HQNO <sub>C9</sub>	288.2	172.2
PQS <sub>C9</sub>	288.2	175.3

### 2.7.12 Synthèse du *R*-3-hydroxydécanoïl-CoA

La synthèse du *R*-3-hydroxydécanoïl-CoA comporte deux grandes étapes; l'obtention de l'acide *R*-3-hydroxydécanoïque à partir de l'hydrolyse de rhamnolipides, et la condensation de la coenzyme A sur l'acide gras hydroxylé.

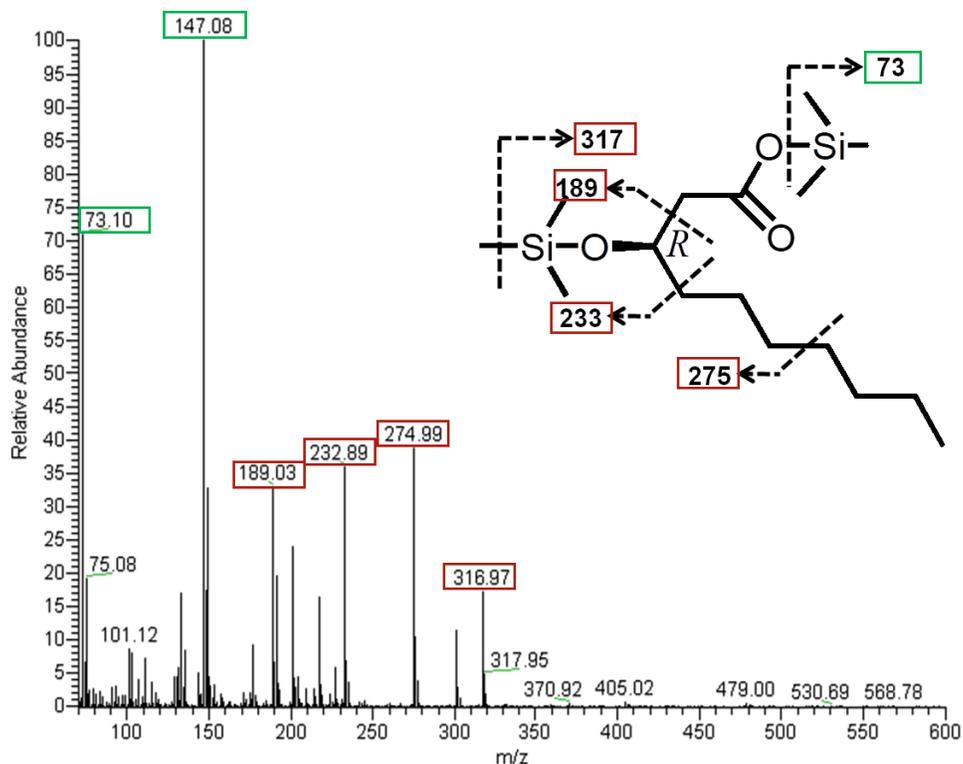
### 2.7.12.1 Obtention de l'acide *R*-3-hydroxydécanoïque

Environ 2 g d'un mélange de rhamnolipides de *P. aeruginosa* (Jeneil Biosurfactants Co.) ont été dissouts dans 200 mL d'une solution 0.5 N HCl, 50 % méthanol. Le mélange a été incubé sous agitation à 100°C pendant 5 jours dans un ballon couplé à un système à reflux. Les acides gras ont ensuite été extraits trois fois avec 50 mL d'acétate d'éthyle. Les extraits ont été combinés, déshydratés avec du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre et filtrés sur une membrane de cellulose. Un aliquot de 100 µL a été récupéré à cette étape pour vérifier l'hydrolyse par une analyse spectrométrique selon le protocole décrit à la section 3.13.8 (Fig. 2.13 et 2.14). Le filtrat obtenu a été neutralisé avec du NH<sub>4</sub>OH (7,5 N) et évaporé à sec avec un évaporateur rotatif. Le produit obtenu a été stocké à -20°C.



**Figure 2.13. Chromatogramme de l'acide *R*-3-hydroxydécanoïque obtenu à partir de l'hydrolyse de rhamnolipides.**

Analyse effectuée par GC-MS



**Figure 2.14.** Spectre de masse de l'acide *R*-3-hydroxydécanoïque avec le fragmentogramme de l'ion mère 332.22 u.a.

Les ions filles correspondant à la silylation sont encadrés en vert et ceux qui correspondent à la signature de la molécule sont encadrés en rouge. Analyse effectuée par GC-MS.

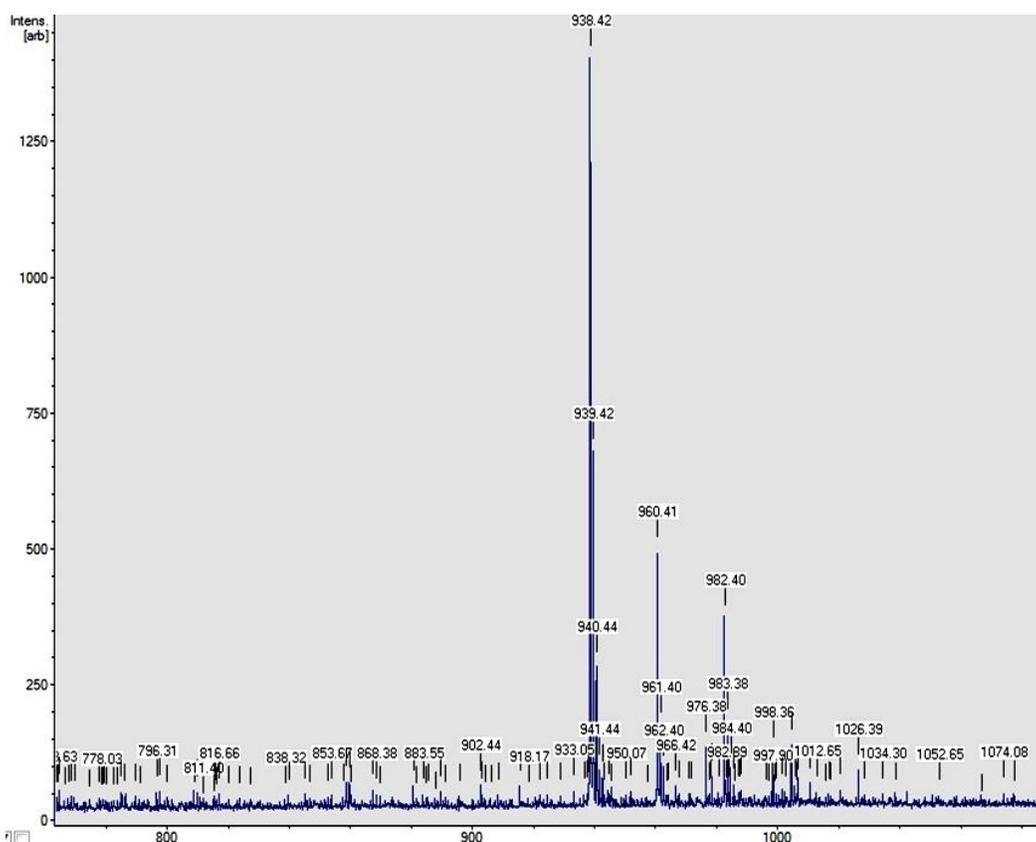
### 2.7.12.2 Synthèse chimique du *R*-3-hydroxydécanoïl-CoA

Le protocole pour la synthèse du *R*-3-hydroxydécanoïl-CoA est basé sur ses protocoles publiés (Goldman & Vagelos, 1961, Waterson & Hill, 1972). La réaction a été effectuée avec le ratio molaire suivant : 1 éq coenzyme A (CoA), 2 éq acide *R*-3-hydroxydécanoïque (3-HD), 2 éq triéthylamine (TEA) (Parker & Newstead), 2 éq chloroformate d'éthyle (EtCl).

Préparation de l'acide gras : Le 3-HD a été dissout dans du tétrahydrofurane anhydre (THF) à une concentration finale de 4 mg/mL. Ensuite, le TEA a été ajouté et le mélange a été incubé à la température pièce pendant 10 min. Cette solution a été ajoutée au EtCl préalablement dilué 1:100 dans le THF anhydre. La réaction a été incubée pendant 20 min sur la glace. Le surnageant a été récupéré par centrifugation (900 xg, 2 min) et évaporé à sec avec un jet d'azote. Le culot formé a été resuspendu dans du THF dans un volume à peu près égal de solvant.

Préparation de la coenzyme A : La CoA a été diluée dans de l'eau basique (ajusté à pH 8,0 avec une solution 1 M NaHCO<sub>3</sub>) à une concentration finale de 26 mg/mL. Ensuite, la solution de CoA a été diluée avec du THF de manière à avoir  $\frac{1}{3}$  H<sub>2</sub>O et  $\frac{2}{3}$  THF à la fin sous un barbotement avec de l'azote gazeux.

Condensation de l'acide R-3-hydroxydécanoïque avec la coenzyme A :  $\frac{1}{4}$  de solution CoA a été ajouté à la solution de 3-HD et le pH a été ajusté à 8,0 au besoin avec une solution 1 M NaHCO<sub>3</sub>. La réaction a été incubée pendant 5 min sous un jet d'azote. Cette étape a été répétée jusqu'à l'épuisement de la solution de CoA. La réaction a été arrêtée en abaissant le pH à 5,0 en ajoutant de l'acide perchlorique 1 % (v/v). Ensuite, le THF a été évaporé avec un évaporateur rotatif et le pH a été abaissé de nouveau à  $\approx$  3,0 avec l'acide perchlorique 10 % (v/v). La solution a été centrifugée (15 000 x g, 10 min) et le culot a été lavé avec de l'éther. Une analyse par spectrométrie de masse a permis de vérifier la synthèse du produit désiré, soit le R-3-hydroxydécanoyl-CoA avec une masse théorique de 937.78 g/mol (Fig. 2.15). Le produit de synthèse a été lyophilisé et conservé à  $-20$  °C.



**Figure 2.15. Spectre de masse du R-3-hydroxydécanoyl-CoA synthétisé à partir de l'acide R-3-hydroxydécanoïque.**

Une  $m/z$  de 938,42 majoritaire a été observée. Analyse effectuée par MALDI-TOF-MS.

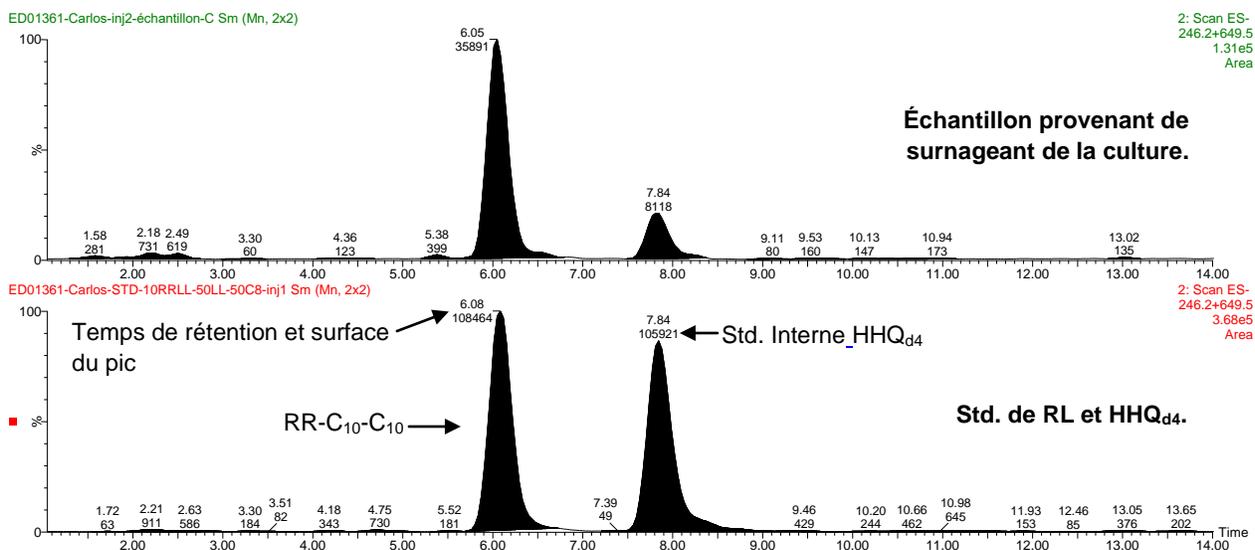
### **2.7.13 Essai d'acylation de l'AcpP1 avec le *R*-hydroxydécanoïl-CoA à partir d'un extrait cellulaire clarifié d'un mutant *rhIA*<sup>-</sup> de *P. aeruginosa***

Préparation de l'extrait cellulaire : Une culture d'un mutant *rhIA*<sup>-</sup> de *P. aeruginosa* a été préparée dans 125 mL de milieu MSM. Afin d'induire l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras, l'acide octadécanoïque à une concentration de 30 mM a été utilisé comme seule source de carbone (voir recette dans le tableau 2.1). La culture a été incubée à 37°C, à 300 rpm, pendant 160 h. La biomasse a été récupérée par centrifugation et lavée 2 fois avec 40 mL de PBS. Les cellules ont été resuspendues dans 6 mL de tampon 20 mM Tris-HCl, pH 7,4 et lysées par sonication sur glace. La fraction soluble a été séparée par centrifugation à 40 000 x *g* pendant 1 h, à 4°C, et filtrée ultérieurement avec une membrane de cellulose avec des pores de 0,2 µm.

Réaction d'acylation : Un mélange réactionnel a été préparé en utilisant 5 mL d'extrait cellulaire clarifié (filtré avec une membrane de cellulose de pores de 0,2 µm) d'un mutant PA14\_*rhIA*::TnMrT7, 1 mM holo-AcpP1, 75 ppm *R*-hydroxydécanoïl-CoA, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothréitol, 10 mM ATP, dans un tampon 100 mM Tris-HCl, pH 7,4 pour un volume final de 8,5 mL. Le mélange réactionnel a été incubé à 37°C pendant 18 h. Un témoin négatif a été effectué en parallèle sans l'ajout du *R*-hydroxydécanoïl-CoA. Finalement, l'ACP a été purifié à partir du mélange réactionnel (voir protocole de purification dans la section 2.7.5). L'ACP purifiée a été analysée par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF afin de vérifier l'acylation (voir section 2.7.8).

### **2.7.14 Essai de production des HAA et des rhamnolipides dans un extrait cellulaire d'un mutant *rhIA*<sup>-</sup> de *P. aeruginosa* complémenté avec une construction *-rhIA/rhIB***

Préparation de l'extrait cellulaire : Une culture d'un mutant PA14\_*rhIA*::TnMrT7 complémenté avec le plasmide pUCP26-*rhIAB* (pAS23) a été préparée dans 125 mL de milieu MSM-acide octadécanoïque (30 mM). La culture a été effectuée de la même façon que dans la section précédente (2.7.13). Un aliquot du surnageant a été analysé par spectrométrie de masse pour vérifier la production de rhamnolipides, indiquant que la complémentation avec le plasmide pAS23 permettait la production des enzymes RhIA et RhIB fonctionnelles (Fig. 2.16).



**Figure 2.16. Chromatogramme montrant un pic correspondant à la production de RR-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> ( $m/z$  649.5) chez un mutant *rhIA* complété avec le plasmide pAS23 en milieu minimal supplémenté avec de l'acide octadécanoïque comme seule source de carbone.**

Le HHQ<sub>d4</sub> est utilisé comme standard interne pour la quantification de RL.

Le lysat cellulaire total et le lysat clarifié (fraction cytoplasmique) ont été utilisés pour les tests enzymatiques. Les réactions ont été effectuées dans volume final de 8,5 mL dans 100 mM Tris-HCl, pH 7,4 en présence de 1 mM holo-AcpP1 et des concentrations de 50, 100 ou 200 ppm de *R*-3-hydroxydécanoïl-CoA. Les différentes conditions pour les tests enzymatiques sont énumérées dans le tableau 2.7. Les réactions ont été incubées à 37°C pendant 2 h.

Les HAA et les rhamnolipides produits ont été extraits avec de l'acétate d'éthyle et concentrés cinq fois selon le protocole présenté à la section 3.12.6. L'analyse a été effectuée par LC-MS selon la méthode décrite dans la section 3.12.5..

**Tableau 2.7. Conditions utilisées pour les tests de production des HAA et des rhamnolipides dans un extrait cellulaire.**

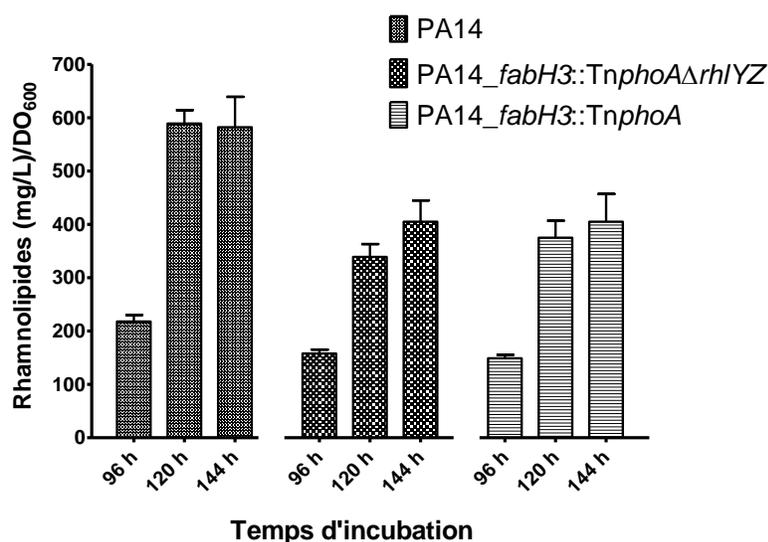
No test	Condition	Mélange réactionnel
1	Contrôle négatif	Mélange réactionnel contenant 5 mL de lysat cellulaire total ou de lysat clarifié, 15 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM DTT, 10 mM ATP, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4). Volume final de 8,5 mL.
2	Avec ajout d'ACP	Mélange réactionnel + 1 mM holo-AcpP1.
3	Avec ajout d'ACP et <i>R</i> -hydroxydécanoyl-CoA (50 ppm)	Mélange réactionnel + 1 mM holo-AcpP1 + 50 ppm <i>R</i> -hydroxydécanoyl-CoA.
4	Avec ajout d'ACP et <i>R</i> -hydroxydécanoyl-CoA (100 ppm)	Mélange réactionnel + 1 mM holo-AcpP1 + 100 ppm <i>R</i> -hydroxydécanoyl-CoA .
5	Avec ajout d'ACP et <i>R</i> -hydroxydécanoyl-CoA (200 ppm)	Mélange réactionnel + 1 mM holo-AcpP1 + 200 ppm <i>R</i> -hydroxydécanoyl-CoA.

## 2.8 Résultats

### 2.8.1 Caractérisation préliminaire de la voie de la $\beta$ -cétolactone synthase III codée par *fabH3*

#### 2.8.1.1 Le mutant PA14\_ *fabH3*::TnPhoA produit moins de rhamnolipides que PA14 lorsque le glycérol est seule source de carbone

La production de rhamnolipides a été comparée entre le simple mutant PA14\_ *fabH3*::TnPhoA, le triple mutant PA14\_ *fabH3*::TnPhoA $\Delta$ *rhIYZ* et PA14 en utilisant le milieu minimal MSM supplémenté avec le glycérol comme seule source de carbone. La figure 2.17 montre le rendement de production de rhamnolipides sur trois échantillonnages effectués à 96, 120 et 144 h d'incubation. Dans cette figure, on peut observer que chez PA14, la teneur en rhamnolipides est de 218 mg/L/DO<sub>600</sub> à 96 h d'incubation, tandis que chez les mutants PA14\_ *fabH3*::TnPhoA et PA14\_ *fabH3*::TnPhoA $\Delta$ *rhIYZ*, le rendement est de 149 et 158 mg/L/DO<sub>600</sub>, respectivement. Donc, chez les mutants PA14\_ *fabH3*::TnPhoA et PA14\_ *fabH3*::TnPhoA $\Delta$ *rhIYZ*, la production de rhamnolipides équivaut à 67 et 72 % de la production de PA14, respectivement. Par ailleurs, des différences de production sont aussi observées dans les deux derniers échantillonnages. Chez PA14, la production de rhamnolipides atteint 600 mg/L/DO<sub>600</sub> après 120 h, tandis que chez les mutants PA14\_ *fabH3*::TnPhoA et PA14\_ *fabH3*::TnPhoA $\Delta$ *rhIYZ*, les productions observées atteignent 405 mg/L/DO<sub>600</sub>, ce qui équivaut à 67 % de la production de PA14.



**Figure 2.17. Rendement de production de rhamnolipides chez les mutants PA14\_ *fabH3*::TnphoA et PA14\_ *fabH3*::TnphoA $\Delta$ *rhIYZ* en comparaison avec PA14.**

Expérience effectuée en milieu minimal MSM-glycérol. Il y a de différence significative entre les populations PA14 vs PA14\_ *fabH3*::TnphoA $\Delta$ *rhIYZ* et PA14 vs PA14\_ *fabH3*::TnphoA. Il n'y a pas de différence significative entre le mutant PA14\_ *fabH3*::TnphoA vs PA14\_ *fabH3*::TnphoA $\Delta$ *rhIYZ*. Analyse statistique effectuée avec le test de comparaison multiple Turkey avec  $P < 0.05$ .

La diminution de 30 % de la production de rhamnolipides observée chez le mutant PA14\_ *fabH3*::TnPhoA révèle que bien que le rôle de FabH3 peut contribuer à la production des rhamnolipides, il ne constitue toutefois pas le mécanisme métabolique principal pour la biosynthèse de ces glycolipides. De plus, le suivi de la production chez le triple mutant PA14\_ *fabH3*::TnPhoAΔ*rhIYZ* n'a pas été associé à une diminution supplémentaire de la biosynthèse des rhamnolipides. Puisque les deux voies impliquées, FabH3 et RhIYZ, sont apparemment abrogées dans ce triple mutant, il semble que dans des conditions de culture utilisant le glycérol comme seule source de carbone, la bactérie utilise d'autres voies métaboliques pour diriger les acides gras vers la biosynthèse des HAA et des rhamnolipides.

Afin d'identifier des voies métaboliques alternatives aux voies FabH3 et RhIYZ, nous avons effectué une analyse spectroscopique des rhamnolipides produits chez le triple mutant PA14\_ *fabH3*::TnPhoAΔ*rhIYZ* en présence de l'acide dodécanoïque-12,12,12-*d*<sub>3</sub> et/ou le glucose-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> comme seules sources de carbone. La présence d'isotopologues différents de ceux précédemment observés dans l'étude publiée par Abdel-Mawgoud *et al.* (2014) (Fig. 2.5 et 2.6), pourraient donner de nouveaux indices sur la façon dont le métabolisme des acides gras fournit des intermédiaires pour la synthèse des HAA.

### **2.8.1.2 La composition des rhamnolipides n'est pas affectée chez le mutant PA14\_ *fabH3*::TnPhoA**

Étant donné que FabH3 utilise préférentiellement l'octanoyl-CoA (C<sub>8</sub>-CoA) pour produire un intermédiaire de la voie FAS II à 10 carbones (Yuan *et al.*, 2012a), il est possible que chez le mutant PA14\_ *fabH3*::TnPhoA, la disponibilité des intermédiaires C<sub>8</sub> provenant de la β-oxydation soit augmentée, favorisant la biosynthèse de congénères de HAA, notamment au niveau des C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub> et C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>. Le tableau 2.8 montre les pourcentages des plus abondants congénères de HAA observés chez le mutant PA14\_ *fabH3*::TnPhoA en comparaison avec PA14 lors d'un échantillonnage effectué à 144 h d'incubation dans le milieu MSM-glycérol. Sur ce tableau, on peut observer que la proportion des 5 types de congénères de HAA analysés (C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>/C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>/C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub> et C<sub>12</sub>-C<sub>12</sub>) est similaire chez les deux souches.

Compte tenu que la composition des rhamnolipides n'est pas affectée chez le mutant PA14\_ *fabH3*::TnPhoA, la question qui se pose désormais est de savoir si l'activité de FabH3

influence réellement la disponibilité métabolique d'octanoyl-CoA. Nous étudions ce sujet dans la section 2.8.3.2.

**Tableau 2.8. Profil de congénères des HAA et des rhamnolipides produits par un mutant PA14\_ *fabH3*::TnPhoA.**

Effectué dans un milieu minimal supplémenté avec du glycérol pendant 144 h. Le 100% correspond à la somme de tous les congénères détectés.

Souche	Pourcentage de congénères				
	C <sub>8</sub> -C <sub>8</sub> <sup>1</sup>	C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub> et C <sub>10</sub> -C <sub>8</sub> <sup>2</sup>	C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub> <sup>3</sup>	C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub> et C <sub>12</sub> -C <sub>10</sub> <sup>4</sup>	C <sub>12</sub> -C <sub>12</sub> <sup>5</sup>
PA14	0.23 (± 0.03)	10.30 (± 0.97)	74.66 (± 3.68)	14.30 (± 3.43)	0.48 (± 0.08)
PA14_ <i>fabH3</i> ::TnphoA	0.22 (± 0.02)	10.77 (± 0.91)	72.58 (± 0.91)	15.86 (± 0.41)	0.57 (± 0.09)

<sup>1</sup> Somme de congénères C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub> (*m/z* 301.3), Rha-C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub> (*m/z* 447.3) et Rha-Rha-C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub> (*m/z* 593.5).

<sup>2</sup> Somme de congénères C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>/C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub> (*m/z* 329.3), Rha-C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>/Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub> (*m/z* 475.4) et Rha-Rha-C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>/Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub> (*m/z* 621.6).

<sup>3</sup> Somme de congénères C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> (*m/z* 357.3), Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> (*m/z* 503.4) et Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> (*m/z* 649.5).

<sup>4</sup> Somme de congénères C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>/C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub> (*m/z* 385.3), Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>/Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub> (*m/z* 531.4) et Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>/Rha-Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub> (*m/z* 677.5).

<sup>5</sup> Somme de congénères C<sub>12</sub>-C<sub>12</sub> (*m/z* 413.6), Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>12</sub> (*m/z* 559.7) et Rha-Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>12</sub> (*m/z* 705.5).

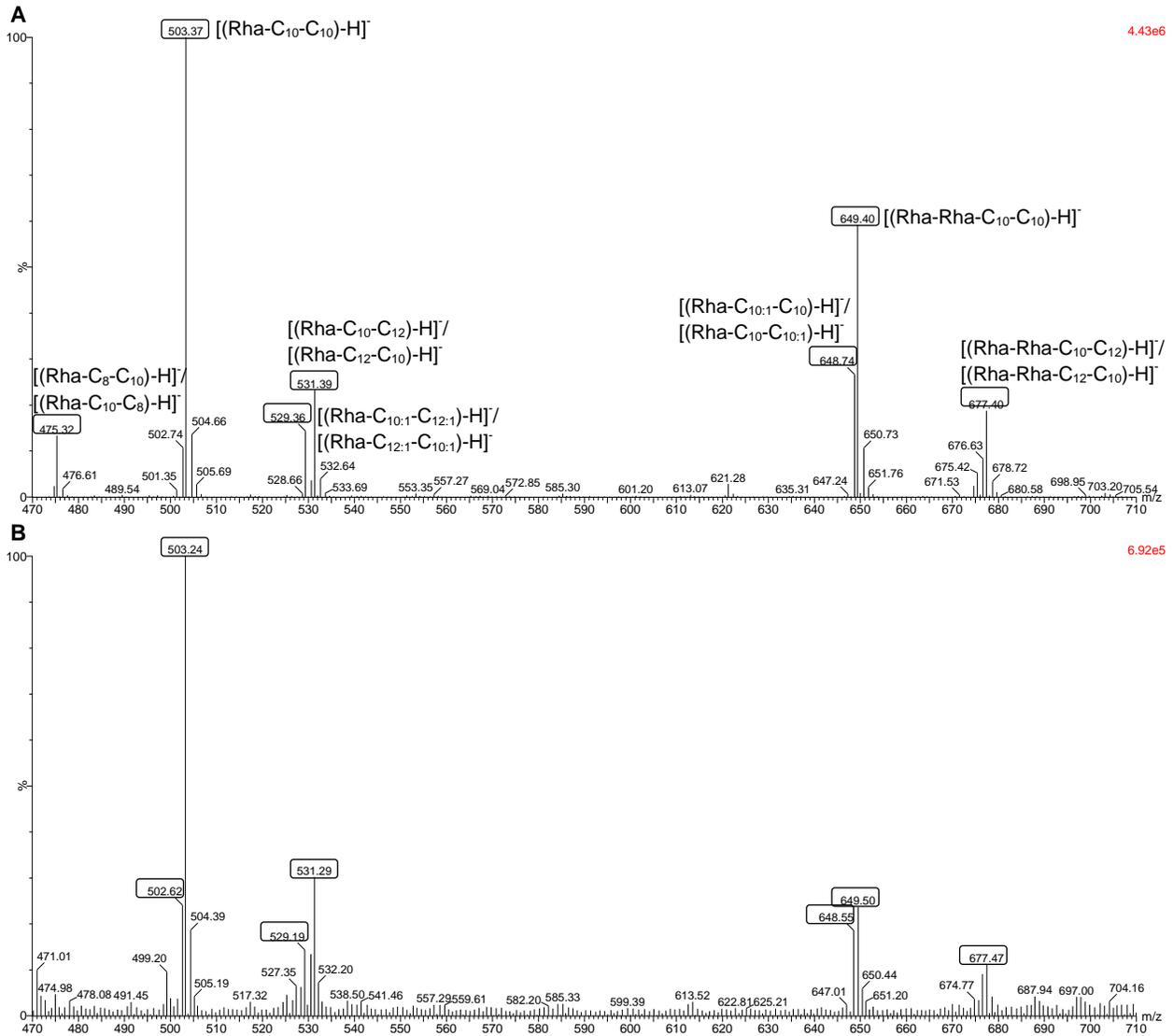
## 2.8.2 Étude préliminaire pour l'identification de mécanismes métaboliques alternatifs pour l'approvisionnement de précurseurs lipidiques pour la synthèse des HAA chez le triple mutant PA14Δ*fabH3*Δ*rhIYZ* à l'aide d'un marquage isotopique

Le glucose-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> et l'acide dodécanoïque-12,12,12-*d*<sub>3</sub> (C<sub>12</sub>-*d*<sub>3</sub>) ont été utilisés comme sources de carbone marquées afin de révéler la façon dont les acides gras sont dirigés vers la synthèse des HAA en absence des enzymes FabH3 et RhIYZ.

### 2.8.2.1 Le congénère Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> est majoritairement détecté soit en présence de glucose ou soit en présence d'acide dodécanoïque comme seules sources de carbone

Afin de faciliter l'étude isotopique, la première étape abordée a consisté à déterminer quel congénère est majoritairement produit en milieu minimal supplémenté avec du glucose ou

avec de l'acide dodécanoïque (C<sub>12</sub>). La figure 2.18 montre les deux spectres de masse générés lors de l'analyse spectrométrique des surnageants de PA14 cultivée parallèlement dans les deux sources de carbone. On peut y voir que les deux spectres obtenus sont très similaires, comportant chacun quatre espèces principales de rhamnolipides, les ions  $[(\text{Rha-C}_{10}\text{-C}_{10})\text{-H}]^-$ ,  $[(\text{Rha-Rha-C}_{10}\text{-C}_{10})\text{-H}]^-$ ,  $[(\text{Rha-C}_{10}\text{-C}_{12})\text{-H}]/[(\text{Rha-C}_{12}\text{-C}_{10})\text{-H}]^-$  et  $[(\text{Rha-Rha-C}_{12}\text{-C}_{10})\text{-H}]/[(\text{Rha-Rha-C}_{10}\text{-C}_{12})\text{-H}]^-$  ayant des  $m/z$  de 503, 531, 649 et 677, respectivement (Fig. 2.18).



**Figure 2.18. Spectres de masse de deux surnageants de PA14 montrant l'abondance relative des ions pseudomoléculaires des rhamnolipides détectés.**

A. Culture effectuée dans le milieu MSM avec du glucose comme seule source de carbone. B. Culture effectuée en milieu MSM-acide dodécanoïque. Les valeurs de  $m/z$  encadrées peuvent avoir une correspondance avec les ions pseudomoléculaires des rhamnolipides assignés.

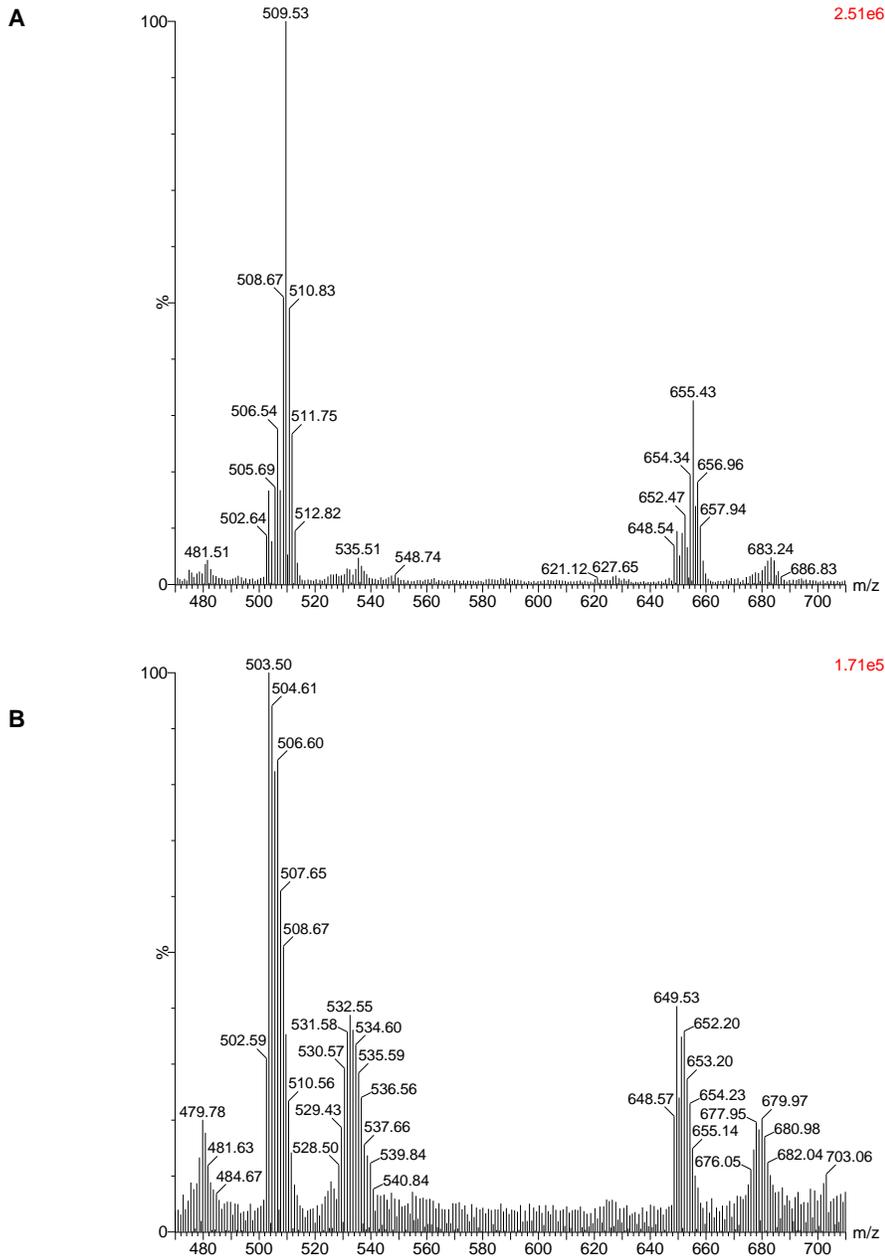
L'identité des ions  $[(\text{Rha-C}_{10}\text{-C}_{10})\text{-H}]^-$  et  $[(\text{Rha-Rha-C}_{10}\text{-C}_{10})\text{-H}]^-$  a été confirmée ultérieurement par fragmentation des ions correspondant aux valeurs de  $m/z$  de 503 et 649, respectivement (résultats non-montrés). Étant donné que dans les deux conditions de culture, l'ion  $[(\text{Rha-C}_{10}\text{-C}_{10})\text{-H}]^-$  présente la majeure abondance relative, il a été ciblé pour faciliter l'analyse des résultats de marquage isotopique effectués ultérieurement.

### 2.8.2.2 Marquage isotopique avec l'acide dodécanoïque-12,12,12- $d_3$

Lors du traitement avec l'acide  $\text{C}_{12}\text{-}d_3$  comme seule source de carbone, des résultats différents ont été observés chez PA14 et chez le triple mutant PA14\_ *fabH3*:TnPhoA $\Delta$ *rhIYZ*. La figure 2.19 montre les deux spectres de masses correspondants aux analyses des rhamnolipides produits dans les deux cultures. Les valeurs de  $m/z$  les plus abondantes observées dans les deux spectres sont 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512 et 513. Ces valeurs de  $m/z$  semblent bien correspondre avec les isotopologues  $\{[(\text{Rha-C}_{10}\text{-C}_{10})\text{-}d_0, \text{-}d_1, \text{-}d_2, \text{-}d_3, \text{-}d_4, \text{-}d_5, \text{-}d_6, \text{-}d_7, \text{-}d_8, \text{-}d_9, \text{ et } \text{-}d_{10}]\text{-H}\}^-$ , respectivement. Le spectre de masses obtenu à partir du surnageant de PA14 montre une diversité plus large d'ions et des intensités différentes par rapport au spectre obtenu à partir du surnageant de PA14\_ *fabH3*:TnPhoA $\Delta$ *rhIYZ*. L'abondance relative des ions observés dans les deux spectres est présentée dans le tableau 2.9. On peut y voir que les ions ayant les  $m/z$  de 508 et 509 (correspondant possiblement aux espèces marquées  $\text{-}d_5$ , et  $\text{-}d_6$ ) sont les plus abondants chez PA14 avec 51 et 100 % de contribution, respectivement, tandis que chez PA14\_ *fabH3*:TnPhoA $\Delta$ *rhIYZ*, ces ions représentent seulement 2 et 0.5 %, respectivement. Au contraire, les ions ayant les  $m/z$  503 et 504 (correspondant possiblement aux espèces marquées  $\text{-}d_0$ , et  $\text{-}d_1$ ) sont les plus abondants chez PA14\_ *fabH3*:TnPhoA $\Delta$ *rhIYZ* avec 100 et 59 % de contribution, respectivement, ce qui diffère considérablement avec PA14 où ces ions représentent seulement 11 et 7 %, respectivement.

L'ion majoritairement observé chez PA14 étant le  $m/z$  de 509, cela suggère une correspondance avec un isotopologue de type  $\{[(\text{Rha-C}_{10}\text{-C}_{10})\text{-}d_6]\text{-H}\}^-$  ayant incorporé deux chaînes aliphatiques de type  $\text{C}_{10}\text{-}d_3$  dans le mono-rhamnolipide. Afin de confirmer ce marquage, l'ion précurseur ( $m/z$  509) a été analysé par MS/MS. La figure 2.20 montre des valeurs de  $m/z$  163, 172 et 336 obtenues lors de la fragmentation. Ce profil de fragmentation révèle que les valeurs obtenues correspondent aux ions filles  $[(\text{Rha})\text{-H}]^-$ ,  $\{[(\text{C}_{10})\text{-}d_3]\text{-H}\}^-$  et  $\{[(\text{Rha-C}_{10})\text{-}d_3]\text{-H}\}^-$ ,

respectivement. Ce résultat confirme que l'ion  $m/z$  correspond à l'isotopologue  $\{[(\text{Rha-C}_{10}\text{-C}_{10})\text{-d}_6]\text{-H}\}^-$  ayant un marquage  $-d_3$  dans les deux chaînes  $\text{C}_{10}$ . La présence de ces deux chaînes  $\text{C}_{10}\text{-d}_3$  dans le rhamnolipide lui confère une masse additionnelle de +6 Da. Néanmoins, la localisation spécifique du marquage dans chaque chaîne aliphatique  $\text{C}_{10}\text{-d}_3$  ne peut pas être établie par les méthodes analytiques utilisées lors de cette étude.



**Figure 2.19. Spectres de masse obtenus à partir des surnageants de PA14 et du mutant PA14\_ *fabH3*::TnPhoAΔ*rhlYZ* dans des cultures effectuées en milieu MSM-acide dodécanoïque-12,12,12- $d_3$  (20 mM).**

A. PA14. B. Triple mutant PA14\_ *fabH3*::TnPhoAΔ*rhlYZ*.

Tableau 2.9. Assignment des ions de mono-rhamnolipides produits chez PA14 et PA14\_fabH3::TnPhoAΔrhlYZ en utilisant l'acide dodécanoïque-12,12,12-d<sub>3</sub> comme seule source de carbone.

Source de carbone	Possibles espèces correspondantes	Ion [M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Abondance relative <sup>1</sup> (%)	
			PA14	PA14_fabH3::TnPhoAΔrhlYZ
Acide dodécanoïque-12,12,12-d <sub>3</sub>	[(Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub> )-H] <sup>-</sup>	503	11	100
	{[(Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub> )-d <sub>1</sub> ]-H} <sup>-</sup>	504	7	59
	{[(Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub> )-d <sub>2</sub> ]-H} <sup>-</sup>	505	5	30
	{[(Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub> )-d <sub>3</sub> ]-H} <sup>-</sup>	506	5	17
	{[(Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub> )-d <sub>4</sub> ]-H} <sup>-</sup>	507	17	6
	{[(Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub> )-d <sub>5</sub> ]-H} <sup>-</sup>	508	51	2
	{[(Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub> )-d <sub>6</sub> ]-H} <sup>-</sup>	509	100	0,5
	{[(Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub> )-d <sub>7</sub> ]-H} <sup>-</sup>	510	33	0
	{[(Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub> )-d <sub>8</sub> ]-H} <sup>-</sup>	511	20	0
	{[(Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub> )-d <sub>9</sub> ]-H} <sup>-</sup>	512	6	0
	{[(Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub> )-d <sub>10</sub> ]-H} <sup>-</sup>	513	3	0

<sup>1</sup>L'abondance relative tient compte de la contribution naturelle de l'isotope <sup>13</sup>C.

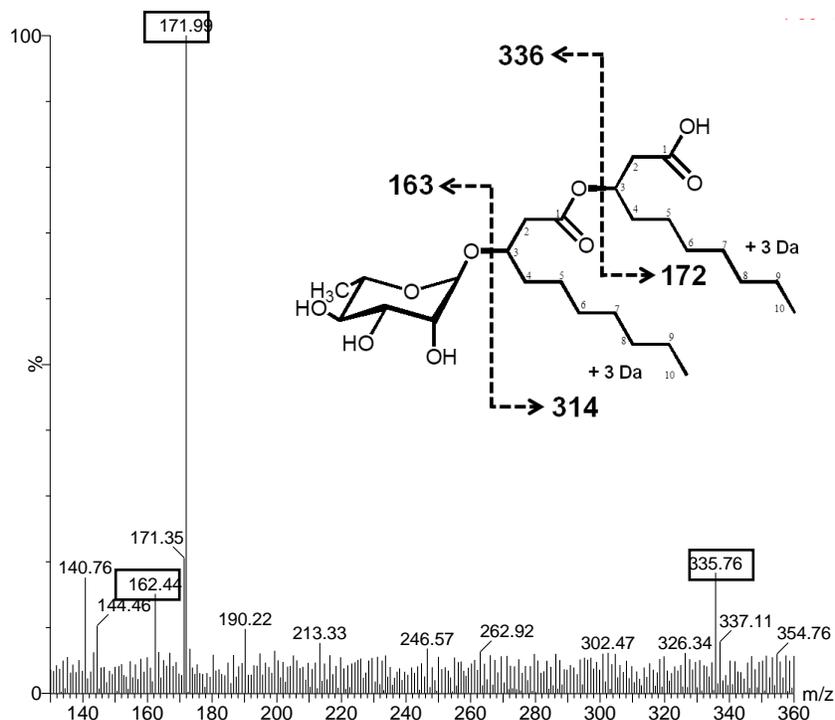


Figure 2.20. Spectre de masse obtenu de la fragmentation de l'ion m/z de 509.

### 2.8.2.3 Marquage isotopique avec le glucose- $^{13}\text{C}_6$ et l'acide dodécanoïque-12,12,12- $d_3$ chez PA14

Lorsque la culture de PA14 a été supplémentée avec l'acide  $\text{C}_{12}\text{-}d_3$  (20 mM) et excès de glucose- $^{13}\text{C}_6$  (80 mM) et de nouvelles valeurs de  $m/z$  ont été observées. La figure 2.21 montre le spectre de masses obtenu de l'analyse du surnageant de PA14. On peut y observer un ion majoritaire présentant un  $m/z$  de 515. Cette valeur de  $m/z$  est indicatrice d'un monorhamnolipide Rha- $\text{C}_{10}\text{-C}_{10}$  avec une masse additionnelle de +12 Da. L'ion  $m/z$  509 y est observé aussi mais avec une abondance de 15 % relative à l'ion majoritaire.

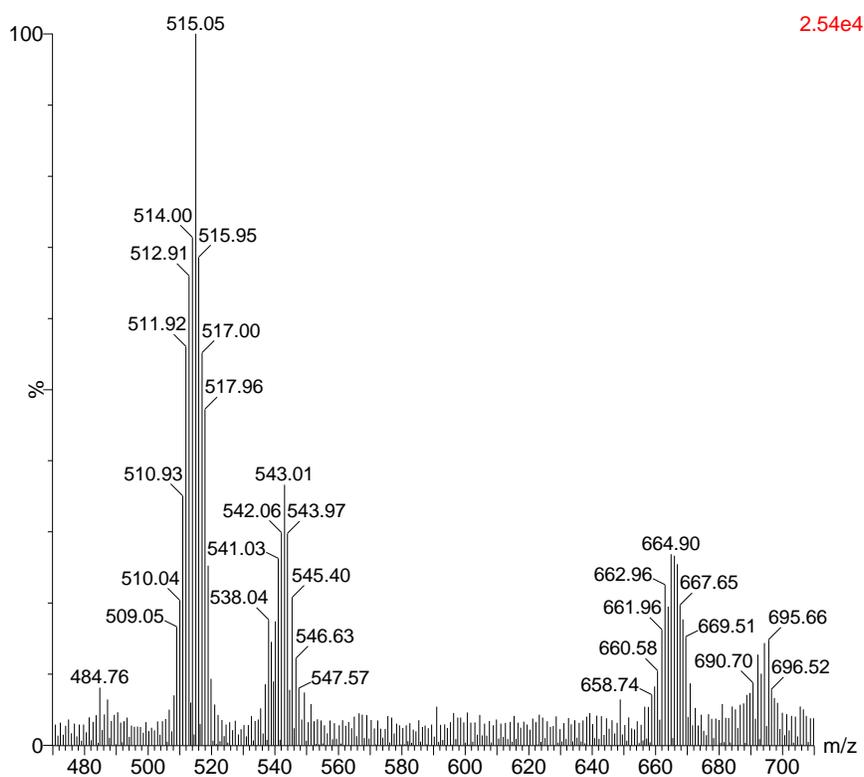


Figure 2.21. Spectre de masse obtenu de l'analyse du surnageant du PA14 en utilisant le MSM-glucose- $^{13}\text{C}_6$  et acide dodécanoïque-12,12,12- $d_3$  comme sources de carbone.

La fragmentation ultérieure de l'ion à  $m/z$  515 a produit des valeurs de  $m/z$  169, 171 et 342 (Fig. 2.22). Ce profil de fragmentation permet d'assigner les valeurs de  $m/z$  obtenues avec les ions filles  $[(\text{Rha})\text{-H}]^-$  (+6 Da),  $[(\text{C}_{10})\text{-H}]^-$  (+3 Da) et  $[(\text{Rha}\text{-C}_{10})\text{-H}]^-$  (+9 Da), respectivement. Ces ions correspondent bien avec la signature de fragmentation de l'isotopologue  $[(\text{Rha}\text{-C}_{10}\text{-C}_{10})\text{-H}]^-$

(+12 Da) avec une distribution de marquage de +6 Da sur le rhamnose et +3 Da sur chaque acide gras C<sub>10</sub>.

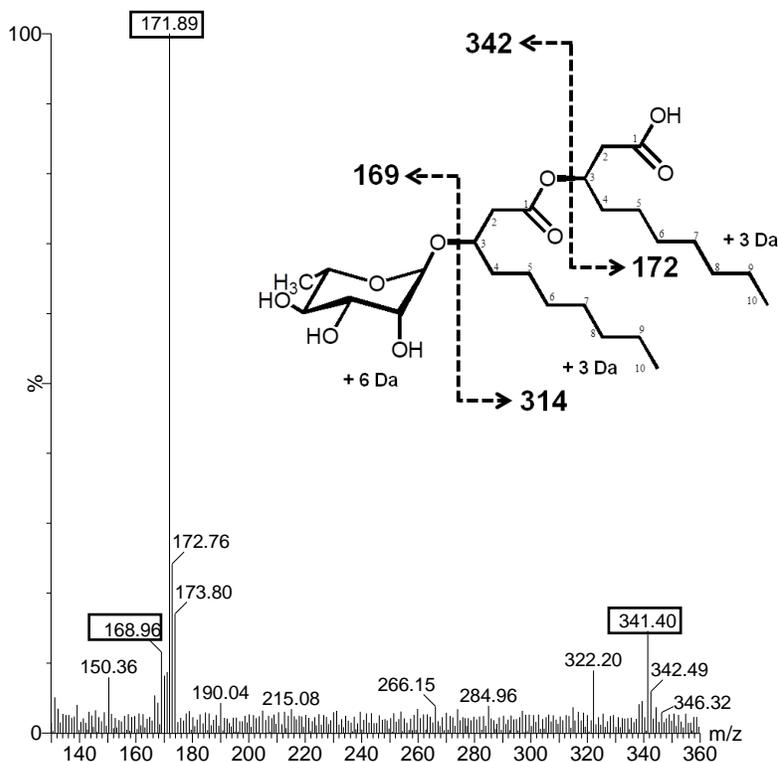


Figure 2.22. Spectre de masse observé lors de la fragmentation du précurseur  $m/z$  515 par MS/MS.

À des fins comparatives, le tableau 2.10 présente la liste des ions filles obtenus lors de l'analyse MS/MS des ions majoritaires observés dans les surnageants de PA14 avec différentes sources de carbone. On peut y voir que l'acide C<sub>12</sub>-d<sub>3</sub> et le glucose-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> contribuent de façon différente au marquage du Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>. Lorsque le C<sub>12</sub>-d<sub>3</sub> est la seule source de carbone, un marquage +3 Da apparaît principalement sur chacun des acides gras greffés au monorhamnolipide, tandis que l'addition du glucose-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> contribue à l'apparition d'un isotopologue majoritaire avec un marquage additionnel de +6 Da sur le rhamnose. Au regard de ces évidences, il semble que le glucose est préférentiellement utilisé pour la synthèse du rhamnose, tandis que le C<sub>12</sub> approvisionne les acides gras C<sub>10</sub> du dilipide sans avoir recours à l'oxydation complète du C<sub>12</sub>.

**Tableau 2.10. Profil de fragmentation obtenu par MS/MS des ions majoritaires observés dans les cultures de PA14 effectuées avec les sources de carbone C<sub>12</sub>, C<sub>12</sub>-d<sub>3</sub> et glucose-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> avec C<sub>12</sub>-d<sub>3</sub>.**

Source de carbone	Espèces observées majoritairement	Ion précurseur [M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Ions filles obtenus (m/z)	Ions pseudomoléculaires	Distribution du marquage
Acide C <sub>12</sub> (non-marqué)	[(Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub> )-H] <sup>-</sup>	503	163 169 333	[(Rha)-H] <sup>-</sup> [(C <sub>10</sub> )-H] <sup>-</sup> [(Rha-C <sub>10</sub> )-H] <sup>-</sup>	Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub> Sans marquage
Acide C <sub>12</sub> -d <sub>3</sub>	{[(Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub> )-d <sub>6</sub> ]-H] <sup>-</sup>	509	163 171 336	[(Rha)-H] <sup>-</sup> {[(C <sub>10</sub> )-d <sub>3</sub> ]-H] <sup>-</sup> {[(Rha-C <sub>10</sub> )-d <sub>3</sub> ]-H] <sup>-</sup>	Rha-C <sub>10</sub> (-d <sub>3</sub> )-C <sub>10</sub> (-d <sub>3</sub> ).
Glucose- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> et acide C <sub>12</sub> -d <sub>3</sub>	{[(Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub> )-d <sub>12</sub> ]-H] <sup>-</sup>	515	169 171 336	[(Rha)-H] <sup>-</sup> (+6 Da) [(C <sub>10</sub> )-H] <sup>-</sup> (+3 Da) [(Rha-C <sub>10</sub> )-H] <sup>-</sup> (+9 Da)	Rha(+6 Da)-C <sub>10</sub> (+3 Da)-C <sub>10</sub> (+3 Da).

