

THESE en CO-TUTELLE

Réalisée à

Ecole Doctorale des Sciences de la Matière du Rayonnement et de l'Environnement :
Laboratoire des Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien EA 1026 :
ProBioGEM, l'Institut Charles Viollette

&

Ecole Doctorale Sciences Fondamentales de la Faculté des Sciences de Sfax:
Unité enzymes et bioconversion de l'école Nationale d'Ingénieurs de Sfax

En vue de l'obtention du titre de docteur

Spécialités

Ingénierie des Fonctions Biologiques - Sciences Biologiques

Par

Oumaima Zouari

**Identification, caractérisation, production et application
des biosurfactants lipopeptidiques de *Pseudomonas spp.***

Soutenance prévue le 22 Décembre 2017 à Villeneuve d'ascq

devant le jury composé de :

Philippe Jacques, Professeur, Agrobiotech Gembloux, Belgique
Dhouha Ghribi, Maître de Conférences HDR, ISBS, Sfax, Tunisie
Pascal DHULSTER, Professeur, IUT « A » Lille 1, France
Dider Lecouturier, Maître de conférences, IUT « A » Lille, France
Nicole orange, professeur, Université de Rouen-Normandie
Slim Tounsi, Professeur, Laboratoire biopesticide, Sfax
Mouhamed Chemkha, Professeur, Laboratoire des bioprocédés environnementaux, Sfax
Christian Larroche, Professeur polytech Clermont-Ferrand, France
Alice Rochex, Maître de conférences, Polytech'Lille, France

Directeur de thèse
Directrice de thèse
Co-directeur de thèse
Co-encadrant
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Invitée

Remerciement	7
Résumé	9
Abstract:	10
Liste des Figures	11
Liste des tableaux	14
Liste des abréviations	16
CHAPITRE I :	20
INTRODUCTION	20
1. Synthèse bibliographique	21
1.1. Les biosurfactants.....	21
1.1.1. Classification des biosurfactants selon leur nature chimique.....	22
1.1.1.1. Les lipopeptides.....	22
1.1.1.2. Les glycolipides.....	22
a) Les rhamnolipides.....	23
b) Les sophorolipides.....	23
c) Les tréhalolipides.....	23
1.1.1.3. Les phospholipides	24
1.1.1.4. Les acides gras.....	24
1.1.1.5. Les polymères microbiens.....	24
1.1.2. Les propriétés fonctionnelles des biosurfactants	25
1.1.2.1. Propriétés tensioactive et micellaire.....	25
1.1.2.2. Propriété moussante.....	26
1.1.2.3. Propriété émulsifiante.....	27
1.1.3. Méthodes de screening des biosurfactants	29
1.1.3.1. La mesure directe de la tension de surface et de la tension interfaciale	29
1.1.3.2. La méthode de Du-Noüy-Ring.....	29
1.1.3.3. Le test de 'Drop collapse'	30
1.1.3.4. La méthode de l'étalement d'huile	30
1.1.3.5. L'activité émulsifiante	30
1.1.3.6. Solubilisation de l'antracène cristallin	31
1.1.3.7. Test d'adhésion bactérienne aux hydrocarbures ou 'BATH'	31
1.1.3.8. Test de la plaque d'agar 'CTAB'	31
1.1.4. Les procédés de purification des biosurfactants.....	32
1.1.4.1. La précipitation.....	32

1.1.4.2.	Extraction par des solvants chimiques	32
1.1.4.3.	Adsorption	33
1.1.4.4.	Filtration sur membrane.....	33
1.1.4.5.	Echangeuse d'ions	33
1.1.4.6.	Techniques de séparation chromatographiques.....	33
1.2.	Rôles et applications des biosurfactants de <i>Pseudomonas</i> -----	34
1.2.1.	Les <i>Pseudomonas</i> :-----	34
1.2.2.	Les fonctions biologiques des biosurfactants de <i>Pseudomonas</i>	36
1.2.2.1.	Interaction avec la surface	37
1.2.2.2.	Effet sur la biodisponibilité.....	38
1.2.2.3.	Interaction avec les membranes des plantes.....	38
1.2.2.4.	Interaction avec les membranes microbiens	39
1.2.3.	Domaines d'application potentielle des biosurfactants.....	39
1.2.3.1.	Les biosurfactants dans l'industrie cosmétique	40
1.2.3.2.	Les biosurfactants dans l'industrie agroalimentaire	40
1.2.3.3.	Les biosurfactants dans les domaines pharmaceutiques et thérapeutiques.....	41
1.2.3.4.	Application des biosurfactants en bioremédiation	42
1.3.	La diversité des peptides issus de la synthèse non ribosomique chez les <i>Pseudomonas</i> 44	
1.3.1.	La diversité structurale des lipopeptides de <i>Pseudomonas</i> : Rôle et classification ..	44
	• Les amphisines :.....	46
	• Les plusbacines	46
	• Les syringomycines	49
	• Les orfamides.....	50
	• Les putisolvines.....	50
	• Les syringopeptines	51
	• Les syringafactines.....	52
	• Les tolaasines.....	53
1.3.2.	Les sidérophores.....	54
1.4.	Les domaines des synthétases NRPS chez les <i>Pseudomonas</i>	55
	• Le domaine d'adénylation :	55
	• Le domaine de thiolation:	55
	• Le domaine de condensation:	56
	• Le domaine de thioestérase (TE):.....	57
1.5.	Les voies de biosynthèse des lipopeptides chez les <i>Pseudomonas</i>	58

•	La biosynthèse linéaire	58
•	La biosynthèse Itérative	59
•	La biosynthèse non linéaire	59
1.6.	Les nutriments influents la production des lipopeptides -----	60
1.6.1.	Les sources de carbone	60
1.6.2.	Les sources d'azote.....	61
1.6.3.	Les minéraux.....	61
1.7.	Les plans d'expériences-----	62
1.7.1.	Les plans de criblage.....	62
1.7.2.	Les méthodologies de surface de réponse (RSM)	63
2.	Situation et objectif du travail	64
Chapitre 2	66
Matériels et méthodes	66
1.	Isolement des souches de <i>Pseudomonas</i>	67
1.1.	Echantillonnage et purification des souches de <i>Pseudomonas</i> -----	67
1.2.	Les milieux de culture-----	67
1.2.1.	Milieu Cétrimide	67
1.2.2.	Milieu Luria-Bertani LB	68
1.2.3.	Conservation des souches	68
2.	Cultures des souches de <i>Pseudomonas sp.</i> en fioles d'Erlenmeyer	68
2.1.	Milieu TSB-----	