#### 2.8.2.4 Marquage isotopique avec le l'acide dodécanoïque-12,12,12-d<sub>3</sub> et excès de glucose-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> chez PA14\_ *fabH3*:TnPhoAΔ*rhlYZ*

L'analyse du surnageant du mutant PA14\_ *fabH3*:TnPhoAΔ*rhlYZ* supplémenté avec l'acide C<sub>12</sub>-d<sub>3</sub> (20 mM) et excès de glucose-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> (80 mM) montre une variété d'ions ayant des valeurs de *m/z* entre 509 et 529, avec l'ion qui présente un *m/z* de 527 étant le plus abondant (Fig. 2.23). Cette valeur de *m/z* 527 est indicatrice d'un mono-rhamnolipide Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> avec une masse additionnelle de +24 Da. Afin de confirmer le marquage isotopique du mono-rhamnolipide, une analyse MS/MS a été effectuée subséquentement. La figure 2.24 montre le profil de fragmentation de l'ion *m/z* 527. On peut y voir les ions filles *m/z* 168, 176, 179, 346 et 348 qui correspondent bien avec la signature des deux isotopomères, à savoir le {[(Rha)(+6 Da)-(C<sub>10</sub>)(+8 Da)-(C<sub>10</sub>)(+10 Da)]-H]<sup>-</sup> et le {[(Rha)(+6 Da)-(C<sub>10</sub>)(+10 Da)-(C<sub>10</sub>)(+8 Da)]-H]<sup>-</sup>.

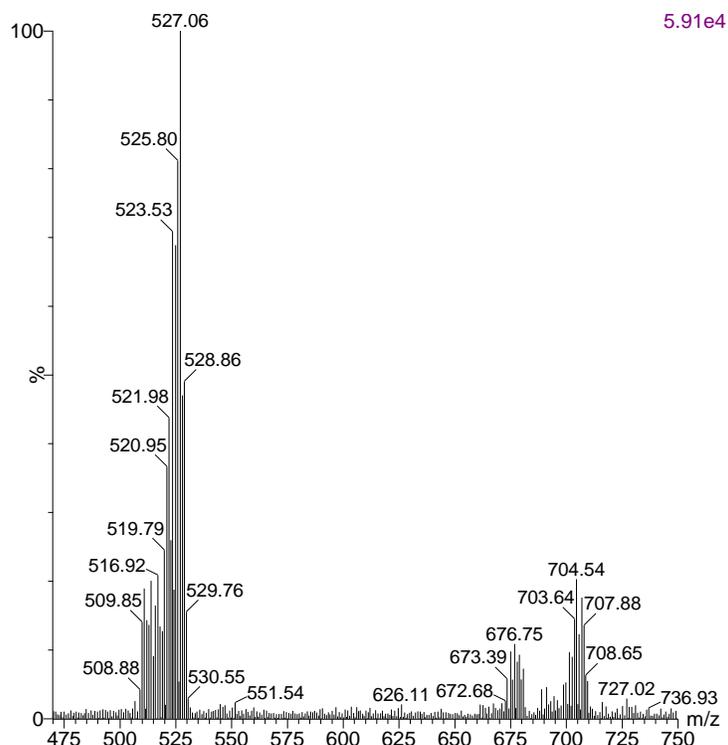


Figure 2.23. Spectre de masse obtenu de l'analyse du surnageant du mutant PA14\_ *fabH3::TnPhoAΔrhIZ* en utilisant le milieu MSM-glucose  $^{13}\text{C}_6$  et acide dodécanoïque-12,12,12- $d_3$  comme sources de carbone.

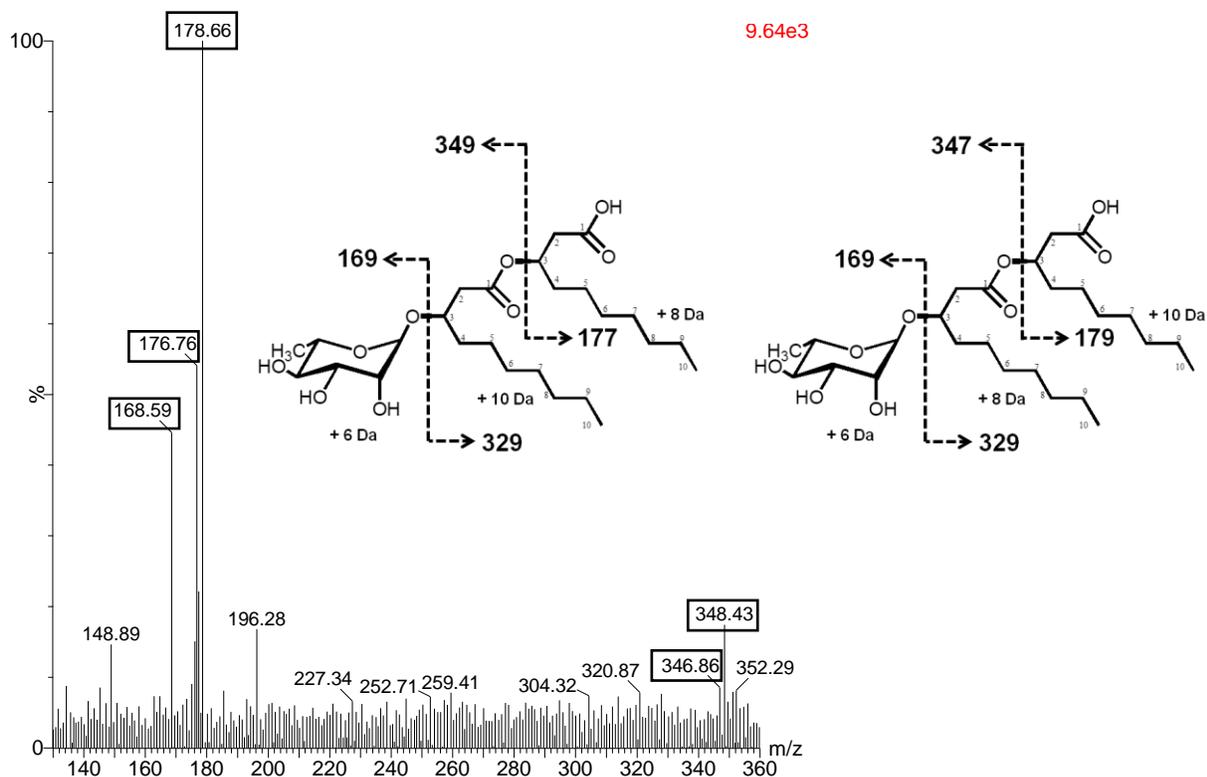


Figure 2.24. Spectre de masses produit de la fragmentation du précurseur  $m/z$  527 par MS/MS.

À des fins comparatives, le tableau 2.11 présente la liste des ions filles obtenus lors de l'analyse MS/MS des ions majoritaires observés dans les cultures de PA14\_ *fabH3::TnPhoAΔrhlYZ* avec le C<sub>12</sub>-d<sub>3</sub> et parallèlement avec C<sub>12</sub>-d<sub>3</sub> et le glucose-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>. On peut y observer que seul l'acide C<sub>12</sub>-d<sub>3</sub> produit un mono-rhamnolipide non-marqué (*m/z* = 503), toutefois, lorsque le glucose-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> est ajouté le mono-rhamnolipide obtenu est marqué autant sur le rhamnose (+6 Da) que sur les acides gras (+ 18 Da). D'une part, l'absence de marquage de l'ion *m/z* 503 suggère que C<sub>12</sub>-d<sub>3</sub> ne peut pas être utilisé directement pour fournir les acides gras C<sub>10</sub> nécessaires à la synthèse du dilipide. Le C<sub>12</sub>-d<sub>3</sub> étant la seule source de carbone, il semble être oxydé complètement en acétyl-CoA, qui est à son tour utilisé pour la synthèse de rhamnose et d'acides gras. D'autre part, lorsque le C<sub>12</sub>-d<sub>3</sub> et le glucose-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> sont ajoutés simultanément, il semble que le sucre est utilisé préférentiellement pour la synthèse de rhamnose et aussi pour la synthèse d'acides gras *via* la voie FAS II, ce qui expliquerait le marquage  $\{[(\text{Rha})(+6 \text{ Da})-(\text{C}_{10})(+8 \text{ Da})-(\text{C}_{10})(+10 \text{ Da})]-\text{H}\}^-$  et  $\{[(\text{Rha})(+6 \text{ Da})-(\text{C}_{10})(+10 \text{ Da})-(\text{C}_{10})(+8 \text{ Da})]-\text{H}\}^-$ .

**Tableau 2.11. Profil de fragmentation obtenu par MS/MS des ions majoritaires observés dans les cultures de PA14 effectuées avec les sources de carbone C<sub>12</sub>-d<sub>3</sub> et glucose-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> avec C<sub>12</sub>-d<sub>3</sub>.**

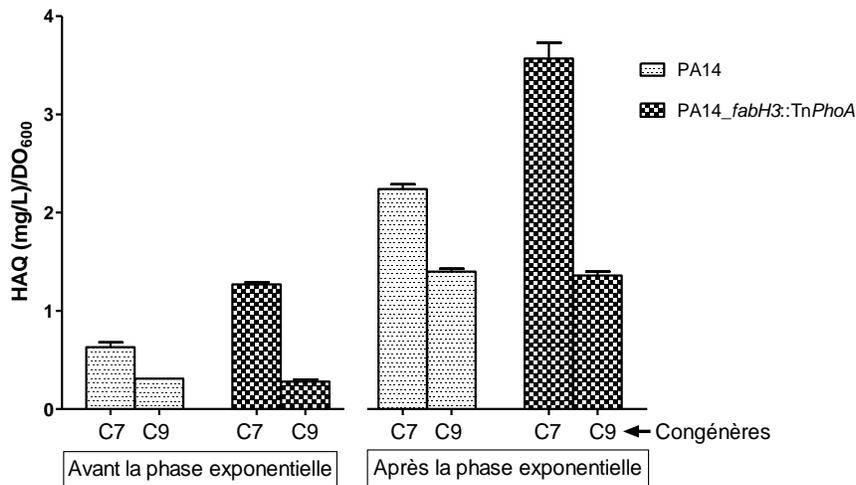
Source de carbone	Espèces observées majoritairement	Ion précurseur [M-H] <sup>-</sup> ( <i>m/z</i> )	Ions filles obtenus ( <i>m/z</i> )	Ions pseudomoléculaires	Distribution du marquage
Acide C <sub>12</sub> -d <sub>3</sub>	$\{[(\text{Rha}-\text{C}_{10}-\text{C}_{10})-\text{H}]\}^-$	503	163 169 333	$\{[(\text{Rha})-\text{H}]\}^-$ $\{[(\text{C}_{10})-\text{H}]\}^-$ $\{[(\text{Rha}-\text{C}_{10})-\text{H}]\}^-$	Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub> Sans marquage
Glucose- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> et acide C <sub>12</sub> -d <sub>3</sub>	$\{[(\text{Rha}-\text{C}_{10}-\text{C}_{10})-\text{d}_{24}]-\text{H}\}^-$	527	169 177 349 169 179 347	$\{[(\text{Rha})-\text{H}]\}^- (+6 \text{ Da})$ $\{[(\text{C}_{10})-\text{H}]\}^- (+8 \text{ Da})$ $\{[(\text{Rha}-\text{C}_{10})-\text{H}]\}^- (+16 \text{ Da})$ $\{[(\text{Rha})-\text{H}]\}^- (+6 \text{ Da})$ $\{[(\text{C}_{10})-\text{H}]\}^- (+10 \text{ Da})$ $\{[(\text{Rha}-\text{C}_{10})-\text{H}]\}^- (+14 \text{ Da})$	$\{[(\text{Rha})(+6 \text{ Da})-(\text{C}_{10})(+8 \text{ Da})-(\text{C}_{10})(+10 \text{ Da})]-\text{H}\}^-$ $\{[(\text{Rha})(+6 \text{ Da})-(\text{C}_{10})(+10 \text{ Da})-(\text{C}_{10})(+8 \text{ Da})]-\text{H}\}^-$

### 2.8.3 FabH3 affecte la disponibilité métabolique d'octanoyl-CoA

Étant donné que le mutant PA14\_*fabH3*::Tn*PhoA* affecte peu la production de rhamnolipides (il en synthétise 30 % de moins que PA14), nous étudions dans cette section si FabH3 influence la disponibilité métabolique de C<sub>8</sub>-CoA. Pour ce faire, nous considérons que l'entrée du C<sub>8</sub>-CoA dans la voie FAS II – *via* l'activité de FabH3 – pourrait engendrer une compétition pour la consommation de ce précurseur dans d'autres voies métaboliques comme la biosynthèse des HAQ (4-hydroxy-2-alkylquinolines). Les HAQ sont une famille de molécules de signalisation du système de *quorum sensing pqs* utilisant les acides gras C<sub>8</sub> ou C<sub>10</sub> comme précurseurs (Fig. supplémentaire 2.1) (Dulcey *et al.*, 2013, Lépine *et al.*, 2004). Puisque chez un mutant PA14\_*fabH3*::Tn*PhoA*, la disponibilité de C<sub>8</sub>-CoA devrait augmenter, la biosynthèse des HAQ pourrait donc être davantage favorisée.

La figure 2.25 montre la production des HAQ chez le mutant PA14\_*fabH3*::Tn*PhoA* et PA14 dans le milieu riche TSB. Puisque la production des HAQ est majeure à la fin de la phase de croissance exponentielle (Dekimpe, 2010), nous avons effectué un échantillonnage avant et après cette phase afin de vérifier si l'effet métabolique recherché était constant pendant la croissance. La partie gauche de la figure 2.25 révèle la production de HAQ –C<sub>7</sub> et –C<sub>9</sub> (les congénères incorporant un acide gras C<sub>8</sub> et C<sub>10</sub> dans leur structure, respectivement) avant la phase de croissance exponentielle. On peut y voir une différence de la production de HAQ-C<sub>7</sub> chez les deux souches. En effet, chez PA14, la production de HAQ-C<sub>7</sub> est de 0.6 mg/L/DO<sub>600</sub> tandis que chez le mutant PA14\_*fabH3*::Tn*PhoA*, celle-ci est de 1.2 mg/L/DO<sub>600</sub>, autrement dit, la teneur en HAQ-C<sub>7</sub> est 100 % fois plus élevée lorsque l'activité de FabH3 est abrogée. Concernant la production de HAQ-C<sub>9</sub>, celle-ci reste similaire chez les deux souches, elle est d'environ 0.3 mg/L/DO<sub>600</sub>. La partie droite de la figure montre la production de congénères –C<sub>7</sub> et –C<sub>9</sub> après la phase exponentielle. Chez le mutant PA14\_*fabH3*::Tn*PhoA*, la production de HAQ-C<sub>7</sub> est de 3.57 mg/L/DO<sub>600</sub>, soit 60 % fois plus élevée par rapport à PA14 qui est de 2.24 mg/L/DO<sub>600</sub>. Par ailleurs, il n'y pas de différence significative en ce qui concerne la production de congénères HAQ-C<sub>9</sub> entre les deux souches. Ces résultats indiquent que le rôle de FabH3 affecte de façon importante le flux de l'octanoyl-CoA dans la  $\beta$ -oxydation sans toutefois avoir un effet observable sur les intermédiaires à 10 carbones dans le contexte de la biosynthèse des HAQ.

Compte tenu que chez le mutant PA14\_*fabH3::TnPhoA*, le flux de C<sub>8</sub>-CoA favorise davantage la synthèse des HAQ, il est envisageable que le blocage de la synthèse de HAQ (Fig. supplémentaire 2.1) puisse favoriser le flux du C<sub>8</sub> vers la synthèse de C<sub>10</sub>-ACP grâce à l'activité de FabH3, ce qui pourrait se refléter par une augmentation de la synthèse des rhamnolipides selon le modèle de Zhang *et al.* 2012. Cette question est abordée dans la section 2.8.3.1.

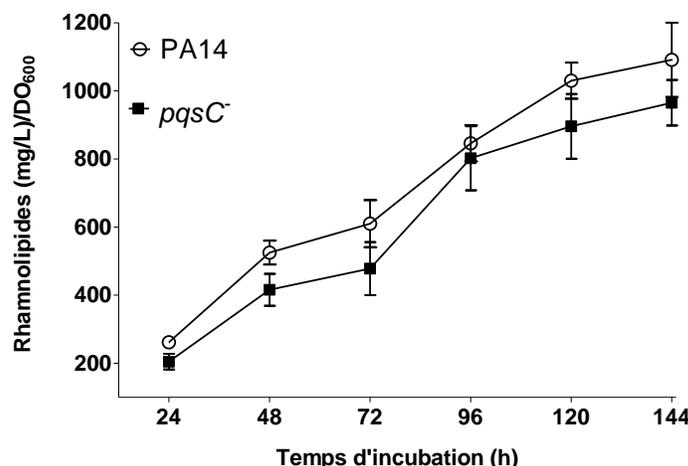


**Figure 2. 25. Production des HAQ chez le mutant PA14\_*fabH3::TnPhoA* en comparaison avec PA14 en milieu riche.**

Ces résultats ont été confirmés par des cinétiques effectuées dans le cadre d'une étude sur la production des HAQ au laboratoire du Pr. Déziel (résultats non montrés).

### 2.8.3.1 Le blocage de la synthèse de HAQ n'affecte pas la production des rhamnolipides

PqsC est l'enzyme responsable de l'approvisionnement d'octanoyle vers la synthèse des HAQ. Chez un mutant *pqsC*, la consommation de C<sub>8</sub>-CoA pour la synthèse des HAQ est interrompue. Nous avons comparé la production de rhamnolipides chez le mutant *pqsC* et PA14 en milieu MSM-glycérol. La figure 2.26 montre chez PA14 une augmentation progressive du rendement de production de rhamnolipides de 262 à 1091 mg/L/DO<sub>600</sub> pendant une période d'incubation de 144 h. Toutefois, on peut observer que la teneur en rhamnolipides chez le mutant *pqsC* semble suivre la même tendance, passant de 205 à 965 mg/L/DO<sub>600</sub>. De plus, nous avons vérifié s'il y avait des différences quant au profil de congénères de rhamnolipides entre les deux souches (tableau 2.12).



**Figure 2.26. Cinétique de production des rhamnolipides chez le mutant *pqsC* en comparaison avec PA14.** Expérience effectuée en milieu minimal MSM-glycérol. Les moyennes de production des rhamnolipides ne sont pas significativement différentes entre les deux populations (test de Student avec  $P < 0.05$ ).

Le tableau 2.12 révèle que la proportion des 5 types de congénères de HAA analysés ( $C_8-C_8$ ,  $C_8-C_{10}/C_{10}-C_8$ ,  $C_{10}-C_{10}$ ,  $C_{10}-C_{12}/C_{12}-C_{10}$  et  $C_{12}-C_{12}$ ) est comparable entre le mutant *pqsC* et PA14. Or, l'augmentation de la disponibilité métabolique d'octanoyl-CoA semble ne pas avoir un effet ni sur la production, ni sur la composition des rhamnolipides. Ceci sera vérifié en faisant une culture de PA14 supplémentée avec des acides gras comme seules sources de carbone (Voir section 2.8.3.2).

**Tableau 2.12. Profil de congénères des HAA et des rhamnolipides produits par un mutant *pqsC*.** Effectué dans un milieu minimal supplémenté avec du glycérol pendant 144h.

Souche	Pourcentage de congénères				
	$C_8-C_8$ <sup>1</sup>	$C_8-C_{10}$ et $C_{10}-C_8$ <sup>2</sup>	$C_{10}-C_{10}$ <sup>3</sup>	$C_{10}-C_{12}$ et $C_{12}-C_{10}$ <sup>4</sup>	$C_{12}-C_{12}$ <sup>5</sup>
PA14	0.23 (± 0.03)	10.30 (± 0.97)	74.66 (± 3.68)	14.30 (± 3.43)	0.48 (± 0.08)
PA14Δ <i>pqsC</i>	0.25 (± 0.10)	9.98 (± 1.06)	73.01 (± 1.67)	16.16 (± 1.41)	0.58 (± 0.12)

<sup>1</sup> Somme de congénères  $C_8-C_8$  ( $m/z$  301.3), Rha- $C_8-C_8$  ( $m/z$  447.3) et Rha-Rha- $C_8-C_8$  ( $m/z$  593.5).

<sup>2</sup> Somme de congénères  $C_8-C_{10}/C_{10}-C_8$  ( $m/z$  329.3), Rha- $C_8-C_{10}/Rha-C_{10}-C_8$  ( $m/z$  475.4) et Rha-Rha- $C_8-C_{10}/Rha-Rha-C_{10}-C_8$  ( $m/z$  621.6).

<sup>3</sup> Somme de congénères  $C_{10}-C_{10}$  ( $m/z$  357.3), Rha- $C_{10}-C_{10}$  ( $m/z$  503.4) et Rha-Rha- $C_{10}-C_{10}$  ( $m/z$  649.5).

<sup>4</sup> Somme de congénères  $C_{10}-C_{12}/C_{12}-C_{10}$  ( $m/z$  385.3), Rha- $C_{10}-C_{12}/Rha-C_{12}-C_{10}$  ( $m/z$  531.4) et Rha-Rha- $C_{10}-C_{12}/Rha-Rha-C_{12}-C_{10}$  ( $m/z$  677.5).

<sup>5</sup> Somme de congénères  $C_{12}-C_{12}$  ( $m/z$  413.6), Rha- $C_{12}-C_{12}$  ( $m/z$  559.7) et Rha-Rha- $C_{12}-C_{12}$  ( $m/z$  705.5).

### 2.8.3.2 Le C<sub>8</sub> et le C<sub>12</sub> exogènes affectent différemment la production de rhamnolipides mais pas leur composition chez PA14

Puisque le complexe RhIYZ utilise un intermédiaire C<sub>10</sub> de la  $\beta$ -oxydation et FabH3 un intermédiaire C<sub>8</sub>, la supplémentation de PA14 avec du glycérol comme seule source de carbone ne permet pas d'observer les différentes contributions de ces enzymes dans la biosynthèse des HAA. Si l'on considère que le pontage de la  $\beta$ -oxydation vers la synthèse des HAA se fait exclusivement *via* FabH3 (tel que proposé par Zhang *et al.* 2012), la supplémentation avec l'acide octanoïque devrait favoriser davantage la biosynthèse de rhamnolipides chez PA14. Au contraire, si le pontage se fait au niveau du C<sub>10</sub> grâce à RhIYZ (tel que proposé par Abdel-Mawgoud *et al.* 2014b), la supplémentation avec l'acide dodécanoïque serait plus avantageuse pour la synthèse des HAA.

Afin de vérifier si l'excès d'acide octanoïque favorise la production de rhamnolipides, deux cultures de PA14 ont été effectuées en milieu minimal supplémenté avec l'acide octanoïque et parallèlement avec l'acide dodécanoïque comme uniques sources de carbone. La figure 2.27 montre la quantification des protéines totales (utilisée ici comme un indicateur indirect de la croissance cellulaire) et la teneur de rhamnolipides sur trois échantillonnages effectués à 12, 24 et 30 h d'incubation. La partie gauche de la figure montre l'effet de la présence de C<sub>8</sub>. Nous pouvons y voir une augmentation des protéines totales entre 12 et 24 h d'incubation, passant de 47 à 148 mg/L, respectivement. Toutefois, il n'y a pas de variations significatives après 30 h d'incubation, indiquant que la culture se trouve en phase stationnaire. La teneur en rhamnolipides suit une tendance croissante remarquée passant de 32 à 456 mg/L entre 12 et 24 h, cette dernière valeur reste constante pendant la phase stationnaire (après 30 h d'incubation).

La partie droite de la figure montre l'effet de la présence de C<sub>12</sub>. Dans les trois échantillonnages effectués, la quantité de protéines totales semble suivre la même tendance observée dans la culture supplémentée avec le C<sub>8</sub>, indiquant que les deux sources de carbone testées affectent de façon similaire la croissance cellulaire. Néanmoins, la production de rhamnolipides est majeure dans la culture supplémentée avec du C<sub>12</sub> en comparaison à celle supplémentée avec du C<sub>8</sub>. À 12 h d'incubation, la concentration de rhamnolipides dans la culture supplémentée avec le C<sub>8</sub> était de 32 mg/L tandis que celle supplémentée avec le C<sub>12</sub> était de 50 mg/L. Cette dernière valeur est donc 56 % plus élevée. De façon similaire, après 24 et 30 h

d'incubation, la production de rhamnolipides est respectivement 60 % et 100 % plus élevée dans la culture supplémentée avec l'acide gras C<sub>12</sub> que celle supplémentée avec le C<sub>8</sub>.

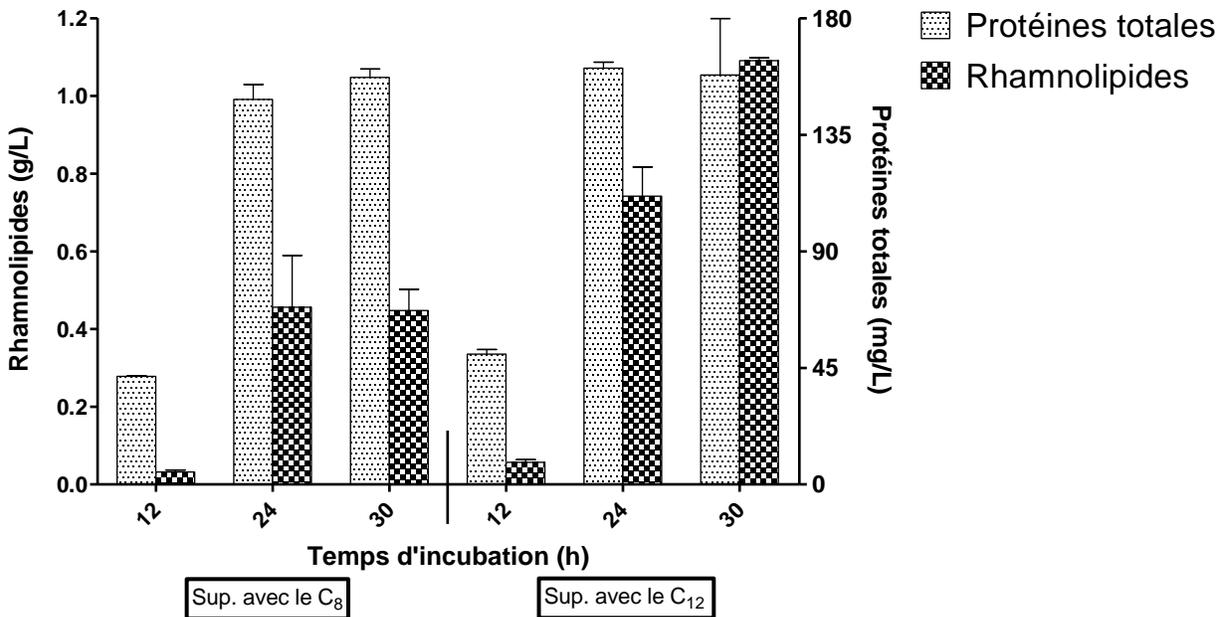


Figure 2.27. Production de rhamnolipides chez PA14 en présence d'acide octanoïque ou dodécanoïque comme seule source de carbone.

Par ailleurs, considérant que la disponibilité de différents intermédiaires de la  $\beta$ -oxydation peut varier entre les cultures supplémentées avec le C<sub>8</sub> et avec le C<sub>12</sub>, il est envisageable que le profil de congénères de rhamnolipides varie aussi dans les deux conditions de culture. Le tableau 2.13 montre les pourcentages des acides gras incorporés dans les HAA et les rhamnolipides après 24 h d'incubation. On y observe que la proportion des acides gras C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub> et C<sub>12</sub> incorporés dans les congénères détectés est similaire dans les deux conditions de supplémentation testées. Clairement, le C<sub>8</sub> et le C<sub>12</sub> exogènes affectent différemment la production de rhamnolipides lorsqu'ils se trouvent en excès sans toutefois affecter la composition du mélange des congénères de rhamnolipides.

Puisque l'ensemble des résultats présentés dans la section 2.8.3 révèle que l'augmentation de la disponibilité métabolique du C<sub>12</sub>-CoA favorise davantage la production de rhamnolipides en comparaison avec le C<sub>8</sub>-CoA, nous remettons en question l'hypothèse de Zhang *et al.* (2012) selon laquelle la  $\beta$ -oxydation est connectée avec la synthèse des HAA

seulement au niveau de l'intermédiaire C<sub>8</sub>. Considérant que les mutants PA14\_ *fabH3*:Tn*PhoA* (Fig. 2.17) et *rhlYZ* (Fig. 2.7) affectent la production des rhamnolipides, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que les deux activités enzymatiques contribuent différemment à la synthèse des HAA.

**Tableau 2.13. Pourcentage d'acide gras incorporé dans les congénères des HAA et des rhamnolipides en utilisant l'acide gras C<sub>8</sub> et C<sub>12</sub> comme seules sources de carbone.**

Effectué dans un milieu minimal supplémenté avec l'acide octanoïque ou l'acide décanoïque pendant 24 h.

Source de carbone	Pourcentage des acides gras présents dans les congénères		
	C <sub>8</sub> <sup>1</sup>	C <sub>10</sub> <sup>2</sup>	C <sub>12</sub> <sup>3</sup>
Acide octanoïque	2.8 (± 0.6)	87.5 (± 1.0)	9.7 (± 1.3)
Acide dodécanoïque	5.0 (± 1.4)	87.2 (± 1.8)	7.8 (± 0.6)

<sup>1</sup> Calculé à partir des congénères C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub> (*m/z* 301.3), Rha-C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub> (*m/z* 447.3), Rha-Rha-C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub> (*m/z* 593.5), C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>/C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub> (*m/z* 329.3), Rha-C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>/Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub> (*m/z* 475.4) et Rha-Rha-C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>/Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub> (*m/z* 621.6).

<sup>2</sup> Calculé à partir des congénères C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>/C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub> (*m/z* 329.3), Rha-C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>/Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub> (*m/z* 475.4), Rha-Rha-C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>/Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub> (*m/z* 621.6), C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> (*m/z* 357.3), Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> (*m/z* 503.4) et Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> (*m/z* 649.5).

<sup>3</sup> Calculé à partir des congénères C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>/C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub> (*m/z* 385.3), Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>/Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub> (*m/z* 531.4), Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>/Rha-Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub> (*m/z* 677.5), C<sub>12</sub>-C<sub>12</sub> (*m/z* 413.6), Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>12</sub> (*m/z* 559.7) et Rha-Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>12</sub> (*m/z* 705.5).

## 2.8.4 Recherche d'enzymes de type acyl-CoA:ACP transacylases chez PA14

La section 2.8.4 vise à déterminer si, chez PA14, il existe une activité acyl-CoA:ACP transacylase permettant de produire le *R*-hydroxydécanoïl-ACP à partir de son homologue activé par la CoA. L'activité catalytique recherchée permettrait de connecter directement l'intermédiaire hydroxylé de la  $\beta$ -oxydation avec RhlA, favorisant la synthèse des HAA (Revoir la figure 2.10).

Dans un premier temps, l'identification des acyl-CoA:ACP transacylases chez *P. aeruginosa* s'est basée sur la recherche de séquences peptidiques homologues utilisant comme matrice la séquence de l'enzyme AasS de *Vibrio harveyi* B392, une acyl-ACP synthétase caractérisée (Jiang *et al.*, 2010). Le tableau 2.14 montre quatre protéines putatives de PA14 appartenant à la famille des acyl-CoA synthétases. Ces protéines ont été choisies en fonction d'une similarité supérieure à 40 % avec AasS d'après un alignement de séquences peptidiques effectué sur le site [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com). Les trois protéines putatives codées par les gènes PA3924, PA4198 et PA2557 ont été rapportées dans une étude précédente vis-à-vis de leur

similarité avec l'acyl-CoA synthétase FadD d'*E. coli*. Le motif de liaison à l'ATP/AMP et le motif de reconnaissance d'acides gras, une caractéristique des acyl-CoA synthétases, sont conservés chez ces trois protéines (Zarzycki-Siek *et al.*, 2013). Zarzycki-Siek *et al.* (2013) suggèrent que le gène PA3924 (*fadD6*) est responsable de l'expression d'une protéine pouvant utiliser de l'acide gras C<sub>4</sub> exogène, permettant la survie de la bactérie lorsque les gènes *fadD1*, *2*, *3*, *4*, et *5* sont absents du génome tandis que les gènes PA4198 et PA2557 semblent n'avoir aucune implication dans l'assimilation des acides gras.

Afin de vérifier si les protéines, codées par les gènes présentés dans le tableau 2.14, sont impliquées dans la biosynthèse des HAA *via* une fonction acyl-CoA:ACP transacylase, une analyse de la production des rhamnolipides a été effectuée chez ces mutants en milieu minimal supplémenté avec le glycérol. On peut observer, dans la figure 2.28, la production de rhamnolipides qui oscille entre 450 et 630 mg/L/DO<sub>600</sub> de façon similaire entre les mutants étudiés et PA14. Ces résultats révèlent que ces mutations n'affectent significativement la biosynthèse des rhamnolipides que lorsque le glycérol est la seule source de carbone. Puisque nous ne pouvons pas écarter la possibilité que les gènes décrits possèdent une fonction acyl-CoA:ACP transacylase, des tests enzymatiques spécifiques ont été effectués afin de confirmer l'existence de cette activité dans la section 2.8.4.1.

**Tableau 2.14. Enzymes acyl-CoA synthétases identifiées chez PA14 par homologie de séquence avec l'enzyme AasS de *Vibrio harveyi* B392.**

Locus de la protéine putative	Produit prédit <sup>1</sup>	Identité <sup>2</sup> (%)	Similarité <sup>2</sup> (%)	ID du mutant <sup>3</sup>	Transposon inséré <sup>3</sup>	Nom du gène	Références <sup>5</sup>
PA14_13110 (PA3924) <sup>4</sup>	CoA-ligase d'acides gras à chaîne longue.	54	72	28440	TnMrT7	FadD6	(Zarzycki-Siek <i>et al.</i> , 2013)
PA14_09660 (PA4198) <sup>4</sup>	Synthétase d'acyl-CoA.	32	52	23248	TnMrT7	Non assigné	(Zarzycki-Siek <i>et al.</i> , 2013)
PA14_35940	Synthétase d'acyl-CoA.	30	49	43104	TnMrT7	Non assigné	Aucun article
PA14_31470 (PA2557) <sup>4</sup>	Protéine liant l'AMP.	24	44	30010	TnMrT7	Non assigné	(Zarzycki-Siek <i>et al.</i> , 2013)

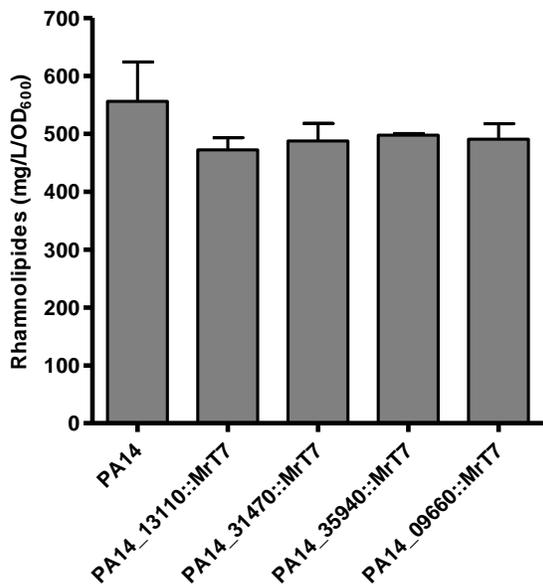
<sup>1</sup>Prédiction de fonction obtenue du site [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com).

<sup>2</sup>D'après l'alignement de séquences peptidiques effectué sur le site [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com).

<sup>3</sup>D'après la banque de mutants par transposon générée par Liberati *et al.* (2016) (<http://pa14.mgh.harvard.edu/cgi-bin/pa14/home.cgi>).

<sup>4</sup>Locus des gènes chez *P. aeruginosa* PAO1.

<sup>5</sup>Des articles qui font mention de ces protéines putatives.



**Figure 2.28. Production de rhamnolipides chez les mutants PA14\_13110::TnMrT7 (*fadD6*), PA14\_09660::TnMrT7, PA14\_35940::TnMrT7 et PA14\_31470::TnMrT7 en comparaison avec PA14.**  
 Il n'y a pas de variation significative de production entre les cinq souches testées selon l'analyse statistique effectuée en utilisant le test Kruskal-Wallis avec un intervalle de confiance de 95 %.

#### 2.8.4.1 Étude de l'activité acyl-CoA:ACP transacylase par FadD6

Parmi les quatre gènes présentés dans le tableau 2.14, l'enzyme FadD6 possède la plus haute similarité avec l'acyl-ACP synthétase AasS (72 %). Il est donc possible que FadD6 partage le même rôle catalytique que AasS, présentant plutôt une activité enzymatique de type acyl-CoA:ACP transacylase. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons purifié FadD6 et nous avons effectué quatre tests enzymatiques d'acylation *in vitro* en utilisant comme accepteur d'acyle, l'AcpP1 de PA14, et comme donneurs, quatre acides gras conjugués à la CoA, à savoir le C<sub>6</sub>-CoA, le C<sub>8</sub>-CoA, le C<sub>10</sub>-CoA et le 3-OH-C<sub>10</sub>-CoA (cf. le schéma de la réaction dans la figure supplémentaire 2.3). L'acylation de l'AcpP1 a été vérifiée par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Les résultats de ces tests enzymatiques sont compilés dans le tableau 2.15.

**Tableau 2.15. Valeurs de  $m/z$  obtenues lors de l'acylation de l'AcpP1 par l'enzyme purifiée FadD6.**

Substrat	Principales valeurs $m/z$ observées	Ajout de masses attribuées lors de la réaction (Da)	Forme attribuée
C <sub>6</sub> -CoA	11160	Non-déterminé	Non-déterminé
C <sub>8</sub> -CoA	10440	10102 <sup>1</sup> +339 <sup>3</sup>	Holo-AcpP1 <sub>-1Met</sub>
	10570	10102 <sup>1</sup> +339 <sup>3</sup> +128 <sup>4</sup> ou 10230 <sup>2</sup> +339 <sup>3</sup>	C <sub>8</sub> -holo-AcpP1 <sub>-1Met</sub> ou holo-AcpP1 <sub>Natif</sub>
C <sub>10</sub> -CoA	10442	10102 <sup>1</sup> +339 <sup>3</sup>	Holo-AcpP1 <sub>-1Met</sub>
	10595	10102 <sup>1</sup> +339 <sup>3</sup> +157 <sup>5</sup>	C <sub>10</sub> -holo-AcpP1 <sub>-1Met</sub>
	10727	10230 <sup>4</sup> +339 <sup>3</sup> +157 <sup>5</sup>	C <sub>10</sub> -holo-AcpP1 <sub>Natif</sub>
R-3OH-C <sub>10</sub> -CoA	10441	10102 <sup>1</sup> +339 <sup>3</sup>	Holo-AcpP1 <sub>-1Met</sub>
	10571	10230 <sup>4</sup> +339 <sup>3</sup>	Holo-AcpP1 <sub>Natif</sub>

<sup>1</sup>Masse de l'apo-AcpP1 sous la forme clivée apo-AcpP1<sub>-1Met</sub>.

<sup>2</sup>Masse de l'apo-AcpP1 sous la forme native apo-AcpP1<sub>Natif</sub>.

<sup>3</sup>Masse du groupement phosphopantothéine.

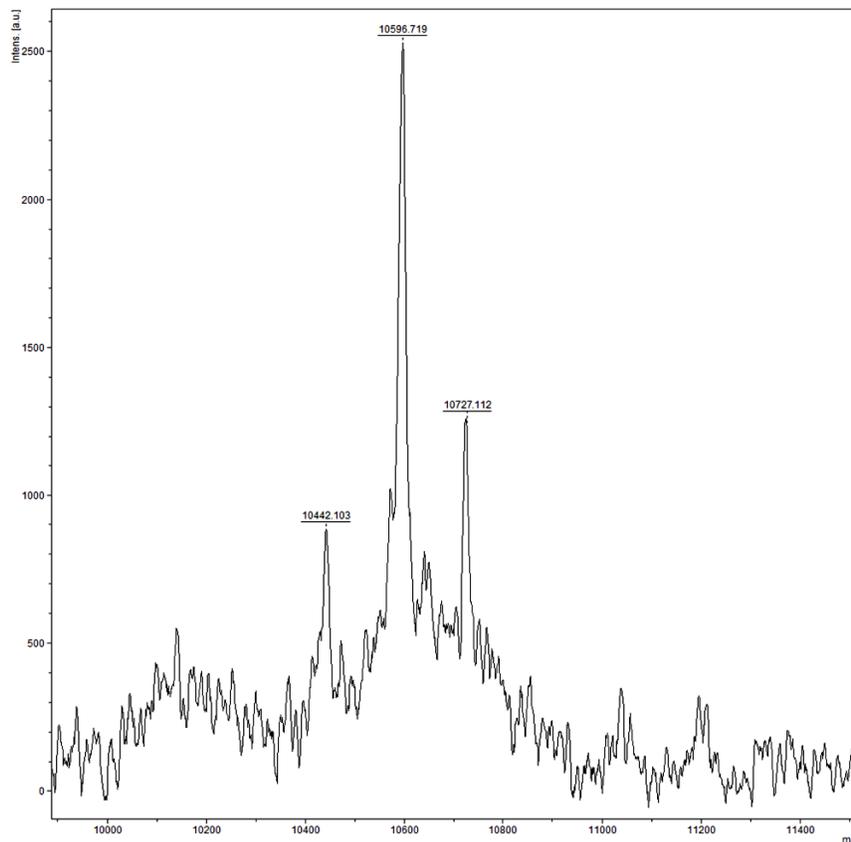
<sup>4</sup>Masse du groupement octanoyle.

<sup>5</sup>Masse du groupement décanoyle.

Lors du test enzymatique utilisant le C<sub>6</sub>-CoA comme substrat, nous avons observé une valeur  $m/z$  de 11160. Toutefois, les valeurs attendues lorsque l'AcpP1 devient activée ou acylée dans cette réaction diffèrent de cette valeur, soit  $m/z$  10440 holo-AcpP1<sub>-1Met</sub>,  $m/z$  10570 holo-AcpP1<sub>Natif</sub>,  $m/z$  10540 C<sub>6</sub>-AcpP1<sub>-1Met</sub> ou 10668 C<sub>6</sub>-AcpP1<sub>Natif</sub>. Puisque la valeur observée de  $m/z$  11160 est plus élevée que celles attendues, nous n'avons pas pu attribuer le  $m/z$  observé à aucune forme d'ACP. Par ailleurs, la réaction avec le C<sub>8</sub>-CoA a produit deux valeurs de  $m/z$ . Le  $m/z$  10440 correspond bien avec l'AcpP1<sub>-1Met</sub> (10102 Da) activé par le groupement phosphopantothéine (339 Da) donnant l'holo-AcpP1<sub>-1Met</sub>. Le  $m/z$  10570 peut correspondre à deux formes d'ACP. D'une part, l'activation de l'apo-AcpP1<sub>Natif</sub> (10230 Da) par le groupement phosphopantothéine (339 Da) permet l'obtention d'un ACP de masse 10570 Da. D'autre part, lorsque l'apo-AcpP1<sub>-1Met</sub> (10102 Da) devient activé et acylé avec le C<sub>8</sub>, les masses de 339 et 128 Da s'ajoutent, respectivement, donnant un C<sub>8</sub>-AcpP1<sub>-1Met</sub> de masse 10570 Da. Puisque dans les conditions d'analyse utilisées, nous n'avons pas pu déterminer laquelle des deux formes a été produite dans la réaction, nous ne pouvons pas conclure que FadD6 peut transférer le groupement acyle C<sub>8</sub> vers l'AcpP1. Néanmoins, lorsque le C<sub>10</sub>-CoA a été utilisé comme substrat, des valeurs observées de  $m/z$  10595 et 10727 révèlent une possible acylation de l'AcpP1 (Fig. 2.29). Le  $m/z$  10595 correspond bien avec l'apo-AcpP1<sub>-1Met</sub> (10102 Da) activé (+339 Da) et acylé (+157 Da) et le  $m/z$  10727 correspond bien avec l'apo-AcpP1<sub>Natif</sub> (10102 Da) activé (+339 Da) et acylé (+157 Da). Finalement, la réaction enzymatique avec le R-3OH-C<sub>10</sub>-

CoA a produit des  $m/z$  10441 et 10571, qui semblent bien correspondre avec les formes activées holo-AcpP1-<sub>1Met</sub> et holo-AcpP1<sub>Natif</sub>, respectivement. Aucune valeur de  $m/z$  indiquant l'acylation de l'AcpP1 avec le C<sub>10</sub> hydroxylé n'a été observée. Le même test enzymatique effectué avec l'enzyme AasS de *V. harveyi* n'a pas non plus produit des valeurs de  $m/z$  correspondant à une acylation avec le C<sub>10</sub> hydroxylé (résultat non montré).

Bien que l'acylation de l'AcpP1 avec le *R*-3OH-C<sub>10</sub> n'a pas pu être confirmée en présence de FadD6, nous ne pouvons pas écarter la possibilité que l'acide gras hydroxylé de l'AcpP1 puisse être transféré par une acyl-CoA:ACP transacylase spécifique non-identifiée (ou bien identifiée, mais sans fonction spécifique rapportée). Afin d'évaluer cette possibilité, un test enzymatique utilisant un extrait cellulaire de *P. aeruginosa* en présence d'ACP et un excès de *R*-3-hydroxydécanoyl-CoA a été effectué (Voir la section 2.8.4.2).



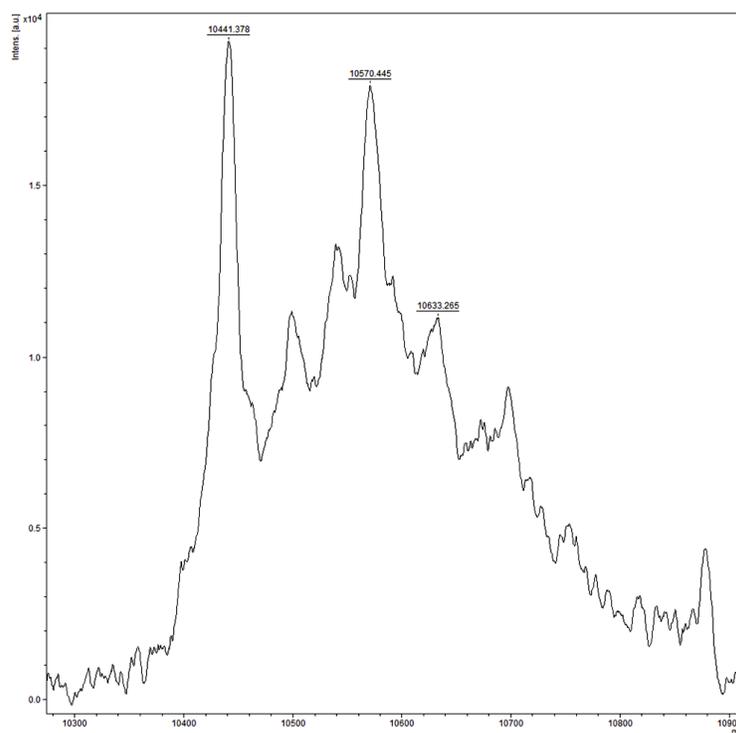
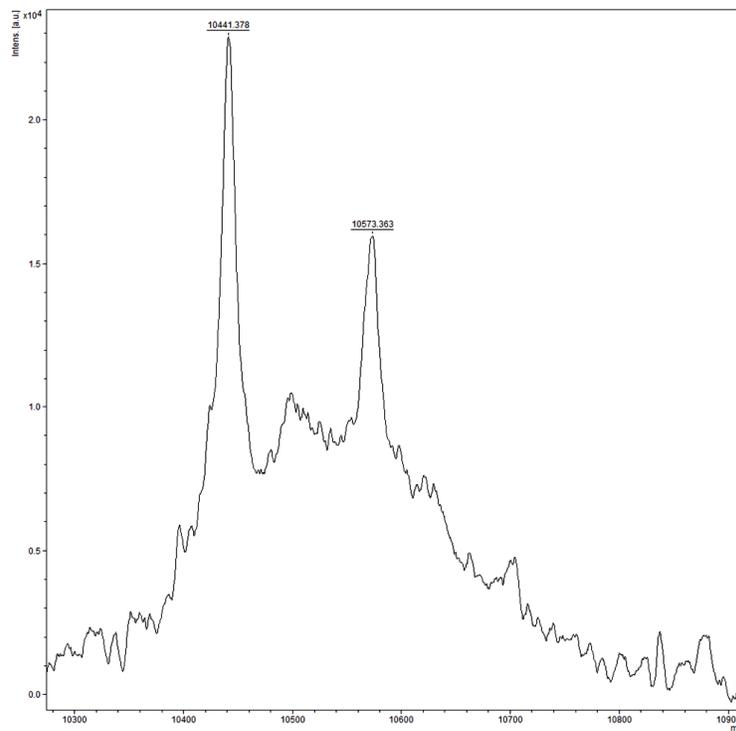
**Figure 2.29. Spectre de masse obtenu lors de l'acylation de l'AcpP1 de *P. aeruginosa* avec un groupement décanoyle et FadD6.**

Analyse effectuée par MALDI-TOF MS. Les pics principaux correspondent à :  $m/z$  10442 (holo-AcpP1-<sub>1Met</sub> non-acylé),  $m/z$  10596 (C<sub>10</sub>-AcpP1-<sub>1Met</sub>) et  $m/z$  10727 (C<sub>10</sub>-AcpP1<sub>Natif</sub>).

#### 2.8.4.2 Acylation de l'ACP dans un extrait cellulaire d'un mutant PA14\_ *rhIA*::TnMr7

Afin d'investiguer si l'AcpP1 de PA14 peut accepter un groupement acyle hydroxylé dans un extrait cellulaire (pour vérifier l'hypothèse émise en Fig. 2.10), un extrait cytoplasmique a été préparé à partir d'une culture d'un mutant PA14\_ *rhIA*::TnMr7 polaire cultivé dans un milieu minimal où l'acide octadécanoïque (C<sub>18</sub>) a été utilisé comme la seule source de carbone. D'une part, la supplémentation avec un acide gras à chaîne longue (l'acide octadécanoïque) cherchait à favoriser l'induction de l'expression des gènes impliqués dans la  $\beta$ -oxydation (Kang *et al.*, 2008). D'autre part, l'utilisation d'un mutant *rhIA* a été envisagée afin d'éviter que le R-3OH-C<sub>10</sub>-AcpP1 qui serait produit dans la réaction d'acylation ne soit rapidement utilisé pour la synthèse de HAA, ce qui résulterait en la formation d'un AcpP1 non acylé. L'extrait cytoplasmique a été obtenu à partir d'un lysat cellulaire additionné avec du holo-AcpP1-6His et un excès de R-3OH-C<sub>10</sub>-CoA (50, 100 et 200 ppm). Après incubation à 37°C pendant 18 h, l'AcpP1 ajouté a été purifié à partir du mélange réactionnel par chromatographie d'affinité et ensuite analysé par MALDI-TOF MS (Figure supplémentaire 2.4). Des valeurs de *m/z* de 10609 et/ou 10740 (considérant les deux formes typiquement observées de l'AcpP1) indiquent que la réaction d'acylation de l'ACP avec l'acide gras hydroxylé s'est produite. Néanmoins, l'analyse MALDI-TOF MS effectuée a révélé deux pics principaux qui diffèrent des valeurs attendues (Fig. 2.30). Le pic donnant un *m/z* de 10441 correspond au holo-AcpP1-<sub>1Met</sub> non-acylé, et le pic donnant un *m/z* de 10570 correspond à la protéine native activée mais non-acylée, l'holo-AcpP1<sub>Natif</sub>.

Dans les conditions utilisées pour le test enzymatique présenté dans cette section, les résultats obtenus semblent indiquer que *P. aeruginosa* ne possède pas une enzyme capable d'utiliser un acide gras hydroxylé pour réaliser l'acylation de l'AcpP1. Toutefois, il nous reste à évaluer la possibilité que le R-3OH-C<sub>10</sub>-CoA pourrait tout de même être utilisé comme substrat pour la synthèse des HAA et/ou des rhamnolipides dans un extrait cellulaire. Ceci est évalué dans la section 2.8.4.3.



**Figure 2.30. Résultats de la réaction d'acylation de l'AcpP1 dans un extrait cellulaire clarifié.**

En haut, spectre de masse du contrôle négatif (sans l'ajout d'acyl-CoA) et en bas, analyse du test effectué avec l'AcpP1 et un excès de *R*-3-hydroxydécanoyl-CoA.

### 2.8.4.3 Test de production de HAA et de rhamnolipides *in vitro* dans un extrait cellulaire d'un mutant *rhIA* complétement

Le  $R$ -3-OH- $C_{10}$ -CoA, qu'il soit le substrat direct de RhIA (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014b) ou qu'il nécessite d'être d'abord transformé en  $R$ -3-OH- $C_{10}$ -ACP — *via* l'activité acyl-CoA:ACP transacylase recherchée —, l'ajout d'un excès de celui-ci dans un extrait cellulaire de PA14 produirait des HAA et/ou des rhamnolipides. Afin d'évaluer l'effet du  $R$ -3-OH- $C_{10}$ -CoA dans la production de rhamnolipides, une culture d'un mutant PA14\_ *rhIA*::TnMr7 polaire complétement avec une construction exprimant de façon constitutive l'opéron *rhIAB* (pAS23), a été préparée en suivant le protocole décrit à la section précédente (2.8.4.2). Le lysat total et la fraction cytoplasmique obtenus ont été supplémentés avec un excès de  $R$ -3OH- $C_{10}$ -CoA et l'AcpP1 (Figure supplémentaire 2.5).

Les molécules d'intérêt ont été extraites en phase non polaire et concentrées 10 fois selon le protocole de la section 3.12.6. La figure 2.31 montre l'analyse spectrométrique des extraits. On peut y voir dans le contrôle négatif (lysat cellulaire non supplémenté), un pic correspondant à la somme des ions  $[(C_{10}-C_{10})-H]^+$  ( $m/z = 357.3$ ),  $[(Rha-C_{10}-C_{10})-H]^+$  ( $m/z = 503.4$ ) et  $[(Rha-Rha-C_{10}-C_{10})-H]^+$  ( $m/z = 649.5$ ) donnant une surface de 225024. En particulier, les rhamnolipides détectés dans le contrôle négatif sont des contaminations présentes dans l'extrait cellulaire. De façon similaire, nous pouvons observer que le lysat supplémenté exclusivement avec l'holo-AcpP1, ainsi que les lysats supplémentés avec l'holo-AcpP1 et le  $R$ -3-OH- $C_{10}$ -CoA à des concentrations de 50, 100 et 200 ppm produisent des pics avec des surfaces équivalentes.

Des pics ayant des surfaces très similaires dans toutes les conditions testées indiquent que la réaction de synthèse des rhamnolipides à partir du  $R$ -3-OH- $C_{10}$ -CoA ne s'est pas produite. Néanmoins, il est à considérer que plusieurs facteurs physico-chimiques qui nous sont inconnus peuvent interférer dans les étapes enzymatiques séquentielles qui mènent à la synthèse du dilipide  $C_{10}$ - $C_{10}$  dans le lysat cellulaire. De plus, nous ne pouvons pas écarter la possibilité que la labilité des enzymes impliquées empêche la réalisation de telles réactions. Aussi, nous ne pouvons pas exclure l'éventualité que les conditions réactionnelles utilisées dans cette approche complexe soient inappropriées pour la synthèse des HAA.

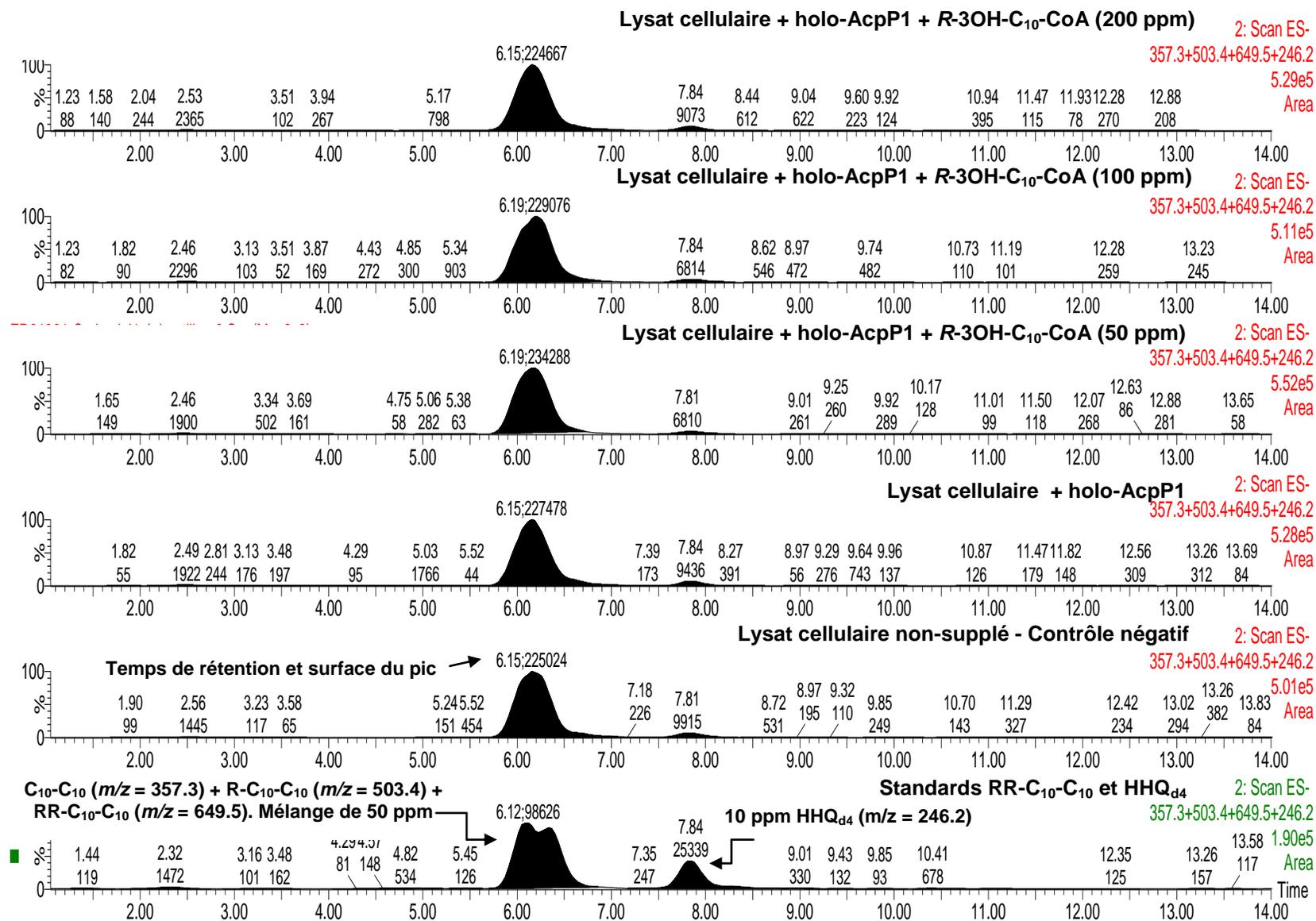


Figure 2.31. Chromatogramme de la phase non polaire des lysats cellulaires supplémentés avec l'holo-AcpP1 et le R-3-OH-C<sub>10</sub>-CoA.

## 2.9 Discussion et perspectives

### 2.9.1 Rôle de l'activité $\beta$ -cétol-ACP synthase codée par PA14\_ *fabH3*::TnPhoA dans la production des rhamnolipides

Le mécanisme de pontage postulé par Zhang *et al.* (2012) selon lequel le substrat de RhlA (*R*-3-hydroxyacyl-ACP) est produit *via* une activité  $\beta$ -cétol-ACP synthase a été investigué dans ce chapitre. Ce mécanisme est attribué à l'enzyme FabH3, une 3-oxoacyl-[ACP] synthase 3 produite chez *P. aeruginosa* (Yuan *et al.*, 2012a). Lorsque nous avons cultivé le mutant PA14\_ *fabH3*::TnPhoA dans le milieu MSM-glycérol, la production totale de rhamnolipides observée est diminuée d'environ 30 % par rapport à la souche sauvage (Fig. 2.17). Par ailleurs, lorsque les deux principales voies apparemment impliquées sont abrogées dans le triple mutant PA14\_ *fabH3*::TnPhoA $\Delta$ rhlYZ, la production de rhamnolipides est similaire à celle observée chez le simple mutant PA14\_ *fabH3*::TnPhoA (Fig. 2.17). Or, il s'avère que dans des conditions de culture utilisant le glycérol comme seule source de carbone, des mécanismes métaboliques différents de FabH3 et RhlYZ contribuent à l'approvisionnement des acides gras hydroxylés précurseurs des HAA. Nous avons donc évalué cette hypothèse de façon préliminaire en ayant recourt à un repérage isotopique chez le triple mutant PA14\_ *fabH3*::TnPhoA $\Delta$ rhlYZ. La supplémentation de PA14 avec l'acide dodécanoïque-12,12,12- $d_3$  ( $C_{12}$ - $d_3$ ) produit un isotopologue du mono-rhamnolipide Rha- $C_{10}$ - $C_{10}$  présentant un marquage- $d_6$ , partagé entre deux chaînes aliphatiques sous forme de  $C_{10}$ - $d_3$  (Fig. 2.19A et 2.20). Ce résultat est en accord avec les informations expérimentales présentées par Abdel-Mawgoud *et al.* (2014) et suggère que les acides gras précurseurs du  $C_{10}$ - $C_{10}$  proviennent de l'oxydation du  $C_{12}$ - $d_3$ , qui après un cycle d'oxydation fournit directement des acides gras marqués  $C_{10}$ - $d_3$ . Par contre, en utilisant la même source de carbone ( $C_{12}$ - $d_3$ ), le mutant PA14\_ *fabH3*::TnPhoA $\Delta$ rhlYZ produit principalement l'ion [(Rha- $C_{10}$ - $C_{10}$ )-H]<sup>+</sup> ( $m/z$  = 503) (Fig. 2.19B). Puisque les acides gras de l'ion [(Rha- $C_{10}$ - $C_{10}$ )-H]<sup>+</sup> ne sont pas marqués, cela indique qu'ils ne proviennent pas directement d'un intermédiaire de l'oxydation du  $C_{12}$ - $d_3$  mais plutôt des acides gras synthétisés à partir d'unités d'acétyl-CoA non-marqués. Par ailleurs, ces observations ont été corroborées par une supplémentation avec le glucose- $^{13}C_6$  et le  $C_{12}$ - $d_3$ . Cette fois, nous avons observé, chez PA14, un ion majoritaire de  $m/z$  515 (Fig. 2.21), correspondant au Rha- $C_{10}$ - $C_{10}$  avec un marquage de +6 Da sur le rhamnose et +3 Da sur chaque acide gras  $C_{10}$  (Fig. 2.22). Or, même en présence du glucose, lorsque FabH3 et RhlYZ

sont fonctionnelles, les acides gras greffés sur le mono-rhamnolipide semblent provenir directement d'un intermédiaire de l'oxydation du  $C_{12-d_3}$ . D'autre part, dans les mêmes conditions de culture (Glucose- $^{13}C_6$  et le  $C_{12-d_3}$ ), le mutant PA14\_ *fabH3::TnPhoAΔrhlYZ* produit majoritairement un isotopologue de type Rha(+6 Da)- $C_{10}$ (+10 Da)- $C_{10}$ (+8 Da) (Fig. 2.23 et 2.24). Puisque les chaînes  $C_{10}$  sont marquées avec +8 Da et +10 Da, le précurseur de ce marquage ne peut pas être un acide gras intermédiaire de l'oxydation du  $C_{12-d_3}$ . Ce résultat indique plutôt que les chaînes +8 Da et +10 Da proviennent de la synthèse *de novo* des acides gras ayant incorporé ce marquage de façon aléatoire à partir d'unités d'acétyl-CoA marquées et non-marquées. En effet, des unités d'acétyl-CoA marquées de façon différente peuvent provenir de l'oxydation du glucose- $^{13}C_6$  comme étant une source d'acétyl- $^{13}C_2$ -CoA et de l'oxydation complète du  $C_{12-d_3}$  qui fournit 83,3 % d'acétyl-CoA non-marqué et 16,6 % d'acétyl(- $d_3$ )-CoA. Le modèle métabolique présenté dans la figure 2.32 pourrait expliquer le marquage des chaînes +8 Da et +10 Da observé. Collectivement, les résultats du marquage isotopique différentiel observés entre PA14 et le triple mutant PA14\_ *fabH3::TnPhoAΔrhlYZ* permettent de suggérer que chez la souche sauvage, les intermédiaires de la  $\beta$ -oxydation sont préférentiellement utilisés pour la synthèse des HAA tandis que chez le triple mutant PA14\_ *fabH3::TnPhoAΔrhlYZ*, la voie FAS II est fortement impliquée dans l'approvisionnement des acides gras précurseurs sans avoir recours à la  $\beta$ -oxydation. Autrement dit, les acides gras produits *via* FAS II ne nécessitent pas d'être dirigés vers la  $\beta$ -oxydation pour devenir les précurseurs des HAA. Par ailleurs, l'implication de la voie FAS II comme source principale de précurseurs lipidiques des HAA a été aussi observée *in vivo* chez *Burkholderia thailandensis* E264 à l'aide du repérage isotopique (Irorere *et al.*, 2018).

Nous avons observé chez PA14 que la supplémentation avec du  $C_{12-d_3}$ , et de manière simultanée, du  $C_{12-d_3}$  avec du glucose- $^{13}C_6$ , produit majoritairement des isotopologues de type Rha- $C_{10}$ (+3 Da)- $C_{10}$ (+3 Da) et Rha(+6 Da)- $C_{10}$ (+3 Da)- $C_{10}$ (+3 Da), respectivement (Tableau 2.10). Puisque le marquage de type  $C_{10}(-d_3)$  est un indicateur d'un précurseur dérivé d'un intermédiaire de l'oxydation du  $C_{12-d_3}$ , cela suggère qu'en présence d'acides gras exogènes, la  $\beta$ -oxydation est plus sollicitée pour la synthèse des HAA que la voie FAS II. En effet, étant donné que l'expression des gènes *fadBA5* est activée par le régulateur transcriptionnel PsrA en présence des acyl-CoA d'une longueur de chaîne  $\geq C_{12:0}$  (Kang *et al.*, 2008), il est possible que la  $\beta$ -oxydation ne soit pas activée de façon constitutive, mais plutôt qu'elle soit fortement sollicitée en présence d'acyl-CoA à chaîne longue. Ainsi, la supplémentation avec des acides gras  $C \geq 12$  activant la  $\beta$ -oxydation favoriserait le flux des intermédiaires vers la synthèse des

HAA. Certes, chez *P. aeruginosa*, FabH3 et/ou RhlYZ semblent connecter les intermédiaires de la  $\beta$ -oxydation avec la synthèse des HAA. Cependant, la contribution précise de ces enzymes dans la synthèse ne peut pas être élucidée dans les conditions expérimentales utilisées dans cette étude.

### **2.9.2 Les acides gras C<sub>8</sub> et le C<sub>12</sub> affectent différemment la production de rhamnolipides chez PA14**

Étant donné que le mutant PA14\_*fabH3*::Tn*PhoA* affecte peu la production de rhamnolipides (qui en produit 30 % de moins que PA14), nous avons étudié si le troncage du gène *fabH3* avait un effet sur la disponibilité métabolique de C<sub>8</sub>-CoA. Nous avons observé que chez le mutant PA14\_*fabH3*::Tn*PhoA* la synthèse de HAQ-C<sub>7</sub> augmente de 60 % par rapport à PA14 (Fig. 2.25), indiquant qu'en absence de l'enzyme FabH3, l'octanoyl-CoA est davantage disponible pour le métabolisme cellulaire. Considérant que la disponibilité de C<sub>8</sub>-CoA est un facteur limitant dans la synthèse des HAQ-C<sub>7</sub>, il pourrait être aussi un facteur limitant dans la synthèse du C<sub>10</sub>-ACP par FabH3, affectant la synthèse des HAA. Cependant, nous avons observé que lorsque la consommation de C<sub>8</sub>-CoA pour la synthèse des HAQ est bloquée chez le mutant *pqsC*, la synthèse des HAA ne se voit pas davantage favorisée (Fig. 2.26). Ces résultats permettent de suggérer que bien que FabH3 affecte la disponibilité métabolique de C<sub>8</sub>-CoA, il semble que ce dernier ne soit pas préférentiellement utilisé pour la synthèse des HAA. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que ce soit le malonyl-ACP le facteur limitant dans la synthèse du C<sub>10</sub>-ACP par FabH3 et non le C<sub>8</sub>-CoA. Par ailleurs, lorsque la culture de PA14 a été supplémentée avec l'acide gras C<sub>8</sub> et C<sub>12</sub>, nous avons observé que la production des rhamnolipides a été affectée différemment. En effet, la supplémentation exclusive avec l'acide dodécanoïque abouti à une production de rhamnolipides 2 fois plus élevée chez PA14 en comparaison avec la supplémentation avec l'acide gras C<sub>8</sub> (Fig. 2.27). Cela permet de suggérer que le C<sub>12</sub>-CoA fournit davantage l'intermédiaire utilisé comme précurseur des HAA. Or, un intermédiaire à 10 carbones est probablement le précurseur des HAA, tel que proposé par Abdel-Mawgoud *et al.* (2014b), au regard des résultats de marquage isotopique effectué chez PA14 avec l'acide C<sub>12</sub>-*d*<sub>23</sub> (Fig. 2.5 et 2.6).

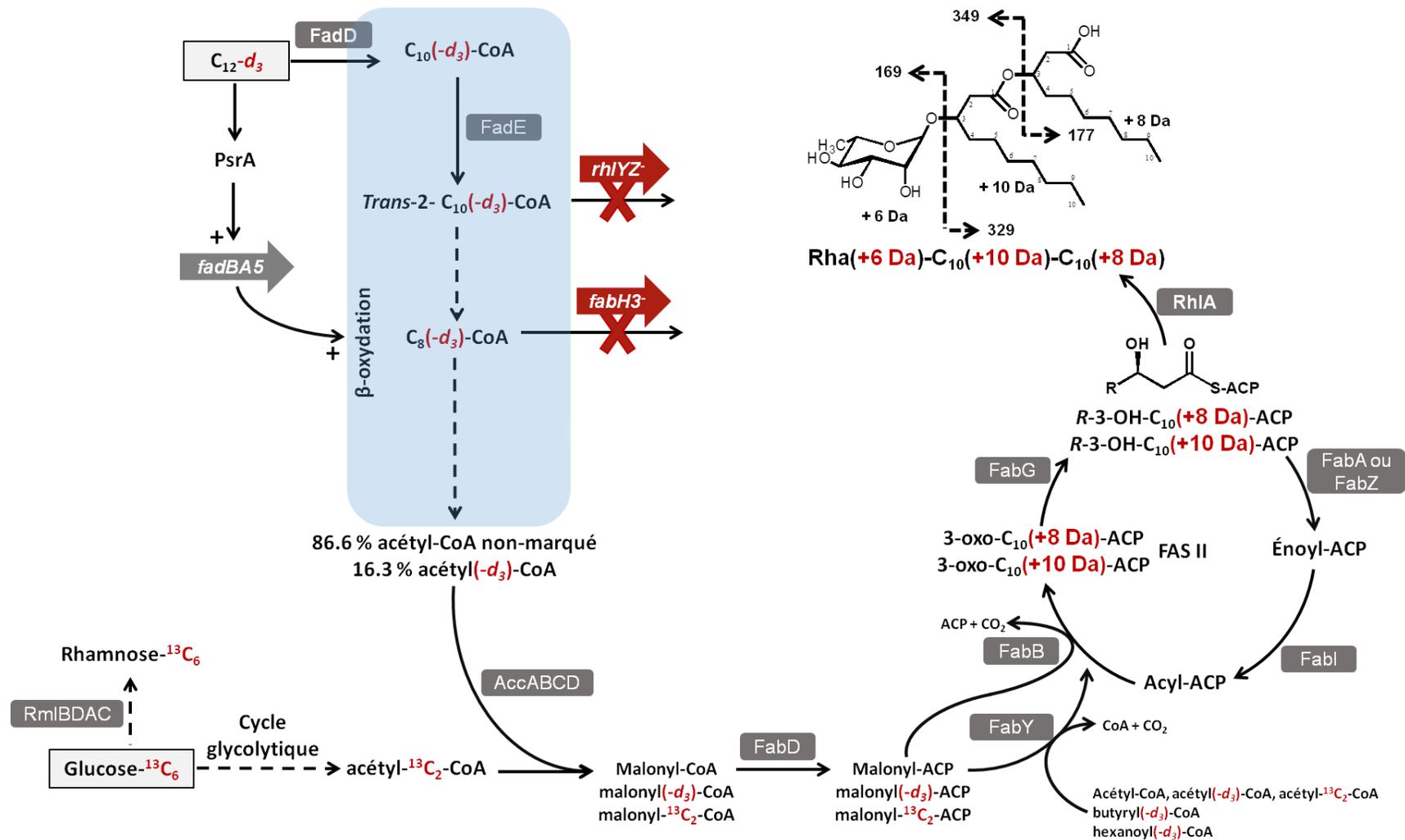


Figure 2.32. Schéma du modèle proposé pour la synthèse des rhamnolipides chez le mutant *fabH3<sup>-</sup> rhlYZ* en supplémentation avec le glucose- $^{13}\text{C}_6$  et l'acide dodécanoïque-12,12,12- $\text{d}_3$  ( $\text{C}_{12}\text{-d}_3$ ). Les composés utilisés comme seules sources de carbone sont encadrés en gris.

Il est possible que FabH3, RhlYZ et FAS II contribuent différemment à la synthèse des HAA, toutefois, investiguer l'implication spécifique des différents mécanismes enzymatiques requiert des expériences supplémentaires. Il est envisageable que la supplémentation des souches PA14, *rhlYZ*, et PA14\_ *fabH3::TnPhoA* avec l'acide octanoïque complètement marqué au carbone 13 ( $^{13}\text{C}_8$ ) ou deutéré ( $\text{C}_8\text{-}d_{15}$ ) et l'acide dodécanoïque non-marqué simultanément puisse montrer un marquage des HAA différentiel, révélant la contribution spécifique de FabH3, RhlYZ et la voie FAS II dans l'approvisionnement du précurseur.

### 2.9.3 FadD6 présente une activité acyl-CoA:ACP transacylase

En considérant l'hypothèse de cette étude selon laquelle le *R*-3-OH- $\text{C}_{10}$ -CoA produit par RhlYZ doit être couplé à une molécule d'ACP pour devenir le substrat de RhlA, nous avons recherché des acyl-CoA:ACP transacylases permettant le couplage de l'intermédiaire hydroxylé avec une molécule d'ACP chez PA14. L'analyse de séquences homologues à l'acyl-ACP synthase AasS de *V. harveyi* chez PA14 a permis d'identifier 4 enzymes putatives (Tableau 2.14). La haute similarité observée entre FadD6 et AasS (72 %) suggère que FadD6 présenterait potentiellement une activité acyl-CoA:ACP transacylase. Les tests effectués *in vitro* avec FadD6 purifiée et des acyl-CoA ont montré que cette enzyme catalyse le transfert du groupement décanoyle vers l'ACP (Fig. 2.29), mais sans toutefois utiliser l'acide gras homologue hydroxylé comme substrat. Nous avons donc tenté de démontrer que la réaction d'acylation de l'AcpP1 pouvait s'effectuer dans un extrait cellulaire de PA14 avec un excès de *R*-3-OH- $\text{C}_{10}$ -CoA. Toutefois, l'ajout du *R*-3-OH- $\text{C}_{10}$ -CoA seul ou avec l'holo-AcpP1 dans un lysat cellulaire n'a abouti ni à la synthèse de HAA ni à l'acylation de l'AcpP1 (Tableau 2.15 et figure 2.30).

Alors que FadD6 ne semble pas catalyser l'acylation l'AcpP1 avec l'acide gras hydroxylé, nous devons quand même envisager la possibilité qu'un des homologues d'AasS identifiés dans le tableau 2.14 puisse effectuer la réaction recherchée. Pour ce faire, une caractérisation de la production des rhamnolipides chez ces homologues serait d'abord nécessaire. Cependant, considérant que la contribution de ces enzymes dans la synthèse des HAA ne peut pas être clairement déterminée en utilisant le glycérol comme source de carbone (Fig. 2.28), il serait pertinent que la caractérisation de la production des rhamnolipides soit effectuée en utilisant un acide gras  $\text{C} \geq 12$  comme seule source de carbone. Si l'un des mutants testés diminue

significativement la production des rhamnolipides, une caractérisation de l'activité acyl-CoA:ACP transacylase devrait être effectuée *in vitro*.

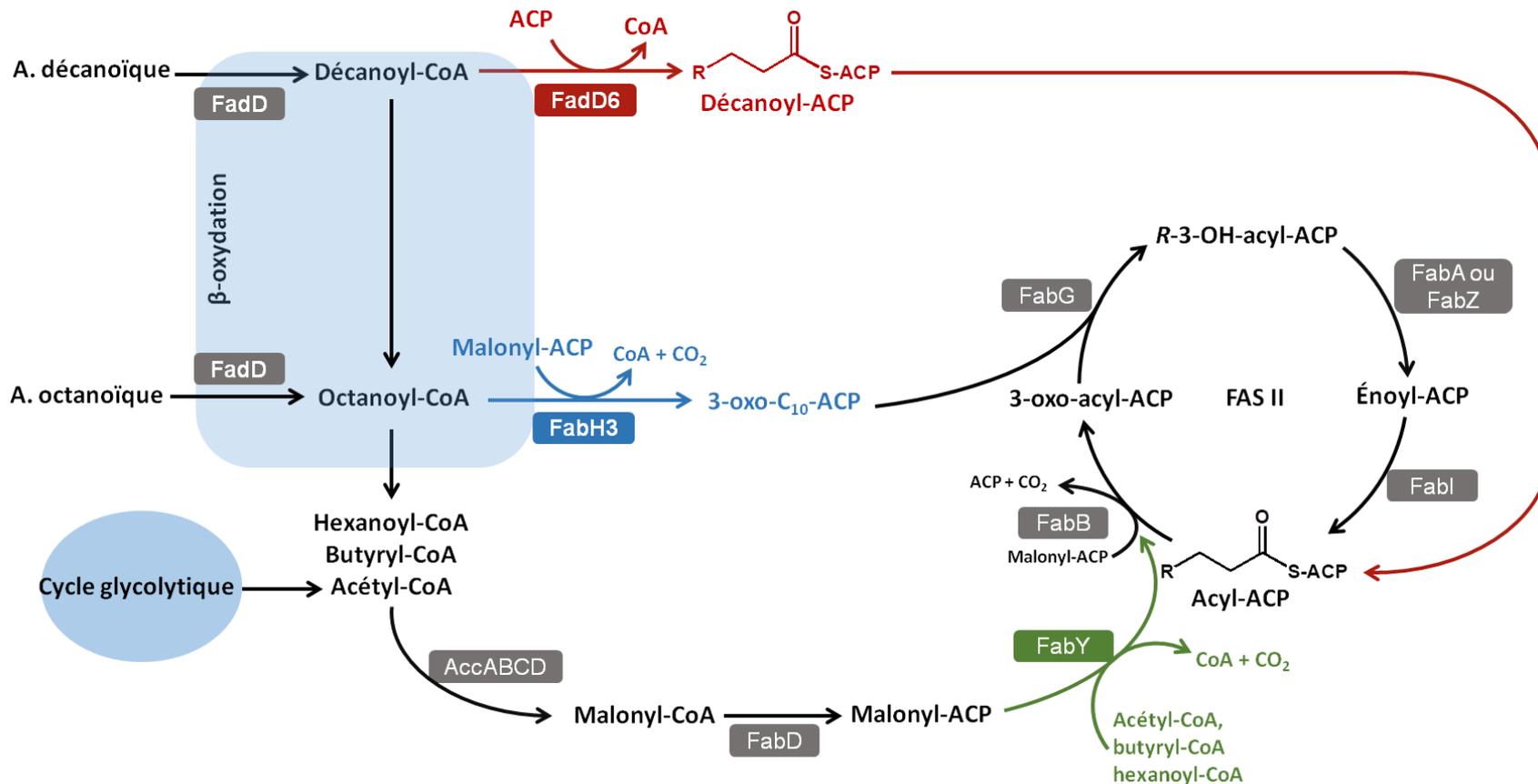
La recherche d'une activité acyl-CoA:ACP transacylase permettant l'acylation de l'AcpP1 avec un acide gras hydroxylé pourrait aussi être envisagée en réalisant une mutagenèse aléatoire par transposon chez le triple mutant PA14\_ *fabH3::TnPhoAΔrhIYZ* et un criblage phénotypique pour l'identification de mutants affectés dans la production de rhamnolipides dans un milieu contenant un acide gras C ≥ 12 comme seule source de carbone.

Par ailleurs, le fait que le C<sub>10</sub>-CoA est lui-même utilisé comme substrat par FadD6 pour produire le décanoil-ACP (Fig. 2.29), confirme l'existence d'une activité acyl-CoA:ACP transacylase qui n'a pas encore été rapportée chez *P. aeruginosa*. Cette activité catalytique est remarquable car elle permet le pontage entre la  $\beta$ -oxydation et la voie FAS II au niveau d'un acide gras à 10 carbones.

À l'heure actuelle, seulement deux mécanismes d'activation de la voie FAS II ont été identifiés chez *P. aeruginosa*. D'une part, l'activité  $\beta$ -cétoacyl synthase I/II attribuée à FabY permet l'initiation de FAS II par la condensation du malonyl-ACP avec des d'acyl-CoA à chaîne courte, incluant l'acétyl-CoA, le butyryl-CoA et l'hexanoil-CoA (Yuan *et al.*, 2012b). D'autre part, l'activité  $\beta$ -cétoacyl-ACP synthase III attribuée à FabH3 permet l'initiation de FAS II par la condensation du malonyl-ACP avec l'octanoil-CoA (Yuan *et al.*, 2012a). L'activité acyl-CoA:ACP transacylase attribuée à FadD6 pourrait constituer un mécanisme non conventionnel pour l'initiation de FAS II (Fig. 2.33). Le fait que le gène *fadD6* est surexprimé dans le contexte de formation de biofilms au sein des interfaces formées avec des alcanes à chaîne longue (Niepa *et al.*, 2017) permet de suggérer que le rôle de FadD6 est important pour l'activation de FAS II en présence de substrats hydrophobes à chaîne longue.

En fonction de l'homologie de séquences entre FadD<sub>*E.coli*</sub>, FadD6<sub>PA14</sub> et AasS<sub>*V.harveyi*</sub>, il peut être aussi envisagé que l'activité acyl-CoA:ACP transacylase attribuée à FadD6 ne soit pas exclusive, mais peut être partagée avec une activité acyl-CoA synthétase (CoA-ligase d'acides gras). Cette hypothèse n'a pas été investiguée dans le cadre de cette étude sur FadD6, mais pourra faire l'objet d'une recherche plus poussée dans le futur visant à vérifier *in vitro* si FadD6 catalyse l'activation des acides gras en acyl-CoA et si cette réaction constitue une étape intermédiaire dans la synthèse d'acyl-ACP. Par ailleurs, un alignement de séquences de type PSI-BLAST a montré que des protéines putatives très similaires à FadD6 sont aussi présentes chez d'autres espèces de *Pseudomonas* comme, par exemple, *P. denitrificans* (88 % d'identité),

*P. mendocina* (86 % d'identité) et *P. alcaligenes* (85 % d'identité) (Tableau supplémentaire 2.4). Cela suggère que l'avantage métabolique que représente cette activité enzymatique est probablement conservé chez cette espèce, permettant son adaptation aux changements environnementaux auxquels les bactéries doivent faire face dans différents contextes.



**Figure 2.33. Schéma de l'implication de FadD6 dans l'approvisionnement de l'intermédiaire C<sub>10</sub> vers la voie FAS II via son activité acyl-CoA:ACP transacylase (en rouge).**

Les mécanismes d'initiation de FAS II sont montrés : en vert l'activité β-cétoacyl synthase I/II effectuée par FabY et en bleu l'activité β-cétoacyl-ACP synthase III effectuée par FabH3.

## 2.10 Matériel supplémentaire

Tableau supplémentaire 2.1. Souches utilisées dans cette étude.

Souche	Caractéristique/génotype	Références
<i>P. aeruginosa</i> PA14	Isolat clinique UCBPP-PA14	Rahme <i>et al.</i> (1995).
PA14_1910::TnMrT7	Insertion du transposon MrT7 sur le locus PA14_1910. Gm <sup>R</sup> (Mutant polaire).	Liberati <i>et al.</i> (2006).
PA14ΔpqsC	Délétion du gène <i>pqsC</i> chez PA14. Mutant non polaire. Kan <sup>R</sup> .	Lesic and Rahme (2008).
PA14_fabH3::TnPhoA	Insertion du transposon <i>PhoA</i> sur le locus PA14_21540. ID : 714.	Liberati <i>et al.</i> (2006).
PA14_13110::TnMrT7	Insertion du transposon MrT7 sur le locus PA14_13110. ID : 28440	Liberati <i>et al.</i> (2006).
PA14_09660::TnMrT7	Insertion du transposon MrT7 sur le locus PA14_09660. ID : 23248.	Liberati <i>et al.</i> (2006).
PA14_35940::TnMrT7	Insertion du transposon MrT7 sur le locus PA14_35940. ID : 43104.	Liberati <i>et al.</i> (2006).
PA14_31470::TnMrT7	Insertion du transposon MrT7 sur le locus PA14_31470. ID : 30010.	Liberati <i>et al.</i> (2006).
PA14_21540::TnPhoAΔrhIYZ	Délétion des gènes <i>rhIYZ</i> chez le mutant PA14_21540::TnPhoA. Kan <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> .	Cette étude <sup>1</sup>
<i>E. coli</i> DH5α	<i>Sup E44, ΔlacU169</i> (Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15), <i>hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i> .	Invitrogen.
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> B F- <i>dcm ompT hsdS</i> (rB- mB-) <i>gal λ</i> (DE3), hôte de vecteurs utilisant le système d'expression T7.	Novagen.
<i>E. coli</i> Origami (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS</i> <sub>B</sub> (rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ) <i>gal dcm lacY1 ahpC</i> (DE3) <i>gor522::Tn10 trxB</i> (Kan <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> ). Hôte de vecteurs utilisant le système d'expression T7.	Novagen.
<i>E. coli</i> SM10 λpir	<i>Sup E44, ΔlacU169</i> (Φ <i>lacZ</i> ΔM15), <i>recA1, endA1, hsdR17, thi-1, gyrA96, relA1</i> , phage lysogénique λpir.	Simon <i>et al.</i> (1983).
<i>E. coli</i> SM10_pAS09	Souche de conjugaison <i>E. coli</i> SM10 λpir ayant le plasmide pAS09 (pEX14ApGW_54640::54660_Gm <sup>R</sup> _FRT).	Abdel-Mawgoud (2014).

<sup>1</sup>Cette délétion a été vérifiée par séquençage.

**Tableau supplémentaire 2.2. Plasmides utilisés dans cette étude.**

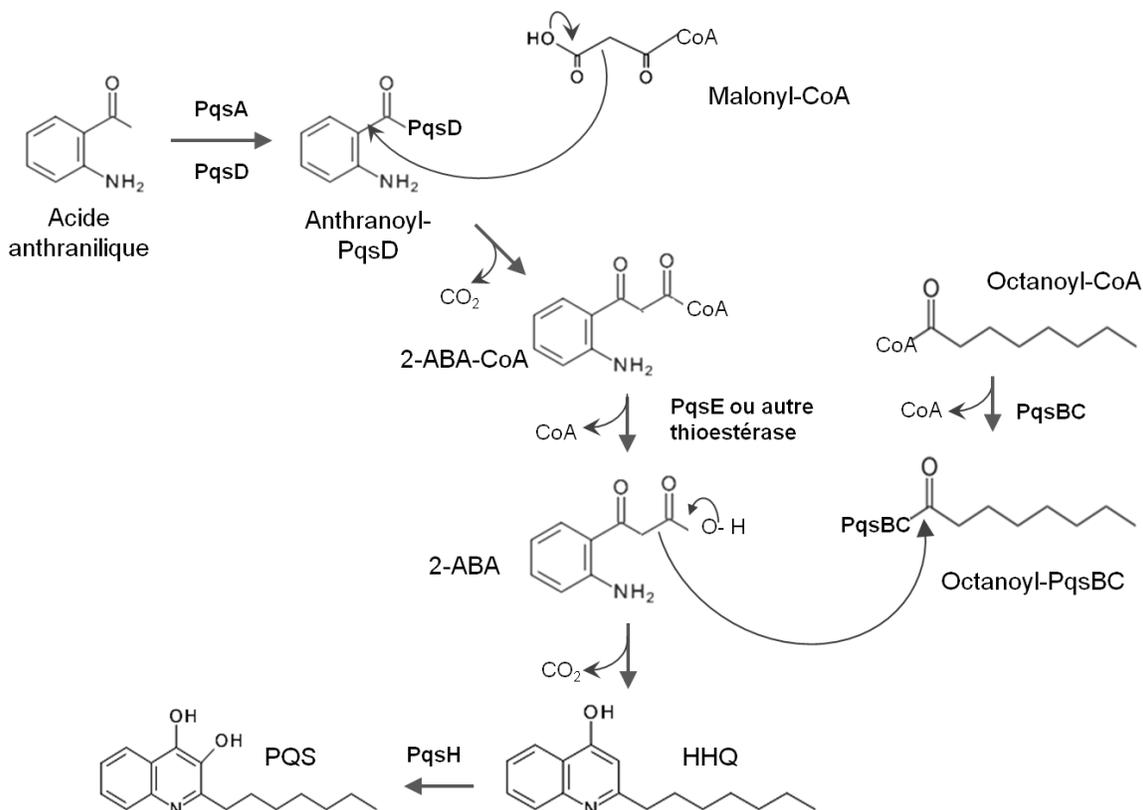
Plasmides	Caractéristiques rélevantes	Références
pET28a(+)	P <sub>T7</sub> , <i>lacO</i> , MCS, facteur Xa, N et C-terminal 6xHis-Tag, <i>lacI</i> , Kan <sup>R</sup> .	Novagen.
pET16b	P <sub>T7</sub> , <i>lacO</i> , MCS, facteur Xa, N-terminal 10xHis-Tag, <i>lacI</i> , Amp <sup>R</sup> .	Novagen.
pET22b(+)	P <sub>T7</sub> , <i>lacO</i> , MCS, <i>peIB</i> (localisation périplasmique), N et C-terminal 6xHis-Tag, <i>lacI</i> , Amp <sup>R</sup> .	Novagen.
pEX18Ap	Dérivé du pUCP18/19, Apr, <i>sacB</i> , <i>lacZα</i> -allèle, <i>oriT</i> , <i>FRT</i> .	Hoang <i>et al.</i> (1998).
pAS09	pEX18ApGW-ΔPA14_54640-PA14_54660::Gm <sup>R</sup> FRT.	Abdel-Mawgoud (2014).
pCD10	pET28a_6His-PA14_25670, insertion entre <i>NcoI/HindIII</i> , Kan <sup>R</sup> .	Cette étude
pCD11	pET28a_6His-PA14_40310, insertion entre <i>NcoI/HindIII</i> , Kan <sup>R</sup> .	Cette étude
pCD12	pET28a_6His-PA14_20940, insertion entre <i>NcoI/HindIII</i> , Kan <sup>R</sup> .	Cette étude
pCD13	pET28a_PA14_56600, insertion entre <i>NcoI/EcoRI</i> , Kan <sup>R</sup> .	Cette étude
pCD14	pET22b(+)_6His-PA14_49340, insertion entre <i>NdeI/HindIII</i> , Amp <sup>R</sup> .	Cette étude
pCD15	pET16b_10His-PA14_13110, insertion entre <i>NdeI/BamHI</i> , Amp <sup>R</sup> .	Cette étude
pET16b-aasS	pET16b_10His-aasS <i>Vibrio harveyi</i> B392, insertion entre <i>NdeI/BamHI</i> , Amp <sup>R</sup> .	Jiang <i>et al.</i> (2010).
pAS23	pUCP26_ρhIAB PA14. Insertion entre <i>EcoRI/HindIII</i> . La séquence clonée inclue -90 bp avant le codon d'initiation et +36 bp après le codon stop. Tet <sup>R</sup> .	Abdel-Mawgoud (2014).

**Tableau supplémentaire 2.3. Amorces utilisées dans cette étude.**

<b>Amorce</b>	<b>Séquence (5'→3')</b> (La séquence qui s'hybride à l'ADN matrice est soulignée en caractère gras et majuscule)	<b>Construction</b>
<i>NcoI</i> _PA14_25670_F	5'-acacaccatcc <b>ATGGGCACCATCGAAGAACGCGTTAAG</b> -3'	pCD10
<i>HindIII</i> _PA14_25670_R	5'-acacaccataagctt <b>TTGCTGGTGAGCAACGATGTAGTC</b> -3'	
<i>NcoI</i> _PA14_40310_F	5'-acacaccatcc <b>ATGGACGACATCGAGACCAGAGTG</b> -3'	pCD11
<i>HindIII</i> _PA14_40310_R	5'-acacaccataagctt <b>GGTCGGCACGGCTTCCTCGAGATAG</b> -3'	
<i>NcoI</i> _PA14_20940_F	5'-acacaccatcc <b>ATGGGCAACGACATGGAAGACCATCTCCTC</b> -3'	pCD12
<i>HindIII</i> _PA14_20940_R	5'-acacaccataagctt <b>GGCGGCGCGGTGCTTCTC</b> -3'	
<i>NcoI</i> _PA14_56600_F	5'-acacaccatcc <b>ATGGCCTACCTCGCGCATCTCCACC</b> -3'	pCD13
<i>EcoRI</i> _PA14_56600_R	5'-acacaccatgaatt <b>CCAGCTCAGAACGCGAGGAC</b> -3'	
<i>NdeI</i> _PA14_49340_F	5'-acacaccatcat <b>ATGCGCGCCATGAACGAC</b> -3'	pCD14
<i>HindIII</i> _PA14_49340_R	5'-acacaccataagctt <b>GGCGCCGACCGCCACCAG</b> -3'	
<i>NdeI</i> _PA14_13110_F	5'-acacaccatcat <b>ATGCTGAAGACCCGTCTCATCCCG</b> -3'	pCD15
<i>BamHI</i> _PA14_13110_R	5'-acacaccatggatcc <b>TCAGACGGTCGACAGGAAGGC</b> -3'	
<i>rhlyZ</i> -F- <i>HindIII</i>	5'-accgaagctt <b>AACCATCGCATCCGATAGT</b> -3'	pAS09
<i>rhlyZ</i> -R- <i>EcoRI</i>	5'-cgtagaattc <b>GCTTAGACGCTATGGACG</b> -3'	

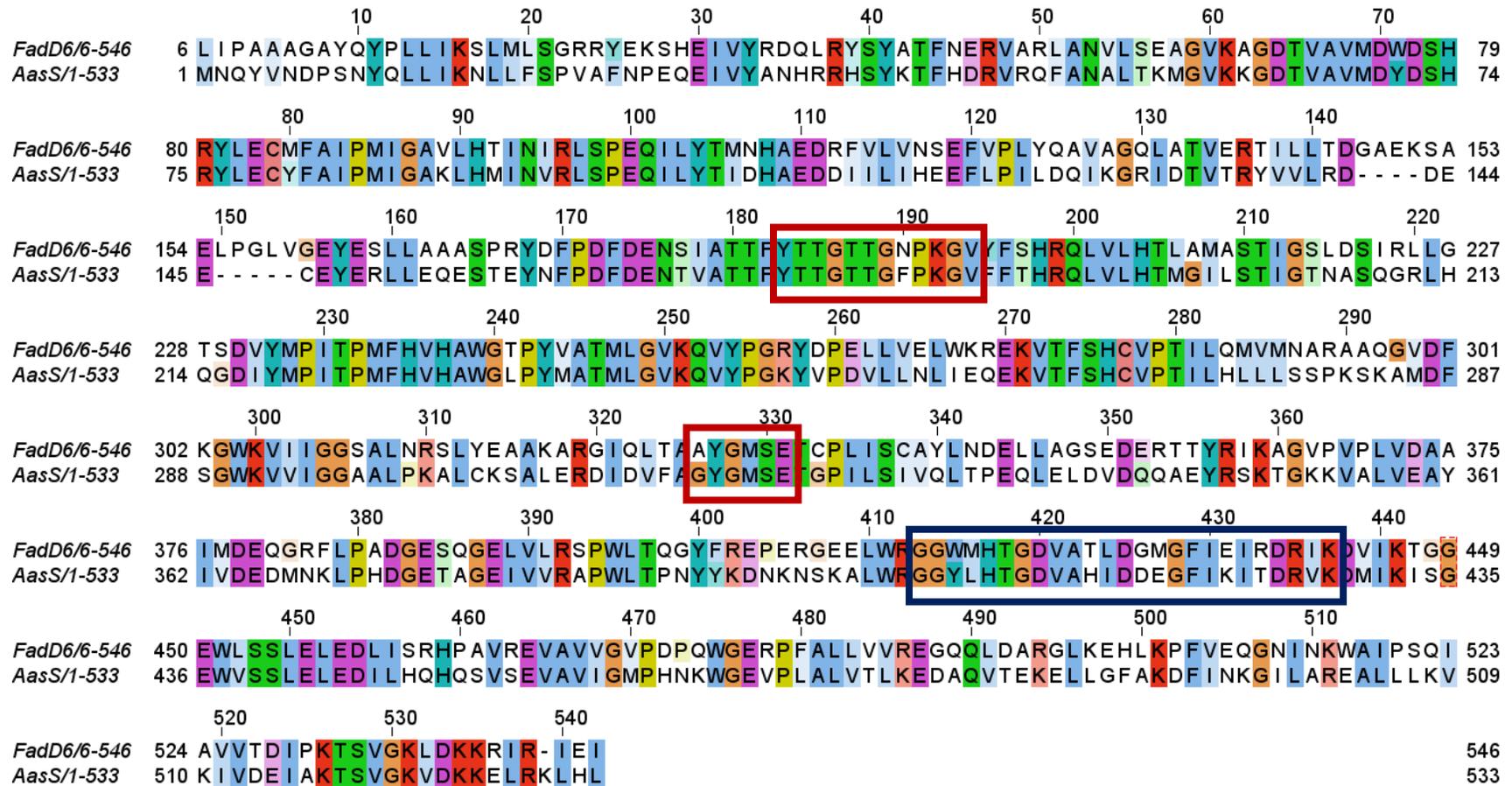
**Tableau supplémentaire 2.4. Alignement de type PSI-BLAST de la séquence peptidique de FadD6.**

Espèces	PSI-Blast (alignements avec le plus faible E value)			
	E Value	Identité %	Couverte (acides aminés)	Description
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> E2	0.0	100	560	CoA-ligase d'acides gras à chaîne longue.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14	0.0	100	560	CoA-ligase d'acides gras à chaîne longue.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA45	0.0	100	560	CoA-ligase d'acides gras à chaîne longue.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCGM2.S1	0.0	100	560	Synthétase d'acyl-CoA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> VRFPA01	0.0	99	560	CoA-ligase d'acides gras à chaîne longue.
<i>Pseudomonas viridiflava</i> UASWS0038	1,00E-176	79	560	CoA-ligase d'acides gras à chaîne longue.
<i>Pseudomonas putida</i> NBRC 14164	1,00E-174	82	560	CoA-ligase d'acides gras à chaîne moyenne.
<i>Pseudomonas mendocina</i> DLHK	1,00E-174	86	560	CoA-ligase d'acides gras à chaîne longue.
<i>Pseudomonas denitrificans</i> ATCC 13867	1,00E-174	88	560	CoA-ligase d'acides gras à chaîne longue.
<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	1,00E-174	84	560	CoA-ligase d'acides gras à chaîne longue.
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> CECT 5344	1,00E-174	85	560	CoA-ligase d'acides gras à chaîne longue.
<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	1,00E-173	87	560	CoA-ligase d'acides gras à chaîne longue.
<i>Pseudomonas monteilii</i>	1,00E-173	82	560	CoA-ligase d'acides gras à chaîne longue.
<i>Pseudomonas entomophila</i> L48	1,00E-172	81	560	CoA-ligase d'acides gras à chaîne longue.
<i>Pseudomonas mosselii</i>	1,00E-172	82	560	CoA-ligase d'acides gras à chaîne longue.
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	1,00E-171	81	560	CoA-ligase d'acides gras à chaîne longue.
<i>Pseudomonas resinovorans</i> NBRC 106553	1,00E-171	83	560	CoA-ligase d'acides gras à chaîne moyenne.
<i>Pseudomonas thermotolerans</i>	1,00E-171	83	560	CoA-ligase d'acides gras à chaîne longue.
<i>Pseudomonas agarici</i>	1,00E-170	81	560	CoA-ligase d'acides gras à chaîne longue.
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	1,00E-170	85	560	CoA-ligase d'acides gras à chaîne longue.
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	1,00E-169	82	560	CoA-ligase d'acides gras à chaîne longue.
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	1,00E-169	82	560	CoA-ligase d'acides gras à chaîne longue.
<i>Desulfatibacillum alkenivorans</i> AK-01	1,00E-169	56	544	Synthétase AMP dépendante.
<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	1,00E-169	82	560	CoA-ligase d'acides gras à chaîne longue.
<i>Pseudomonas fluorescens</i> HK44	1,00E-169	82	560	CoA-ligase d'acides gras à chaîne longue.



**Figure supplémentaire 2.1. Biosynthèse de molécules de signalisation du système de *quorum sensing pqs* avec l'incorporation de l'octanoyl-CoA.**

Le PQS (3,4-dihydroxy-2-heptylquinoline) et le HHQ (4-hydroxy-2-heptylquinoline) activent le régulateur transcriptionnel MvfR. Le HHQ et le PQS sont produits par un processus multi enzymatique catalysé par les protéines PqsABCD et PqsH (Schertzer *et al.*, 2010, Dulcey *et al.*, 2013). La synthèse de HAQ commence par l'activation de l'acide anthranilique en anthranoyl-CoA par PqsA (Coleman *et al.*, 2008). Dans cette voie, l'anthranoyl-CoA subit une condensation avec la malonyl-CoA par PqsD, produisant le 2-aminobenzoylac tyl-CoA (2-ABA-CoA) qui est à son tour hydrolysé en 2-aminobenzoylac tate (2-ABA). Bien que PqsE puisse catalyser cette dernière réaction *in vitro* (Drees et Fetzner, 2015), un mutant *pqsE* produit toujours des HAQ à des niveaux comparables à la souche sauvage (Gallagher *et al.*, 2002, Déziel *et al.*, 2004), indiquant une activité thiol-hydrolase compensatoire réalisée par d'autres enzymes telles que TesB (Drees et Fetzner, 2015). Le 2-ABA intermédiaire est ensuite condensé avec un groupement octanoate couplé au complexe PqsBC; conduisant à la formation de HHQ (Dulcey *et al.*, 2013). Le HHQ peut être converti en PQS par l'activité mono-oxygénase de PqsH (Gallagher *et al.*, 2002; Schertzer *et al.*, 2011).



**Figure supplémentaire 2.2. Alignement de séquences peptidiques de l'enzyme AasS et FadD6.**

Alignement généré par Clustal Omega (Li *et al.*, 2015, McWilliam *et al.*, 2013, Sievers *et al.*, 2011). Le motif de liaison à l'ATP/AMP est encadré en rouge et le motif de liaison à l'acide gras en bleu. Le code de couleurs des résidus a été attribué par défaut par le logiciel Clustal Omega pour indiquer : en bleu les résidus hydrophobes (A, I, L, M, F, W et V); en rouge, les résidus chargés positivement (K et R); en magenta, les résidus chargés négativement (E et D); en vert, les résidus polaires (N, Q, S et T); en rose, les résidus cystéines; en orange, les résidus glycines; en jaune, les résidus prolines; en cyan, les résidus aromatiques (H et Y); et en blanc, les résidus non conservés et les espaces.

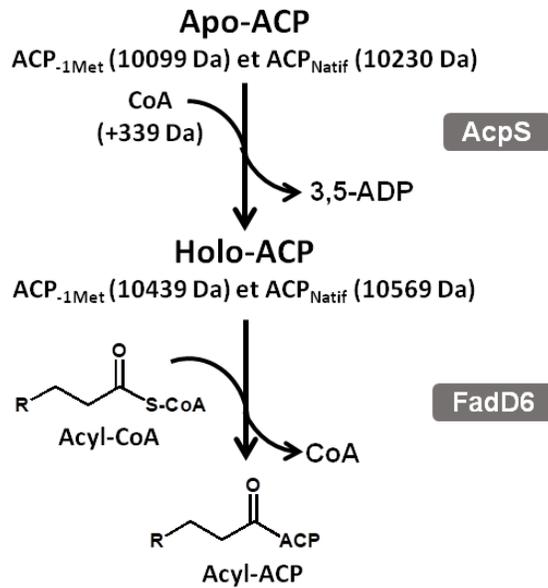


Figure supplémentaire 2.3. Schéma de la réaction d'acylation d'une molécule d'ACP avec FadD6.

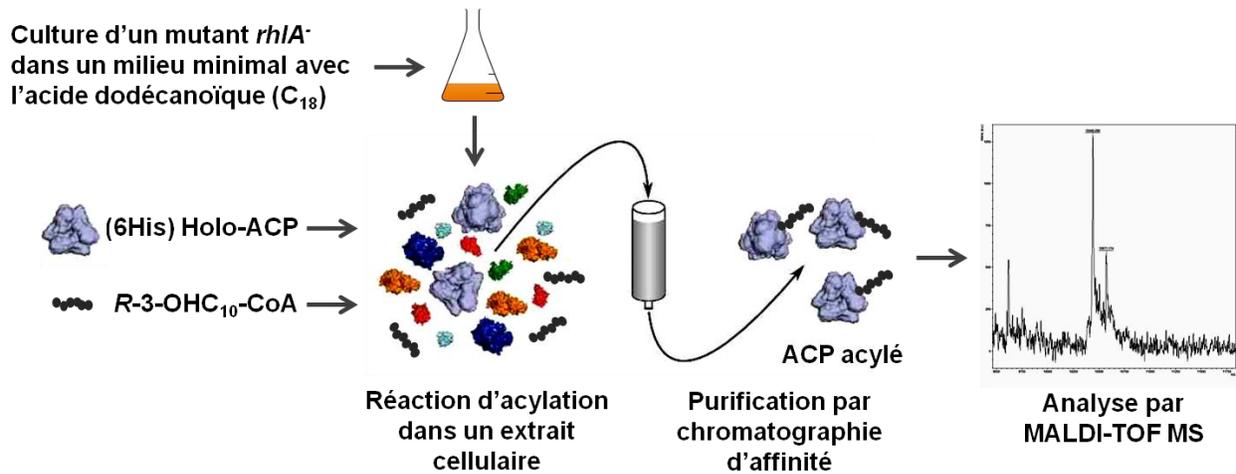


Figure supplémentaire 2.4. Schéma de l'approche d'acylation de l'ACP dans un extrait cellulaire.

Les étapes ultérieures à la réaction enzymatique dans l'extrait cellulaire sont indiquées, soit la purification de l'ACP par chromatographie d'affinité et l'analyse par MALDI-TOF MS.

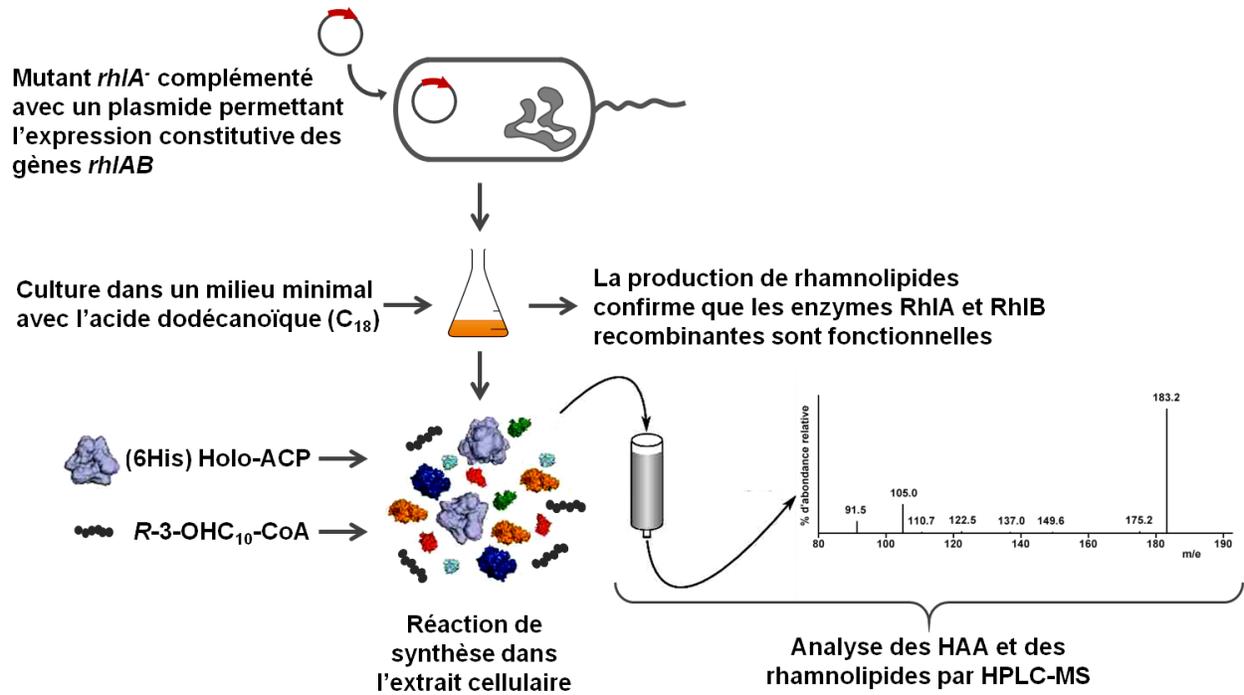


Figure supplémentaire 2.5. Schéma de l'approche de synthèse des HAA et des rhamnolipides dans un extrait cellulaire.

# Chapitre 3

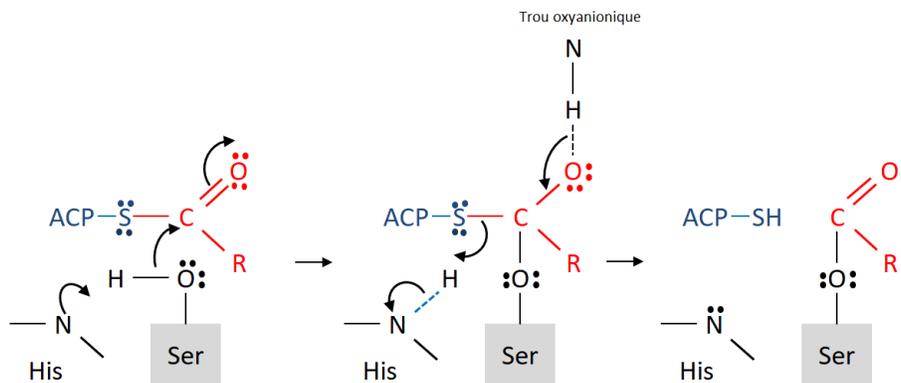
**Étude de la sélectivité de l'enzyme  
RhIA de *P. aeruginosa* par une  
approche mutationnelle.**

## 3.1 Introduction

### 3.1.1 Mécanisme catalytique de RhIA

RhIA est une protéine de 34 kDa dont la forme recombinante a été purifiée pour la première fois par Zhu et Rock en 2008. Tel que présenté au chapitre précédent, le rôle catalytique de la RhIA consiste à l'estérification de deux acides gras hydroxylés sur leur carbone  $\beta$ . Cette fonction enzymatique place RhIA dans le groupe EC3.1 rassemblant les estérases. Selon le mécanisme réactionnel de ce type d'enzymes (Stauffer & Zeffren, 1970), la formation du HAA s'effectueraient en deux étapes :

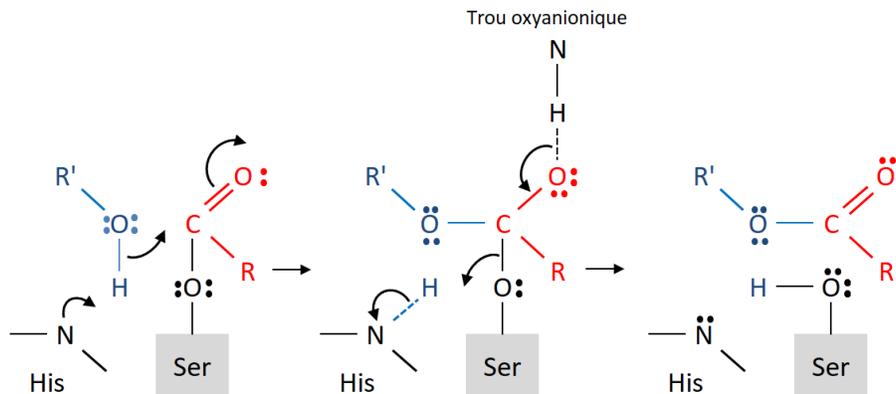
- i. Formation d'un complexe acyl-enzyme. Un résidu nucléophile, typiquement une sérine catalytique du site actif, exerce une attaque nucléophile sur le carbone du groupement thioester du premier substrat, un hydroxy-acyl-ACP, conduisant à la formation d'un intermédiaire tétraédrique de charge négative qui est stabilisé par des ponts hydrogènes au sein des résidus du trou oxyanionique. La formation de la fonction thiol (-SH) conduit au relâche de l'ACP et à la formation du complexe acyl-enzyme (Fig. 3.1).



**Figure 3.1. Représentation schématique de la formation d'un complexe acyl-enzyme.**  
Inspiré de Beer *et al.* (1996).

- ii. Condensation d'un deuxième acide gras. Le groupement hydroxyle sur le carbone  $\beta$  du deuxième substrat, un second acyl-ACP hydroxylé, subit une déprotonation par un résidu basique, typiquement une histidine du site actif. L'ion alcoolate formé ( $R-O^-$ ) exerce une attaque nucléophile sur le carbone du complexe acyle-enzyme, formant de nouveau un intermédiaire tétraédrique

stabilisé par les résidus composant le trou oxyanionique. Enfin, la liaison ester entre les deux acides gras effectue la formation du dilipide (Fig. 3.2), qui est libéré parallèlement à la régénération de l'enzyme sous sa forme chimique initiale.



**Figure 3.2. Représentation schématique de la synthèse enzymatique d'un dilipide.**

L'attaque nucléophile exercée par le deuxième acide gras hydroxylé (en bleu) sur le carbonyle (en rouge) au niveau du complexe acyl-enzyme permet la formation d'un dilipide *via* une liaison ester. Inspiré de Beer *et al.* (1996).

Visiblement, pour que la réaction présentée ait lieu, le premier substrat de la RhIA doit se trouver sous une forme activée, donc sous forme d'acyl-ACP. Toutefois, puisque c'est le groupement hydroxyle du deuxième substrat qui initie la deuxième étape de la réaction d'estérification, il n'est pas nécessaire que cet acide gras soit sous forme d'acyl-CoA ou acyl-ACP pour accomplir la réaction. Par ailleurs, lors de la réaction ultérieure qui est catalysée par la RhIB qui mène à la condensation d'une unité de rhamnose sur le groupement hydroxyle en position  $\beta$  du premier acide gras, la participation d'un complexe acyl-CoA ou acyl-ACP n'est pas sollicitée. Cela suggère qu'une hydrolase clive le lien thioester, probablement après la formation du HAA. Au moins 80 hydrolases putatives ont été prédites chez *P. aeruginosa* (Jaeger & Kovacic, 2014).

### 3.1.2 Conformation structurale de la RhIA

À l'heure actuelle, la structure tridimensionnelle de la RhIA n'a pas encore été rapportée. Cependant, le rôle catalytique de cette enzyme ainsi que des prédictions de ses structures secondaire et tertiaire suggèrent un repliement de type  $\alpha/\beta$  (Fig. S2) (Wittgens *et al.*, 2017). Il s'agit d'un domaine structural central typiquement formé par 8 brins  $\beta$  connectés par 6 hélices  $\alpha$  (Ollis *et al.*, 1992), autour duquel se greffent divers motifs responsables des propriétés catalytiques spécifiques et de la spécificité envers le substrat. Le site catalytique des estérases est constitué d'un résidu nucléophile qui est typiquement une sérine, d'une histidine et d'un acide carboxylique (Asp, Glu) (Arpigny & Jaeger, 1999). Chez RhIA, la sérine catalytique est localisée dans un pentapeptide hautement conservé chez les estérases. Cette séquence, GX SXG, est située à l'extrémité C-terminale du brin  $\beta_5$  et suivie d'une hélice  $\alpha$  (Wittgens *et al.*, 2017).

Une caractéristique structurale remarquable chez plusieurs hydrolases est la présence d'une région amphiphile qui couvre leur site actif. Généralement placée entre les brins  $\beta_6$  et  $\beta_7$ , cette région constitue un volet qui peut être composé d'une boucle ou de plusieurs hélices  $\alpha$  (Nardini & Dijkstra, 1999a). Le rôle de ce volet dans l'activité enzymatique est complexe, car il est associé aux interactions spécifiques avec le substrat, et même à l'activation interfaciale chez les lipases (Khan *et al.*, 2017b).

Étant étroitement associé avec le site actif, le volet peut être impliqué dans la conformation du canal d'accès au substrat, connectant le site actif avec la surface de la protéine. De plus, cette région peut jouer un rôle majeur dans la sélectivité du substrat et dans l'activité enzymatique. L'étude effectuée par Dugi *et al.* (1995) a montré que l'activité hydrolytique envers les triglycérides et les phospholipides de lipases spécifiques peut être modulée par le remplacement de la région formant le volet. Dans cette étude, une lipase lipoprotéique chimérique (LPL<sub>C</sub>) comportant le volet de la lipase hépatique humaine (HL) a montré une diminution de 3.3 fois de son activité hydrolytique envers les triglycérides et une augmentation de 327% de son activité phospholipase en comparaison avec la LPL native. À l'opposé, la lipase hépatique chimérique (HL<sub>C</sub>) contenant le volet de la LPL a montré une activité accrue envers les triglycérides de 123% et une diminution de l'activité hydrolytique des phospholipides de 30% en comparaison avec la HL native (Dugi *et al.*, 1995b). Par ailleurs, une sélectivité modulée par le volet a également été observée chez les lipases ayant leur site actif exposé à la surface. En effet, lors d'une étude présentée par Boersma *et al.* (2008), une

approche chimérique au niveau du volet a permis d'invertir l'énantiosélectivité de la lipase A de *Bacillus subtilis* (LipA). Ces protéines chimériques ont été générées par un échange de la boucle formant le volet au sein de la cutinase de *Fusarium solani* et de l'acétylxylane estérase de *Penicillium purpurogenum* (Boersma *et al.*, 2008a). Enfin, d'autres recherches ont utilisé des approches chimériques similaires (nommée *lid swapping*) pour l'étude de la sélectivité et de l'activité enzymatique des hydrolases d'origine microbienne, par exemple chez les lipases de *Candida rugosa* (CRLs) (Brocca *et al.*, 2003a, Secundo *et al.*, 2004b), de *Rhizopus oryzae* (Shiraga *et al.*, 2005a) et de *Rhizopus chinensis* (Yu *et al.*, 2014b).

### 3.2 Problématique

L'engouement pour les surfactants biologiques et, particulièrement les rhamnolipides, fait écho au grand défi visant à remplacer les produits synthétiques pour réduire la contamination des écosystèmes aquatiques à la source et favoriser la biorestauration. Cependant, la croissance de cette technologie est confrontée à plusieurs obstacles qui empêchent les différents secteurs de l'industrie d'en tirer profit. Notamment, les coûts de production très élevés constituent un problème majeur.

Grâce au génie de protéines, il a été possible de moduler la sélectivité et d'augmenter l'activité catalytique de plusieurs hydrolases (Khan *et al.*, 2017b). Particulièrement, les avancées en protéomique, en biologie structurale et en bioinformatique appliquée constituent un puissant ensemble de technologies favorisant l'émergence de la biologie de synthèse et l'étude de la conformation des protéines et leurs interactions.

Le génie des protéines se présente donc comme une technologie attrayante pouvant s'appliquer à la biosynthèse de rhamnolipides, mais le manque de caractérisation fonctionnelle et structurale des enzymes qui s'y rattachent constitue un obstacle majeur. De plus, le manque de méthodes de criblage à haut débit pour identifier les variants surproducteurs de rhamnolipides est un facteur limitant à l'égard de l'ampleur des modifications génétiques qui seraient engendrées afin de faire évoluer une protéine vers une activité spécifique recherchée.

### 3.3 Hypothèse

Deux aspects font l'objet d'une grande attention concernant les rhamnolipides : l'amélioration de la productivité à faible coût et la diversification de leurs propriétés *via* l'obtention de mélanges de congénères spécifiques ou purs. À l'heure actuelle, l'enzyme RhIA, jouant un rôle clé dans la biosynthèse de précurseurs lipidiques de rhamnolipides, constitue la candidate à cibler tant pour augmenter le flux de précurseurs dans la voie biosynthétique que pour moduler le profil des acides gras générés et formant ces glycolipides.

Par ailleurs, la diversité phylogénétique de RhIA peut être utile pour étudier les éléments structuraux qui gouvernent sa sélectivité pour son substrat. Si de tels éléments sont identifiés à la base, il est possible de mettre en place des stratégies d'évolution non aléatoires, telle l'évolution semi-rationnelle, où l'ampleur des modifications génétiques peut être limitée, permettant ainsi l'analyse des variants générés par des méthodes analytiques n'étant pas optimisées pour un criblage à haut débit.

### 3.4 Objectifs du chapitre

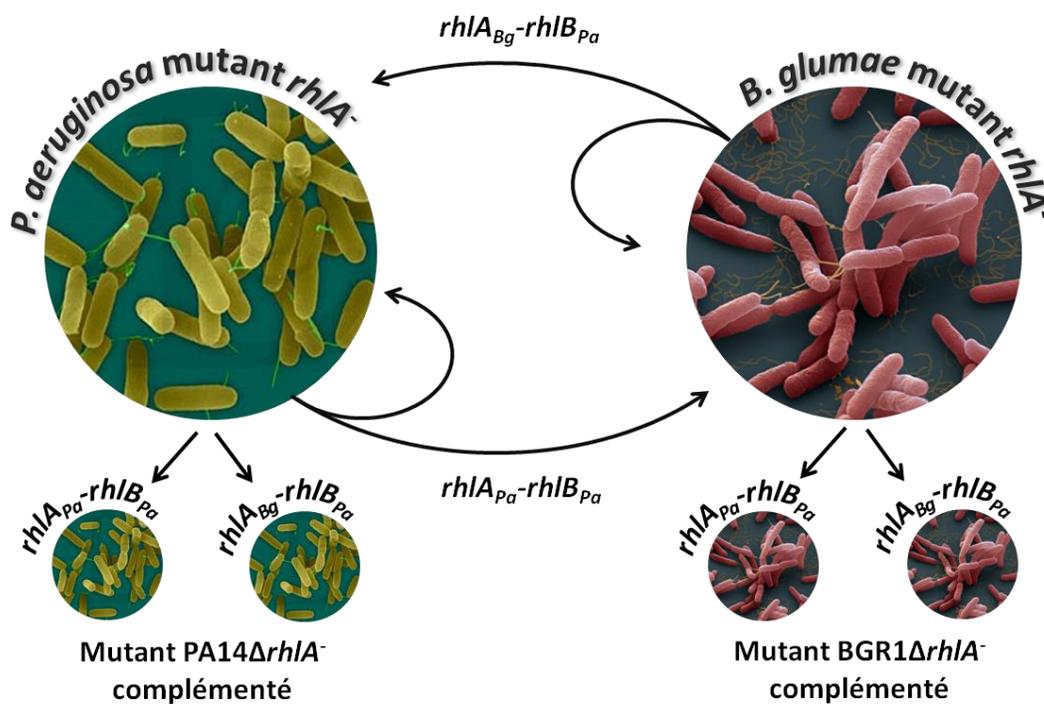
Le présent chapitre met l'accent sur le recours à une stratégie d'évolution semi-rationnelle ayant pour objectif la modulation de la sélectivité du substrat et l'augmentation de l'efficacité catalytique de l'enzyme RhIA de *P. aeruginosa*. Les objectifs spécifiques du chapitre sont :

Le présent chapitre met l'accent sur le recours à une stratégie d'évolution semi-rationnelle ayant pour objectif la modulation de la sélectivité de substrat et l'augmentation de l'efficacité catalytique de l'enzyme RhIA de *P. aeruginosa*. Les objectifs spécifiques du chapitre sont :

- i. Déterminer le rôle de RhIA dans les profils de congénères distincts observés chez *P. aeruginosa* et *B. glumae*.
- ii. Identifier la région de la séquence primaire et les éléments structuraux putatifs qui modulent la reconnaissance du substrat et la sélectivité de RhIA.
- iii. Effectuer une exploration mutationnelle du site actif pour augmenter l'efficacité catalytique de RhIA.

### 3.5 Méthodologie et approche globale

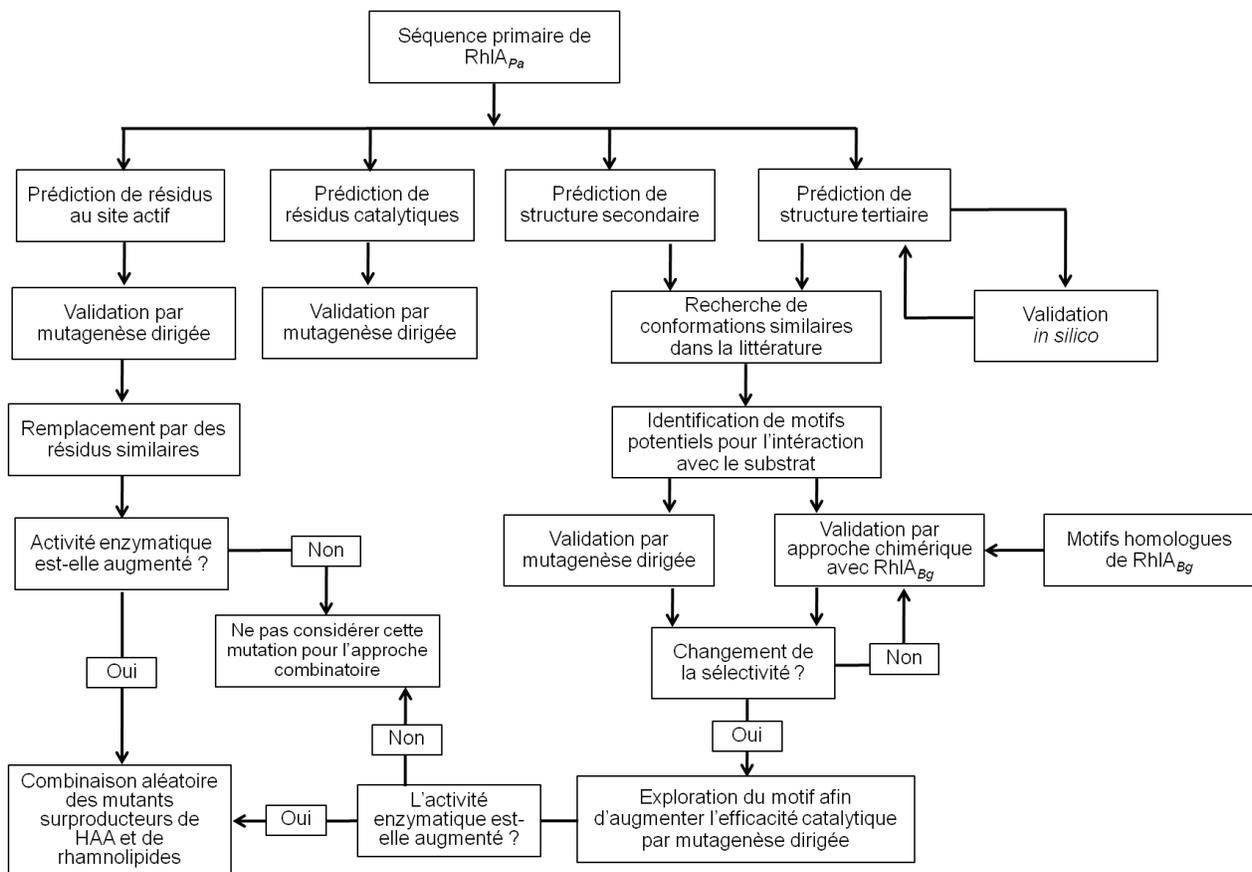
L'étude de l'enzyme RhIA présentée ici est principalement basée sur la caractérisation des régions de la protéine impliquées dans la formation du site actif et la reconnaissance du substrat. Premièrement, le rôle de RhIA dans le profil de congénères de rhamnolipides produits chez *P. aeruginosa* et chez *B. glumae* a été étudié via une approche de complémentation croisée de mutants *rhIA*<sup>-</sup> (Fig. 3.3). L'espèce *B. glumae* produisant un profil de congénères de rhamnolipides très différent de celui de *P. aeruginosa* a été jugée idéale pour cet objectif.



**Figure 3.3. Schéma de la complémentation croisée des mutants *rhIA*<sup>-</sup> de *P. aeruginosa* et *B. glumae*.** Chez le mutant PA14\_ *rhIA*::TnMr7 (ayant un effet polaire sur le gène *rhIB*), la production de HAA et des rhamnolipides est interrompue. La complémentation est effectuée parallèlement avec l'opéron natif *rhIA*<sub>Pa</sub>-*rhIB*<sub>Pa</sub> (*Pa* : *P. aeruginosa*) et l'opéron chimérique *rhIA*<sub>Bg</sub>-*rhIB*<sub>Pa</sub> (*Bg* : *B. glumae*).

Par la suite, un modèle par homologie de RhIA de *P. aeruginosa* a été construit et évalué en utilisant plusieurs outils bioinformatiques. Des outils de prédiction ont également permis d'identifier les résidus catalytiques et des résidus qui interagissent éventuellement avec le substrat au site actif. Ces prédictions ont été validées de façon expérimentale par mutagenèse dirigée; les différents congénères de rhamnolipides produits par ces mutants ont été

caractérisés et quantifiés par une méthode de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. L'analyse du modèle par homologie et des résultats obtenus lors des mutations effectuées au site actif a dévoilé une région structurale putative de l'enzyme pouvant jouer un rôle clé dans l'interaction avec les acides gras. L'importance de cette région a été ultérieurement investiguée par une approche chimérique utilisant des éléments structuraux putatifs homologues de l'enzyme RhIA de *B. glumae*. Finalement, les résultats de cette approche ont permis d'établir des points de référence pour l'exploration mutationnelle de résidus placés dans les éléments structuraux qui entourent le site actif et qui éventuellement peuvent favoriser l'activité catalytique de l'enzyme (Fig. 3.4).



**Figure 3.4. Diagramme de flux de l'approche d'évolution semi-rationnelle globale utilisée pour l'exploration de l'enzyme RhIA au site actif.**

Cette approche cherche l'identification de motifs/résidus potentiels pour moduler la sélectivité du substrat et l'activité enzymatique de RhIA<sub>Pa</sub>.

### 3.6 Article soumit

## Semi-rational evolution of the 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoate (HAA) synthase RhIA to improve rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia glumae*

Carlos Eduardo Dulcey<sup>1,#</sup>, Yossef López de los Santos<sup>1,#</sup>, Myriam Létourneau<sup>1</sup>, Eric Déziel<sup>1\*</sup> & Nicolas Doucet<sup>1,2\*</sup>

From the <sup>1</sup>INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 Boulevard des Prairies, Laval, QC, Canada, H7V 1B7; <sup>2</sup>PROTEO, the Québec Network for Research on Protein Function, Engineering, and Applications, 1045 Avenue de la Médecine, Université Laval, QC, Canada, G1V 0A6.

Running title: *Semi-rational evolution of RhIA*

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

\*To whom correspondence should be addressed: Nicolas Doucet, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 Boulevard des Prairies, Laval, QC, Canada, H7V 1B7; [nicolas.doucet@iaf.inrs.ca](mailto:nicolas.doucet@iaf.inrs.ca); Tel. (450) 687-5010, ext. 4212; Fax. (450) 686-5501; and Éric Déziel, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 Boulevard des Prairies, Laval, QC, Canada, H7V 1B7; [eric.deziel@iaf.inrs.ca](mailto:eric.deziel@iaf.inrs.ca); Tel. (450) 687-5010, ext. 4220; Fax. (450) 686-5501.

**Keywords:** lipids, biosurfactants, enzymes, substrate specificity, microbiology.

**Database:** Model data are available in the PMDB database under the accession number PM0081867.

**Type of manuscript:** Original research

**Status:** In preparation.

**Authors' contributions:** Carlos Eduardo Dulcey performed all experimental procedures and analyzed the data. Bioinformatics procedures were performed by Yossef López de los Santos. Redaction of manuscript by Carlos Eduardo Dulcey and Yossef López de los Santos. All authors contribute to designed experiments. Dr. Doucet and Déziel supervised the work and corrected the manuscript.

### 3.7 Résumé

RhIA, la 3-(3-hydroxyalcanoyloxy)alcanoate HAA synthase, est une enzyme essentielle impliquée dans la biosynthèse des HAA principalement chez les espèces *Pseudomonas* et *Burkholderia*. RhIA module la longueur de la chaîne aliphatique des rhamnolipides, conférant à ces biosurfactants des propriétés physico-chimiques distinctes et une valeur industrielle et pharmaceutique prometteuse. Une compréhension moléculaire détaillée des facteurs structuraux qui gouvernent l'activité catalytique et la spécificité de substrat de RhIA pourraient faciliter l'utilisation d'outils de génie de protéines pour développer des variantes capables de synthétiser de nouveaux mélanges de rhamnolipides pour la fabrication de produits spécifiques et respectueux de l'environnement. Cependant, l'évolution dirigée de RhIA demeure limitée dû à l'absence de méthodes de criblage à haut débit et au manque de structures moléculaires résolues expérimentalement. Dans le présent travail, l'approche de modélisation moléculaire comparative combinée avec la construction de protéines chimériques a été utilisée comme point de départ pour identifier des éléments structuraux putatifs impliqués dans l'interaction protéine-substrat facilitant la conception d'une approche de mutagenèse semi-rationnelle chez RhIA de *Pseudomonas aeruginosa*. La production de différents variants de RhIA et la création de protéines hybrides entre les homologues de *Pseudomonas* et *Burkholderia* nous a permis la modulation sélective sur la longueur de la chaîne alkyle des rhamnolipides chez *P. aeruginosa* et *B. glumae*. Nos résultats démontrent aussi la présence d'un motif de type *cap-domain* qui recouvre le site catalytique de l'enzyme étant impliqué aussi dans la spécificité de substrat de RhIA. Notre approche semi-rationnelle a montré des « *hot-spots* » prometteurs pour la modulation du profil de congénères des rhamnolipides et pour le contrôle de l'activité enzymatique, en plus de découvrir des positions des résiduels qui modulent la sélectivité entre les homologues fonctionnels de *Pseudomonas* et *Burkholderia*.

### 3.8 Abstract

The 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoate (HAA) synthase RhIA is an essential enzyme involved in the biosynthesis of HAAs in *Pseudomonas* and *Burkholderia* species. RhIA modulates the aliphatic chain length in rhamnolipids, conferring distinct physicochemical properties to these biosurfactants exhibiting promising industrial and pharmaceutical value. A detailed molecular understanding of substrate specificity and catalytic performance in RhIA could offer protein engineering tools to develop designer variants involved in the synthesis of novel rhamnolipid mixtures for tailored eco-friendly products. However, current directed evolution progress remains limited due to the absence of high-throughput screening methodologies and lack of an experimentally resolved RhIA structure. In the present work, we used comparative modeling and chimeric-based approaches to perform a comprehensive semi-rational mutagenesis of RhIA from *Pseudomonas aeruginosa*. Our extensive RhIA mutational variants and chimeric hybrids between the *Pseudomonas* and *Burkholderia* homologs illustrate selective modulation of rhamnolipid alkyl chain length in both *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia glumae*. Our results also demonstrate the implication of a putative cap-domain motif that covers the catalytic site of the enzyme and provides substrate specificity to RhIA. This semi-rational mutant-based survey reveals promising 'hot-spots' for the modulation of RL congener patterns and potential control of enzyme activity, in addition to uncovering residue positions that modulate substrate selectivity between the *Pseudomonas* and *Burkholderia* functional homologs.

### 3.9 Introduction

Rhamnolipids (RLs) are glycolipid compounds produced by a limited number of bacterial species, including *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2009). RLs are attractive biosurfactants exhibiting good biodegradability, broad structural diversity and low toxicity (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2009, Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010). These features make them promising biotechnological metabolites in a wide variety of applications (Vatsa *et al.*, 2010), including the cosmetic (DeSanto, 2011), detergent (Parry *et al.*, 2013), agricultural (Sachdev & Cameotra, 2013), pharmaceutical (Piljac *et al.*, 2008), oil recovery (Zhang & Miller, 1992), and bioremediation fields (Chen *et al.*, 2013, Chrzanowski *et al.*, 2012a). RLs belong to a family of amphiphilic compounds that share a hydroxylated lipidic moiety (3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoate (HAA) in couple with a sugar moiety which corresponds to one or two units of rhamnose (Bergström *et al.*, 1946, Jarvis & Johnson, 1949). RLs are produced through a multi enzymatic process involved proteins RhIA, RhIB, RhIC and RmlBDAC. The synthesis of the lipidic precursor of RLs (HAA) is conducted by RhIA, which catalyzed the esterification between two units of hydroxylated fatty acids to form a di-lipid (Figure S1) (Burger *et al.*, 1963, Déziel *et al.*, 2003, Ochsner *et al.*, 1995, Zhu & Rock, 2008a). RhIB further catalyzes the condensation of one unit of dTDP-L-rhamnose through an O-glycosidic bond with the HAA moiety (Déziel *et al.*, 2003, Jarvis & Johnson, 1949, Ochsner *et al.*, 1995). A second unit of dTDP-L-rhamnose can be condensed with the mono-rhamnolipid formed through an  $\alpha$ -1,2-glycosidic bond catalyzed by RhIC (Edwards & Hayashi, 1965, Rahim *et al.*, 2001). Enzymes encoded by the *rmlBDAC* operon provided the TDP-L-rhamnose (Rahim *et al.*, 2000). Two metabolic pathways have been proposed to provide hydroxylated fatty acids for the HAA synthesis. While Zhu and Rock (2008) showed *in vitro* that fatty acids are linked to an acyl carrier protein (ACP) to be used by RhIA *in vitro* - thus suggested that FAS II is the default metabolic pathway (Zhu & Rock, 2008a) - recent isotopic tracing investigations performed *in vivo* demonstrated that  $\beta$ -oxidation is the main supplier of lipid precursors to RLs (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014b, Zhang *et al.*, 2012).

The industrial use of RLs currently poses two major challenges, *i.e.* they are produced as a complex mixture of congeners with significantly distinct structural and molecular properties (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010, Mendes *et al.*, 2015, Tiso *et al.*, 2017), in addition to being produced at much higher costs relative to synthetic surfactants (Randhawa & Rahman, 2014). As a result, improving production yields and achieving a competitive advantage in the biosurfactant market requires combining approaches that lower production costs with strategies

that target high-performance RL cell synthesis (Lovaglio *et al.*, 2015). Furthermore, the ability to manipulate RL congener mixture composition would offer significant advantage to better exploit RL properties in selected applications (Han *et al.*, 2014, Marchant & Banat, 2012, Tiso *et al.*, 2017). To this day, many studies have addressed these challenges by using genetically engineered, non-pathogenic microbial hosts to synthesize RLs (Cabrera-Valladares *et al.*, 2006, Solaiman *et al.*, 2015, Tiso *et al.*, 2017, Wittgens *et al.*, 2018a, Wittgens *et al.*, 2011). However, engineered strains are often incapable of achieving high production yields relative to the well-characterized high RL producer *Pseudomonas aeruginosa*. This is attributed to the complexity of the genetically regulated pathways controlling *in vivo* RL production and/or the inability of efficiently controlling heterologous gene expression leading to metabolic perturbations. In fact, expression of *rmIBDAC*, *rhlAB* and *rhlC* in *P. aeruginosa* is mainly regulated by the *rhl* quorum sensing system (Aguirre-Ramirez *et al.*, 2012, Ochsner & Reiser, 1995, Rahim *et al.*, 2001), which in turns forms part of a complex genetic regulation cascade (Lee & Zhang, 2015). According to some previous reports (Déziel *et al.*, 2003, Wittgens *et al.*, 2017, Zhu & Rock, 2008a) RhlA acts as a key enzyme providing the lipidic flux toward the RL biosynthesis pathway. Thus, HAA biosynthesis could act as the rate-limiting step of RL production.

To the best of our knowledge, only one study previously reported the molecular evolution of RhlB to improve RL production from the RL biosynthesis pathway (Han *et al.*, 2014). The lack of a reliable high-throughput screening methodology for RL production and the absence of a crystallographically-resolved protein structure for RhlA, RhlB, or RhlC severely restrict the possibility of using directed evolution approaches to improve RL biosynthesis. To partly overcome such limitations, we combined homology modeling and targeted structural mutagenesis of RhlA from *P. aeruginosa* (RhlA<sub>Pa</sub>) to investigate its potential to increase RL production and to modulate RL congener mixtures in *P. aeruginosa* and *Burkholderia glumae*. We performed homology modeling of the RhlA<sub>Pa</sub> enzyme using structural homologs of the  $\alpha/\beta$  hydrolase superfamily to perform structure-guided rational mutagenesis at targeted positions. Experimental validation of selected positions by alanine scanning allowed us to identify the catalytic site of RhlA, which was found to be covered by a putative cap-domain motif. Since cap-type domains play a crucial role in  $\alpha/\beta$  hydrolase ligand selectivity (Boersma *et al.*, 2008a, Brocca *et al.*, 2003a, Dugi *et al.*, 1995b, Secundo *et al.*, 2004b, Shiraga *et al.*, 2005a, Yu *et al.*, 2014b), we also performed the mutational exploration of this potentially important RhlA motif. Since various *Burkholderia* species have the ability to produce RLs that differ in RL alkyl chain length relative to *P. aeruginosa* (Costa *et al.*, 2011, Dubeau *et al.*, 2009, Haussler *et al.*, 1998, Hörmann *et al.*, 2010), we also used RhlA from *Burkholderia glumae* (RhlA<sub>Bg</sub>) as a comparative

partner to develop chimeric RhIA<sub>Bg</sub>-RhIA<sub>Pa</sub> hybrid biocatalysts. Our aim was to characterize the structure-function relationship between the putative cap-domain and substrate binding/selectivity in these structural and functional homologs. Results from chimeric RhIA enzymes from *Pseudomonas* and *Burkholderia* species illustrate that substrate selectivity of RhIA<sub>Pa</sub> is partly located in the putative cap-domain motif. Finally, we found that selected point mutants are sufficient to increase the catalytic efficiency of RhIA<sub>Pa</sub> expressed in *P. aeruginosa* and *Burkholderia glumae*. We identified nine mutations with increased *in vivo* RL biosynthesis, resulting in doubling of RL production relative to WT RhIA<sub>Pa</sub>. Our results suggest that these replacements could be involved in stabilization of RhIA substrates during HAA synthesis.

## 3.10 Results

### 3.10.1 Substrate selectivity of RhIA from *P. aeruginosa* and *B. glumae*

*P. aeruginosa* produces RLs with fatty acid chain lengths varying from 8 to 12 carbons (C<sub>8</sub>-C<sub>12</sub>), favoring the predominant C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> dilipid (Déziel *et al.*, 2000b). RhIAP<sub>a</sub> also shows remarkably high *in vitro* preference for C<sub>10</sub> (87.3 %) alkyl chain length over C<sub>8</sub> (8.5 %) and C<sub>12</sub> (4.1 %) substrates (Zhu & Rock, 2008a). Nevertheless, enzyme selectivity for longer 3-hydroxyalkyl chain lengths (C<sub>14</sub> and C<sub>16</sub>) remains uncharacterized. To verify whether *P. aeruginosa* produces C<sub>14</sub> and C<sub>16</sub> fatty acid precursors that could be used in RL biosynthesis, we cultured a PA14\_ *rhIA*::TnMrT7 strain in minimal medium supplemented with glycerol as the sole carbon source and analyzed the pattern of free 3-hydroxyfatty acids in early stationary growth phase by GC/MS. We observed that the *rhIA*-depleted PA14 strain supplies 3-hydroxyfatty acids with chain lengths varying from C<sub>8</sub> to C<sub>14</sub>, with C<sub>8</sub> and C<sub>10</sub> being the most abundant (Table 3.1). The relative abundance of C<sub>14</sub> was only ~2 % and C<sub>16</sub> hydroxylated fatty acid was not detected. Since *P. aeruginosa* primarily synthesizes medium-sized chain hydroxyfatty acids (C<sub>8</sub>-C<sub>12</sub>) in early stationary phase, the production of larger alkyl chain HAA congeners is unlikely to be achieved with glycerol as the sole carbon source.

**Table 3.1. GC/MS analysis of free 3-hydroxy fatty acids from a PA14\_ *rhIA*::TnMrT7 strain in early stationary growth phase.**

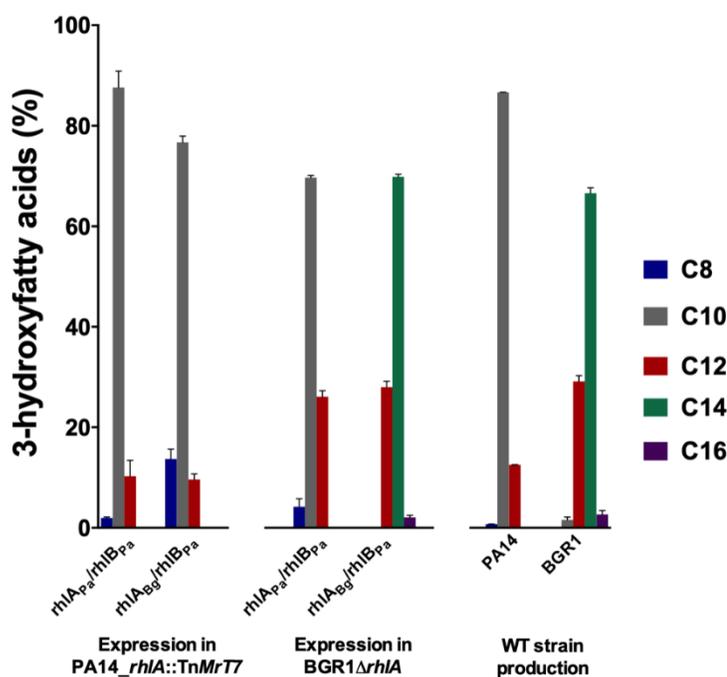
Species	MW <sup>1</sup>	MW <sup>2</sup> of trimethylsilyl derivatives <sup>2</sup>	Retention time (min)	Proportion (%)
3-OH-C <sub>8</sub>	160.1	304.2	10.54	33.9
3-OH-C <sub>10</sub>	188.1	332.2	11.23	50.5
3-OH-C <sub>12</sub>	216.1	360.3	11.80	13.7
3-OH-C <sub>14</sub>	244.1	388.2	12.31	1.9

<sup>1</sup> Molecular weight calculations are based on the exact mass.

<sup>2</sup> Trimethylsilyl derivative is of both the carboxylic group and the 3-hydroxyl group.

To circumvent the lack of longer C<sub>14</sub> and C<sub>16</sub> hydroxyfatty acids produced in *P. aeruginosa*, we considered the fact that *B. glumae* produces RLs with fatty acid chain lengths varying from C<sub>12</sub> to C<sub>16</sub>, favoring the most abundant dilipid congener C<sub>14</sub>-C<sub>14</sub> (Costa *et al.*, 2011).

Thus, we complemented a *B. glumae* BGR1 $\Delta$ *rhIA* mutant with native operon *rhIA<sub>Pa</sub>/rhIB<sub>Pa</sub>*. Again, we observed that the RL pattern exhibits 3-hydroxyfatty acid chain lengths ranging from C<sub>8</sub> to C<sub>12</sub>, without production of C<sub>14</sub> or C<sub>16</sub> alkyl chains, similar to the wild-type RL pattern observed in *P. aeruginosa* (Fig. 3.5). This result confirms that the fatty acid composition of the RL mixture observed in *P. aeruginosa* is due to the preference of RhIA<sub>Pa</sub> for medium-sized substrates (C<sub>8</sub> - C<sub>12</sub>) instead of the predominant length of the 3-hydroxyalkyl chain species provided by the bacterial host. Furthermore, we observed that *B. glumae* supplies a wider range of hydroxyfatty acid species than *P. aeruginosa*, including alkyl chain lengths ranging from C<sub>8</sub> to C<sub>16</sub>. Nevertheless, upon expression of the hybrid operon *rhIA<sub>Bg</sub>/rhIB<sub>Pa</sub>* in a BGR1 $\Delta$ *rhIA* mutant, RLs carrying C<sub>12</sub>-C<sub>16</sub> alkyl chains were detected, similar to the RL congener mixture observed in WT *B. glumae* (Fig. 3.5). In contrast, expression of the hybrid operon *rhIA<sub>Bg</sub>/rhIB<sub>Pa</sub>* in a PA14\_ *rhIA::TnMrT7* mutant produces only RLs with alkyl chain lengths ranging from C<sub>8</sub> to C<sub>12</sub>. Although RhIA<sub>Bg</sub> is a more permissive enzyme that produces both medium-sized and long-sized chain HAAs, this result suggests that the significant production yields of C<sub>14</sub>-HAAs in *B. glumae* is not exclusively dependent on the available 3-hydroxyfatty acids in this host, but also due to the intrinsic lower selectivity of RhIA<sub>Bg</sub>.



**Figure 3.5. 3-hydroxyfatty acids consumed by RhIA<sub>Pa</sub> and RhIA<sub>Bg</sub> upon cross complementation assays with strains PA14\_ *rhIA::TnMrT7* and BGR1 $\Delta$ *rhIA* (WT operon *rhIA<sub>Pa</sub>/rhIB<sub>Pa</sub>* and hybrid operon *rhIA<sub>Bg</sub>/rhIB<sub>Pa</sub>*).**

3-hydroxyfatty acid production was calculated based on total HAAs, with mono- and di-RLs detected by LC/MS. All experiments were performed in triplicate. Error bars were calculated from typical standard deviation of at least three independent measurements.

### 3.10.2 Substrate selectivity in RhIA

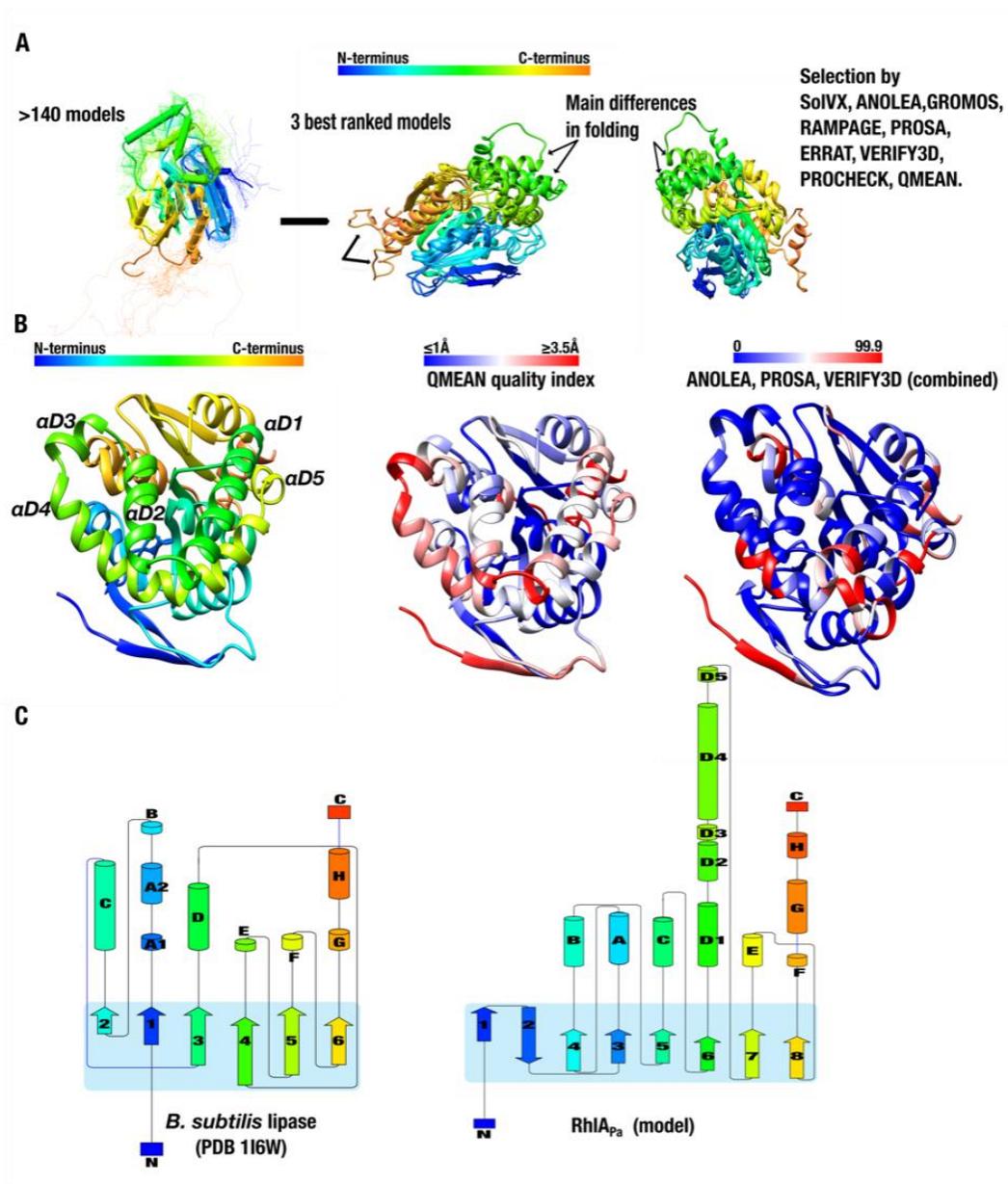
The three-dimensional structure of the RhIA enzyme has not been resolved. Consequently, to rationalize RL production yields and to understand RL congener selectivity at the molecular level, we used PSI-Blast and HHblits algorithms to identify the best structural template candidates to perform homology modeling on the RhIA<sub>Pa</sub> target sequence (Altschul *et al.*, 1997, Remmert *et al.*, 2011). Both algorithms were intended to cover close and remote homolog detection. Template structures of proline iminopeptidase-related protein TTHA1809 (PDB entry 2YYS), amidohydrolase VinJ (PDB entry 3WMR), and  $\alpha/\beta$  hydrolase from *P. aeruginosa* PAO1 (PDB entry 3OM8) were selected as the most promising template candidates. Although these all preserve the canonical  $\alpha/\beta$  hydrolase fold, they nevertheless exhibit low sequence identity with RhIA<sub>Pa</sub> (22%, 28.4%, and 21%, respectively). Because inaccuracies in homology modeling typically arise from errors in initial sequence alignments — and therefore inadequate template selection (Venclovas & Margelevicius, 2005) — we used T-Coffee Expresso to evaluate local sequence alignment reliability between RhIA<sub>Pa</sub> and the three template candidates. We also opted to build and challenge the validity of distinct homology model predictions for all three templates. This was warranted on the basis that templates exhibiting sequence identities below 30% tend to display broadly similar folds with different side chain packing and orientation, potentially leading to serious mispredictions (Venclovas & Margelevicius, 2005). As a result, we selected the prediction convergence of all template models to increase the reliability of our RhIA model (Figure 3.6).

Three independent homology modeling procedures (SWISS-MODEL, I-TASSER, and Robetta) were used, yielding a pool of 140 predicted RhIA<sub>Pa</sub> structures with nearly identical fold and main structural differences located in the loop environments (Figure 3.6 A). The best ranked models were subjected to a second round of robust structural and energetic validation, including atomic solvation to qualify side chain packing, C $\alpha$  geometry structural evaluation, stereochemical quality, packing quality, and composite scoring function for quality estimation of homology models (Benkert *et al.*, 2011) (see Methods, Figure 3.6, and Table S1 for details). The best ranked structure supports the methodology and confirms that the topology of RhIA<sub>Pa</sub> resembles that of the conserved  $\alpha/\beta$  hydrolase superfamily (SCOP annotation (Murzin *et al.*, 1995b)), preserving 8  $\beta$ -strands at the core of the enzyme fold (Figure 3.6 B-C). The main difference between the RhIA<sub>Pa</sub> model and the canonical  $\alpha/\beta$  hydrolase fold is the addition of a set of 5  $\alpha$ -helices in structural motif D ( $\alpha$ D<sub>1</sub>- $\alpha$ D<sub>5</sub>, Figure 3.6 C). As expected, the overall quality estimation index (QMEAN) and the combined tools of ANOLEA and VERIFY-3D confirmed that

the N-terminal portion and the  $\alpha$ D4 motif exhibit the lowest structural accuracy. Nevertheless, the predicted protein structure exhibits a global quality value comparable to similarly sized and folded experimental structures reported in the Protein Data Bank (Figure S2 C).

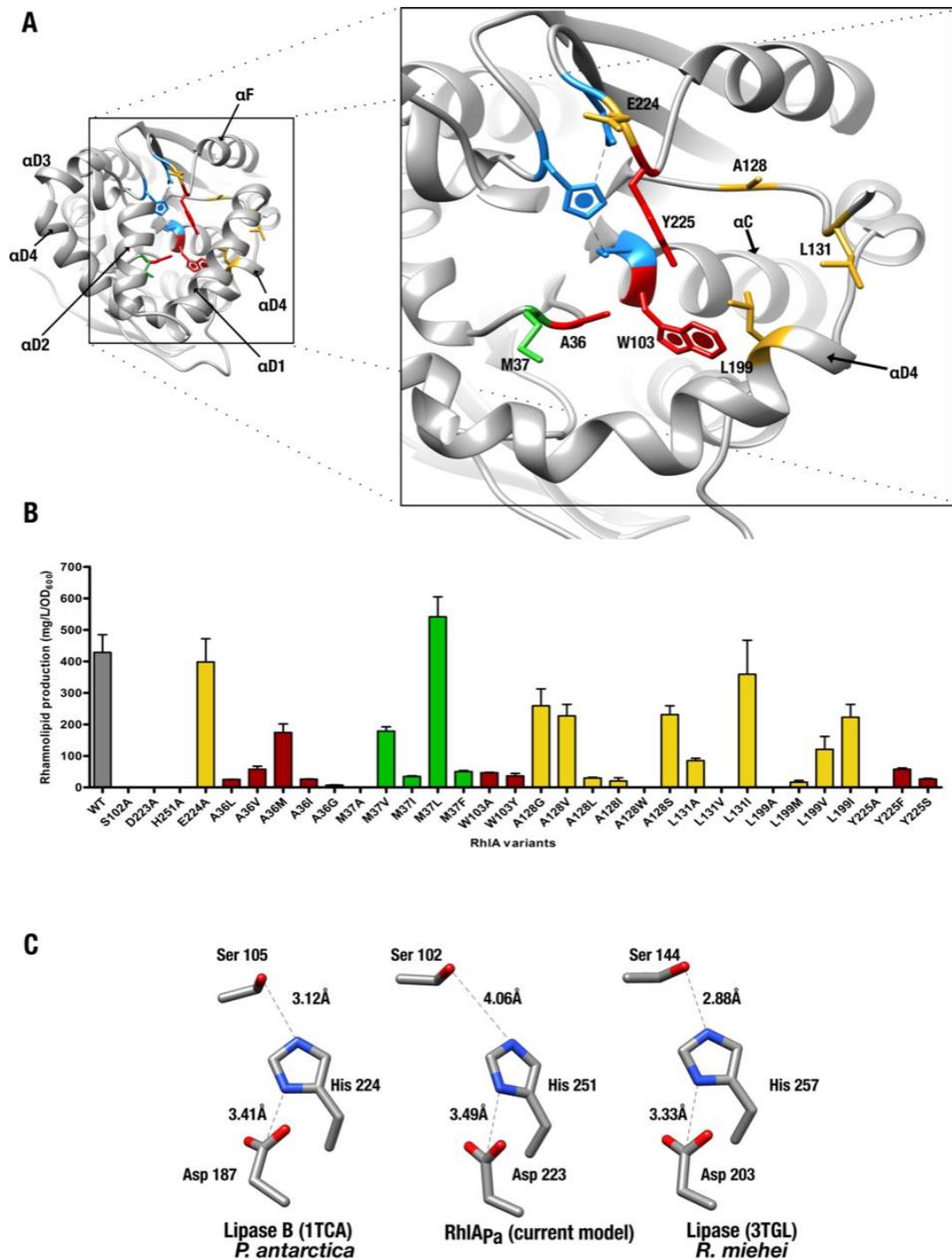
We used the TM-align and COACH tools on the best ranked structure to identify residues potentially involved in the catalytic function of RhIA<sub>Pa</sub> (Yang *et al.*, 2015, Zhang & Skolnick, 2005). A set of 8 residues were identified as catalytically relevant positions (A36, M37, W103, A128, L131, L199, E224 and Y225), with S102, D223, and H251 acting as a potential catalytic triad (Figure 3.7 A). An alanine scanning exploration of this putative catalytic triad showed that substitution of any of the residues at positions 102, 223, and 251 generated a catalytically inactive RhIA enzyme. This was confirmed by the lack of HAA or RL production in a PA14\_*rhlA*::TnMr7 strain expressing these single-site mutational variants (Figure 3.7 B). The potential role of the proximal E224 residue as the acid component of the catalytic triad was also discarded due to the fact that the loss-of-function E224A variant did not affect RL production in *P. aeruginosa* (Figure 3.7 B).

Since the *P. aeruginosa* and *B. glumae* bacterial systems used to test rhamnolipid production express RhIA at constitutive levels and therefore yield low cellular enzyme concentrations, it was impossible for us to confirm WT or mutant RhIA expression on SDS-PAGE over empty strain controls. The lack of either a proper expression tag and/or lack of commercially available anti-RhIA antibody also precluded us from performing Western Blot analyses to confirm protein expression of all RhIA variants. Consequently, we used a reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) to confirm that the mutated genes of inactive variants are well transcribed in the PA14\_*rhlA*::TnMr7 system (Figure S3). These results suggest that loss of rhamnolipid synthesis by RhIA is caused by loss-of-function mutations rather than lack of proper enzyme expression or misfolding. This observation is further supported by the fact that no RhIA protein band was ever observed on SDS-PAGE, including for the highly active WT RhIA enzyme and for all rhamnolipid producing mutational variants. Overall, these results support the hypothesis that S102, D223, and H251 act as the catalytic triad of RhIA<sub>Pa</sub>, which is further supported by strict evolutionary sequence conservation and highly similar structural organization of the putative catalytic triad residues between RhIA and homologous  $\alpha/\beta$  hydrolase superfamily members (Figure 3.7 C).



**Figure 3.6. RhlA<sub>Pa</sub> homology modeling procedure and validation.**

A) Based on template structures of proline iminopeptidase-related protein TTHA1809 (PDB entry 2YYS), amidohydrolase VinJ (PDB entry 3WMR),  $\alpha/\beta$  hydrolase MGS-M2 (PDB entry 4Q3I), 140 models were computed by independent homology modeling protocols. The most structurally and energetically favorable models were evaluated for a second round of validation (see Methods, Table S1, and Figure S2 for details). All models exhibited similar protein backbone architecture (left section of panel A). B) Comparison between the QMEAN quality index (middle section) and the combined tools of ANOLEA, PROSA, and VERIFY3D. The QMEAN index provides a scoring function for the quality estimation of protein structure models, highlighting the degree of confidence for every residue within the model structure (in Å). Similarly, the combined tools (right section of panel B) illustrate structure prediction certainty, represented by a scoring range value between 0 and 99.9 (high and low certainty, respectively). C) Comparative schematic topology between the best ranked RhlA<sub>Pa</sub> model and the minimal  $\alpha/\beta$  hydrolase fold of the *Bacillus subtilis* lipase (PDB entry 116W). The RhlA<sub>Pa</sub> topology illustrates a central subdomain of 8 beta sheets (blue square), which is highly conserved in  $\alpha/\beta$  hydrolase superfamily (SCOP annotation (Murzin *et al.*, 1995a)). N- to C-terminus color palettes are shared in all sections of the figure, except for the right sections of panel B.



**Figure 3.7. Single-site mutagenesis of putative active-site residues in RhlA<sub>Pa</sub>.**

A) Structural location of targeted residues for mutagenesis, based on TM-align and COACH predictions. The putative catalytic triad is depicted in blue and side-chains of other targeted residues are color-coded. In red all mutations at positions that reduced the activity  $\geq 50\%$ , yellow; at least one substitution decrease the synthesis of rhamnolipids  $\leq 50\%$ , at green; at least one of mutations increase the enzyme activity. Secondary structure labels are identical as in Figure 3.6 B. B) Total rhamnolipid production of a *P. aeruginosa* (PA14\_ *rhlA*::TnMrT7) strain expressing single-site mutational variants of RhlA<sub>Pa</sub>. C) The geometry and orientation of the predicted RhlA catalytic triad is compared to experimental  $\alpha/\beta$  hydrolase structures, *i.e.* lipase B from *Pseudozyma antarctica* (PDB entry 1TCA) and triacylglyceride lipase from *Rhizomucor miehei* (PDB entry 3TGL).

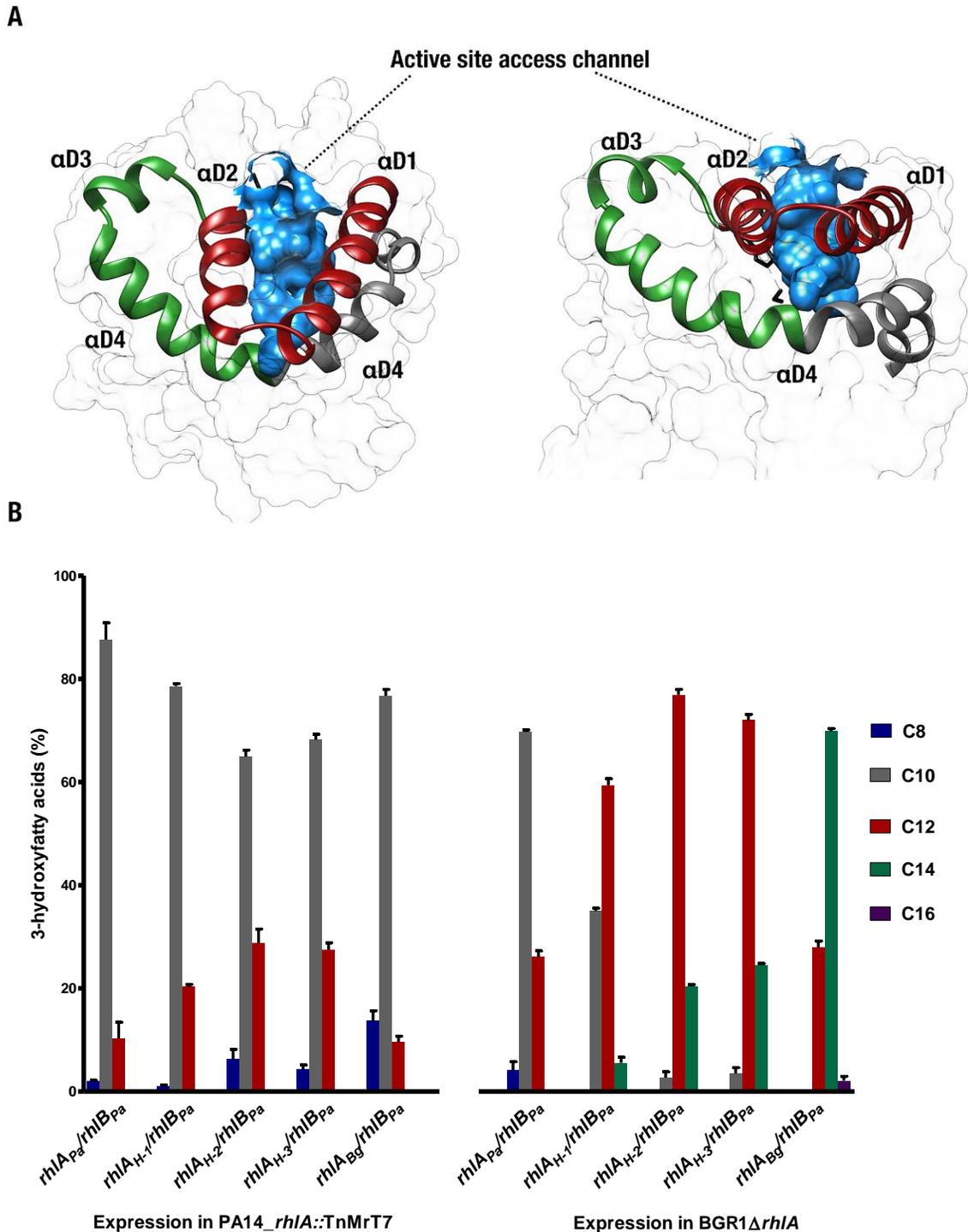
Our homology model suggests that catalytic residues S102, D223, and H251 are not surface-exposed but rather located in the core of the enzyme and covered by the abovementioned structural  $\alpha$ -helix motif ( $\alpha D_1$ – $\alpha D_5$ ), spanning residues 132-190 between strands  $\beta 6$  and  $\beta 7$  (Figure 3.7 A). Homologous  $\alpha/\beta$  hydrolases, such as lipases, also exhibit buried active sites under similarly shaped secondary structure elements, forming a flap (or a cap-domain) that can experience a conformational change to allow substrate access (Holmquist, 2000). These extra helices in RhIA<sub>Pa</sub> could therefore act as a similarly shaped cap-domain previously reported in other  $\alpha/\beta$  hydrolases (Figure 3.8 A) (Khan *et al.*, 2017a). Therefore, we hypothesized that residues 132-190 in RhIA<sub>Pa</sub> could act as a key domain allowing substrate recognition and discrimination, whereby this  $\alpha$ -helix motif would be critical to substrate selectivity in RhIA<sub>Pa</sub>.

To experimentally challenge this hypothesis, we considered the fact that RhIA<sub>Pa</sub> and RhIA<sub>Bg</sub> display distinct substrate selectivity. Both RhIA<sub>Pa</sub> and RhIA<sub>Bg</sub> share the  $\alpha/\beta$  hydrolase fold with conserved catalytic residues, exhibiting 62% (45%) sequence similarity (identity) and preserving the abovementioned putative cap-domain motif. To explore the role of specific residues in substrate recognition and discrimination within the putative cap-domain, we performed single-site amino acid substitutions at non-conserved residue positions between RhIA<sub>Pa</sub> and RhIA<sub>Bg</sub> (Figure S4). Based on total production yields of HAA and RL congeners detected by LC/MS, we compared changes in chain length incorporation for each RhIA<sub>Pa</sub> variants. Seven amino acid substitutions in the putative cap-domain of RhIA<sub>Pa</sub> completely obliterated the production of RLs, while some point mutations induced the production of RLs at low levels, thus preventing the analysis of specific congeners and further confirming the catalytic importance of this motif in RhIA (Table S2). Among active RhIA<sub>Pa</sub> variants, amino acid substitutions did not exhibit changes in congener chain length ratios. However, the A182P substitution (predicted on  $\alpha D_4$ ) exhibited a  $\approx 7\%$  increase (20% to 27%) in C<sub>12</sub> chain length production when expressed in strain BGR1 $\Delta rhIA$  (Table S3).

Since point mutations were insufficient to fully explain the involvement of the putative cap-domain in substrate recognition, we further opted to sequentially swap residues 132-165, 132-190, and 132-210 of RhIA<sub>Bg</sub> with the corresponding positions in RhIA<sub>Pa</sub>, generating chimeric enzymes RhIA<sub>H-1</sub>, RhIA<sub>H-2</sub>, and RhIA<sub>H-3</sub>, respectively. Chimeric enzymes were built and expressed using the constitutive expression vector pUCP26, yielding plasmids pCD6 (*rhIA<sub>H-1</sub>/rhIB<sub>Pa</sub>*), pCD7 (*rhIA<sub>H-2</sub>/rhIB<sub>Pa</sub>*), and pCD8 (*rhIA<sub>H-3</sub>/rhIB<sub>Pa</sub>*) (Figures 3.8, S3, and S4). This effectively encoded full length RhIA<sub>Pa</sub> with  $\alpha D_1$ - $\alpha D_2$  from RhIA<sub>Bg</sub> (RhIA<sub>H-1</sub>), full length RhIA<sub>H-1</sub> with

swapping of  $\alpha$ D3 and a section of  $\alpha$ D4 from RhIA<sub>Bg</sub> (RhIA<sub>H-2</sub>), and RhIA<sub>H-2</sub> with additional swapping of the terminal  $\alpha$ D4 motif (RhIA<sub>H-3</sub>) (Figure 3.8 A). Upon expression of these chimeric enzymes in strain PA14\_ *rhIA*::TnMr7, HAA and RL analyses showed a downward trend in C<sub>10</sub> substrate synthesis ( $\approx$ 30% lower production for RhIA<sub>H-2</sub> and RhIA<sub>H-3</sub>) and an increase in incorporation of C<sub>12</sub> ( $\approx$ 20%) relative to ratios observed with WT RhIA<sub>Pa</sub> (Figure 3.8 B). Nevertheless, the resulting 3-hydroxyfatty acids consumed by these chimeric enzymes retained C<sub>8</sub> to C<sub>12</sub> chain lengths, consistent with prior identification of the 3-hydroxyfatty acid pool available in this bacterium (Table 3.1).

To evaluate the relative contribution of  $\alpha$ D1- $\alpha$ D5 in the modulation of RhIA selectivity, the chimeric enzymes (RhIA<sub>H-1</sub>, RhIA<sub>H-2</sub> and RhIA<sub>H-3</sub>) were also expressed in the BGR1 $\Delta$ *rhIA* strain. This provided a broader range of 3-hydroxyfatty acid synthesis profiles, including chain lengths ranging from C<sub>8</sub> to C<sub>16</sub>. Interestingly, RhIA<sub>H-1</sub> expression exhibited  $\approx$ 50% decrease in C<sub>10</sub> and  $\approx$ 100% increase in C<sub>12</sub> congener synthesis relative to WT RhIA<sub>Pa</sub> (Figure 3.8 B). Unlike WT RhIA<sub>Pa</sub>, this chimera can synthesize C<sub>14</sub>-HAA and RL congeners. Also, RhIA<sub>H-2</sub> and RhIA<sub>H-3</sub> synthesize a higher ratio of longer alkyl chain HAAs, mainly the C<sub>12</sub> and C<sub>14</sub> congeners (with only minor differences). These results confirm the involvement of residues within  $\alpha$ D1- $\alpha$ D3 and the first half of  $\alpha$ D4 (132-190) in the selectivity of R-3-hydroxyfatty acids exhibiting C<sub>12</sub> to C<sub>14</sub> chain lengths in RhIA<sub>Bg</sub> (Figure 3.8 B). Furthermore, the fact that C<sub>12</sub> production was doubled after  $\alpha$ D1 and  $\alpha$ D2 substitution (residues 132-165) strongly suggests that C<sub>12</sub> chain length selectivity partly resides within these  $\alpha$ -helices of the putative RhIA cap-domain. In contrast, C<sub>14</sub> hydroxy fatty acid selectivity appears to lie within the  $\alpha$ D3 and  $\alpha$ D4 helices, as illustrated by the significantly increased C<sub>14</sub> profiles of RhIA<sub>H-2</sub> and RhIA<sub>H-3</sub> chimeras (Figure 3.8 B).



**Figure 3.8. Selectivity performance of the RhlA chimeric proteins.**

A) Chimeric  $\alpha$ -helix motif swapping from RhlA<sub>Bg</sub> to RhlA<sub>Pa</sub>. In RhlA<sub>H-1</sub> the replacement was the  $\alpha$ D1 and  $\alpha$ D2 (dark red), for RhlA<sub>H-2</sub> the entire  $\alpha$ D3 and part of the  $\alpha$ D4 were added to RhlA<sub>H-1</sub> (green) and RhlA<sub>H-3</sub> incorporated the rest of the  $\alpha$ D4 (Gray *et al.*) to RhlA<sub>H-2</sub>. The surface of the active site channel is depicted in blue. B) Synthesis profiles of RhlA<sub>H-1</sub>, RhlA<sub>H-2</sub> and RhlA<sub>H-3</sub> relative to wild-type RhlA enzymes from *P. aeruginosa* and *B. glumae* (RhlA<sub>Pa</sub> and RhlA<sub>Bg</sub>, respectively) under the metabolic environments of PA14\_ *rhlA*::TnMrT7 (left) and BGR1Δ*rhlA* (right). The amount of 3-hydroxyfatty acids was calculated considering the total HAAs, mono- and di-RLs detected by LC/MS.

### 3.10.3 Exploring potential active-site residues that increase the catalytic efficiency of RhIA<sub>Pa</sub>

To increase the catalytic activity of RhIA<sub>Pa</sub>, we first explored residues in the vicinity of the modeled catalytic triad of RhIA<sub>Pa</sub> (Figure 3.7 A). Based on our TM-align and COACH analyses (see Methods for details), we performed the exploration of eight residue positions that could be involved in stabilization of the substrate-enzyme complex, *i.e.* A36, M37, W103, A128, L131, L199, E224, and Y225 (Yang *et al.*, 2013, Zhang & Skolnick, 2005). Through alanine scanning, we showed that M37, W103, L199, and Y225 were critical to RhIA<sub>Pa</sub> activity, as their alanine substitutions led to the complete abrogation of enzyme activity (Figure 3.7 B). To identify whether mutations at these positions could potentially increase RhIA<sub>Pa</sub> activity, substitutions with similar physicochemical properties were also performed. M37L was the only beneficial replacement, exhibiting increased RL production ( $\approx 25\%$  improvement). From the eight positions explored, all were shown to be important for RhIA<sub>Pa</sub> activity and/or stability since all substitutions (except for M37L) decreased RhIA<sub>Pa</sub> activity at least 50%.

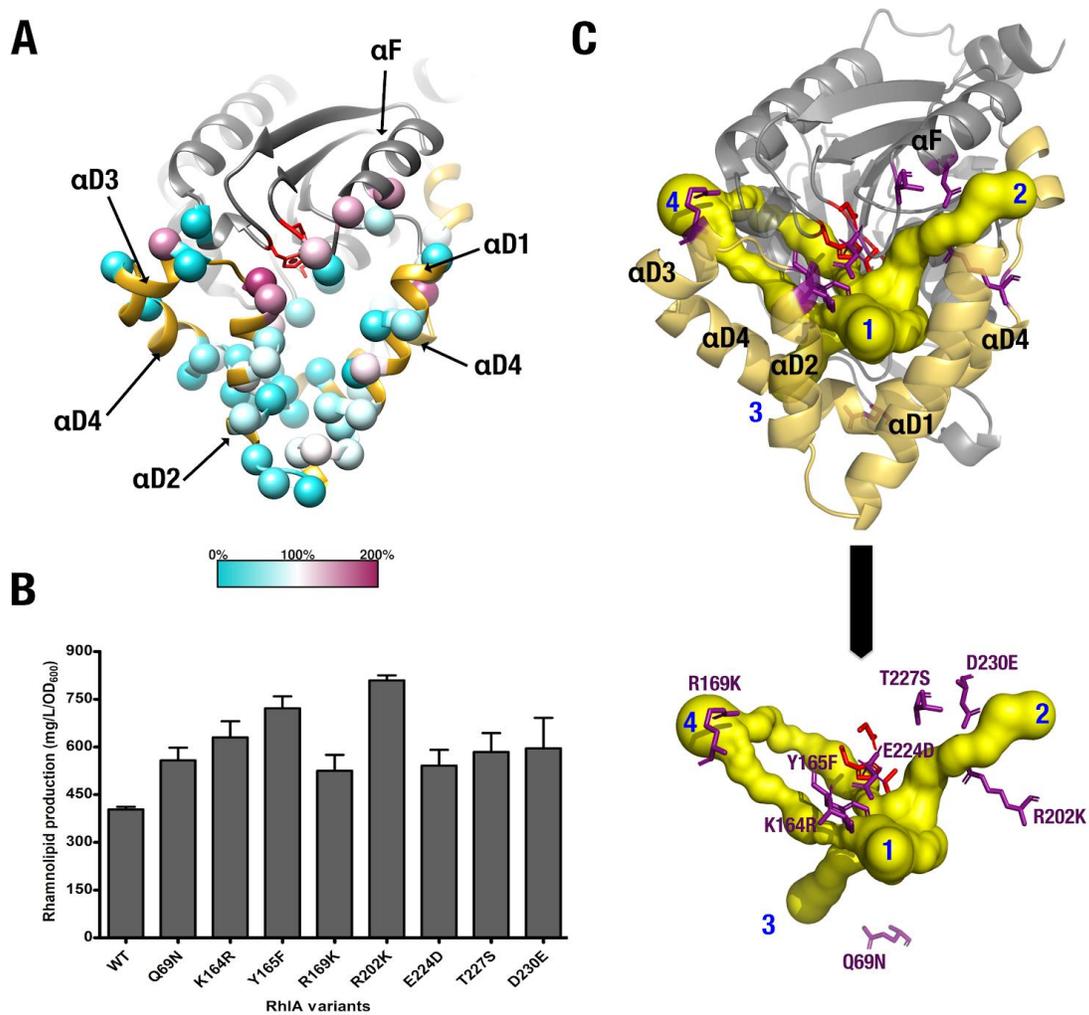
### 3.10.4 Targeting residues 132-210 as a promising strategy to increase or modulate the catalytic activity of RhIA

Considering that the putative cap-domain (residues 132-210) participates in substrate recognition, this region represents a promising mutagenesis target for modulating or controlling RhIA activity and/or specificity. Since protein hinges are often involved in controlling conformational exchange linked with enzyme activity (Henzler-Wildman & Kern, 2007), we explored putative cap-domain hinge regions for mutagenesis, selecting positions located in close proximity to the N-terminal of the  $\alpha$ D1 helix (132, 227, 230), between  $\alpha$ D2- $\alpha$ D3 helices (169 and 256), between  $\alpha$ D3- $\alpha$ D4 helices (66, 69, 167, 168, and 192), and in C-terminal of the  $\alpha$ D4 helix (79, 202, and 204) (Figure 3.9 and Table S4). We were especially interested in polar and electrostatic residues, as time-resolved forming and breaking of electrostatic and hydrogen-bonding interactions were shown to affect local flexibility and/or stability, potentially promoting broader conformational changes of cap-domain helices involved in catalysis.

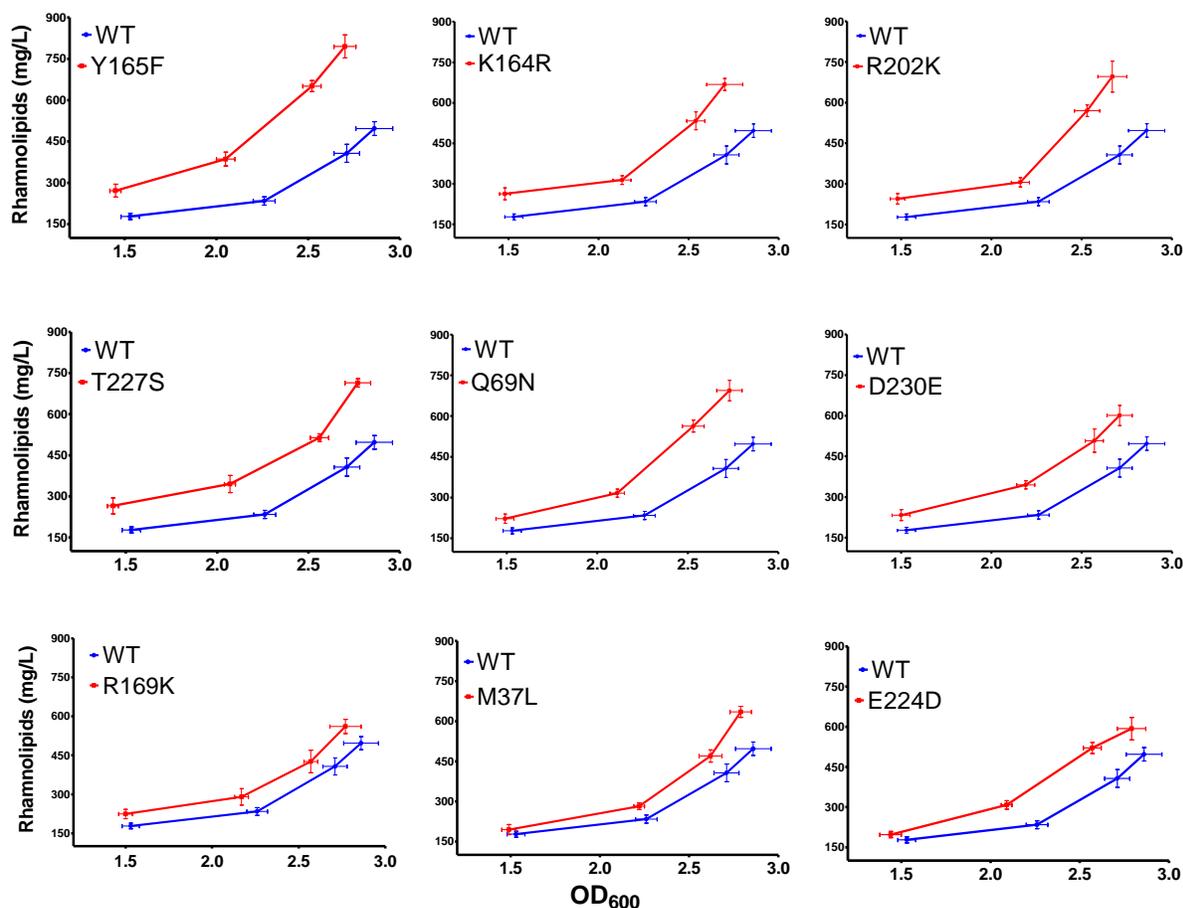
Based on the common occurrence of active-site access channels in the canonical  $\alpha/\beta$  hydrolase fold (Figure S7), we also used our model to identify putative substrate access channels in RhIA<sub>Pa</sub> (Figure 3.9 B). Our observation provided justification for the mutational exploration of positions surrounding potential active-site channels (141, 161, 164, 165, and 224).

Selected residues were replaced by amino acids with similar physicochemical properties and size (Table S4). Mutagenesis of potential hinges, access channels, and C-terminal helices resulted in 85 distinct point mutants at 39 positions, offering broad exploration of this particular RhIA motif (Figure 3.9 A and Table S4). Most mutants exhibited similar substrate selectivity as WT RhIA<sub>Pa</sub>, with an increase in synthetic activity for RhIA<sub>Pa</sub> variants Q69N, K164R, Y165F, R169K, R202K, E224D, T227S, and D230E. The maximum increase in RL synthetic activity was observed for variants Y165F and R202K, both respectively showing ≈100% improvement relative to WT RhIA<sub>Pa</sub> (Figure 3.9 A-C). Within these 8 activity-promoting variants, the only non-polar replacement was found to be the Tyr to Phe residue at position 165 (near the catalytic serine), with other substitutions preserving polar and electrostatic properties, and 6 out of 8 changes primarily reducing length or size of the residue side chain without affecting physicochemical properties. Surprisingly, with the exception of Q69N (which is located in a loop below αD4), these mutations delineate three potential access channels that could be involved in connecting the surface of RhIA<sub>Pa</sub> to its active site (Figure 3.9 B). Additionally, three mutations that promote catalytic activity in RhIA<sub>Pa</sub> (K164R, Y165F, E224D) delineate the main active-site channel in our model (Figure 3.9 B, channel 1).

Two factors affecting RhIA<sub>Pa</sub> mutant efficiency were considered to further corroborate our experimental data: (1) the fact that our activity screen was performed using *in vivo* models, which are expected to exhibit cell growth differences, and (2) the fact that RL production is controlled by *quorum sensing*, imposing a delayed RL production to clones exhibiting slower growth, therefore lowering cell density. To eliminate cell growth effects on quantification, we experimentally validated whether the proposed substitutions would improve HAA and RL production during the entire fermentation period. Strains expressing engineered RhIA<sub>Pa</sub> variants demonstrated increased RL production during the whole fermentation period relative to the strain carrying WT RhIA<sub>Pa</sub> (Figure 3.10). Overexpression of variants Q69N, R202K, and T227S led to strains producing up to 700 mg/L RLs, while the Y165F variant reached the maximum value recorded in this study, *i.e.* 800 mg/L RL production. This variant showed 100% increased yield relative to PA14\_ *rhIA*::TnMr7 complemented with WT RhIA<sub>Pa</sub>, further confirming the rate-limiting function of RhIA<sub>Pa</sub> in bacterial RL biosynthesis.



**Figure 3.9. Catalytic performance of RhlA<sub>Pa</sub> mutants after an extensive cap-domain mutagenesis exploration.** A) Effect of point mutations in the putative cap-domain of RhlA<sub>Pa</sub> (blue helices), color-coded by % rhamnolipid production levels relative to WT RhlA<sub>Pa</sub>. B) Top panel: Predicted RhlA<sub>Pa</sub> cap-domain access channels that connect the solvent environment with the active-site cavity of the enzyme (in yellow). Bottom panel: specific mutations that increase catalytic activity of RhlA<sub>Pa</sub>, with channels numbered 1 through 4 according to their respective volume and surface entrance (biggest to smallest). All panels maintain the same color scheme and orientation as panel A. Only side chains of favorable substitutions are illustrated (in purple) and the catalytic triad is depicted in red. C) Increased rhamnolipid production of favorable mutations relative to WT RhlA<sub>Pa</sub>.



**Figure 3.10. Kinetics of rhamnolipids production of the upgraded variants of *rhlA* under the metabolic pressure of PA14\_ *rhlA*::TnMrT7.**

Experiments were performed for 72 h at 34 °C in MSM-glycerol broth. RL analysis includes all mono- and di-RLs detected by LC/MS.

### 3.10.5 Combinatorial amino acid substitutions

To investigate cooperativity between important positions near the modeled active site of RhlA<sub>Pa</sub> (Figure 3.9 B), we combined favorable point mutations with the aim to further enhance RL production. We found that the combination of active point mutants K164R, Y165F, and T227S did not provide significant increases in enzyme activity relative to WT RhlA<sub>Pa</sub> (Table S4). Similarly, combining unfavorable and favorable mutations also further reduced the catalytic activity of RhlA<sub>Pa</sub> (e.g. R141A-K164R and R141A-T161A-K164R). Unfortunately, the lack of a reliable high throughput screening method for the *in vivo* production of RLs currently precludes proper screening of large combinatorial or randomized RhlA mutant libraries. However, to experimentally validate whether the combination of our previously selected favorable residue

positions is advantageous when permutations are combinatorially mutated with a broader range of amino acid replacements, we pursued the discrete random combination of the abovementioned RhIA<sub>Pa</sub> variants with the theoretical generation of 197 mutants (Figure S8). We quantified RL production with the orcinol method, using the constitutive expression of the new RhIA<sub>Pa</sub> variants in a PA14Δ*rhIA* background (Chandrasekaran & Bemiller, 1980, Koch *et al.*, 1991b). Surprisingly, we found a remarkably lower RL production in RhIA<sub>Pa</sub> variants relative to WT RhIA<sub>Pa</sub>. Unexpectedly, mutational combinations at these positions produced deleterious effects in terms of RhIA<sub>Pa</sub> activity. As a result, whether point mutants M37N, Q69N, K164R, Y165F, R169K, R202K, E224D, T227S, and D230E can cooperatively contribute to improving the catalytic efficiency of RhIA<sub>Pa</sub> remains elusive.

### 3.11 Discussion

RhIA catalyses the esterification of two hydroxylated fatty acid units to produce HAA, the lipid precursor of RLs (Figure S1) (Déziel *et al.*, 2000a, Wittgens *et al.*, 2018b, Zhu & Rock, 2008b). This catalytic reaction represents a crucial step in RL biosynthesis, positioning RhIA as an interesting engineering target to increase precursor flux for the production of this biosurfactant. The catalytic role of RhIA in RL biosynthesis suggests that this enzyme modulates fatty acid chain length observed in different RL mixtures (Zhu & Rock, 2008b). The importance of improving RL production and controlling RL alkyl chain length composition remains an important goal for the effective design of biosurfactants. The present work represents the first attempt at quantifying the relationship between the putative cap-domain and substrate selectivity in RhIA<sub>Pa</sub>, illustrating how increased HAA biosynthesis impacts total RL production. We showed that RhIA<sub>Pa</sub> is directly responsible for the diversity of alkyl chain lengths in RLs. Our cross-complementation assay (*rhIA<sub>Pa</sub>/rhIB<sub>Pa</sub>* operon expressed in BGR1Δ*rhIA*) confirmed the restricted selectivity of RhIA<sub>Pa</sub> toward C<sub>8</sub>-C<sub>12</sub> substrates within a metabolic background, providing C<sub>8</sub>-C<sub>16</sub> hydroxyfatty acids (Figure 3.5). In contrast, RhIA<sub>Bg</sub> exhibited wider selectivity, adjusting its catalytic behavior to the environmental availability of the precursor (*rhIA<sub>Bg</sub>/rhIB<sub>Pa</sub>* in PA14\_ *rhIA*::TnMrT7). Under this metabolic pressure, RhIA<sub>Bg</sub> can synthesize short chain RLs such as C<sub>8</sub> and C<sub>12</sub> (an outlier behavior for this enzyme), while still exhibiting clear preference for C<sub>14</sub> and C<sub>12</sub> substrates when the proper environmental availability is provided by the *B. glumae* strain (with glycerol as sole carbon source).

To overcome the lack of an experimental structure and to investigate potential structural elements involved in RhIA<sub>Pa</sub> selectivity, we built a homology model of the enzyme and explored it

using semi-rational single-site mutagenesis. It has been suggested that 30% sequence identity is a reliable cutoff to build trustworthy protein homology models (Baker & Sali, 2001). Our best template exhibited 28.4% sequence identity and reliably predicted the canonical  $\alpha/\beta$  hydrolase fold, in addition to predicting the catalytic triad of homologous experimental structures (Figure 3.7 C). Despite the inherent limitations of this approach, we broadly used this model as structural guidance to perform experimental site directed mutagenesis and chimeric analysis of RhIA<sub>Pa</sub> (Figures 3.7 and 3.9). Mutational analyses and alanine scanning investigation adequately identified the catalytic pocket of RhIA<sub>Pa</sub>, localizing the S102, D223, and H251 catalytic residues within an enzyme core primarily formed by residues 132-210 and 221-227. Residues 132-210 are predicted to form five  $\alpha$ -helices ( $\alpha$ D1- $\alpha$ D5) of a putative cap-domain, a well-known structural feature providing substrate specificity within homologous  $\alpha/\beta$  hydrolase family members (Khan *et al.*, 2017a, Nardini & Dijkstra, 1999b) (Figure 3.8 A). Since RhIA<sub>Pa</sub> and RhIA<sub>Bg</sub> clearly show distinct substrate selectivity, we also performed sectional swapping of the putative RhIA<sub>Bg</sub> cap-domain within the RhIA<sub>Pa</sub> background, yielding chimeras RhIA<sub>H-1</sub>, RhIA<sub>H-2</sub>, and RhIA<sub>H-3</sub> (Figure 3.8 A). Expression of these chimeric enzymes in BGR1 $\Delta$ *rhIA* yielded biosynthesis of two new RL mixtures, with a remarkably higher ratio of larger chain lengths in comparison with WT RhIA<sub>Pa</sub>. While RhIA<sub>H-1</sub> increased the incorporation of C<sub>12</sub> over C<sub>10</sub> hydroxyfatty acids into HAAs, RhIA<sub>H-2</sub> and RhIA<sub>H-3</sub> exhibited increased incorporation of C<sub>12</sub> over C<sub>14</sub> substrates (Figure 3.8 B). These results demonstrate the involvement of C-terminal residues 132-190 in RhIA substrate selectivity.

The fact that this specific region modulates substrate selectivity illustrates its direct role in providing the active site of RhIA with an adequate physicochemical environment for optimal catalysis. Lid swapping has been reported as an effective approach to modify substrate specificity and enantioselectivity in lipases (Boersma *et al.*, 2008b, Brocca *et al.*, 2003b, Dugi *et al.*, 1995a, Secundo *et al.*, 2004a, Shiraga *et al.*, 2005b, Yu *et al.*, 2014a). Hence, the abundant diversity of RhIAs producing a range of different congeners showcases the importance of targeting this region as a source of designed RhIA variants to produce new HAA/RL mixtures and/or pure HAA or RL congeners.

In our attempt to identify positions that promote the biocatalytic activity of RhIA<sub>Pa</sub>, we uncovered interesting amino acid replacements located in the vicinity of the active site (Figure 3.7 A). Except for E224, mutated residues located in this specific region significantly affected catalytic activity upon substitution by alanine (Table S4). Specifically, Arg and Tyr replacements at positions 164 and 165 play critical roles in enzyme activity due to their significant decrease in

HAA and RL production. Interestingly, substitutions K164R, Y165F, and E224D showed an increase in RL production up to  $\approx 90\%$  (Figure 3.9 C and Table S4), with the most significant increase resulting from the loss of a polar terminal hydroxyl group in variant Y165F. The additive behavior of mutations was also tested by combining negative and positive substitutions. The negative effect of variant R141A on catalysis ( $\approx 37\%$  depletion in rhamnolipid production) was nearly recovered to WT levels after introduction of mutation K164R (see double mutant R141A/K164R, Table S4). In contrast, complete loss of RhIA<sub>Pa</sub> activity was observed after addition of a second negative mutation in the context of this double variant (see triple mutant R141A/T161A/K164R). Future structural studies will be required to investigate whether beneficial mutations (e.g. K164R and E224D on the putative  $\alpha$ D1- $\alpha$ D2 helices) favor rhamnolipid synthesis due to protein/substrate stabilization and/or promoting access to the active-site pocket (Figure 3.9 B).

It is also possible that selected mutations in the active-site channels could perturb their shape and volume, in addition to affecting conformational dynamics of the cap-domain, which we have shown to be possible by performing normal mode analysis (NMA) (Figure S9). Such conformational exchange could also create new access channels to the active site within the cap-domain (Figure S9).

Likewise, we cannot exclude the possibility that positive surface substitutions (e.g. at positions 164, 169, 224, 227 and 230) could be involved in protein (de)stabilization, recognition of acyl carrier protein (ACP), and ACP-RhIA complex formation, which provides hydroxylated fatty acids to RhIA during HAA synthesis (Zhu & Rock, 2008b). Overall, we do expect the cap-domain of RhIA to play an integral part in safeguarding specificity and/or optimal catalytic efficiency in RhIA, much like the cap-domain of other  $\alpha/\beta$  hydrolases was shown to be essential for enzyme activity.

Mutagenesis exploration of the active-site environment revealed that all 29 substitutions severely reduced rhamnolipid synthesis in RhIA<sub>Pa</sub>, except for two mutations at positions 37 and 224 (Figure 3.7 B). This alanine scanning and selective mutagenesis replacements (*i.e.* amino acid replacements with similar physicochemical features) confirm the importance of these residue positions in maintaining the synthetic ability of RhIA<sub>Pa</sub>. In contrast, the M37L replacement increased the catalytic activity of RhIA<sub>Pa</sub>. Interestingly, this favorable leucine substitution in RhIA<sub>Pa</sub> occurs at a normally conserved leucine position in functional homologs, whereby the only exception is the methionine residue found among *Pseudomonas* RhIA members (Figure S4).

This observation suggests a specific role for this methionine in the *Pseudomonas* genus. It is worth mentioning that 7 of the best 8 mutations that increase the synthetic activity of RhIA<sub>Pa</sub> are located in the vicinity of potential molecular channels connecting the active-site cavity to the protein surface (Figure 3.9 B). Mutagenesis at these positions yielded favorable effects on RhIA<sub>Pa</sub> catalysis, with most replacements (Y165F, R169K, R202K, E224D, and T227S) exhibiting similar physicochemical features and smaller side-chain changes (*i.e.* polar substitutions, except at position 165). These results suggest that lower side-chain size could increase active-site volume and access, further promoting substrate transit and improved catalytic activity.

$\alpha/\beta$  hydrolase homology and careful RhIA model analysis predict that the main active-site cavity can only accommodate one substrate unit at a time, in apparent contradiction with the fact that RhIA catalyzes the esterification of two substrate molecules to produce HAA. Consequently, it is highly probable that the cap-domain either experiences conformational exchange and/or relies on the existence of extra channels to accommodate the two additional substrate units required to synthesize HAA (Figure S9). This hypothesis is in accordance with the previously reported sequential mechanism for HAA synthesis, whereby smaller fatty acid molecules enter the active-site cavity first, followed by sequential addition of a second larger substrate molecule (Lépine *et al.*, 2002b). As a result, catalytic activity could be favored by minor conformational adjustments resulting from mutations R169K, R202K, T227S, and D230E, which are localized far from the active-site pocket, but in the predicted cap-domain vicinity.

Although the lack of an experimentally resolved RhIA<sub>Pa</sub> structure currently precludes confirmation of these modeled observations, our comprehensive mutational exploration of the RhIA structure strongly positions the putative cap-domain motif as an important functional and engineering 'hot spot' to modulate the catalytic activity of this enzyme. Similarly, the role of  $\alpha$ D3- $\alpha$ D4 helices on RhIA<sub>Pa</sub> selectivity favors this region as one of the most promising targets for future studies aimed at the development of RhIA<sub>Pa</sub> variants with improved substrate selectivity. Ongoing structural, biophysical, and functional studies on the most relevant RhIA<sub>Pa</sub> variants will provide additional information on the relative importance of selected mutations in expression, stability, and/or activity in this enzyme. Overall, the molecular investigation of RhIA<sub>Pa</sub> variants will likely offer better tools to engineer the biosynthesis of new rhamnolipid mixtures exhibiting promising biosurfactant properties.

## 3.12 Materials and methods

### 3.12.1 Homology modeling of RhIA<sub>Pa</sub>

PSI-Blast and HHblits algorithms were used to identify the best structural template candidates for homology modeling with the RhIA<sub>Pa</sub> target (Altschul *et al.*, 1997, Remmert *et al.*, 2011), *i.e.* template structures of proline iminopeptidase-related protein TTHA1809 (PDB entry 2YYS), amidohydrolase VinJ (PDB entry 3WMR), and  $\alpha/\beta$  hydrolase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (PDB entry 3OM8). T-Coffee Espresso was used to evaluate the local reliability of the templates found by PSI-BLAST and HHblits (Di Tommaso *et al.*, 2011). Homology modeling outputs of three individual servers were compared: Robetta (Chivian *et al.*, 2003, Kim *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2005), SWISS-MODEL (Biasini *et al.*, 2014, Guex *et al.*, 2009), and I-Tasser (Roy *et al.*, 2010, Yang *et al.*, 2015). PDB templates 2YYS (chain A), 3WMR (chain A), and 3OM8 (chain A) were used for Robetta, SWISS-MODEL, and I-Tasser, respectively. The best computed models for each server were independently ranked and selected by their own scoring functions for further validation. Additional model validation included evaluation of the best atomic solvation and molecular packing by SolVX (Holm & Sander, 1992), structural validation by C $\alpha$  carbon geometry (RAMPAGE (Lovell *et al.*, 2003)), statistical error evaluation by model regions calculated based on non-bonded interactions between different atom types relative to a curated database of highly refined structures (ERRAT (Colovos & Yeates, 1993)), determination of model compatibility with its own residue sequence based on local environment (VERIFY\_3D (Luthy *et al.*, 1992)), stereochemical quality of the protein structure (PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993)), energy validation of model packing quality (ANOLEA (Melo & Feytmans, 1998)), biomolecular molecular dynamics simulations (GROMOS (van Gunsteren *et al.*, 1996)), and composite scoring function for homology model quality estimation (QMEAN (Benkert *et al.*, 2011)). RhIA<sub>Pa</sub> homology model selection and validation is summarized in Table S1 and Figure S2.

### 3.12.2 Normal Mode Analysis

To simulate conformational dynamics in RhIA, the best Robetta model was used as input structure to calculate the elastic network provided by the server eINémo (Suhre *et al.*, 2004). Ten models of the lowest-frequency normal modes were computed, with minimal and maximum perturbation range of -100. Elastic interactions cutoff was fixed at 8 Å. RMSD values and

residues were automatically grouped according to default parameters. The best elastic network model was manually selected based on best frequency and collectivity scores.

### 3.12.3 Selection of target residue positions and structural exploration of the RhIA mutants

To identify potential ligand binding sites corresponding to common substrates of the  $\alpha/\beta$  hydrolase fold, a combination of TM-align and COACH tools were employed to scan the closest protein structures in the Protein Data Bank (Yang *et al.*, 2013, Zhang *et al.*, 2005b). The RosettaBackrub server was employed to predict backbone effects upon mutagenesis of RhIA<sub>Pa</sub> (Lauck *et al.*, 2010, Smith *et al.*, 2011). The Computed Atlas of Surface Topography of proteins was used to calculate the concomitant modifications of surfaces, cavities after mutagenesis of the RhIA<sub>Pa</sub> homology model (Liang *et al.*, 1998). The ChExVis tool was applied to the molecular channel extraction of the cap-domain using a plugin installed on the PyMol to analyze the results and generate the images of the Figure 3.9 C (Masood *et al.*, 2015); The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.). USCF Chimera 1.1 was used for all analyses and molecular structure visualization performed in this work. Carton models were created using the Pro-origami package and the motif topology search was obtained from the SA tableau tool (Stivala *et al.*, 2011, Stivala *et al.*, 2010).

### 3.12.4 Bacterial strains, plasmids, and growth media

Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Tables S5 and S6. For molecular biology experiments, lysogeny broth (LB) was used for all cultures. Bacteria were grown at 37°C in a TC-7 roller drum (New Brunswick) or on LB agar plates. For RL production experiments on *P. aeruginosa*, MSM-glycerol broth was used (Slater *et al.*, 1979). Composition of MSM-glycerol broth is 15 g/L glycerol, 0.9 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.7 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 g/L CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O, 0.4 g/L MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 2 g/L NaNO<sub>3</sub>, 2 mL/L trace element solution (TES), pH 7 ± 0.1. Composition of TES is 2 g/L FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 1.5 g/L MnSO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O, 0.6 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>•4H<sub>2</sub>O). Bacteria were grown at 34°C in the TC-7. For RL production experiments on *B. glumae*, cultures were performed on nutrient broth (NB; Difco™) supplemented with 20 g/L mannitol.

### 3.12.5 Rhamnolipid production in *P. aeruginosa*

To test the production of RLs in *P. aeruginosa*, at least three positive clones of each strain or mutant were grown overnight at 37°C with shaking in 5 mL LB broth, with addition of antibiotics as needed. Overnight pre-cultures were washed once with sterile PBS and once with MSM broth. Cultures were carried out in 5 mL MSM-glycerol broth starting at an initial OD<sub>600</sub> = 0.1, or in 50 mL for kinetic characterization. Appropriate antibiotics were included as needed. Cultures were carried out at 34°C with shaking for ~75 h. Supernatants were prepared for LC/MS analysis by adding an equal volume of methanol supplemented with 10 mg/L 5,6,7,8-tetradeutero-4-hydroxy-2-heptylquinolone (HHQ<sub>d4</sub>) and 50 mg/L 16-hydroxyhexadecanoic acid as internal standards. Supernatants were then collected by centrifugation at 10,000 x *g* for 15 minutes. RLs were analyzed and quantified by LC/MS (see below).

### 3.12.6 Rhamnolipid production in *B. glumae*

Rhamnolipid production in *B. glumae* followed the *P. aeruginosa* procedure described above, with the following modifications: cultures were carried out in NB-mannitol broth supplemented with antibiotic as needed. The initial OD<sub>600</sub> was 0.05 and cultures were carried out at 37°C with shaking for ~120 h. The internal standards HHQ<sub>d4</sub> and 16-hydroxyhexadecanoic acid were added to 3.5 mL culture supernatant and the solution acidified to pH 2 with 150 µL 12N HCl. RLs were then extracted three times with 1 mL ethyl acetate. The organic fractions were pooled, evaporated to dryness and the dry extract was finally resuspended in 350 µL MS negative buffer (30% acetonitrile, 1 % acetic acid). Samples were finally filtered with a 0.2 µm pore size PTFE filter membrane (Sigma-Aldrich) and analyzed by LC/MS.

### 3.12.7 Site-directed mutagenesis of *rhIA<sub>Pa</sub>*

Site-directed mutagenesis of *rhIA<sub>Pa</sub>* was performed using plasmid pAS25 (Table S6) as template and following either a QuikChange site-directed mutagenesis procedure (Wang *et al.*, 1999) or a SPPCR protocol (Edelheit *et al.*, 2009) to yield plasmid pAS25<sub>M</sub>. Primers were generated using the QuikChange primer design tool of Agilent Technologies (Novoradovsky *et al.*, 2005). For QuikChange mutagenesis, PCR was carried out using Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher), while Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) was used for

SPPCR. *rhlA*-mutated genes were confirmed by DNA sequencing. *rhlA*-mutated fragments of pAS25<sub>M</sub> were digested by *EcoRI* and *HindIII*, respectively, and inserted into the same sites of the multicopy plasmid pUCP26 to yield pAS23<sub>M</sub>.

### 3.12.8 Quantification of free intracellular 3-hydroxyfatty acids in *P. aeruginosa*

The free intracellular 3-hydroxyfatty acid pool of *P. aeruginosa* PA14 in early stationary growth phase was analyzed by GC/MS. To reduce interference from RLs and HAAs, which require additional hydrolysis steps, we performed the experiment with a PA14\_*rhlA*::TnMrT7 mutant. The selected strain was cultivated as described for RL production, in MSM-glycerol broth medium at 34°C for 72 h at 300 rpm. Cells were recovered by centrifugation (4,400 x *g*, 10 min) from 10 mL culture. The pellet was resuspended in 1 mL PBS and the internal standard methyl 4-hydroxybenzoate was added at a final concentration of 20 ppm. Cells were then lysed by sonication and the lysate was acidified to pH 2 with 12 N HCl. 3-hydroxyfatty acids were then extracted three times with 2 mL ethyl acetate. The organic phase were combined and evaporated to dryness under a stream of nitrogen gas, then resuspended in 1 mL ethyl acetate and dehydrated by adding Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A sample of 100 µL was prepared for silylation by adding 30 µL BSTFA and 90 µL acetonitrile, then incubated overnight at 70°C. The sample was diluted with acetonitrile to a volume of 1 mL prior to injection into the gas chromatograph. The GC/MS analytical method was performed using a Trace GC Ultra - Polaris Q (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) equipped with a ZB-5MS (Zebron™) capillary column (30 m X 0.25 mm internal diameter, 0.25 µM film thickness, Phenomenex®) using the electron impact ionization mode. The GC program used an oven temperature of 70°C held for 5 min, then increased at a rate of 20°C/min to reach 140°C, then increased at a rate of 30°C/min to reach 160°C, then increased at a rate of 40°C/min to reach 310°C, which was held for 3 min with an overall oven run time of 15.92 min. The sample injection volume was 1 µL. The mass spectrometer (Polaris Q) was operated in full scan positive ion mode covering the mass range of 70-600 with a total scan time of 0.54 second. MS scan started at 6.6 min and the ion source temperature was set at 250 °C. The injector and detector (ion source) temperatures were both set at 250 °C. Helium was used as the carrier gas at a constant flow rate of 1.1 ml/min. Quantification was performed by comparing integration data of M<sup>+</sup> fragment ions resulting from the electron impact of the trimethylsilyl esters of 3-hydroxyfatty acids with those of the 3-hydroxyalkanoic acid standards prepared and analyzed using the same procedure. Free C8, C10, C12 and C14 hydroxyfatty

acids were detected with  $m/z=304.2$  at 10:54 min,  $m/z=322.2$  at 11:23 min,  $m/z=360.3$  at 11:80 min, and  $m/z=388.2$  at 12:31 min, respectively. All experiments were performed in triplicate. Errors were calculated from typical standard deviation of at least three independent measurements.

### 3.12.9 Construction of the *rhIA<sub>Bg</sub>/rhIB<sub>Pa</sub>* hybrid operon

To express the *rhIA<sub>Bg</sub>* gene within the polar mutant PA14\_*rhIA::TnMrT7*, the *rhIA<sub>Bg</sub>* gene was swapped in the *rhIA<sub>Pa</sub>/rhIB<sub>Pa</sub>* wild-type operon of plasmid pAS23. Three PCR fragments were generated (Table S5-S6, Fig. S6). Fragments 1 and 3 (bases -90 to -1 of *rhIA<sub>Pa</sub>* and -65 to 1346 of *rhIB<sub>Pa</sub>*, respectively) were obtained by PCR from the genomic DNA of PA14 using primers P-EcoRI-F/P1-90-R and P3-65-F/P-HindIII-R, respectively. Fragment 2, which corresponds to the *rhIA<sub>Bg</sub>* coding sequence, was PCR-amplified from the genomic DNA of BGR1 as template and primers P2-*rhIA<sub>Bg</sub>*-F/P2-*rhIA<sub>Bg</sub>*-R. These three PCR amplicons were purified using a DNA gel extraction kit (Bio Basic) and fused together by overlap extension PCR and primers P-EcoRI-F/P-HindIII-R. The PCR product obtained was purified and sequentially digested with EcoRI and HindIII (Thermo Fisher). In parallel, pAS23 (carrying the wild-type operon *rhIA<sub>Pa</sub>/rhIB<sub>Pa</sub>*) was digested and purified using similar conditions. Ligation was carried out with the T4 DNA ligase (NEB) and transformation was performed in chemically competent *E. coli* DH5 $\alpha$  cells. The chimeric operon was confirmed by DNA sequencing. The functional expression of *rhIA<sub>Bg</sub>/rhIB<sub>Pa</sub>* was confirmed by complementation of a polar BGR1 $\Delta$ *rhIA* mutant and RL detection by LC/MS.

### 3.12.10 Construction of chimeric *rhIA* genes

Three chimeric *rhIA* genes were built by swapping bases 397-495, 397-597, and 397-630 of *rhIA<sub>Bg</sub>* in *rhIA<sub>Pa</sub>*. Chimeric fragments 2, 3, and 4 (bases 397-495, 397-597 and 397-630, respectively) were generated by PCR amplification from genomic *rhIA<sub>Bg</sub>* using primers P234F/P2R, P234F/P3R, and P234F/P4R, respectively. Upstream fragment 1 (bases -90-396) and downstream fragments 5, 6 and 7 (bases 496-789, 598-789 and 631-789, respectively) were obtained by PCR amplification from genomic *rhIA<sub>Pa</sub>* using primers P-EcoRI-F/P1R, P5F/P-SacII-R, P6F/P-SacII-R, and P7F/P-SacII-R, respectively. Chimeric genes *rhIA<sub>Pa-H1</sub>*, *rhIA<sub>Pa-H2</sub>* and

*rhIA*<sub>Pa-H3</sub> were obtained by overlap extension PCR with fragments 1-2-5, 1-3-6 and 1-4-7, respectively, using primers P-EcoRI-F/P-SacII-R. Finally, chimeric *rhIA* genes were digested with *EcoRI* and *SacI* prior to cloning into plasmid pAS23, yielding plasmids pCD6, pCD7, and pCD8, respectively (Tables S6 and S8, Fig. S5). Chimeric *rhIA* genes were confirmed by DNA sequencing. All amplicons were generated using Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher).

### 3.12.11 Randomized combinations of selected *rhIA*<sub>Pa</sub> amino acid substitutions

Single *rhIA* variants M37L, Q69N, K164R, Y165F, R169K, R202K, E224D, T227S, D230E, and double variants K164R/Y165F, K164R/T227S, and Y165F/T227S were used as template to generate 7 *rhIA* fragment groups that were randomly recombined and assembled with fragment 1 using the Gibson assembly cloning kit (NEB) (Fig. S8). Fragment 1 corresponds to linear plasmid pAS29 (pET28a-*rhIAB*<sub>PA14</sub>) obtained by PCR amplification using Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) with primers PG1F/PG1R. Transformed *E. coli* cells were selected on LB agar plates containing 50 µg/mL kanamycin. Randomized mutational combinations were verified by sequencing the *rhIA*-combined genes from 20 clones. Clones were picked from a Petri dish colony growth and collected cells were used for standard miniprep DNA extraction (BioBasic). *rhIA*-recombined variants were then subcloned into constitutive expression vector pUCP26 using *XbaI* and *HindIII* restriction sites to yield plasmids pCD9<sub>M</sub>, which were finally transformed into a PA14\_*rhIA*::TnMrT7 mutant (Liberati *et al.*, 2006). Quantification of *in vivo* RL production was performed using the orcinol spectrophotometric assay (Chandrasekaran *et al.*, 1980).

### 3.12.12 RL quantification based on the orcinol assay

RL quantification was also performed using the orcinol assay, whereby RLs were extracted three times from a 5-mL culture (acidified with 200 µL HCl) with 1 mL ethyl acetate. Samples were mixed by vortexing, with subsequent phase separation by centrifugation. The organic phase was evaporated to dryness and the dry extract was then resuspended in 100 µL H<sub>2</sub>O, to which 100 µL orcinol solution (1.6% orcinol in H<sub>2</sub>O) and 800 µL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (60%) were added, prior to incubation at 80°C for 30 min. Samples developed a blue-green color that was measured spectrophotometrically at 421 nm (Chandrasekaran *et al.*, 1980). A standard curve

was prepared with rhamnose for quantification and a correction factor of 2.25 was applied to compensate for the extra mass of the RL lipidic portion (Déziel *et al.*, 2000).

### 3.12.13 Detection and quantification of HAAs and RLs by LC/MS

LC/MS analyses were performed on a Waters system composed of a triple quadrupole Quattro Premier XE interfaced to a Waters 2795 HPLC (Waters, Mississauga, ON). Samples were separated on a Phenomenex Luna Omega PS C18 column (100 x 3 mm, 5  $\mu$ m) under isocratic conditions with a mobile phase composed of water and acetonitrile containing 1% acetic acid. Quantification of various HAA and rhamnolipids was performed using HHQ-d<sub>4</sub> as internal standard, as described previously (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2014a). The mass spectrometer was operated in negative electrospray ionization mode with a capillary voltage of 5 kV and a cone voltage of 30 V. Nitrogen was the nebulizer gas and the source was held at 120 °C. Scanning was performed in full scan mode with a mass range of 130 to 930 m/z. In negative mode, 2 mM ammonium acetate was included in the water and acetonitrile mobile phases. Fatty acid contribution within congeners were calculated from detected pseudomolecular ions [(C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub>)-H]<sup>-</sup> (m/z 301.3), [(Rha-C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub>)-H]<sup>-</sup> (m/z 447.3), [(Rha-Rha-C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub>)-H]<sup>-</sup> (m/z 593.5), [(C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>)-H]<sup>-</sup> / [(C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub>)-H]<sup>-</sup> (m/z 329.3), [(Rha-C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>)-H]<sup>-</sup> / [(Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub>)-H]<sup>-</sup> (m/z 475.4), [(Rha-Rha-C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>)-H]<sup>-</sup> / [(Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub>)-H]<sup>-</sup> (m/z 621.6), [(C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>)-H]<sup>-</sup> (m/z 357.3), [(Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>)-H]<sup>-</sup> (m/z 503.4), [(Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>)-H]<sup>-</sup> (m/z 649.5), [(C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>/C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub>)-H]<sup>-</sup> (m/z 385.3), [(Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>)-H]<sup>-</sup> / Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub>-H]<sup>-</sup> (m/z 531.4), [(Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>)-H]<sup>-</sup> / [(Rha-Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub>)-H]<sup>-</sup> (m/z 677.5), [(C<sub>12</sub>-C<sub>12</sub>)-H]<sup>-</sup> (m/z 413.6), [(Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>12</sub>)-H]<sup>-</sup> (m/z 559.7), [(Rha-Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>12</sub>)-H]<sup>-</sup> (m/z 705.5), [(C<sub>12</sub>-C<sub>14</sub>)-H]<sup>-</sup> / [(C<sub>14</sub>-C<sub>12</sub>)-H]<sup>-</sup> (m/z 441.4), [(Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>14</sub>)-H]<sup>-</sup> / [(Rha-C<sub>14</sub>-C<sub>12</sub>)-H]<sup>-</sup> (m/z 587.4), [(Rha-Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>14</sub>)-H]<sup>-</sup> / [(Rha-Rha-C<sub>14</sub>-C<sub>12</sub>)-H]<sup>-</sup> (m/z 733.5), [(C<sub>14</sub>-C<sub>14</sub>)-H]<sup>-</sup> (m/z 469.4), [(Rha-C<sub>14</sub>-C<sub>14</sub>)-H]<sup>-</sup> (m/z 615.5), [(Rha-Rha-C<sub>14</sub>-C<sub>14</sub>)-H]<sup>-</sup> (m/z 761.6), [(C<sub>14</sub>-C<sub>16</sub>)-H]<sup>-</sup> / [(C<sub>16</sub>-C<sub>14</sub>)-H]<sup>-</sup> (m/z 497.4), [(Rha-C<sub>14</sub>-C<sub>16</sub>)-H]<sup>-</sup> / [(Rha-C<sub>16</sub>-C<sub>14</sub>)-H]<sup>-</sup> (m/z 643.5), [(Rha-Rha-C<sub>14</sub>-C<sub>16</sub>)-H]<sup>-</sup> / [(Rha-Rha-C<sub>16</sub>-C<sub>14</sub>)-H]<sup>-</sup> (m/z 789.6), [(C<sub>16</sub>-C<sub>16</sub>)-H]<sup>-</sup> (m/z 525.4), [(Rha-C<sub>16</sub>-C<sub>16</sub>)-H]<sup>-</sup> (m/z 671.5) and [(Rha-Rha-C<sub>16</sub>-C<sub>16</sub>)-H]<sup>-</sup> (m/z 817.6).

### **3.13 Acknowledgments**

We thank Marie-Christine Groleau and Sylvain Milot for helpful technical assistance and discussions. This work was supported in part by Discovery grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) under award numbers RGPIN-2016-05557 (to ND) and RGPIN-2015-03931 (to ED), in addition to a grant from the National Institute of General Medical Sciences (NIGMS) of the National Institutes of Health (NIH) under award R01GM105978 (to ND). CED was the recipient of PhD scholarships from the Fondation Armand-Frappier, the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (FRQNT), the Regroupement québécois de recherche sur la fonction, l'ingénierie et les applications des protéines (PROTEO), and the Groupe de recherche axé sur la structure des protéines (GRASP). YLS held a Postdoctoral Fellowship from the Merit Scholarship Program for Foreign Students of the Ministère de l'Éducation, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche du Québec (File number 194706). ED holds a Canada Research Chair in sociomicrobiology, and ND is the recipient of a Fonds de Recherche Québec – Santé (FRQS) Research Scholar Junior 2 Career Award (number 32743).

### **3.14 Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institutes of Health.

### 3.15 Supplementary material

**Table S1. Scoring functions obtained for the best ranking RhIA<sub>Pa</sub> models calculated by homology modeling.**

Tool/Model	A	B	C
<b>Rampage<sup>a</sup></b>			
AA in favored regions (%)	79.5	94.9	89.3
AA in allowed regions (%)	14.7	4.1	8.9
AA in outlier regions (%)	5.8	1	1.9
<b>SolVX<sup>b</sup></b>	-31.2	-129	-68.3
<b>Verify3D<sup>c</sup></b> (%)	77.97 Warning	90.85 Pass	83.46 Pass
<b>ERRAT<sup>d</sup></b> (%)	93.031	94.386	85.714
<b>PROCHECK (errors)</b>	23	18	27
<b>ANOLEA,GROMOS<sup>e</sup></b> (%)	2	1	3
<b>QMEAN6 score<sup>f</sup></b>	0.62	0.742	0.627

<sup>a</sup> Percentage of amino acid residues (AA) in favored, allowed or outlier regions.

<sup>b</sup> Solvation index: more negative values illustrate better structural packing, typically correlating with better model validation.

<sup>c</sup> Percentage of amino acid residues in favored conformations, according to their local environment.

<sup>d</sup> Percentage of residues with <95% confidence of statistical rejection compared to highly refined experimental structures.

<sup>e</sup> Relative ranking of the best three models considering combined simulation outcomes performed using ANOLEA and GROMOS.

<sup>f</sup> Absolute QMEAN6 quality score, ranging from 0 to 1 (higher value = higher model reliability).

**Table S2. Catalytic performance of RhIA of *P. aeruginosa* upon the substitution of non-conserved residues on the cap-domain (relative to RhIA of *B. glumae*).**

Mutation	Relative activity (%) <sup>ab</sup>	Mutation	Relative activity (%) <sup>ab</sup>
A144D	78 (± 2) <sup>d</sup>	S173Y	10 (± 1) <sup>c</sup>
L145H	60 (± 4) <sup>d</sup>	H177Y	0
E147A	85 (± 5) <sup>d</sup>	A179T	73 (± 4) <sup>d</sup>
L148A	106 (± 1) <sup>d</sup>	A182P	39 (± 2)
D149G	86 (± 11) <sup>d</sup>	T183R	0
K151N	8 (± 2) <sup>c</sup>	G184D	84 (± 3) <sup>d</sup>
S152L	29 (± 2) <sup>c</sup>	Y186Q	0
A153H	24 (± 7) <sup>c</sup>	E187D	0
H156Q	66 (± 9) <sup>d</sup>	R190A	0
E160D	80 (± 6) <sup>d</sup>	D194N	63 (± 3) <sup>d</sup>
K164R	156 (± 13) <sup>d</sup>	A198E	105 (± 3) <sup>d</sup>
P168R	0	L199M	4 (± 2) <sup>c</sup>
R169I	16 (± 2) <sup>c</sup>	R202E	0

<sup>a</sup>The catalytic activity is relative to the WT RhIAP<sub>a</sub> performance with the standard deviation (SD) obtained from triplicate experiments.

<sup>b</sup>Rhamnolipids congeners detected by LC/MS.

<sup>c</sup>Low yields of this mutant hamper proper identification and quantification of congeners.

<sup>d</sup>No differences were observed in the RL congener pattern with respect to WT.

**Table S3. Rhamnolipid congener pattern observed upon expression of RhIAP<sub>a</sub>-A182P/RhIB<sub>P<sub>a</sub></sub> variant with respect to RhIAP<sub>a</sub>-WT/RhIB<sub>P<sub>a</sub></sub> in a BGR1Δ*rhIA* mutant.**

Variant	C <sub>8</sub> (%) <sup>*</sup>	C <sub>10</sub> (%) <sup>*</sup>	C <sub>12</sub> (%) <sup>*</sup>
RhIAP <sub>a</sub> -WT	5.4 (± 0.6)	74.3 (± 0.6)	20.3 (± 0.6)
RhIAP <sub>a</sub> -A182P	7.9 (± 0.6)	65.1 (± 1.1)	27.0 (± 1.3)

<sup>\*</sup>Fatty acid contribution were calculated from LC/MS negative mode analysis of congeners C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub> (*m/z* 301.3), Rha-C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub> (*m/z* 447.3), Rha-Rha-C<sub>8</sub>-C<sub>8</sub> (*m/z* 593.5), C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>/C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub> (*m/z* 329.3), Rha-C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>/Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub> (*m/z* 475.4), Rha-Rha-C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>/Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub> (*m/z* 621.6), C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> (*m/z* 357.3), Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> (*m/z* 503.4), Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> (*m/z* 649.5), C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>/C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub> (*m/z* 385.3), Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>/Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub> (*m/z* 531.4), Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>/Rha-Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub> (*m/z* 677.5), C<sub>12</sub>-C<sub>12</sub> (*m/z* 413.6), Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>12</sub> (*m/z* 559.7) and Rha-Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>12</sub> (*m/z* 705.5). No others congeners longer than C<sub>12</sub> were detected.

**Table S4. Catalytic performance of RhIA<sub>Pa</sub> after mutations explored in this study.**

Mutation	Relative activity*	Mutation	Relative activity*	Mutation	Relative activity*
A36L	6	D137A	32 (± 3)	R169K	126 (± 10)
A36V	13 (± 2)	D137E	51 (± 8)	E185A	12 (± 1)
A36M	43 (± 7)	Y138A	12 (± 1)	Q188N	29 (± 3)
A36I	7	Y138F	14 (± 1)	A189P	1
A36G	2	R141A	63 (± 5)	H192R	1
M37A	0	R141A- K164R	97 (± 5)	H192A	9 (± 2)
M37V	43 (± 4)	R141K	121 (± 11)	H192K	5 (± 1)
M37I	9 (± 1)	R141A- T161A- K164R	0	A198P	10 (± 1)
M37L	123 (± 6)	A142P	2	L199A	0
M37F	12 (± 1)	A142P- A144P	2	L199M	4 (± 2)
Q66R	68 (± 7)	L145H	60 (± 4)	L199V	29 (± 9)
Q69K	8 (± 1)	L145A	27 (± 4)	L199I	54 (± 13)
Q69N	138 (± 10)	L145I	23 (± 2)	R202K	201 (± 4)
Q69R	0	L146I	56 (± 9)	R202E	0
K79Q	6	L148I	86 (± 13)	R202D	0
K79R	9 (± 1)	L157A	5	Y204E	93 (± 7)
S102A	0	L157I	18 (± 4)	Y204D	88 (± 7)
W103A	11 (± 1)	L157P	2	D223A	0
W103Y	9 (± 1)	L158A	3	E224A	99 (± 18)
A128G	63 (± 14)	L158P	2	E224D	134 (± 2)
A128V	55 (± 8)	L158I	101 (± 5)	Y225A	0
A128L	7 (± 1)	E160A	2	Y225F	14 (± 1)
A128I	5 (± 2)	T161A	57 (± 3)	Y225S	6
A128W	0	T161S	23 (± 5)	T227E	31 (± 2)
A128S	57 (± 7)	K164R- T227S	60 (± 8)	T227D	38 (± 2)
L131A	21 (± 2)	K164R- Y165F	59 (± 6)	T227S	145 (± 15)
L131V	0	K164A	55 (± 10)	T227D	38 (± 6)
L131I	86 (± 24)	K164R	156 (± 13)	D230E	148 (± 24)
N132K	3	Y165A	4	H251A	0
N132R	15 (± 1)	Y165F	187 (± 16)	E256D	0
N132Q	11 (± 1)	Y165F- T227S	13		

\*The catalytic activity is relative to the WT RhIA<sub>Pa</sub> performance with the standard deviation (SD) obtained from triplicate experiments.

**Table S5. Bacterial strains used in this study.**

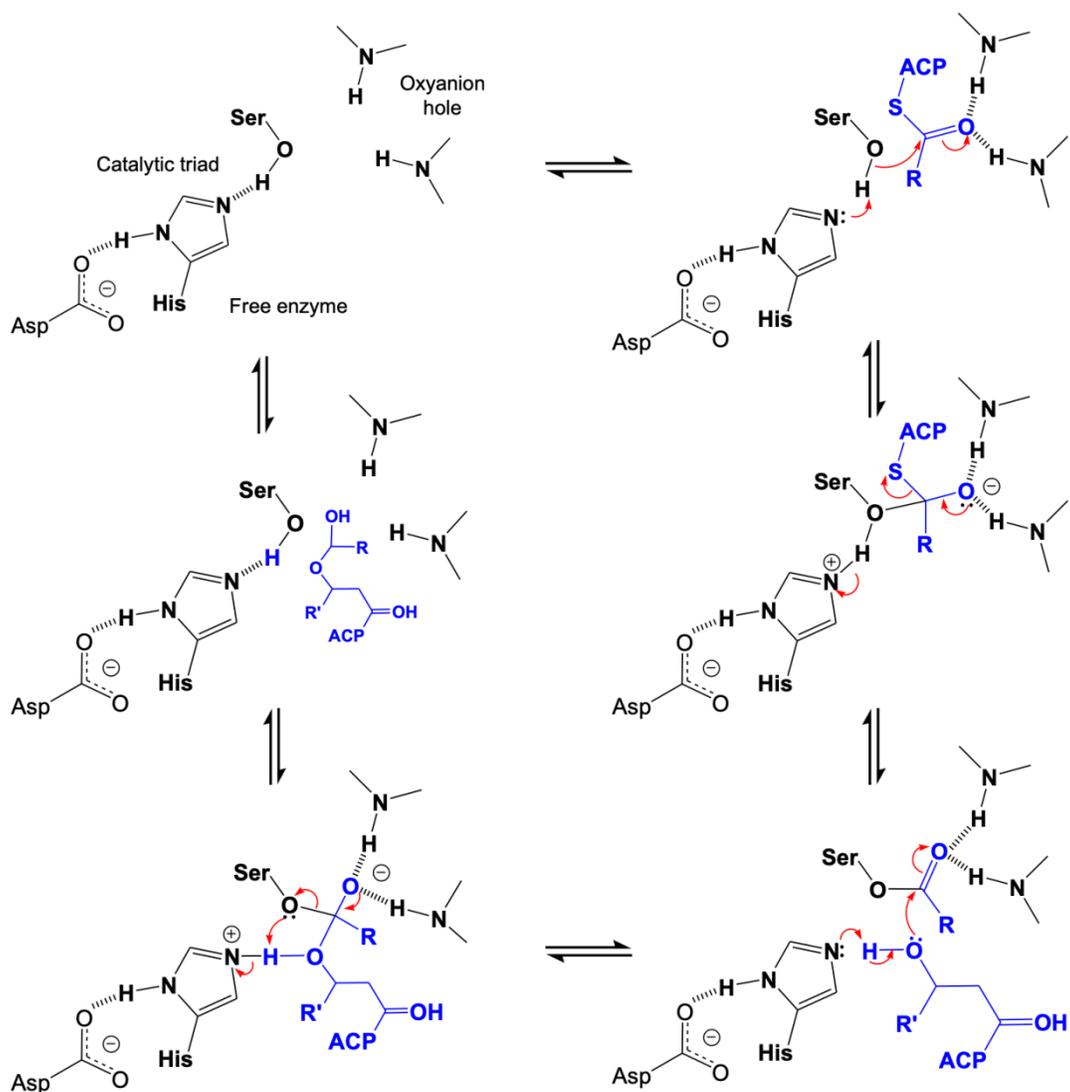
Strains	Characteristics	References
<i>P. aeruginosa</i> PA14	Clinical isolate UCBPP-PA14	Rahme <i>et al.</i> (1995).
PA14_ <i>rhIA</i> ::TnMrT7	Inactivation of <i>rhIA</i> in PA14 ( <i>rhIA</i> ::TnMrT7) (polar mutant)	Liberati <i>et al.</i> (2006).
<i>B. glumae</i> BGR1	Wild-type, Rif <sup>R</sup>	Jeong <i>et al.</i> (2003).
<i>B. glumae</i> BGR1 <i>rhIA</i> <sup>-</sup>	Deletion of <i>rhIA</i> in BGR1 (polar mutant)	Nickzad <i>et al.</i> (2015).
<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (Φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> 5-alpha	<i>DH5α</i> derivate. <i>fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	NEB

**Table S6. Plasmids used in this study.**

Plasmids	Characteristics	References
pET28a(+)	$P_{T7}$ , <i>lacO</i> , MCS, 6xHis-Tag, <i>lacI</i> , Kan <sup>R</sup>	Novagen
pUCP26	Broad host-range high copy number cloning vector; pBR322 (pMB1, ColE1) origin of replication; Tc <sup>R</sup> , $P_{lac}$	West <i>et al.</i> (1994).
pME6000	Broad-host-range low-copy-number cloning vector. pBBR1 origin, Tc <sup>R</sup> , $P_{lac}$ , <i>lacZ</i> , <i>mob</i> <sup>+</sup>	S. Heeb. The University of Nottingham. UK.
pAS25	<i>rhIAB</i> <sub>PA14</sub> including -90 bp before the start codon to +36 bp after the stop codon of the coding sequence, cloned into pME6000 at EcoRI/HindIII restriction sites	Abdel-Mawgoud (2014).
pAS23	<i>rhIAB</i> <sub>PA14</sub> including -90 bp before the start codon to +36 bp after the stop codon of the coding sequence, cloned into pUCP26 at EcoRI/HindIII restriction sites	Abdel-Mawgoud (2014).
pAS23 <sub>M</sub>	pAS23 in which <i>rhIA</i> has at least one point mutation	This study
pAS26	<i>rhIAB</i> <sub>PA14</sub> including -90 bp before the start codon to +36 bp after the stop codon of the coding sequence, cloned into pME6000 at EcoRI/HindIII restriction sites	Abdel-Mawgoud (2014).
pAS26 <sub>M</sub>	pAS26 in which <i>rhIA</i> has at least one single-site mutation	This study
pAS29	<i>rhIAB</i> <sub>PA14</sub> cloned into pET28a(+) at NdeI/HindIII restriction sites	Abdel-Mawgoud (2014).
pAS29 <sub>M</sub>	Plasmid pAS29 carrying <i>rhIA</i> -combined mutations.	This study
pCD5	Chimeric operon <i>rhIA</i> <sub>Bg</sub> / <i>rhIB</i> <sub>Pa</sub> cloned in tandem into pUCP26 at EcoRI/HindIII restriction sites. Includes -90 bp before the start codon of <i>rhIA</i> <sub>PA14</sub>	This study
pCD6	Chimeric <i>rhIA</i> <sub>Pa-H1</sub> cloned into pAS23 at EcoRI/SacII restriction sites. Chimeric <i>rhIA</i> <sub>Pa-H1</sub> swapped bases 395-495 of native <i>rhIA</i> <sub>BGR1</sub> in <i>rhIA</i> <sub>PA14</sub>	This study
pCD7	Chimeric <i>rhIA</i> <sub>Pa-H2</sub> cloned into pAS23 at EcoRI/SacII restriction sites. Chimeric <i>rhIA</i> <sub>Pa-H2</sub> swapped bases 395-597 of native <i>rhIA</i> <sub>BGR1</sub> in <i>rhIA</i> <sub>PA14</sub>	This study
pCD8	Chimeric <i>rhIA</i> <sub>Pa-H3</sub> cloned into pAS23 at EcoRI/SacII restriction sites. Chimeric <i>rhIA</i> <sub>Pa-H3</sub> swapped bases 395-630 of native <i>rhIA</i> <sub>BGR1</sub> in <i>rhIA</i> <sub>PA14</sub>	This study
pCD9	<i>rhIAB</i> <sub>PA14</sub> subcloned into pUCP26 from pAS29 at XbaI/HindIII restriction sites. Subcloned <i>rhIA</i> gene includes an N-terminal 6 His-tag	This study
pCD9 <sub>M</sub>	Plasmid pCD9 carrying <i>rhIA</i> -combined mutations	This study

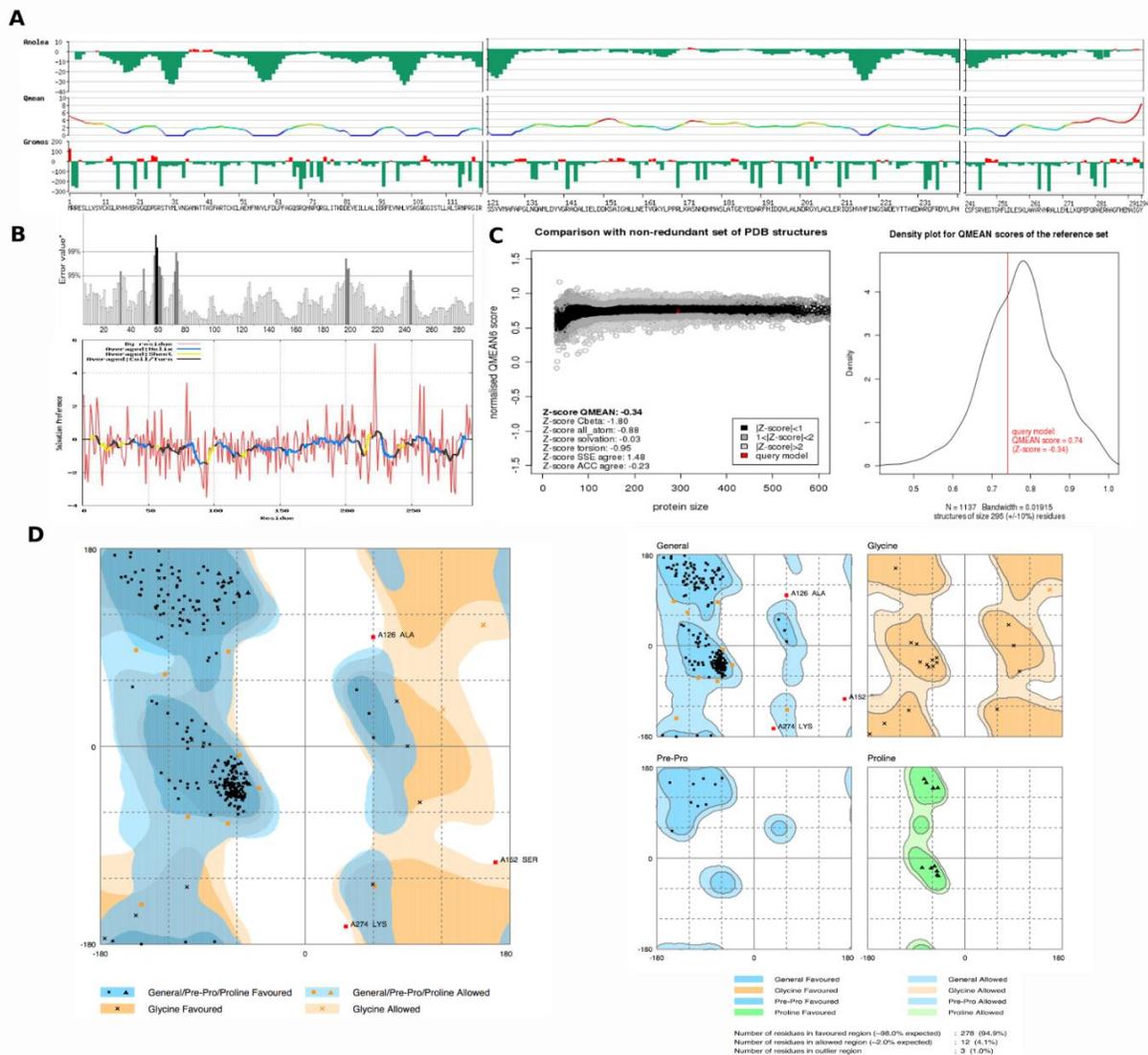
**Table S7. Primers used in this study.**

Primer	Sequence (5'→3') (Sequences that hybridize with DNA template are highlighted in bold)	Restriction site
P-EcoRI-F	5'-cgtaga <u>aattc</u> <b>TCGAACAATAAGAACGA</b> ACTCTACG-3'	EcoRI
P1-90-R	5'-gttttcgataggcat <b>CTCACACCTCCCAAAAATTTTCG</b> -3'	-
P2- <i>rhlA</i> <sub>Bg</sub> -F	5'-ttgggagggtgag <b>ATGCCTATCGAAAAACAGGTCG</b> -3'	-
P2- <i>rhlA</i> <sub>Bg</sub> -R	5'-gtcttcgaggcaaggg <b>TTACGACATCAGCGGC</b> -3'	-
P3-65-F	5'-gccgctgatgtcgt <b>AACCCTTGACCTGCGAAGAC</b> -3'	-
P-HindIII-R	5'-acc <u>caagcct</u> <b>AAATCATGGCAACCCTATCTGTTAT</b> -3'	HindIII
P1-R	5'-cgcgcgcgcgctgacgtagtcgatcatcgctc <b>GTTCAGTCCAGGGGCGAATG</b> -3'	-
P234-F	5'-cgcagctcgggtgatggcattcgcccctggactg <b>AACGACGCGATGATCGACTAC</b> -3'	-
P2-R	5'-gccatgtgctgatggtgctggcttcaggcgcg <b>CGGCAGGTAGCGGCCAC</b> -3'	-
P5-F	5'-gctgtcaacgacaccgtgggcccctacctgccc <b>CCGCGCCTGAAAGCCAGC</b> -3'	-
P-SacII-R	5'-acacaccat <u><b>CCGCGGCCAGCTTGGACTC</b></u> -3'	SacII
P3-R	5'-gatccgctccaggcaagccaggtagccccgatcgtt <b>CATCTCCAGGATCTGGTTCAC</b> -3'	-
P6-F	5'-caggtggcctccacgtgaaccagatcctggagatg <b>AACGATCGGGCTACCTGGCTTG</b> -3'	-
P4-R	5'-ctgccgttgatgaaatgcacgtggctctgga <u>ccg</u> <b>CGTGA</b> ACTCGTCGAGATAGGC-3'	BamHI
P7-F	5'-gagatgaagccggaggcctatctcgacgagttcacg <b>CGGATCCAGAGCCACGTGC</b> -3'	BamHI
PG2F	5'- <b>TATGCGGCGCGAAAGTCTGTTGG</b> -3'	-
PG2R	5'- <b>GGAGACCAGGTGATTGACCTCGAAGCGCTCGATCAGC</b> -3'	-
PG3F	5'- <b>GTCAATCACCTGGTCTCCGCGTCTGGGGCG</b> -3'	-
PG3R	5'- <b>CGAAGCCATGTGCTGATGGTTGCTGGCTTTCAG</b> -3'	-
PG4F	5'- <b>CATCAGCACATGGCTTCGCTGGCCACCGGC</b> -3'	-
PG5R	5'- <b>GCGGTGCACGCGTACCGCGGCCAGCTTGGACTCCAGGTC</b> -3'	-
PG5F	5'- <b>GCGGTACGCGTGCACCGC</b> -3'	-
PG4R	5'- <b>AGACTTTCGCGCCGCATATGGC</b> -3'	-



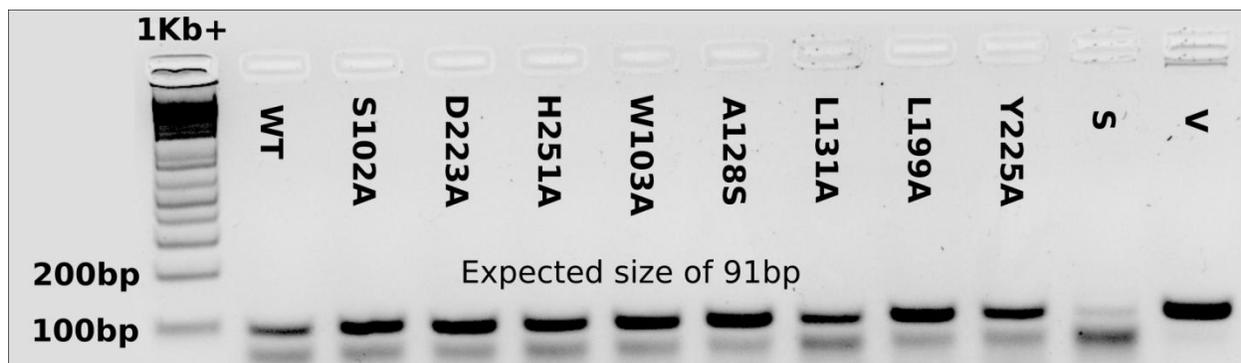
**Figure S1.** Proposed hydroxyacyl esterification mechanism catalyzed by RhlA.

The top left panel shows the free enzyme with the putative catalytic triad (Ser102, Asp223 and His251) and two main chain amide groups (NH) acting as the oxyanion hole. The first step of the reaction involves binding of the first substrate to the active site, *i.e.* hydroxyacyl-ACP (in blue). His251 acts as a catalytic base to deprotonate Ser102, which becomes reactive and performs nucleophilic attack on the carbonyl carbon of the substrate, yielding an enzyme-substrate complex with respective tetrahedral intermediate stabilization (top and middle right panels). Breakdown of the tetrahedral intermediate leads to the release of ACP and formation of a hydroxyacyl enzyme intermediate (middle and bottom right panels). A second hydroxyacyl-ACP substrate binds to the acyl-enzyme intermediate (bottom right panel). His251 deprotonates the hydroxyl group of the  $\beta$ -fatty acid carbon on the second substrate molecule to activate it, catalyzing the nucleophilic attack on the carbonyl carbon of the hydroxyacyl enzyme complex to form a second tetrahedral intermediate (bottom right and left panels). Lastly, breakdown of this tetrahedral intermediate releases a dilipid and restores the free enzyme state (middle and top left panels). This proposed catalytic mechanism is based upon classical enzyme-catalyzed esterification reactions and ester hydrolysis mechanisms catalyzed by proteases (Piljac *et al.*, 2008, Zhang *et al.*, 1992).



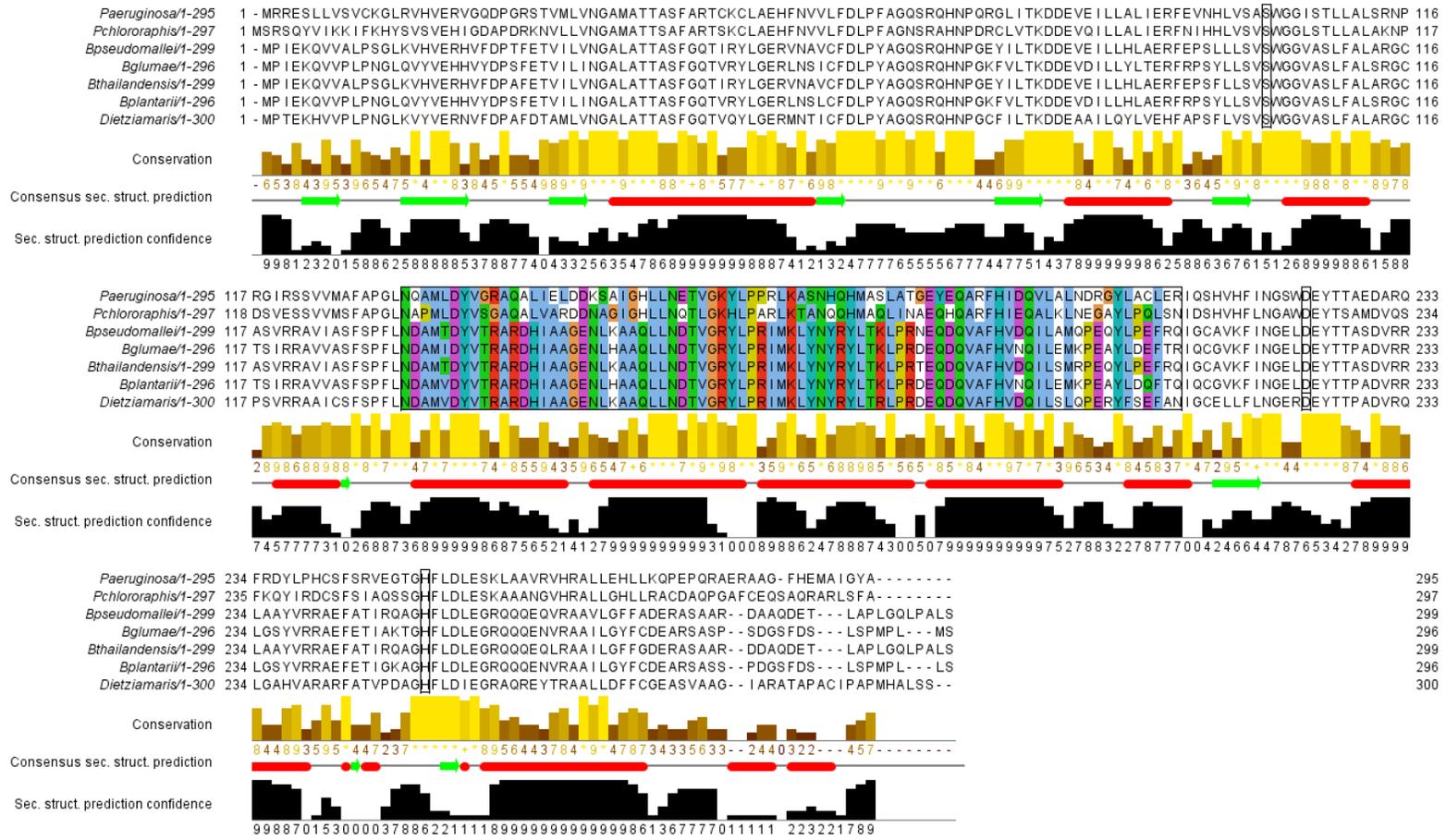
**Figure S2. Second validation round of the best ranking homology models of RhlA<sub>Pa</sub>.**

A) Energy assessment of the RhlA<sub>Pa</sub> conformational model obtained by ANOLEA, GROMOS, and the QMEAN index. Favorable (unfavorable) folding interactions at the residue level are illustrated by green (red) bars for ANOLEA and GROMOS. The QMEAN index is showing the reliability of the predicted RhlA<sub>Pa</sub> fold using a high-to-low reliability scale illustrated by a blue-to-orange color ramping. B) Chances of a residue to be observed in the wrong conformation are estimated by a probabilistic error opportunity (calculated by ERRAT) and solvation values at the residue level (calculated by SolvX). The threshold of 95-99% statistical confidence is illustrated, whereby residues with a higher chance of exhibiting incorrect conformation reach the 95-99% confidence level (highlighted by gray and black histogram bars). The highest error is located around residue 60 and is depicted by a red dashed rectangle. C) The estimate of absolute quality is calculated by QMEAN and is shown by Z-score value (left panel). Comparison between the RhlA<sub>Pa</sub> model and similar sized reference X-ray structures in the Protein Data Bank is shown. Six features evaluated by the QMEAN index are shown with their Z-scores values. Because values are normalized to 0, the QMEAN Z-score directly illustrates how many standard deviations the score of the model differs from expected values in experimental structures. The score of the RhlA Robetta structure locate this model within the average QMEAN6 scores of experimental structures obtained for proteins of similar size (red dashed circle). The right section of panel C illustrates the density plot of all reference models used in the Z-score calculation. The number of structures (N) and the Z-score value is shown (red line) relative to proteins of similar size (+/- 10 residues). D) Outlier model residues are illustrated on a Ramachandran plot using RAMPAGE (red dashed rectangles).



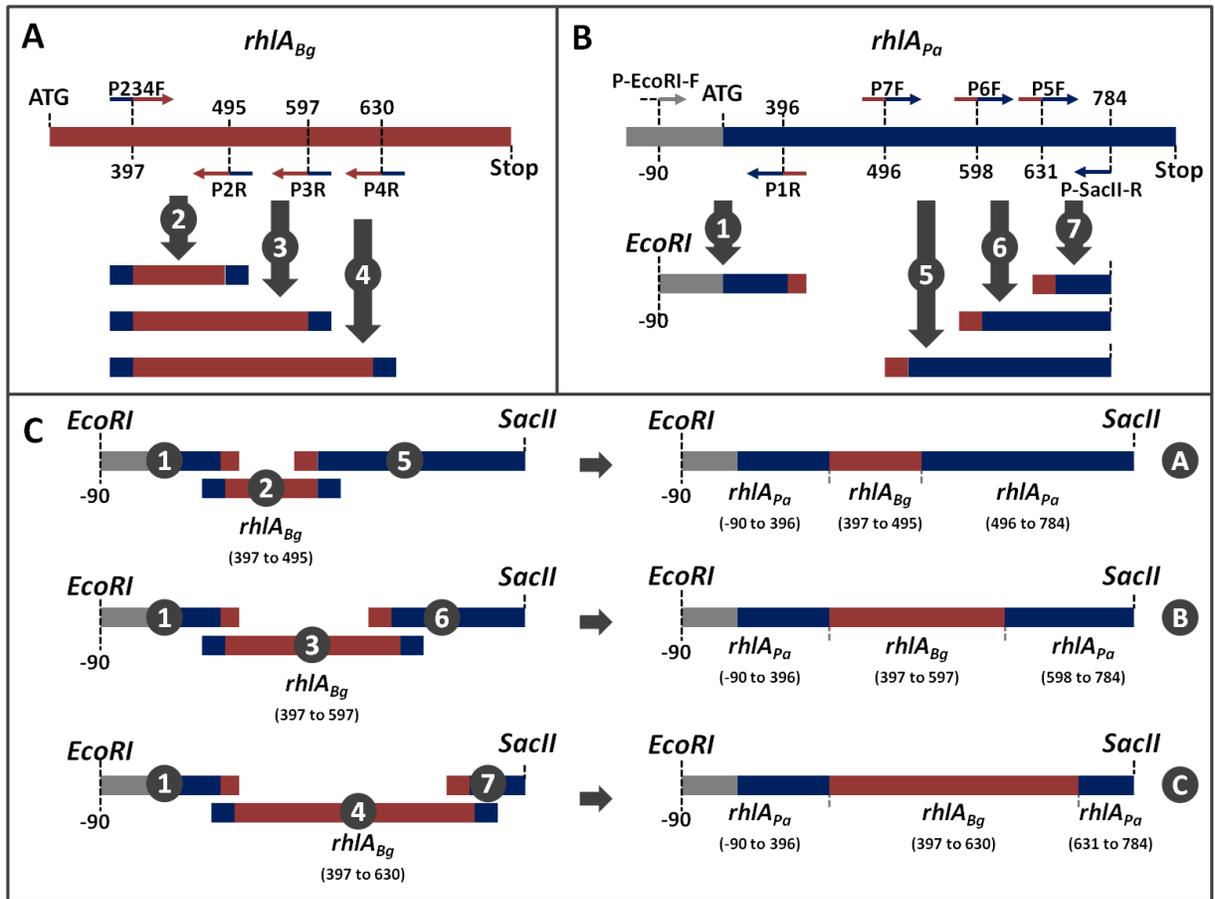
**Figure S3. Gene expression evaluation of RhIA variants in *P. aeruginosa* PA14\_ *rhIA*::MrT7.**

RNA was extracted from fresh cultures, treated with Turbo™ DNase and submitted to reverse transcription using oligo(dT)<sub>20</sub> as primers to generate cDNA. PCR was performed on cDNA obtained from strains transformed with wild type (WT) or RhIA mutant expression vectors, using primers RT-RhIA-F: 5'-TTTCACATCGACCAGGTGCT-3', and RT-RhIA-R: 5'-TGCCGTTGATGAAATGCACG-3'. The untransformed strain (S) as well as the pUCP26A expression vector containing the wild type protein sequence (V) are shown as controls. PCR products were separated on a 3% agarose gel and visualized using GelRed™.



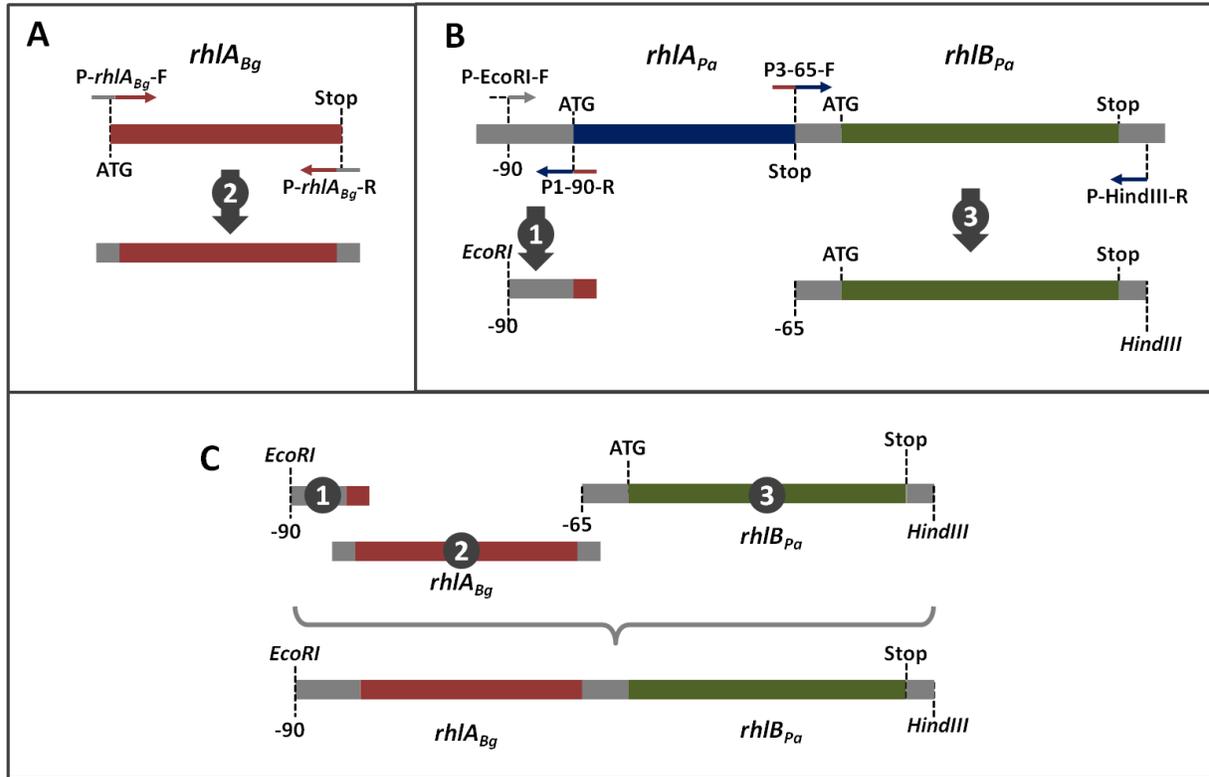
**Figure S4. Multiple sequence alignment of RhlA homologs.**

Sequence alignment shows conserved catalytic residues 102, 223 and 251 (black border), and conserved positions within the putative cap-domain (Clustal default coloring code). RhlA sequences were selected from RL producer strains expressing genes involved in RL biosynthesis. Clustal default coloring code corresponds to: blue, hydrophobic residues (A, I, L, M, F, W and V); red, positive charge residues (K and R); magenta, negative charge residues (E and D); green, polar residues (N, Q, S and T); pink, cysteine residues; orange, glycine residues; yellow, proline residues; cyan, aromatic residues (H and Y); and white, unconserved residues and gaps. Alignment was generated with Clustal Omega (Li *et al.*, 2015, McWilliam *et al.*, 2013, Sievers *et al.*, 2011). Consensus secondary structure prediction was performed with JPred4 (Drozdetskiy *et al.*, 2015).



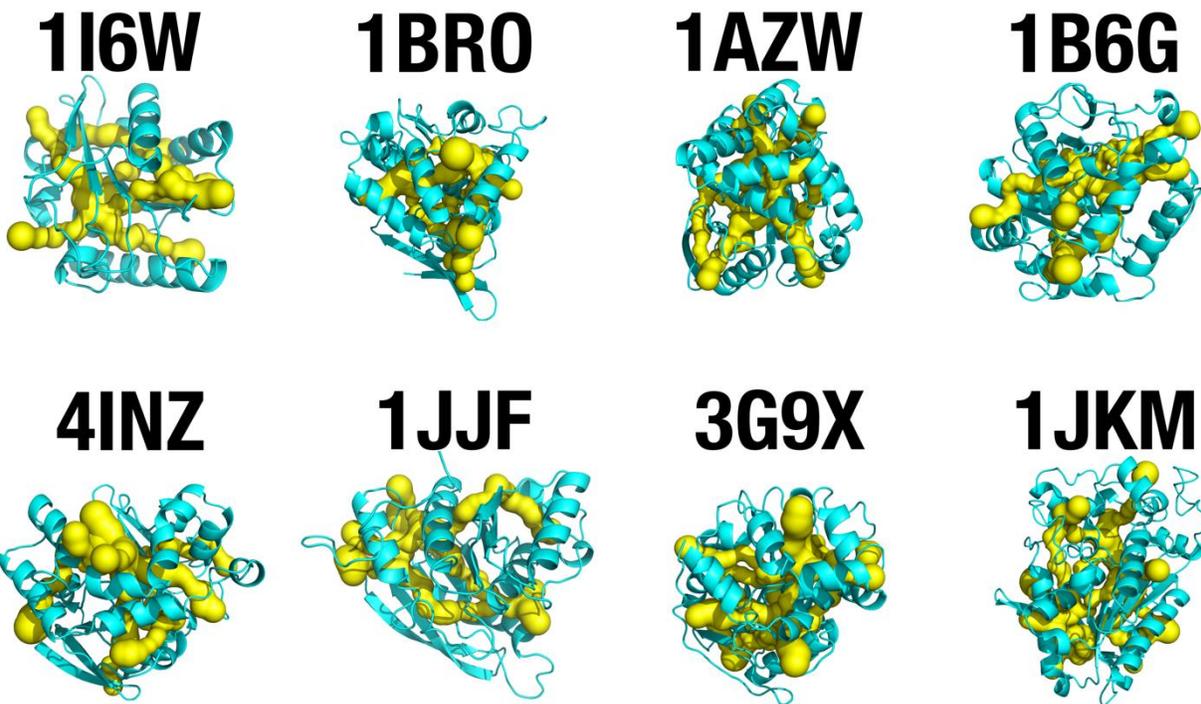
**Figure S5. Strategy for construction of *rhIA<sub>Pa-H-1</sub>*, *rhIA<sub>Pa-H-2</sub>*, and *rhIA<sub>Pa-H-3</sub>* chimeric genes.**

A) Fragments 2, 3 and 4 (397-495, 397-597 and 397-630 bp, respectively) were obtained by PCR amplification from genomic *rhIA<sub>Bg</sub>* using primers P234F/P2R, P234F/P3R, P234F/P4R, respectively. B) Fragments 1, 5, 6 and 7 (-90-396, 496-789, 598-789 and 631-789 bp, respectively) were obtained by PCR amplification from genomic *rhIA<sub>Pa</sub>* using primers P-EcoRI-F/P1R, P5F/P-SacII-R, P6F/P-SacII-R, and P7F/P-SacII-R, respectively. C) Fragments A, B and C (*rhIA<sub>Pa-H-1</sub>*, *rhIA<sub>Pa-H-2</sub>* and *rhIA<sub>Pa-H-3</sub>*, respectively) were obtained by overlap extension PCR using fragments 1-2-5, 1-3-6 and 1-4-7, respectively, with primers P-EcoRI-F/P-SacII-R. Fragments A, B, and C were digested with *EcoRI* and *SacII* prior to cloning into plasmid pAS23, yielding plasmids pCD6, pCD7 and pCD8, respectively.



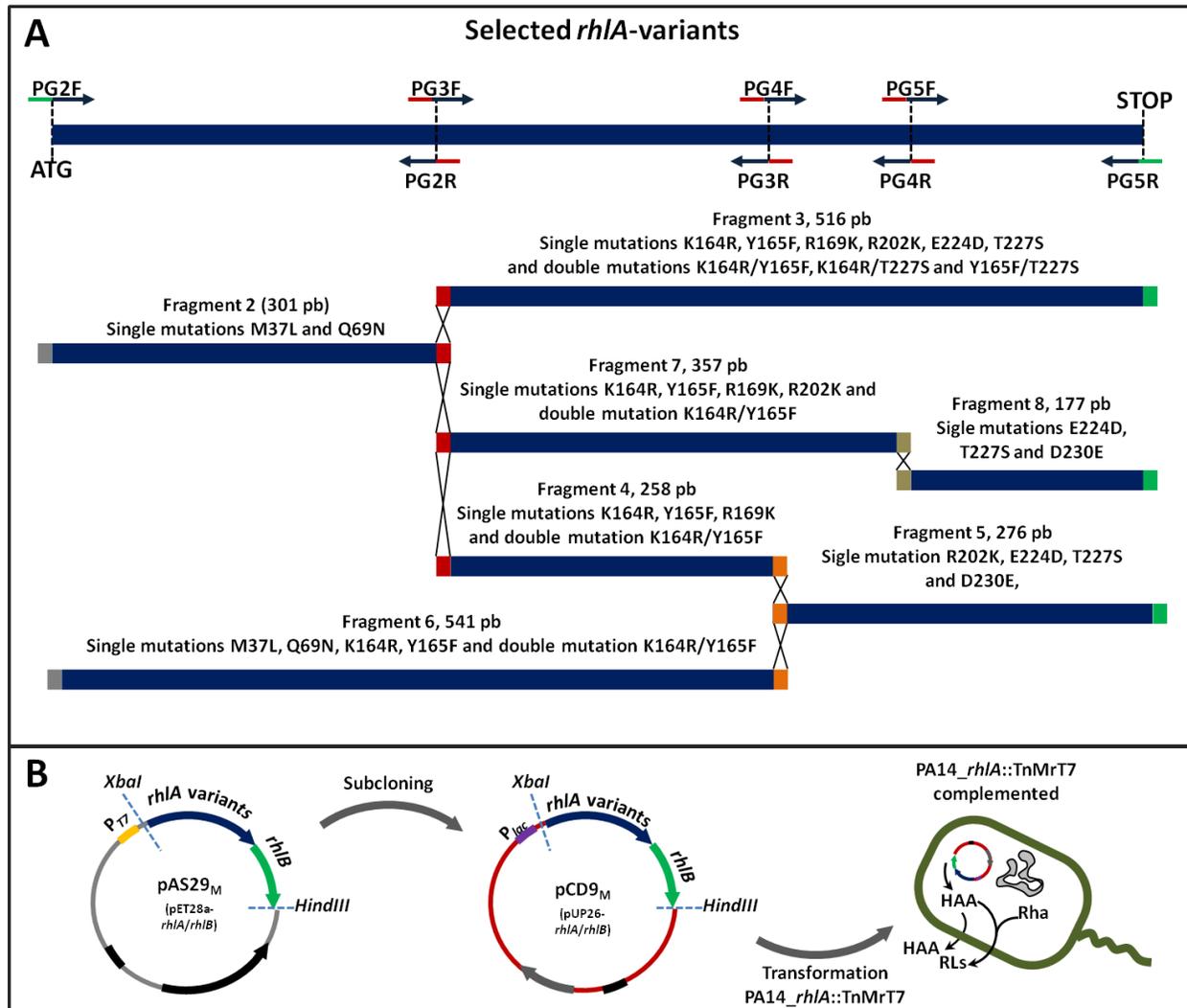
**Figure S6. Strategy for construction of the *rhlA<sub>Bg</sub>/rhlB<sub>Pa</sub>* hybrid operon.**

A) Fragment 2, corresponding to wild-type *rhlA<sub>Bg</sub>*, was PCR-amplified from the genomic DNA of BGR1 using primers P-*rhlA<sub>Bg</sub>*-F and P-*rhlA<sub>Bg</sub>*-R. B) Fragments 1 and 3 were PCR-amplified from the genomic DNA of PA14 using primers P-EcoRI-F/P1-90-R and P3-65-F/P-HindIII-R, respectively. C) Fragments 1, 2 and 3 were fused by overlap extension PCR using primers P-EcoRI-F and P-HindIII-R. Finally, the hybrid operon *rhlA<sub>Bg</sub>/rhlB<sub>Pa</sub>* was digested with *Eco*RI and *Hind*III prior to cloning into plasmid pAS23, yielding plasmid pCD5.



**Figure S7. SCOP active-site access channel extraction from 8 distinct members of the canonical  $\alpha/\beta$  hydrolase superfamily.**

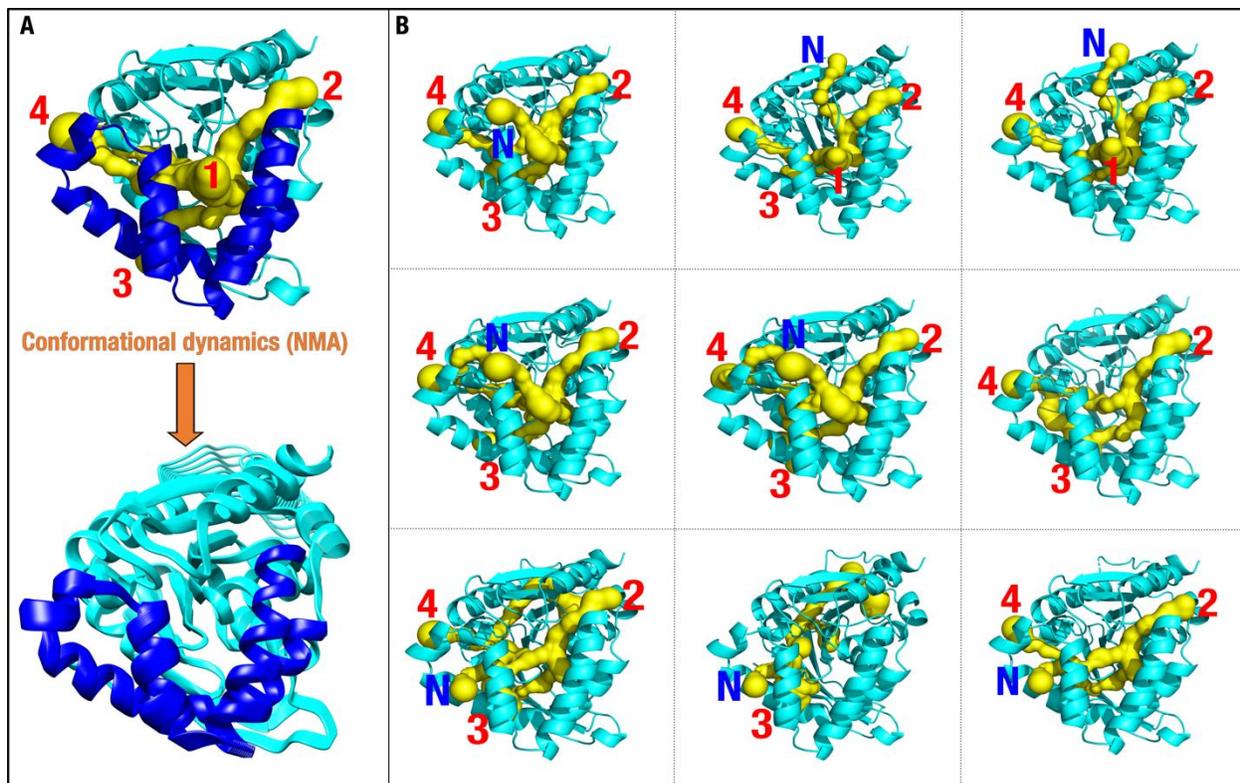
The CHEXVIS tool was applied to analyze whether internal packing of these  $\alpha/\beta$  hydrolase members allows for internal channel formation, as observed with the RhlA<sub>Pa</sub> model (Figure 5B). Predicted access channels that connect the solvent environment with the active-site cavity of the enzyme are shown in yellow. The experimental structures used are: minimal lipase from *Bacillus subtilis* (PDB entry 1I6W), bromoperoxidase from *Kitasatospora aureofaciens* (1BRO), proline iminopeptidase from *Xanthomonas citri* (1AZW), haloalkane dehalogenase from *Xanthobacter autotrophicus* (1B6G), epoxide hydrolase from *Bacillus megaterium* (4INZ), carboxylesterase from *Clostridium thermocellum* (1JJF), haloalkane dehalogenase from *Rhodococcus rhodochrous* (3G9X), and carboxylesterase from *Bacillus subtilis* (1JKM).



**Figure S8. Strategy for random combination of selected *rhIA*<sub>Pa</sub> amino acid substitutions.**

A) Fragments 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 were obtained by PCR from selected *rhIA*<sub>Pa</sub>-mutated genes using primers PG2F/PG2R, PG3F/PG5R, PG3F/PG3R, PG4F/PG5R, PG2F/PG3R, PG3F/PG4R and PG5F/PG5R, respectively. Fragment 1 corresponds to the plasmid pAS29 (pET28a-*rhIAB*<sub>PA14</sub>) amplified with primers PG1F/PG1R. Purified fragments 2 and 3 were combined with fragment 1 using the GIBSON method to generate pAS29<sub>M</sub> wherein 20 *rhIA* variants. Similar, fragments 2, 4 and 5 with fragment 1 were combined to yield 75 *rhIA* variants, fragments 6, 5 and 1 to generate 30 *rhIA* variants, and fragments 2, 7, 8 and 1 to yield 72 variants, for a total of 197 theoretic *rhIA* variants.

B) Generated *rhIA*-variants were subcloned into plasmid pUCP26 between XbaI and HindIII sites yielding plasmids pCD9<sub>M</sub> which were transformed into PA14\_ *rhIA*::TnMrT7.



**Figure S9. Conformational exchange of the putative cap-domain in RhIA.**

A) Conformational dynamics modeled by Normal Mode Analysis (NMA) of the minimized RhIA model structure using eINémo (Suhre *et al.*, 2004). B) Effects of cap-domain dynamics on access channel shape and orientation. Nine conformational states are showed. Channel surfaces and cavities are shown in yellow and the cap-domain is colored blue. Access channels are numbered as in Figure 5 and the formation of new channels is labeled by letter N. Only open channels are shown.

# Conclusion générale du projet

L'objectif à long terme du travail présenté ici était de mieux comprendre le mécanisme de biosynthèse des HAA, une étape essentielle menant à la production de rhamnolipides. Ceci inclut l'étude des voies impliquées dans l'approvisionnement de l'acide gras hydroxylé qui est utilisé comme substrat par RhIA (chapitre 2), ainsi que les facteurs qui contrôlent la diversité structurale de ces glycolipides et qui sont intrinsèques à la sélectivité de cette enzyme (chapitre 3).

*P. aeruginosa* est la bactérie utilisée comme modèle pour l'étude et la caractérisation du mécanisme métabolique de la production des rhamnolipides. Bien que les étapes de la biosynthèse des rhamnolipides à partir d'un di-lipide (HAA) soient bien établies *via* des réactions catalysées par RhIB et RhIC, de nombreuses questions sur les différents mécanismes d'approvisionnement des acides gras hydroxylés restent sans réponse. Les deux modèles proposés dans des études précédentes à partir d'expériences de traçage isotopique semblent ne pas représenter exactement la nature du cheminement qui amène les précurseurs lipidiques vers la synthèse des HAA. Il est certain que les deux modèles proposés ont apporté des éléments additionnels à notre compréhension de ces voies métaboliques, mais des points restent encore à éclaircir. Il s'agit entre autres d'élucider la façon dont la  $\beta$ -oxydation est impliquée dans la synthèse des HAA. Le travail que nous avons présenté dans le chapitre 2 permet de suggérer que le pontage de l'octanoyl-CoA vers la voie FAS II peut contribuer dans l'approvisionnement de l'acide gras hydroxylé pour la synthèse des HAA. Cependant, la voie métabolique de FabH3 ne semble pas constituer le mécanisme principal ni en supplémentation avec du glycérol ni en supplémentation avec l'acide octanoïque. Par ailleurs, les expériences que nous avons effectuées *in vitro* n'ont pas permis de démontrer que le *R*-3-OH-C<sub>10</sub>-CoA produit par le complexe RhIYZ constitue le précurseur direct des HAA tel que proposé par Abdel-Mawgoud et al. (2014). Néanmoins, ce travail soutient qu'en présence de l'acide gras C<sub>12</sub> exogène, un intermédiaire de la  $\beta$ -oxydation à 10 carbones est probablement le le précurseur lipidique des HAA. Il est intéressant de constater que lorsque les activités FabH3 et RhIYZ sont abrogées, la voie FAS II fournit les acides gras précurseurs pour la synthèse des HAA sans avoir recours aux mécanismes de pontage des intermédiaires de la  $\beta$ -oxydation. Cela permet de suggérer que la voie FAS II et la  $\beta$ -oxydation peuvent contribuer indépendamment à la synthèse des HAA. Il est donc possible qu'en présence d'une source de carbone comme le glycérol ou des glucides, la synthèse des acides gras par FAS II fournisse le précurseur des HAA, mais ultérieurement quand la source de carbone diminue et la concentration d'acyl-CoA à chaîne longue augmente, la  $\beta$ -oxydation deviendrait plus sollicitée et les intermédiaires C<sub>10</sub> et C<sub>8</sub>

seraient préférentiellement utilisés pour la synthèse du précurseur des HAA *via* l'activité de RhIYZ et FabH3, respectivement. Au contraire, lors d'une supplémentation avec des acides gras  $C \geq 12$ , la voie métabolique FAS II peut être suppléementée avec des composés intermédiaires de la  $\beta$ -oxydation sans nécessiter des réactions d'initiation classiques. Ce court-circuit métabolique favoriserait davantage la synthèse des HAA avec des acides gras provenant de la  $\beta$ -oxydation. Visiblement, des études approfondies sur ce sujet sont nécessaires afin de concilier les connaissances précédentes avec un modèle qui représente plus fidèlement les mécanismes métaboliques utilisés par la bactérie en fonction des sources de carbone.

Au terme de cette étude, plusieurs nouvelles connaissances ont été apportées sur l'utilisation des acides gras  $C_8$  et  $C_{10}$  dans la  $\beta$ -oxydation. Pour la première fois, il a été démontré qu'il existe, chez *P. aeruginosa*, une activité acyl-CoA:ACP transacylase, attribuée à FadD6, ce qui permettrait l'approvisionnement d'acides gras à 10 carbones dans la voie FAS II à partir de la  $\beta$ -oxydation. Toutefois, l'activité de FadD6 n'a pu être reliée ni à la synthèse du *R*-3-OH- $C_{10}$ -ACP ni à la synthèse des rhamnolipides. L'activité de FadD6 semble être plutôt un mécanisme non-conventionnel pour l'initiation de la voie FAS II. Cela démontre une fois de plus que *P. aeruginosa* est une bactérie extrêmement versatile dans le métabolisme des acides gras. Des recherches additionnelles seront nécessaires afin de mieux caractériser cette nouvelle avenue.

Avant de rejeter l'hypothèse de recherche principale de ce chapitre, il faut considérer que nous avons identifié par homologie de séquence trois autres enzymes putatives qui pourraient présenter une activité acyl-CoA:ACP transacylase potentielle : PA14\_09660, PA14\_35940 et PA14\_31470. Pour la suite de ce projet, la caractérisation de l'activité enzymatique de ces enzymes *in vitro* devrait être envisagée.

L'étude présentée dans le chapitre 3 a proposé pour la première fois l'identification des facteurs structuraux qui gouvernent la sélectivité des substrats de RhIA et son activité catalytique. Les résultats de complémentation croisée des mutants de *rhIA* de *P. aeruginosa* et *B. glumae* avec les opérons hybrides *rhIA<sub>Pa</sub>/rhIB<sub>Pa</sub>* et *rhIA<sub>Bg</sub>/rhIB<sub>Pa</sub>*, ont montré que l'enzyme RhIA<sub>Pa</sub> est directement responsable de la diversité des longueurs des chaînes alkyles des rhamnolipides (Section 3.10.1). En nous basant sur les observations d'une sélectivité différentielle entre les enzymes RhIA<sub>Pa</sub> et RhIA<sub>Bg</sub>, nous avons investigué les éléments structuraux qui déterminent l'utilisation préférentielle des acides gras en fonction de la longueur de leur chaîne aliphatique. L'approche chimérique utilisée pour cette étude (Section 10.3.2) a

général de nouvelles connaissances sur la sélectivité de l'enzyme RhIA. En effet, ces travaux ont apporté des preuves de l'implication d'un motif putatif entre les résidus 132-190 dans la modulation de la sélectivité de RhIA, démontrant la complexité structurale du site actif de cette enzyme. Ces résultats sont très prometteurs car ils démontrent que le profil de congénères des rhamnolipides peut être modulé en utilisant le génie des protéines sur le motif volet identifié. En fonction de la diversité phylogénétique de RhIA, la construction de protéines chimériques fonctionnelles peut être désormais considérée comme une approche viable pour la synthèse de biosurfactants aux propriétés spécifiques. Par ailleurs, le motif putatif identifié constitue également une région structurale d'importance pour l'activité catalytique de RhIA (Section 3.10.4). Nous avons démontré que l'évolution de cette enzyme vers une activité catalytique accrue peut également être atteinte à l'aide d'une approche semi-rationnelle. Les rendements préliminaires des rhamnolipides obtenus dans les variants de RhIA générés dans cette étude atteignent près de 2 fois le rendement observé chez la souche sauvage. Possiblement, l'optimisation de ces variants par une approche de mutagenèse exhaustive sur le motif volet identifié pourrait permettre l'identification de nouvelles positions topologiques clés pour augmenter davantage l'activité catalytique de RhIA, favorisant ainsi la production des rhamnolipides. Cependant, il est important de prendre en compte qu'il existe des facteurs limitants qui persistent encore et qui rendent très laborieux les travaux d'évolution semi-rationnelle de RhIA, à savoir l'absence d'information structurale de l'enzyme et le manque de méthodes de criblage à haut débit.

En conclusion, les résultats rapportés dans cette thèse améliorent les connaissances sur la synthèse des HAA chez *P. aeruginosa* du point de vue métabolique et enzymatique. À plus long terme, les contributions apportées lors de cette recherche pourront faciliter une caractérisation détaillée des mécanismes métaboliques qui participent au flux des acides gras pour la synthèse des HAA, permettant la conception d'approches de génie métabolique pour l'amélioration de la production des rhamnolipides. De plus, ce travail de recherche offre de nouvelles informations sur lesquelles pourront s'appuyer des études d'évolution semi-rationnelle plus approfondies visant la production de variants de RhIA pour la production de rhamnolipides présentant des propriétés physico-chimiques spécifiques. Ceci permettra à long terme une meilleure diversification de l'utilisation de ces biosurfactants et contribuera à diminuer l'impact sur la consommation excessive de surfactants synthétiques.



# Annexes

## 4.1 Annexe 1. Criblage de conditions de cristallogenèse de RhIA de *Pseudomonas aeruginosa*

La résolution de la structure tridimensionnelle d'une protéine par cristallographie nécessite trois grandes étapes : (i) l'optimisation de l'expression et de la purification la protéine, (ii) la recherche des conditions optimales de cristallogenèse, et (Peroutka lii *et al.*) la diffraction de rayons X par les cristaux suivi du traitement des données pour la résolution de la structure. Bien que des essais de cristallogenèse avec RhIA ont été effectués à partir de l'enzyme recombinante purifiée, ces efforts n'ont pas abouti à l'obtention de cristaux. RhIA semble être le cas d'une protéine qui demande des efforts d'optimisation séquentiels. Néanmoins, les travaux effectués concernant l'expression, la purification et le criblage sont présentés.

### 4.1.1 Production de RhIA recombinante

Selon l'outil de prédiction de localisation subcellulaire de protéines PSORTb V3.0 ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)), RhIA serait une protéine de localisation cytoplasmique. Ainsi, la production de RhIA sous forme recombinante a été réalisée en utilisant le système d'expression hétérologue classique T7 chez *E. coli*. Pour ce faire, le gène *rhIA* de *P. aeruginosa* a été cloné dans le plasmide pET28a entre les sites de restriction *NdeI* et *HindIII* (plasmide pCD16, tableau A2.1), tel que présenté dans la section 2.6.3. Cette construction a été inspirée des travaux de Zhu et Rock (2008), la seule étude qui à l'heure actuelle a rapporté des tests enzymatiques avec une protéine RhIA recombinante. En parallèle, une construction similaire a été produite par insertion de la séquence *rhIAB* en utilisant les mêmes sites de restriction (pCD17, tableau A2.1). Ces deux constructions permettent la production de RhIA avec une étiquette de 6 histidines en position *N*-terminale, ce qui facilite la purification de la protéine par chromatographie d'affinité avec une colonne ayant une matrice chargée au nickel de type HisTrap FF (GE Healthcare). Une séquence de clivage reconnue par une sérine protéase, la thrombine, se trouve entre l'étiquette mentionnée et le premier résidu méthionine de RhIA, ce qui permet d'obtenir une protéine native au besoin (Fig. A2.1).

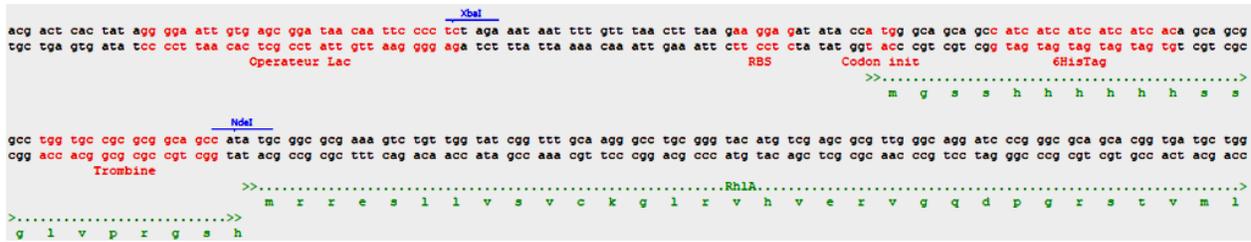


Figure A1.1. Détails des constructions pCD16 et pCD17 au niveau du site de clonage.

Afin de valider si les constructions générées étaient fonctionnelles, la séquence 6His-*rhIAB* a été sous-clonée dans le plasmide navette pUCP26 entre les sites de restriction *XbaI* et *HindIII* (pCD18) (Fig. A2.2, tableau A2.1). Ce plasmide a été transformé chez un mutant PA14\_*rhIA::TnMrT7* dans lequel la production de rhamnolipides a été abolie. Ainsi, la production de rhamnolipides chez le mutant complété, confirmée par une analyse LC-MS, a indiqué que la protéine RhIA exprimée avec une étiquette poly-histidine était fonctionnelle.

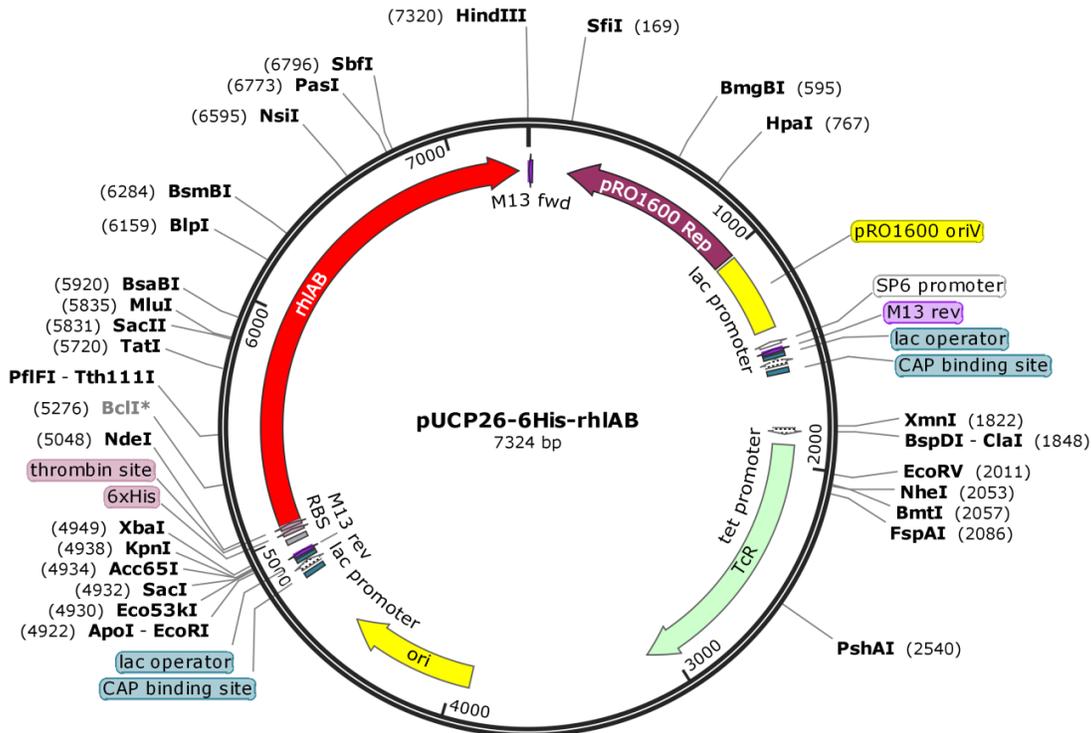


Figure A1.2. Détails de la construction pCD18.

Cette construction a permis de vérifier l'expression fonctionnelle du gène *rhIA* avec une étiquette de poly-histidine chez *P. aeruginosa*.

**Tableau A1.1. Plasmides utilisés pour l'étude des conditions de production de RhIA sous forme recombinante.**

Plasmides	Caractéristiques	Références
pCD16	pET28a_6His- <i>rhIA</i> , insertion entre <i>NdeI/HindIII</i> , Kan <sup>R</sup> .	Cette étude
pCD17	pET28a_6His- <i>rhIAB</i> , insertion entre <i>NdeI/HindIII</i> , Kan <sup>R</sup> .	Cette étude
pCD18	pUCP26_6His- <i>rhIAB</i> . Insertion entre <i>XbaI/HindIII</i> . Tet <sup>R</sup> . Sous-clonage effectué à partir du plasmide pCD17.	Cette étude

#### 4.1.2 Optimisation de la production de RhIA chez *E. coli*

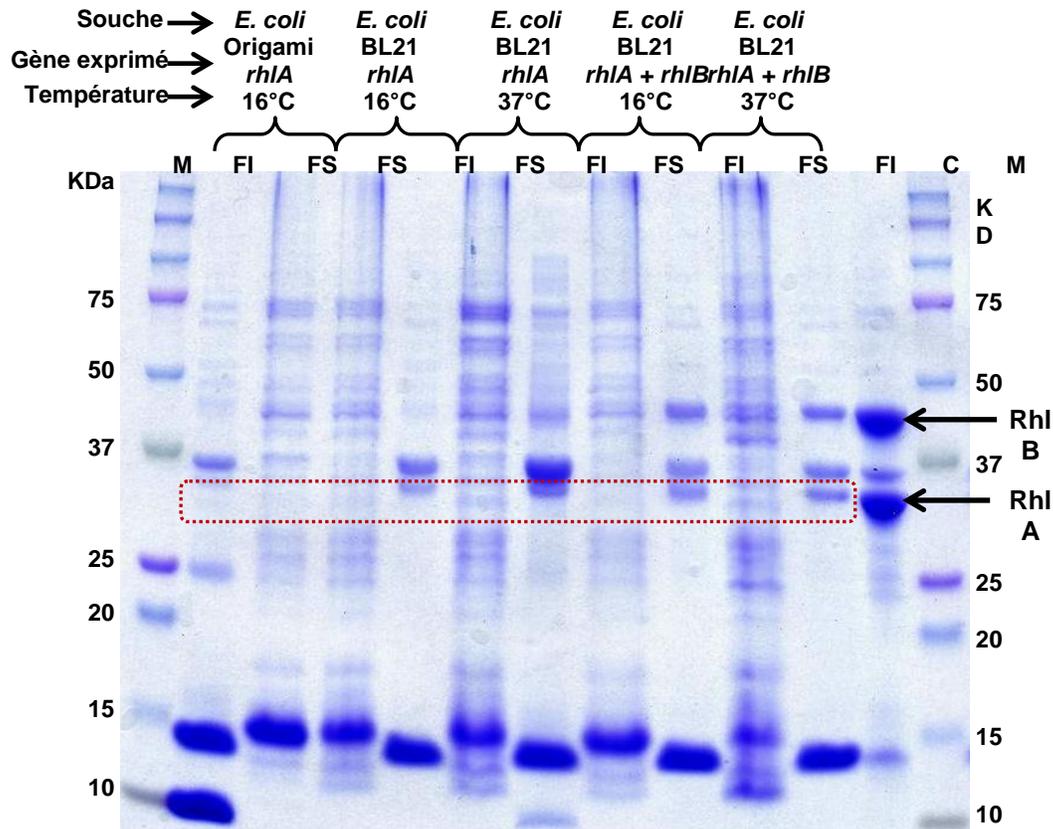
Le plasmide pCD16 a été exprimé chez les souches *E. coli* BL21 (DE3) et *E. coli* Origami 2 (DE3), des souches compatibles avec le système d'expression T7. En parallèle, afin de vérifier si la coexpression de *rhIA* avec *rhIB* pourrait éventuellement favoriser la production de RhIA sous forme soluble, un test d'expression a été effectué avec le plasmide pCD17. Les conditions de culture effectuées sont présentées dans le tableau A2.2 et les résultats de production obtenus dans la figure A2.3.

**Tableau A1.2. Conditions d'expression évaluées pour *rhIA* chez *E. coli* dans un milieu LB.**

Conditions utilisées	Expression à 37 °C	Expression à 16 °C
DO <sub>600</sub> initiale	0.05	0.05
Température d'incubation avant l'induction	37 °C	3 h à 37 °C et 1 h à 16 °C
DO <sub>600</sub> au moment de l'induction	0.7 – 0.9	0.7 – 0.9
Concentration de l'IPTG pour l'induction de l'expression	0.1 mM	0.1 mM
Température d'incubation durant l'expression	37 °C	16 °C
Temps d'expression	3 h	18 h

Selon le profil des protéines observé dans la figure A2.3, il semble que dans les différentes conditions testées, RhIA se trouve majoritairement dans la fraction insoluble. Il est

évident que la coexpression de *rhIA* avec *rhIB* ne favorise pas non-plus l'obtention de l'enzyme sous forme soluble.

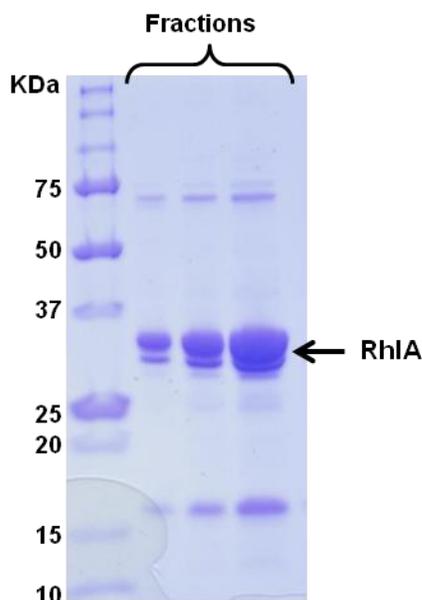


**Figure A1.3. Expression de *rhIA* sous différentes conditions chez *E. coli*.**

Électrophorèse effectuée en conditions dénaturantes (SDS-PAGE, 12%). FI : Fraction insoluble. FS : Fraction soluble. C : Contrôle pour la taille des protéines RhIA et RhIB. Les contrôles proviennent d'une fraction non-soluble concentrée où les bandes de RhIA et RhIB ont été identifiées par séquençage LC-MS/MS. La région où la bande correspondant à RhIA devrait se retrouver est encadrée en rouge.

#### 4.1.3 Purification de RhIA

Malgré la remarquable tendance de RhIA à se retrouver dans la fraction non-soluble, possiblement due à la formation de corps d'inclusion ou à des interactions de la protéine avec la fraction membranaire, un test de purification a été effectué à partir de 3 L de culture en utilisant la souche *E. coli* BL21 (DE3). Afin de diminuer la possible formation de corps d'inclusion, les paramètres de culture suivants ont été considérés : température au moment de l'induction et pendant la production fixée à 16 °C, temps de production 18 h et agitation 300 rpm. RhIA a été purifiée par chromatographie d'affinité selon le protocole présenté dans la section 2.6.4 (Fig. A2.4).

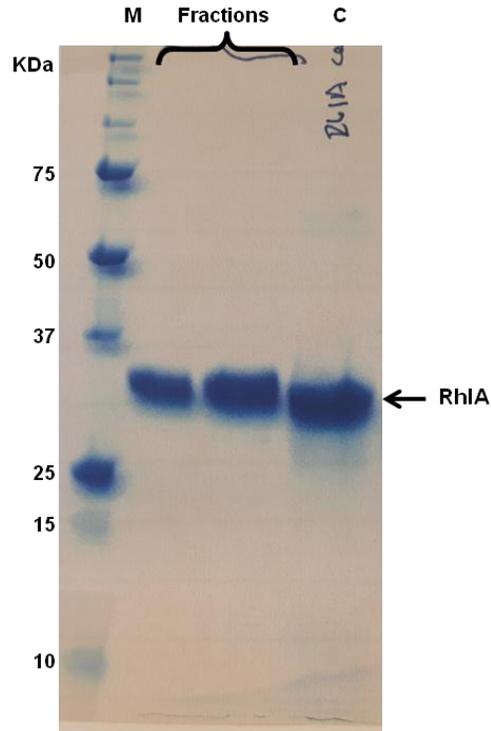


**Figure A1.4. Profil des protéines obtenues de la purification de RhIA par chromatographie d'affinité.**

Électrophorèse en condition dénaturantes (SDS-PAGE, 12%). La bande principale identifiée RhIA dans la figure a été vérifiée par séquençage LC-MS/MS.

Une contrainte observée lors de la purification de RhIA a été la précipitation importante de la protéine dans les fractions d'éluion. Par ailleurs, cette précipitation se poursuivait également pendant l'étape de dialyse effectuée après la purification. Afin de minimiser cette tendance, l'enzyme a été diluée immédiatement 2 ou 3 fois après son éluion dans les tubes du collecteur de fractions avec un tampon contenant 50 mM EDTA, qui en agissant comme agent chélateur du nickel prévient la précipitation des protéines ayant une étiquette de poly-histidine.

Afin d'augmenter la pureté de RhIA, nécessaire pour les études structurales, une deuxième étape de purification a été effectuée par tamisage moléculaire avec une colonne HiPrep™ 26/60 Sephacryl™ S-300 HR (GE Healthcare) (Fig. A2.5). Cette colonne permet un volume d'injection de protéine allant jusqu'à 13 mL, ce qui facilite la purification de la protéine dans un état plutôt dilué, éloigné de la concentration critique de précipitation. En effet, l'utilisation d'une colonne de type Superdex™ 75 10/300 GL (GE Healthcare) limite le volume d'injection à 500 µL, ce qui constitue une contrainte importante puisque la précipitation de RhIA est favorisée avec des concentrations protéiques au-delà de 1 mg/mL; ce type de colonne n'était donc pas approprié.



**Figure A1.5. Profil des protéines obtenues par tamisage moléculaire de RhIA.**  
Électrophorèse effectuée en conditions dénaturantes (SDS-PAGE, 12%). C : Contrôle pour la taille de RhIA.

Visiblement, d’après la figure A2.5, la deuxième purification par tamisage moléculaire a augmenté la pureté de RhIA. Afin d’obtenir des concentrations de protéine adéquates pour effectuer des études structurales, une optimisation des conditions de solubilisation a été effectuée en dialysant la protéine dans différents tampons. Bien qu’une concentration de protéine de 6 mg/mL ait été souhaitée, le maximum atteint a été 3 mg/mL. Les conditions testées sont listées dans le tableau A2.3.

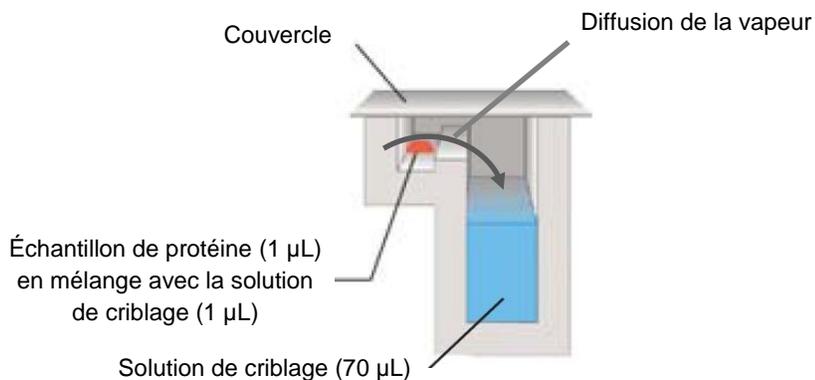
**Tableau A1.3. Optimisation des conditions de solubilisation de RhIA.**  
Les conditions de base pour l’optimisation sont un tampon 20 mM HEPES, 150 mM NaCl.

Conditions testées		Concentration maximale atteint
Gradient NaCl	100 à 500 mM	3 mg/mL de protéine à 500 mM NaCl
Gradient L-arginine	50 à 100 mM	3 mg/mL de protéine à 50 mM L-arginine
Gradient glycérol	10 à 40 %	1 mg/mL de protéine à 10 % glycérol
Gradient CHAPS	0.1 et .02 %	3 mg/mL de protéine à 0.1 % CHAPS
Gradient Triton X-100	1 à 4 Mm	1 mg/mL de protéine à 2 mM Triton X-100

#### 4.1.4 Criblage des conditions de cristallogénèse de RhIA

Afin de trouver les conditions optimales de nucléation, plusieurs matrices de criblage commerciales ont été utilisées : PACJ, JSCG et Crystal Screen I et II. Ces matrices sont des solutions à différents pH, contenant un mélange d'agents agissant sur la solubilité, la stabilité et la structure de la protéine (des sels, des détergents et des polymères principalement). Pour ce criblage, la méthode utilisée a été la diffusion de vapeur de goutte assise (*sitting drop*) (Fig. A2.6). Cette méthode consiste à incuber un mélange équi-volume d'une solution protéique à haute pureté et d'une solution de criblage avec un volume important de cette même solution de criblage dans un puit scellé. Le gradient de concentration entre la goutte échantillon et la solution de criblage du réservoir force un équilibre par diffusion, ce qui induit le processus de cristallisation si toutes les conditions sont réunies.

Lors des tests effectués dans cette étude, la protéine RhIA a été préparée dans un tampon 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 8.0, à une concentration de 1 mg/mL et aussi dans un tampon 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.1 % CHAPS, pH 8.0, à une concentration de 3 mg/mL. Les plaques de criblage ont été incubées à température pièce ( $\approx 25$  °C) et à 4°C. L'observation des puits s'est effectuée régulièrement pendant 2 mois. Il est important de noter que dans les deux concentrations de protéine testées, la formation d'un précipité a fréquemment été observée presque immédiatement après le contact de la protéine avec la solution de criblage, cette précipitation étant plus importante avec une concentration de 3 mg/mL ( $\approx 60\%$  des puits). Dans le cadre de cette étude, aucun cristal ayant une morphologie typique de protéine n'a été observé, seulement des agrégats irréguliers.



**Figure A1.6. Méthode de cristallisation de goutte assise.**  
Modifié du manuel de cristallographie de bioscience™.

#### 4.1.5 Perspectives pour les études structurales de RhIA

La purification de RhIA s'est avérée laborieuse au cours de cette étude, d'une part en raison des circonstances de production qui mènent à l'obtention de faibles quantités de protéine soluble dans la fraction cytoplasmique, et d'autre part dû à la tendance de la protéine à précipiter à des concentrations supérieures à 1 mg/mL, une concentration faible pour des tests de cristallogénèse. Afin d'améliorer la production hétérologue de RhIA, plusieurs approches pourront être considérées dans les études futures:

- i. Étant donné qu'il a été observé que RhIA se trouve majoritairement dans la fraction insoluble des productions hétérologues évaluées, il est possible que cette protéine se trouve localisée dans les fractions membranaires. Une alternative envisageable pour faciliter la production de protéines qui se localisent dans les membranes en évitant la formation d'agrégats est de moduler l'expression du gène d'intérêt, soit en faisant la production dans des conditions d'expression basales en absence d'IPTG (Zhang *et al.*, 2015), ou bien à l'aide de systèmes conçus pour permettre une régulation fine de l'expression, par exemple en utilisant les souches *E. coli* Lemo21(DE3) (Schlegel *et al.*, 2012), C41λ(DE3) ou C43λ(DE3) (Hattab *et al.*, 2015).
- ii. De plus, la solubilisation de la fraction membranaire à l'aide d'un détergent suivi d'une étape de repliement de la protéine avant les étapes de purification en gardant toujours les conditions de solubilisation pourrait permettre de récupérer des quantités plus importantes de protéines (Harder & Fotiadis, 2012).
- iii. Par ailleurs, l'expression du gène *rhIA* à l'aide du plasmide pET22b, qui est compatible aussi avec le système d'expression T7, pourrait permettre une localisation périplasmique de RhIA. Ce plasmide code pour le peptide signal pelB (pectate lyase B d'*Erwinia carotovora*) qui est exprimé en fusion avec la protéine d'intérêt. Il est à noter que ce peptide dirige la protéine d'intérêt au périplasme bactérien où la séquence peptidique est clivée par une peptidase signal (Sokolosky & Szoka, 2013).
- iv. L'expression du gène d'intérêt en fusion avec une protéine dite chaperone peut éventuellement contribuer à augmenter la solubilité des protéines qui tendent à

former des agrégats insolubles sous les conditions de production hétérologue. Particulièrement, les protéines SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) sont impliquées dans l'induction de modifications post-traductionnelles des protéines fusionnées, favorisant entre autres le repliement et la solubilité des protéines recombinantes eucaryotes et procaryotes (Peroutka *et al.*, 2011, Ulrich, 2009).

- v. Mis-à-part l'aspect de production de la protéine, il s'avère également nécessaire de chercher des conditions permettant la stabilisation de RhIA en solution. Principalement, la sélection du pH, la concentration de sels et le type de détergent à utiliser sont des facteurs à considérer afin d'atteindre une concentration adéquate de protéine en s'éloignant de la concentration critique de précipitation (Iwata, 2003, Parker & Newstead, 2016, Prive, 2007).
- vi. Puisqu'une interaction protéine-ligand peut favoriser la stabilisation de certaines protéines et la formation de cristaux sous forme de complexe (Muller, 2017), une alternative envisageable pour RhIA serait la co-cristallisation à l'aide d'un inhibiteur. Quelques  $\alpha/\beta$  hydrolases comme l'estérase EstA de *Pseudoalteromonas* sp. 643A (Brzuszkiewicz *et al.*, 2009) et la lipase PML de *Pseudomonas* sp. MIS38 (Angkawidjaja *et al.*, 2010) ont été co-cristallisées avec le diéthyl *p*-nitrophenyl phosphate, un inhibiteur liant la sérine catalytique de façon covalente.



# Références

- Abdel-Mawgoud AM (2014) Genetic and metabolics studies on rhamnolipids biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Thesis. Université du Québec. INRS-IAF.
- Abdel-Mawgoud AM, Aboulwafa MM & Hassouna NA (2009) Characterization of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolate Bs20. *Applied biochemistry and biotechnology* 157(2):329-345.
- Abdel-Mawgoud AM, Hausmann R, Lépine F, Müller MM & Déziel E (2011) Rhamnolipids: Detection, analysis, biosynthesis, genetic regulation & bioengineering of production. Biosurfactants: From Genes to Applications. *Microbiology Monographs* 20:280.
- Abdel-Mawgoud AM, Lépine F & Déziel E (2010) Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology* 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. *Chemistry & biology* 21(1):156-164.
- Aguirre-Ramirez M, Medina G, Gonzalez-Valdez A, Grosso-Becerra V & Soberon-Chavez G (2012) The *Pseudomonas aeruginosa* *rmlBDAC* operon, encoding dTDP-L-rhamnose biosynthetic enzymes, is regulated by the quorum-sensing transcriptional regulator RhIR and the alternative sigma factor sigmaS. *Microbiology* 158(Pt 4):908-916.
- Albus AM, Pesci EC, Runyen-Janecky LJ, West SE & Iglewski BH (1997) Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 179(12):3928-3935.
- Alhede M, Bjarnsholt T, Jensen PO, Phipps RK, Moser C, Christophersen L, Christensen LD, van Gennip M, Parsek M, Hoiby N, Rasmussen TB & Givskov M (2009) *Pseudomonas aeruginosa* recognizes and responds aggressively to the presence of polymorphonuclear leukocytes. *Microbiology* 155(Pt 11):3500-3508.
- Alhede M, Kragh KN, Qvortrup K, Allesen-Holm M, van Gennip M, Christensen LD, Jensen PO, Nielsen AK, Parsek M, Wozniak D, Molin S, Tolker-Nielsen T, Hoiby N, Givskov M & Bjarnsholt T (2011) Phenotypes of non-attached *Pseudomonas aeruginosa* aggregates resemble surface attached biofilm. *PLoS one* 6(11):e27943.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* 25(17):3389-3402.
- Angkawidjaja C, Matsumura H, Koga Y, Takano K & Kanaya S (2010) X-ray crystallographic and MD simulation studies on the mechanism of interfacial activation of a family I.3 lipase with two lids. *Journal of molecular biology* 400(1):82-95.
- Arino S, Marchal R & Vandecasteele J-P (1996) Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45(1):162-168.
- Arpigny JL & Jaeger KE (1999) Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *The Biochemical journal* 343 Pt 1:177-183.
- Baker D & Sali A (2001) Protein structure prediction and structural genomics. *Science* 294(5540):93-96.
- Bakke R, Trulear MG, Robinson JA & Characklis WG (1984) Activity of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms: Steady state. *Biotechnology and bioengineering* 26(12):1418-1424.
- Banat IM, Satpute SK, Cameotra SS, Patil R & Nyayanit NV (2014) Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Frontiers in microbiology* 5:697.
- Banerjee PC (1989) Fructose-bisphosphatase-deficient mutants of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Folia microbiologica* 34(2):81-86.

- Barekzi N, Joshi S, Irwin S, Ontl T & Schweizer HP (2004) Genetic characterization of *pcpS*, encoding the multifunctional phosphopantetheinyl transferase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 150(Pt 4):795-803.
- Barker AP, Vasil AI, Filloux A, Ball G, Wilderman PJ & Vasil ML (2004) A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis. *Molecular microbiology* 53(4):1089-1098.
- Behrens B, Baune M, Jungkeit J, Tiso T, Blank LM & Hayen H (2016) High performance liquid chromatography-charged aerosol detection applying an inverse gradient for quantification of rhamnolipid biosurfactants. *J Chromatogr A* 1455:125-132.
- Benkert P, Biasini M & Schwede T (2011) Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics* 27(3):343-350.
- Bergström S, Theorell H & Davide H (1946) Pyolipic acid. A metabolic product of *Pseudomonas pyocyanea* active against *Mycobacterium tuberculosis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 10:165-166.
- Bernhard W, Hoffmann S, Dombrowsky H, Rau GA, Kamlage A, Kappler M, Haitsma JJ, Freihorst J, von der Hardt H & Poets CF (2001) Phosphatidylcholine molecular species in lung surfactant: composition in relation to respiratory rate and lung development. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 25(6):725-731.
- Beuker J, Barth T, Steier A, Wittgens A, Rosenau F, Henkel M & Hausmann R (2016) High titer heterologous rhamnolipid production. *AMB Express* 6(1):124.
- Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, Kiefer F, Gallo Cassarino T, Bertoni M, Bordoli L & Schwede T (2014) SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.* 42(Web Server issue):W252-W258.
- Binstock JF, Pramanik A & Schulz H (1977) Isolation of a multi-enzyme complex of fatty acid oxidation from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74(2):492-495.
- Bjarnsholt T, Jensen PO, Fiandaca MJ, Pedersen J, Hansen CR, Andersen CB, Pressler T, Givskov M & Hoiby N (2009) *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatric pulmonology* 44(6):547-558.
- Black PN (1988) The *fadL* gene product of *Escherichia coli* is an outer membrane protein required for uptake of long-chain fatty acids and involved in sensitivity to bacteriophage T2. *Journal of bacteriology* 170(6):2850-2854.
- Black PN & DiRusso CC (1994) Molecular and biochemical analyses of fatty acid transport, metabolism, and gene regulation in *Escherichia coli*. *Biochimica et biophysica acta* 1210(2):123-145.
- Black PN, DiRusso CC, Metzger AK & Heimert TL (1992) Cloning, sequencing, and expression of the *fadD* gene of *Escherichia coli* encoding acyl coenzyme A synthetase. *The Journal of biological chemistry* 267(35):25513-25520.
- Bodey GP, Bolivar R, Fainstein V & Jadeja L (1983) Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Reviews of infectious diseases* 5(2):279-313.
- Boechat AL, Kaihama GH, Politi MJ, Lépine F & Baldini RL (2013) A novel role for an ECF sigma factor in fatty acid biosynthesis and membrane fluidity in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS one* 8(12):e84775.
- Boersma YL, Pijning T, Bosma MS, van der Sloot AM, Godinho LF, Droge MJ, Winter RT, van Pouderooyen G, Dijkstra BW & Quax WJ (2008a) Loop grafting of *Bacillus subtilis* lipase A: inversion of enantioselectivity. *Chemistry & biology* 15(8):782-789.
- Boersma YL, Pijning T, Bosma MS, van der Sloot AM, Godinho LF, Droge MJ, Winter RT, van Pouderooyen G, Dijkstra BW & Quax WJ (2008b) Loop grafting of *Bacillus subtilis* lipase A: inversion of enantioselectivity. *Chem. Biol.* 15(8):782-789.

- Boles BR, Thoendel M & Singh PK (2005) Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Molecular microbiology* 57(5):1210-1223.
- Brocca S, Secundo F, Ossola M, Alberghina L, Carrea G & Lotti M (2003a) Sequence of the lid affects activity and specificity of *Candida rugosa* lipase isoenzymes. *Protein science : a publication of the Protein Society* 12(10):2312-2319.
- Brocca S, Secundo F, Ossola M, Alberghina L, Carrea G & Lotti M (2003b) Sequence of the lid affects activity and specificity of *Candida rugosa* lipase isoenzymes. *Protein Sci.* 12(10):2312-2319.
- Brzuszkiewicz A, Nowak E, Dauter Z, Dauter M, Cieslinski H, Dlugolecka A & Kur J (2009) Structure of EstA esterase from psychrotrophic *Pseudoalteromonas* sp. 643A covalently inhibited by monoethylphosphonate. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 65(Pt 9):862-865.
- Burger MM, Glaser L & Burton RM (1963) The Enzymatic Synthesis of a Rhamnose-Containing Glycolipid by Extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of biological chemistry* 238:2595-2602.
- Cabrera-Valladares N, Richardson AP, Olvera C, Trevino LG, Déziel E, Lépine F & Soberon-Chavez 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.
- Camilios Neto D, Meira JA, de Araujo JM, Mitchell DA & Krieger N (2008) Optimization of the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 in solid-state culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 81(3):441-448.
- Camilli A & Bassler BL (2006) Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science* 311(5764):1113-1116.
- Campbell JW & Cronan JE, Jr. (2002) The enigmatic *Escherichia coli* fadE gene is *yafH*. *Journal of bacteriology* 184(13):3759-3764.
- Campos-Garcia J, Caro AD, Najera R, Miller-Maier RM, Al-Tahhan RA & Soberon-Chavez G (1998) The *Pseudomonas aeruginosa* *rhIG* gene encodes an NADPH-dependent beta-ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis. *Journal of bacteriology* 180(17):4442-4451.
- Carty NL, Layland N, Colmer-Hamood JA, Calfee MW, Pesci EC & Hamood AN (2006) PtxR modulates the expression of QS-controlled virulence factors in the *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1. *Molecular microbiology* 61(3):782-794.
- Chandrasekaran EV & Bemiller JN (1980) Constituent analyses of glycosaminoglycans. *Methods in Carbohydrate Chemistry, Academic Press, NY.*
- Chang CY (2017) Surface Sensing for Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in microbiology* 8:2671.
- Chen J, Wu Q, Hua Y, Chen J, Zhang H & Wang H (2017) Potential applications of biosurfactant rhamnolipids in agriculture and biomedicine. *Appl Microbiol Biotechnol* 101(23-24):8309-8319.
- Chen Q, Bao M, Fan X, Liang S & Sun P (2013) Rhamnolipids enhance marine oil spill bioremediation in laboratory system. *Marine pollution bulletin* 71(1-2):269-275.
- 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.
- Chiang WC, Nilsson M, Jensen PO, Hoiby N, Nielsen TE, Givskov M & Tolker-Nielsen T (2013) Extracellular DNA shields against aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 57(5):2352-2361.
- Chivian D, Kim DE, Malmstrom L, Bradley P, Robertson T, Murphy P, Strauss CE, Bonneau R, Rohl CA & Baker D (2003) Automated prediction of CASP-5 structures using the Robetta server. *Proteins* 53 Suppl 6:524-533.

- Chong H & Li Q (2017) Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies. *Microbial cell factories* 16(1):137.
- Chrzanowski L, Dziadas M, Lawniczak L, Cyplik P, Bialas W, Szulc A, Lisiecki P & Jelen H (2012a) Biodegradation of rhamnolipids in liquid cultures: effect of biosurfactant dissipation on diesel fuel/B20 blend biodegradation efficiency and bacterial community composition. *Bioresource technology* 111:328-335.
- Chrzanowski L, Lawniczak L & Czaczyk K (2012b) Why do microorganisms produce rhamnolipids? *World journal of microbiology & biotechnology* 28(2):401-419.
- Claridge CA (1953) The metabolism of glucose by *Pseudomonas aeruginosa*. *Retrospective Theses and Dissertations - Iowa State College*:167.
- Colovos C & Yeates TO (1993) Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Sci.* 2(9):1511-1519.
- Cortes-Sanchez Ade J, Hernandez-Sanchez H & Jaramillo-Flores ME (2013) Biological activity of glycolipids produced by microorganisms: new trends and possible therapeutic alternatives. *Microbiological research* 168(1):22-32.
- Costa SG, Déziel E & Lépine F (2011) Characterization of rhamnolipid production by *Burkholderia glumae*. *Letters in applied microbiology* 53(6):620-627.
- Costerton JW, Stewart PS & Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284(5418):1318-1322.
- Cuskey SM, Wolff JA, Phibbs PV, Jr. & Olsen RH (1985) Cloning of genes specifying carbohydrate catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. *Journal of bacteriology* 162(3):865-871.
- Davey ME, Caiazza NC & O'Toole GA (2003) Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of bacteriology* 185(3):1027-1036.
- De Almeida DG, Soares Da Silva RC, Luna JM, Rufino RD, Santos VA, Banat IM & Sarubbo LA (2016) Biosurfactants: Promising Molecules for Petroleum Biotechnology Advances. *Frontiers in microbiology* 7:1718.
- de Kievit TR, Kakai Y, Register JK, Pesci EC & Iglewski BH (2002) Role of the *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in rhlI regulation. *FEMS microbiology letters* 212(1):101-106.
- Dekimpe V (2010) Étude approfondie des systèmes de communication intercellulaire chez la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. *Thèse de doctorat. INRS-IAF*.
- Dekimpe V & Déziel E (2009) Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhIR regulates LasR-specific factors. *Microbiology* 155(Pt 3):712-723.
- Del Castillo T, Duque E & Ramos JL (2008) A set of activators and repressors control peripheral glucose pathways in *Pseudomonas putida* to yield a common central intermediate. *Journal of bacteriology* 190(7):2331-2339.
- DeSanto K (2011) Rhamnolipid mechanism. US Patent 201,101,236,23 A1. *US Patent* 201,101,236,23 A1.
- Déziel E, Gopalan S, Tampakaki AP, Lépine F, Padfield KE, Saucier M, Xiao G & Rahme LG (2005) The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting *lasRI*, *rhlRI* or the production of N-acyl-L-homoserine lactones. *Molecular microbiology* 55(4):998-1014.
- 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. *Biochimica et biophysica acta* 1440(2-3):244-252.

- Déziel E, Lépine F, Milot S & Villemur R (2000a) Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. *Biochim. Biophys. Acta* 1485(2-3):145-152.
- Déziel E, Lépine F, Milot S & Villemur R (2000b) Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. *Biochimica et biophysica acta* 1485(2-3):145-152.
- Déziel E, Lépine F, Milot S & 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.
- Déziel E, Paquette G, Villemur R, Lépine F & Bisailon J (1996) Biosurfactant production by a soil pseudomonas strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and environmental microbiology* 62(6):1908-1912.
- Di Tommaso P, Moretti S, Xenarios I, Orobítz M, Montanyola A, Chang JM, Taly JF & Notredame C (2011) T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic Acids Res.* 39(Web Server issue):W13-17.
- Diaz-Salazar C, Calero P, Espinosa-Portero R, Jimenez-Fernandez A, Wirebrand L, Velasco-Dominguez MG, Lopez-Sanchez A, Shingler V & Govantes F (2017) The stringent response promotes biofilm dispersal in *Pseudomonas putida*. *Scientific reports* 7(1):18055.
- Dirusso CC & Black PN (2004) Bacterial long chain fatty acid transport: gateway to a fatty acid-responsive signaling system. *The Journal of biological chemistry* 279(48):49563-49566.
- Dixon R & Kahn D (2004) Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature reviews. Microbiology* 2(8):621-631.
- Dobler L, Vilela LF, Almeida RV & Neves BC (2016) Rhamnolipids in perspective: gene regulatory pathways, metabolic engineering, production and technological forecasting. *N Biotechnol* 33(1):123-135.
- Donlan RM (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases* 8(9):881-890.
- Drozdetskiy A, Cole C, Procter J & Barton GJ (2015) JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic acids research* 43(W1):W389-394.
- Duan K & Surette MG (2007) Environmental regulation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Las and Rhl quorum-sensing systems. *Journal of bacteriology* 189(13):4827-4836.
- Dubeau D, Déziel E, Woods DE & Lépine F (2009) *Burkholderia thailandensis* harbors two identical *rhl* gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. *BMC microbiology* 9:263.
- Dugi KA, Dichek HL & Santamarina-Fojo S (1995a) Human hepatic and lipoprotein lipase: the loop covering the catalytic site mediates lipase substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 270(43):25396-25401.
- Dugi KA, Dichek HL & Santamarina-Fojo S (1995b) Human hepatic and lipoprotein lipase: the loop covering the catalytic site mediates lipase substrate specificity. *The Journal of biological chemistry* 270(43):25396-25401.
- Edwards JR & Hayashi JA (1965) Structure of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Biochem Biophys* 111(2):415-421.
- Eraqi WA, Yassin AS, Ali AE & Amin MA (2016) Utilization of Crude Glycerol as a Substrate for the Production of Rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnol Res Int* 2016:3464509.
- Falbe J (2012) Surfactants in Consumer Products: Theory, Technology and Application. *Springer Science & Business Media*:548.

- Farrow JM, 3rd, Sund ZM, Ellison ML, Wade DS, Coleman JP & Pesci EC (2008) PqsE functions independently of PqsR-Pseudomonas quinolone signal and enhances the *rhl* quorum-sensing system. *Journal of bacteriology* 190(21):7043-7051.
- Fraser GM & Hughes C (1999) Swarming motility. *Current opinion in microbiology* 2(6):630-635.
- Fuqua WC, Winans SC & Greenberg EP (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of bacteriology* 176(2):269-275.
- Gallagher LA, McKnight SL, Kuznetsova MS, Pesci EC & Manoil C (2002) Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 184(23):6472-6480.
- Galloway WR, Hodgkinson JT, Bowden SD, Welch M & Spring DR (2011) Quorum sensing in Gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways. *Chem Rev* 111(1):28-67.
- Glick R, Gilmour C, Tremblay J, Satanower S, Avidan O, Déziel E, Greenberg EP, Poole K & Banin E (2010) Increase in rhamnolipid synthesis under iron-limiting conditions influences surface motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 192(12):2973-2980.
- Goldman P & Vagelos PR (1961) The Specificity of Triglyceride Synthesis from Diglycerides in Chicken Adipose Tissue. *Journal of Biological Chemistry* 236.
- Gray KM, Passador L, Iglewski BH & Greenberg EP (1994) Interchangeability and specificity of components from the quorum-sensing regulatory systems of *Vibrio fischeri* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 176(10):3076-3080.
- Guerra-Santos LH, Kaeppli O & Fiechter A (1986a) Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 24(6):443-448.
- Guerra-Santos LH, Käppeli O & Fiechter A (1986b) Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Applied Microbiology and Biotechnology* 24(6):443-448.
- Guex N, Peitsch MC & Schwede T (2009) Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective. *Electrophoresis* 30:S162-S173.
- Gunther NWt, Nunez A, Fett W & Solaiman DK (2005) Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. *Applied and environmental microbiology* 71(5):2288-2293.
- Gupta R, Gobble TR & Schuster M (2009) GidA posttranscriptionally regulates *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 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. *Biotechnology and bioengineering* 81(3):316-322.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW & Stoodley P (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews. Microbiology* 2(2):95-108.
- Han L, Liu P, Peng Y, Lin J, Wang Q & Ma Y (2014) Engineering the biosynthesis of novel rhamnolipids in *Escherichia coli* for enhanced oil recovery. *J Appl Microbiol* 117(1):139-150.
- Harder D & Fotiadis D (2012) Purification of His-tagged membrane proteins from detergent-solubilized membranes.
- Hattab G, Warschawski DE, Moncoq K & Miroux B (2015) *Escherichia coli* as host for membrane protein structure determination: a global analysis. *Scientific reports* 5:12097.
- Hauser G & Karnovsky ML (1954) Studies on the production of glycolipide by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 68(6):645-654.

- Hauser G & Karnovsky ML (1957) Rhamnose and rhamnolipide biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of biological chemistry* 224(1):91-105.
- Hausner M & Wuertz S (1999) High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative *in situ* analysis. *Applied and environmental microbiology* 65(8):3710-3713.
- Hausler S, Nimtz M, Domke T, Wray V & Steinmetz I (1998) Purification and characterization of a cytotoxic exolipid of *Burkholderia pseudomallei*. *Infection and immunity* 66(4):1588-1593.
- Häußler S, Nimtz M, Domke T, Wray V & Steinmetz I (1998) Purification and Characterization of a Cytotoxic Exolipid of *Burkholderia pseudomallei*. *Infection and immunity* 66(4):1588-1593.
- Henzler-Wildman K & Kern D (2007) Dynamic personalities of proteins. *Nature* 450(7172):964-972.
- Heurlier K, Williams F, Heeb S, Dormond C, Pessi G, Singer D, Camara M, Williams P & Haas D (2004) Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscriptional RsmA/RsmZ system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of bacteriology* 186(10):2936-2945.
- 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. *Analytical and bioanalytical chemistry* 391(5):1579-1590.
- Hisatsuka K-i, Nakahara T, Sano N & Yamada K (1971) Formation of Rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its Function in Hydrocarbon Fermentation. *Agricultural and Biological Chemistry* 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.
- Holm L & Sander C (1992) Evaluation of protein models by atomic solvation preference. *J. Mol. Biol.* 225(1):93-105.
- Holmquist M (2000) Alpha/Beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms. *Curr. Protein Pept. Sci.* 1(2):209-235.
- Hori K, Ichinohe R, Unno H & Marsudi S (2011) Simultaneous syntheses of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* IFO3924 at various temperatures and from various fatty acids. *Biochemical Engineering Journal* 53(2):196-202.
- Hori K, Marsudi S & Unno H (2002) Simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnology and bioengineering* 78(6):699-707.
- Hörmann B, Müller MM, Syldatk C & Hausmann R (2010) Rhamnolipid production by *Burkholderia plantarii* DSM 9509. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112(6):674-680.
- Hoskova M, Jezdik R, Schreiberova O, Chudoba J, Sir M, Cejkova A, Masak J, Jirku V & Rezanka T (2015) Structural and physiochemical characterization of rhamnolipids produced by *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter asburiae* and *Pseudomonas aeruginosa* in single strain and mixed cultures. *Journal of biotechnology* 193:45-51.
- Irorere VU, Smyth TJ, Cobice D, McClean S, Marchant R & Banat IM (2018) Fatty acid synthesis pathway provides lipid precursors for rhamnolipid biosynthesis in *Burkholderia thailandensis* E264. *Appl Microbiol Biotechnol* 10.1007/s00253-018-9059-5.
- Iwata S (2003) Methods and results in Crystallization of Membrane Proteins. . *International University - Biotechnolgy Series* 4:294.

- Jaeger KE & Kovacic F (2014) Determination of lipolytic enzyme activities. *Methods Mol Biol* 1149:111-134.
- Jarvis FG & Johnson MJ (1949) A Glyco-lipide Produced by *Pseudomonas Aeruginosa*. *Journal of the American Chemical Society* 71(12):4124-4126.
- Jensen PO, Bjarnsholt T, Phipps R, Rasmussen TB, Calum H, Christoffersen L, Moser C, Williams P, Pressler T, Givskov M & Hoiby N (2007) Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 153(Pt 5):1329-1338.
- Jeong HS, Lim DJ, Hwang SH, Ha SD & Kong JY (2004) Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* immobilised in polyvinyl alcohol beads. *Biotechnology letters* 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 Disease* 87(8):890.
- Jiang Y, Morgan-Kiss RM, Campbell JW, Chan CH & Cronan JE (2010) Expression of *Vibrio harveyi* acyl-ACP synthetase allows efficient entry of exogenous fatty acids into the *Escherichia coli* fatty acid and lipid A synthetic pathways. *Biochemistry* 49(4):718-726.
- Joo HS & Otto M (2012) Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. *Chemistry & biology* 19(12):1503-1513.
- Juhas M, Eberl L & Tummeler B (2005) Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environmental microbiology* 7(4):459-471.
- Juhas M, Wiehlmann L, Huber B, Jordan D, Lauber J, Salunkhe P, Limpert AS, von Gotz F, Steinmetz I, Eberl L & Tummeler B (2004) Global regulation of quorum sensing and virulence by VqsR in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 150(Pt 4):831-841.
- Jurado E, Fernandez-Serrano M, Nunez-Olea J, Luzon G & Lechuga M (2009) Acute toxicity and relationship between metabolites and ecotoxicity during the biodegradation process of non-ionic surfactants: fatty-alcohol ethoxylates, nonylphenol polyethoxylate and alkylpolyglucosides. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research* 59(12):2351-2358.
- Kang CI, Kim SH, Kim HB, Park SW, Choe YJ, Oh MD, Kim EC & Choe KW (2003) *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and influence of delayed receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 37(6):745-751.
- Kang Y, Nguyen DT, Son MS & Hoang TT (2008) The *Pseudomonas aeruginosa* PsrA responds to long-chain fatty acid signals to regulate the *fadBA5* beta-oxidation operon. *Microbiology* 154(Pt 6):1584-1598.
- Kang Y, Zarzycki-Siek J, Walton CB, Norris MH & Hoang TT (2010) Multiple FadD acyl-CoA synthetases contribute to differential fatty acid degradation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS one* 5(10):e13557.
- Kaplan HB & Greenberg EP (1985) Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *Journal of bacteriology* 163(3):1210-1214.
- Kearns DB (2010) A field guide to bacterial swarming motility. *Nature reviews. Microbiology* 8(9):634-644.
- Khan FI, Lan D, Durrani R, Huan W, Zhao Z & Wang Y (2017a) The lid domain in lipases: Structural and functional determinant of enzymatic properties. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 5:16.
- Khan FI, Lan D, Durrani R, Huan W, Zhao Z & Wang Y (2017b) The Lid Domain in Lipases: Structural and Functional Determinant of Enzymatic Properties. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 5:16.
- Kim DE, Chivian D & Baker D (2004) Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Res.* 32(Web Server issue):W526-531.

- Kim DE, Chivian D, Malmstrom L & Baker D (2005) Automated prediction of domain boundaries in CASP6 targets using GinzU and RosettaDOM. *Proteins* 61 Suppl 7:193-200.
- Koch AK, Kappeli O, Fiechter A & Reiser J (1991a) Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Journal of bacteriology* 173(13):4212-4219.
- Koch AK, Kappeli O, Fiechter A & Reiser J (1991b) Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *J. Bacteriol.* 173(13):4212-4219.
- Kohler T, Curty LK, Barja F, van Delden C & Pechere JC (2000) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *Journal of bacteriology* 182(21):5990-5996.
- Kulakovskaya T, Shashkov A, Kulakovskaya E, Golubev W, Zinin A, Tsvetkov Y, Grachev A & Nifantiev N (2009) Extracellular cellobiose lipid from yeast and their analogues: structures and fungicidal activities. *Journal of oleo science* 58(3):133-140.
- Kumar CG, Mamidyala SK, Das B, Sridhar B, Devi GS & Karuna MS (2010) Synthesis of biosurfactant-based silver nanoparticles with purified rhamnolipids isolated from *Pseudomonas aeruginosa* BS-161R. *J Microbiol Biotechnol* 20(7):1061-1068.
- Kurtzman CP, Price NP, Ray KJ & Kuo TM (2010) Production of sophorolipid biosurfactants by multiple species of the *Starmerella (Candida) bombicola* yeast clade. *FEMS microbiology letters* 311(2):140-146.
- Kustu S, Santero E, Keener J, Popham D & Weiss D (1989) Expression of sigma 54 (ntrA)-dependent genes is probably united by a common mechanism. *Microbiol Rev* 53(3):367-376.
- Kutchma AJ, Hoang TT & Schweizer HP (1999) Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* fatty acid biosynthetic gene cluster: purification of acyl carrier protein (ACP) and malonyl-coenzyme A:ACP transacylase (FabD). *Journal of bacteriology* 181(17):5498-5504.
- Laskowski RA, Moss DS & Thornton JM (1993) Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. *J. Mol. Biol.* 231(4):1049-1067.
- Latifi A, Foglino M, Tanaka K, Williams P & Lazdunski A (1996) A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Molecular microbiology* 21(6):1137-1146.
- Lechuga M, Fernandez-Serrano M, Jurado E, Nunez-Olea J & Rios F (2016) Acute toxicity of anionic and non-ionic surfactants to aquatic organisms. *Ecotoxicology and environmental safety* 125:1-8.
- Lee J & Zhang L (2015) The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* 6(1):26-41.
- Lépine F, Déziel E, Milot S & Villemur R (2002a) Liquid chromatographic/mass spectrometric detection of the 3-(3-hydroxyalkanoxy) alkanic acid precursors of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. *Journal of mass spectrometry : JMS* 37(1):41-46.
- Lépine F, Déziel E, Milot S & Villemur R (2002b) Liquid chromatographic/mass spectrometric detection of the 3-(3-hydroxyalkanoxy) alkanic acid precursors of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. *J. Mass Spectrom.* 37(1):41-46.
- Lequette Y & Greenberg EP (2005) Timing and localization of rhamnolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of bacteriology* 187(1):37-44.
- Lequette Y, Lee JH, Ledgham F, Lazdunski A & Greenberg EP (2006) A distinct QscR regulon in the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing circuit. *Journal of bacteriology* 188(9):3365-3370.
- Lesic B & Rahme LG (2008) Use of the lambda Red recombinase system to rapidly generate mutants in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC molecular biology* 9:20.
- Lessie TG & Phibbs PV, Jr. (1984) Alternative pathways of carbohydrate utilization in pseudomonads. *Annual review of microbiology* 38:359-388.

- Li W, Cowley A, Uludag M, Gur T, McWilliam H, Squizzato S, Park YM, Buso N & Lopez R (2015) The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic acids research* 43(W1):W580-584.
- Liberati NT, Urbach JM, Miyata S, Lee DG, Drenkard E, Wu G, Villanueva J, Wei T & Ausubel FM (2006) An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(8):2833-2838.
- Lovaglio RB, Silva VL, Ferreira H, Hausmann R & Contiero J (2015) Rhamnolipids know-how: Looking for strategies for its industrial dissemination. *Biotechnol Adv* 33(8):1715-1726.
- Lovell SC, Davis IW, Arendall WB, 3rd, de Bakker PI, Word JM, Prisant MG, Richardson JS & Richardson DC (2003) Structure validation by Calpha geometry: phi, psi and Cbeta deviation. *Proteins* 50(3):437-450.
- Luthy R, Bowie JU & Eisenberg D (1992) Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature* 356(6364):83-85.
- Ma JC, Wu YQ, Cao D, Zhang WB & Wang HH (2017) Only Acyl Carrier Protein 1 (AcpP1) Functions in *Pseudomonas aeruginosa* Fatty Acid Synthesis. *Frontiers in microbiology* 8:2186.
- Madsen JK, Pihl R, Moller AH, Madsen AT, Otzen DE & Andersen KK (2015) The anionic biosurfactant rhamnolipid does not denature industrial enzymes. *Frontiers in microbiology* 6:292.
- Maier RM (2003) Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria. *Advances in applied microbiology* 52:101-121.
- Maier RM & Soberon-Chavez G (2000) *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 54(5):625-633.
- Makkar RS, Cameotra SS & Banat IM (2011) Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express* 1(1):5.
- Manresa MA, Bastida J, Mercadé ME, Robert M, de Andrés C, Espuny MJ & Guinea J (1991) Kinetic studies on surfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Journal of Industrial Microbiology* 8(2):133-136.
- Marchant R & Banat IM (2012) Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. *Trends in biotechnology* 30(11):558-565.
- Masood TB, Sandhya S, Chandra N & Natarajan V (2015) CHEXVIS: a tool for molecular channel extraction and visualization. *BMC bioinformatics* 16:119.
- McGrath S, Wade DS & Pesci EC (2004) Dueling quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS). *FEMS microbiology letters* 230(1):27-34.
- McWilliam H, Li W, Uludag M, Squizzato S, Park YM, Buso N, Cowley AP & Lopez R (2013) Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic acids research* 41(Web Server issue):W597-600.
- Medina G, Juarez K & 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. *Journal of bacteriology* 185(1):377-380.
- Melo F & Feytmans E (1998) Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy. *J. Mol. Biol.* 277(5):1141-1152.
- Mendes A, Filgueiras L, Pinto J & Nele M (2015) Physicochemical Properties of Rhamnolipid Biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 to Applications in Microemulsions. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* 6(1):64-79.
- Miller RM (1995) Surfactant-enhanced bioavailability of slightly soluble organic compounds. *Bioremediation: science and applications. Soil Science Society of America*:322–354.

- Morici LA, Carterson AJ, Wagner VE, Frisk A, Schurr JR, Honer zu Bentrup K, Hassett DJ, Iglewski BH, Sauer K & Schurr MJ (2007) *Pseudomonas aeruginosa* AlgR represses the Rhl quorum-sensing system in a biofilm-specific manner. *Journal of bacteriology* 189(21):7752-7764.
- Mukherjee AK & Das K (2010) Microbial surfactants and their potential applications: an overview. *Adv Exp Med Biol* 672:54-64.
- Mukherjee S, Das P & Sen R (2006) Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends in biotechnology* 24(11):509-515.
- Muller F, Honzke S, Luthardt WO, Wong EL, Unbehauen M, Bauer J, Haag R, Hedtrich S, Ruhl E & Rademann J (2017) Rhamnolipids form drug-loaded nanoparticles for dermal drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 116:31-37.
- Muller I (2017) Guidelines for the successful generation of protein-ligand complex crystals. *Acta Crystallogr D Struct Biol* 73(Pt 2):79-92.
- Muller MM, Kugler JH, Henkel M, Gerlitzki M, Hormann B, Pohnlein M, Sylatk C & Hausmann R (2012) Rhamnolipids - next generation surfactants? *Journal of biotechnology* 162(4):366-380.
- Mulligan CN & Gibbs BF (1989) Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and environmental microbiology* 55(11):3016-3019.
- Murray TS, Egan M & Kazmierczak BI (2007) *Pseudomonas aeruginosa* chronic colonization in cystic fibrosis patients. *Current opinion in pediatrics* 19(1):83-88.
- Murzin AG, Brenner SE, Hubbard T & Chothia C (1995a) SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *Journal of molecular biology* 247(4):536-540.
- Murzin AG, Brenner SE, Hubbard T & Chothia C (1995b) SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.* 247(4):536-540.
- Myers D (2005) *Surfactant science and technology. Third edition.* John Wiley & Sons,
- Nardini M & Dijkstra BW (1999a) Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Current opinion in structural biology* 9(6):732-737.
- Nardini M & Dijkstra BW (1999b) Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9(6):732-737.
- Nickzad A, Lépine F & Déziel E (2015) Quorum Sensing Controls Swarming Motility of *Burkholderia glumae* through Regulation of Rhamnolipids. *PLoS one* 10(6):e0128509.
- Niepa THR, Vaccari L, Leheny RL, Goulian M, Lee D & Stebe KJ (2017) Films of Bacteria at Interfaces (FBI): Remodeling of Fluid Interfaces by *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific reports* 7(1):17864.
- Nitschke M & Costa S (2007) Biosurfactants in food industry. *Journal of Food Science and Technology* 18:252-259.
- Nitschke M, Costa SG & Contiero J (2005) Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. *Biotechnology progress* 21(6):1593-1600.
- 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. *The Journal of biological chemistry* 269(31):19787-19795.
- Ochsner UA & Reiser J (1995) Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(14):6424-6428.
- Ochsner UA, Reiser J, Fiechter A & Witholt B (1995) Production of *Pseudomonas aeruginosa* Rhamnolipid Biosurfactants in Heterologous Hosts. *Applied and environmental microbiology* 61(9):3503-3506.

- Oliveira FJS, Vazquez L, de Campos NP & de França FP (2009) Production of rhamnolipids by a *Pseudomonas alcaligenes* strain. *Process Biochemistry* 44(4):383-389.
- Ollis DL, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, Franken SM, Harel M, Remington SJ, Silman I, Schrag J & et al. (1992) The alpha/beta hydrolase fold. *Protein engineering* 5(3):197-211.
- Pacwa-Plociniczak M, Plaza GA, Piotrowska-Seget Z & Cameotra SS (2011) Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *International journal of molecular sciences* 12(1):633-654.
- Pajarron AM, De Koster CG, Heerma W, Schmidt M & Haverkamp J (1993) Structure identification of natural rhamnolipid mixtures by fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *Glycoconj J* 10(3):219-226.
- Pamp SJ & Tolker-Nielsen T (2007) Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 189(6):2531-2539.
- Pantazaki AA, Dimopoulou MI, Simou OM & Pritsa AA (2010) Sunflower seed oil and oleic acid utilization for the production of rhamnolipids by *Thermus thermophilus* HB8. *Applied Microbiology and Biotechnology* 88(4):939-951.
- Parker JL & Newstead S (2016) Membrane Protein Crystallisation: Current Trends and Future Perspectives. *Adv Exp Med Biol* 922:61-72.
- Parry AJ, Parry NJ, Peilow C & Stevenson PS (2013) Combinations of Rhamnolipids and Enzymes for Improved Cleaning. . *Patent No. EP 2596087A1*.
- Parsek MR & Greenberg EP (2000) Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(16):8789-8793.
- Paulino BN, Pessoa MG, Mano MC, Molina G, Neri-Numa IA & Pastore GM (2016) Current status in biotechnological production and applications of glycolipid biosurfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* 100(24):10265-10293.
- Pearson JP, Passador L, Iglewski BH & Greenberg EP (1995) A second *N*-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(5):1490-1494.
- Peroutka Iii RJ, Orcutt SJ, Strickler JE & Butt TR (2011) SUMO fusion technology for enhanced protein expression and purification in prokaryotes and eukaryotes. *Methods Mol Biol* 705:15-30.
- Pesci EC, Milbank JB, Pearson JP, McKnight S, Kende AS, Greenberg EP & Iglewski BH (1999) Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(20):11229-11234.
- Pesci EC, Pearson JP, Seed PC & Iglewski BH (1997) Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 179(10):3127-3132.
- Piljac A, Stipcevic T, Piljac-Zegarac J & Piljac G (2008) Successful treatment of chronic decubitus ulcer with 0.1% dirhamnolipid ointment. *Journal of cutaneous medicine and surgery* 12(3):142-146.
- Pletnev MY (2001) Chemistry of surfactants. *Studies in Interface Science*, Fainerman VB, Möbius D & Miller R (Édit.) Elsevier, Vol 13. p 1-97.
- Potvin E, Sanschagrín F & Levesque RC (2008) Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS microbiology reviews* 32(1):38-55.
- Pramanik A, Pawar S, Antonian E & Schulz H (1979) Five different enzymatic activities are associated with the multienzyme complex of fatty acid oxidation from *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 137(1):469-473.
- Prive GG (2007) Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins. *Methods* 41(4):388-397.

- Rahim R, Burrows LL, Monteiro MA, Perry MB & Lam JS (2000) Involvement of the *rml* locus in core oligosaccharide and O polysaccharide assembly in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 146 ( Pt 11):2803-2814.
- Rahim R, Ochsner UA, Olvera C, Graninger M, Messner P, Lam JS & Soberon-Chavez G (2001) Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa rhlC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Molecular microbiology* 40(3):708-718.
- Rahme LG, Stevens EJ, Wolford SF, Shao J, Tompkins RG & Ausubel FM (1995) Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268(5219):1899-1902.
- Rampioni G, Schuster M, Greenberg EP, Zennaro E & Leoni L (2009) Contribution of the RsaL global regulator to *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. *FEMS microbiology letters* 301(2):210-217.
- Randhawa KKS & Rahman PKSM (2014) Rhamnolipid biosurfactants, past, present, and future scenario of global market. *Frontiers in microbiology* 5(454).
- Rane AN, Baikar VV, Ravi Kumar V & Deopurkar RL (2017) Agro-Industrial Wastes for Production of Biosurfactant by *Bacillus subtilis* ANR 88 and Its Application in Synthesis of Silver and Gold Nanoparticles. *Frontiers in microbiology* 8:492.
- Rasamiravaka T, Labtani Q, Duez P & El Jaziri M (2015) The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *BioMed research international* 2015:759348.
- Rau U, Nguyen LA, Schulz S, Wray V, Nimtz M, Roeper H, Koch H & Lang S (2005) Formation and analysis of mannosylerythritol lipids secreted by *Pseudozyma aphidis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 66(5):551-559.
- Remichkova M, Galabova D, Roeva I, Karpenko E, Shulga A & Galabov AS (2008) Anti-herpesvirus activities of *Pseudomonas* sp. S-17 rhamnolipid and its complex with alginate. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences* 63(1-2):75-81.
- Remmert M, Biegert A, Hauser A & Soding J (2011) HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment. *Nature methods* 9(2):173-175.
- Rezanka T, Siristova L & Sigler K (2011) Rhamnolipid-producing thermophilic bacteria of species *Thermus* and *Meiothermus*. *Extremophiles : life under extreme conditions* 15(6):697-709.
- Rooney AP, Price NP, Ray KJ & Kuo TM (2009) Isolation and characterization of rhamnolipid-producing bacterial strains from a biodiesel facility. *FEMS microbiology letters* 295(1):82-87.
- Roy A, Kucukural A & Zhang Y (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* 5(4):725-738.
- Rudden M, Tsauosi K, Marchant R, Banat IM & Smyth TJ (2015) Development and validation of an ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for the quantitative determination of rhamnolipid congeners. *Appl Microbiol Biotechnol* 99(21):9177-9187.
- Sachdev DP & Cameotra SS (2013) Biosurfactants in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol* 97(3):1005-1016.
- Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW & Prince AS (2005) Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine* 171(11):1209-1223.
- Schlegel S, Lofblom J, Lee C, Hjelm A, Klepsch M, Strous M, Drew D, Slotboom DJ & de Gier JW (2012) Optimizing membrane protein overexpression in the *Escherichia coli* strain Lemo21(DE3). *Journal of molecular biology* 423(4):648-659.
- Schweizer HP & Po C (1996) Regulation of glycerol metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of the *glpR* repressor gene. *Journal of bacteriology* 178(17):5215-5221.

- Secundo F, Carrea G, Tarabiono C, Brocca S & Lotti M (2004a) Activity and enantioselectivity of wildtype and lid mutated *Candida rugosa* lipase isoform 1 in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* 86(2):236-240.
- Secundo F, Carrea G, Tarabiono C, Brocca S & Lotti M (2004b) Activity and enantioselectivity of wildtype and lid mutated *Candida rugosa* lipase isoform 1 in organic solvents. *Biotechnology and bioengineering* 86(2):236-240.
- Sekhon Randhawa KK & Rahman PK (2014) Rhamnolipid biosurfactants-past, present, and future scenario of global market. *Frontiers in microbiology* 5:454.
- Shiraga S, Ishiguro M, Fukami H, Nakao M & Ueda M (2005a) Creation of *Rhizopus oryzae* lipase having a unique oxyanion hole by combinatorial mutagenesis in the lid domain. *Appl Microbiol Biotechnol* 68(6):779-785.
- Shiraga S, Ishiguro M, Fukami H, Nakao M & Ueda M (2005b) Creation of *Rhizopus oryzae* lipase having a unique oxyanion hole by combinatorial mutagenesis in the lid domain. *Applied microbiology and biotechnology* 68(6):779-785.
- Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Soding J, Thompson JD & Higgins DG (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology* 7:539.
- Silva SN, Farias CB, Rufino RD, Luna JM & Sarubbo LA (2010) Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 79(1):174-183.
- Simon R, Priefer U & Pühler A (1983) A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Bio/Technology* 1:784.
- Slater JH, Lovatt D, Weightman AJ, Senior E & Bull AT (1979) The Growth of *Pseudomonas putida* on Chlorinated Aliphatic Acids and its Dehalogenase Activity. *Microbiology* 114(1):125-136.
- Snyder DS & McIntosh TJ (2000) The lipopolysaccharide barrier: correlation of antibiotic susceptibility with antibiotic permeability and fluorescent probe binding kinetics. *Biochemistry* 39(38):11777-11787.
- Soares DSA, Pereira N, Jr. & Freire DM (2016) Strategies for improved rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* PA1. *PeerJ* 4:e2078.
- Sockolosky JT & Szoka FC (2013) Periplasmic production via the pET expression system of soluble, bioactive human growth hormone. *Protein Expr Purif* 87(2):129-135.
- Solaiman DK, Ashby RD, Gunther NWt & Zerkowski JA (2015) Dirhamnose-lipid production by recombinant nonpathogenic bacterium *Pseudomonas chlororaphis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 99(10):4333-4342.
- Son MS, Matthews WJ, Jr., Kang Y, Nguyen DT & Hoang TT (2007) In vivo evidence of *Pseudomonas aeruginosa* nutrient acquisition and pathogenesis in the lungs of cystic fibrosis patients. *Infection and immunity* 75(11):5313-5324.
- Son MS, Nguyen DT, Kang Y & Hoang TT (2008) Engineering of FRT-*lacZ* fusion constructs: induction of the *Pseudomonas aeruginosa fadAB1* operon by medium and long chain-length fatty acids. *Plasmid* 59(2):111-118.
- Sotirova AV, Spasova DI, Galabova DN, Karpenko E & Shulga A (2008) Rhamnolipid-biosurfactant permeabilizing effects on gram-positive and gram-negative bacterial strains. *Curr Microbiol* 56(6):639-644.
- Stauffer CE & Zeffren E (1970) Concerning the mechanism of ester hydrolysis by proteases. *The Journal of biological chemistry* 245(13):3282-3284.
- Stevenson G, Neal B, Liu D, Hobbs M, Packer NH, Batley M, Redmond JW, Lindquist L & Reeves P (1994) Structure of the O antigen of *Escherichia coli* K-12 and the sequence of its *rfb* gene cluster. *Journal of bacteriology* 176(13):4144-4156.

- Stewart PS (2002) Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International journal of medical microbiology* : *IJMM* 292(2):107-113.
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warren P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S & Olson MV (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406(6799):959-964.
- Sun Z, Kang Y, Norris MH, Troyer RM, Son MS, Schweizer HP, Dow SW & Hoang TT (2014) Blocking phosphatidylcholine utilization in *Pseudomonas aeruginosa*, via mutagenesis of fatty acid, glycerol and choline degradation pathways, confirms the importance of this nutrient source in vivo. *PLoS one* 9(7):e103778.
- Suhre, K. & Sanejouand, Y. H. (2004) EINemo: a normal mode web server for protein movement analysis and the generation of templates for molecular replacement, *Nucleic Acids Res.* 32, W610-4.
- Tavares LFD, Silva PM, Junqueira M, Mariano DCO, Nogueira FCS, Domont GB, Freire DMG & Neves BC (2013) Characterization of rhamnolipids produced by wild-type and engineered *Burkholderia kururiensis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(5):1909-1921.
- Temple L, Cuskey SM, Perkins RE, Bass RC, Morales NM, Christie GE, Olsen RH & Phipps PV, Jr. (1990) Analysis of cloned structural and regulatory genes for carbohydrate utilization in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Journal of bacteriology* 172(11):6396-6402.
- Thompson LS, Webb JS, Rice SA & Kjelleberg S (2003) The alternative sigma factor RpoN regulates the quorum sensing gene *rhII* in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS microbiology letters* 220(2):187-195.
- Tiso T, Sabelhaus P, Behrens B, Wittgens A, Rosenau F, Hayen H & Blank LM (2016) Creating metabolic demand as an engineering strategy in *Pseudomonas putida* - Rhamnolipid synthesis as an example. *Metabolic engineering communications* 3:234-244.
- Tiso T, Zauter R, Tulke H, Leuchtle B, Li WJ, Behrens B, Wittgens A, Rosenau F, Hayen H & Blank LM (2017) Designer rhamnolipids by reduction of congener diversity: production and characterization. *Microbial cell factories* 16(1):225.
- Tiwari NP & Campbell JJ (1969) Enzymatic control of the metabolic activity of *Pseudomonas aeruginosa* grown in glucose or succinate media. *Biochimica et biophysica acta* 192(3):395-401.
- Tmáková L, Sekretár S & Schmidt Š (2016) Plant-derived surfactants as an alternative to synthetic surfactants: surface and antioxidant activities. *Chemical Papers* 70(2):188-196.
- Tremblay J, Richardson AP, Lépine F & Déziel E (2007) Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. *Environmental microbiology* 9(10):2622-2630.
- Ulrich HD (2009) The SUMO system: an overview. *Methods Mol Biol* 497:3-16.
- van Delden C, Comte R & Bally AM (2001) Stringent response activates quorum sensing and modulates cell density-dependent gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 183(18):5376-5384.
- Van Gennip M, Christensen LD, Alhede M, Phipps R, Jensen PO, Christophersen L, Pamp SJ, Moser C, Mikkelsen PJ, Koh AY, Tolker-Nielsen T, Pier GB, Hoiby N, Givskov M & Bjarnsholt T (2009) Inactivation of the *rhIA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* prevents rhamnolipid production, disabling the protection against polymorphonuclear leukocytes. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 117(7):537-546.

- van Gunsteren WF, Billeter SR, Eising AA, Hünenberger PH, Krüger P, Mark AE, Scott WRP & Tironi IG (1996) Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide. *Vdf Hochschulverlag AG an der ETH Zürich, Zürich, Switzerland*:1042.
- Van Renterghem L, Roelants S, Baccile N, Uyttersprot K, Taelman MC, Everaert B, Mincke S, Ledegen S, Debrouwer S, Scholtens K, Stevens C & Soetaert W (2018) From lab to market: An integrated bioprocess design approach for new-to-nature biosurfactants produced by *Starmerella bombicola*. *Biotechnology and bioengineering* 115(5):1195-1206.
- Vatsa P, Sanchez L, Clement C, Baillieul F & Dorey S (2010) Rhamnolipid biosurfactants as new players in animal and plant defense against microbes. *International journal of molecular sciences* 11(12):5095-5108.
- Venclovas C & Margelevicius M (2005) Comparative modeling in CASP6 using consensus approach to template selection, sequence-structure alignment, and structure assessment. *Proteins* 61 Suppl 7:99-105.
- Wang W, Cai B & Shao Z (2014) Oil degradation and biosurfactant production by the deep sea bacterium *Dietzia maris* As-13-3. *Frontiers in microbiology* 5:711.
- Waterson RM & Hill RL (1972) Enoyl Coenzyme A Hydratase (Crotonase). Catalytic Properties of Crotonase and its Possible Regulatory Role in Fatty Acid Oxidation. *Journal of Biological Chemistry* 247.
- Wells G, Palethorpe S & Pesci EC (2017) PsrA controls the synthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal via repression of the FadE homolog, PA0506. *PLoS one* 12(12):e0189331.
- Wenner N, Maes A, Cotado-Sampayo M & Lapouge K (2014) NrsZ: a novel, processed, nitrogen-dependent, small non-coding RNA that regulates *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 virulence. *Environmental microbiology* 16(4):1053-1068.
- West SE, Schweizer HP, Dall C, Sample AK & Runyen-Janecky LJ (1994) Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 148(1):81-86.
- Wigneswaran V, Nielsen KF, Sternberg C, Jensen PR, Folkesson A & Jelsbak L (2016) Biofilm as a production platform for heterologous production of rhamnolipids by the non-pathogenic strain *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbial cell factories* 15(1):181.
- Winsor GL, Lam DK, Fleming L, Lo R, Whiteside MD, Yu NY, Hancock RE & Brinkman FS (2011) *Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *Nucleic acids research* 39(Database issue):D596-600.
- Wittgens A, Kovacic F, Muller MM, Gerlitzki M, Santiago-Schubel B, Hofmann D, Tiso T, Blank LM, Henkel M, Hausmann R, Sylatk C, Wilhelm S & Rosenau F (2017) Novel insights into biosynthesis and uptake of rhamnolipids and their precursors. *Appl Microbiol Biotechnol* 101(7):2865-2878.
- Wittgens A, Santiago-Schubel B, Henkel M, Tiso T, Blank LM, Hausmann R, Hofmann D, Wilhelm S, Jaeger KE & Rosenau F (2018a) Heterologous production of long-chain rhamnolipids from *Burkholderia glumae* in *Pseudomonas putida*-a step forward to tailor-made rhamnolipids. *Appl Microbiol Biotechnol* 102(3):1229-1239.
- Wittgens A, Santiago-Schubel B, Henkel M, Tiso T, Blank LM, Hausmann R, Hofmann D, Wilhelm S, Jaeger KE & Rosenau F (2018b) Heterologous production of long-chain rhamnolipids from *Burkholderia glumae* in *Pseudomonas putida*-a step forward to tailor-made rhamnolipids. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 102(3):1229-1239.
- Wittgens A, Tiso T, Arndt TT, Wenk P, Hemmerich J, Muller C, Wichmann R, Kupper B, Zwick M, Wilhelm S, Hausmann R, Sylatk C, Rosenau F & Blank LM (2011) Growth

- independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbial cell factories* 10:80.
- Xiao G, He J & Rahme LG (2006) Mutation analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* mvfR and pqsABCDE gene promoters demonstrates complex quorum-sensing circuitry. *Microbiology* 152(Pt 6):1679-1686.
- Yang J, Roy A & Zhang Y (2013) Protein-ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment. *Bioinformatics* 29(20):2588-2595.
- Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J & Zhang Y (2015) The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods* 12(1):7-8.
- Yang SY, Li JM, He XY, Cosloy SD & Schulz H (1988) Evidence that the *fadB* gene of the *fadAB* operon of *Escherichia coli* encodes 3-hydroxyacyl-coenzyme A (CoA) epimerase, delta 3-cis-delta 2-trans-enoyl-CoA isomerase, and enoyl-CoA hydratase in addition to 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. *Journal of bacteriology* 170(6):2543-2548.
- Ying GG (2006) Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environment international* 32(3):417-431.
- Yu XW, Zhu SS, Xiao R & Xu Y (2014a) Conversion of a *Rhizopus chinensis* lipase into an esterase by lid swapping. *J. Lipid Res.* 55(6):1044-1051.
- Yu XW, Zhu SS, Xiao R & Xu Y (2014b) Conversion of a *Rhizopus chinensis* lipase into an esterase by lid swapping. *Journal of lipid research* 55(6):1044-1051.
- Yuan Y, Leeds JA & Meredith TC (2012a) *Pseudomonas aeruginosa* directly shunts beta-oxidation degradation intermediates into de novo fatty acid biosynthesis. *J Bacteriol* 194(19):5185-5196.
- Yuan Y, Sachdeva M, Leeds JA & Meredith TC (2012b) Fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is initiated by the FabY class of beta-ketoacyl acyl carrier protein synthases. *Journal of bacteriology* 194(19):5171-5184.
- Zarzycki-Siek J, Norris MH, Kang Y, Sun Z, Bluhm AP, McMillan IA & Hoang TT (2013) Elucidating the *Pseudomonas aeruginosa* fatty acid degradation pathway: identification of additional fatty acyl-CoA synthetase homologues. *PloS one* 8(5):e64554.
- Zhang GL, Wu YT, Qian XP & Meng Q (2005) Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. *Journal of Zhejiang University. Science. B* 6(8):725-730.
- Zhang L, Veres-Schalnat TA, Somogyi A, Pemberton JE & Maier RM (2012) Fatty acid cosubstrates provide beta-oxidation precursors for rhamnolipid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*, as evidenced by isotope tracing and gene expression assays. *Appl Environ Microbiol* 78(24):8611-8622.
- Zhang Y & Miller RM (1992) Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Applied and environmental microbiology* 58(10):3276-3282.
- Zhang Y & Miller RM (1994) Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Applied and environmental microbiology* 60(6):2101-2106.
- Zhang Y & Miller RM (1995) Effect of Rhamnolipid (Biosurfactant) Structure on Solubilization and Biodegradation of n-Alkanes. *Applied and environmental microbiology* 61(6):2247-2251.
- Zhang Y & Skolnick J (2005) TM-align: a protein structure alignment algorithm based on the TM-score. *Nucleic Acids Res.* 33(7):2302-2309.
- Zhang Z, Kuipers G, Niemiec L, Baumgarten T, Slotboom DJ, de Gier JW & Hjelm A (2015) High-level production of membrane proteins in *E. coli* BL21(DE3) by omitting the inducer IPTG. *Microbial cell factories* 14:142.

- Zhao F, Shi R, Ma F, Han S & Zhang Y (2018) Oxygen effects on rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial cell factories* 17(1):39.
- Zhu H & Aitken MD (2010) Surfactant-enhanced desorption and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soil. *Environmental science & technology* 44(19):7260-7265.
- Zhu K & Rock CO (2008a) RhIA converts beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the beta-hydroxydecanoyl-beta-hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 190(9):3147-3154.
- Zhu K & Rock CO (2008b) RhIA 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.
- Zhu L, 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. *Bioresource technology* 117:208-213.
- 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*. *Infection and immunity* 74(6):3134-3147.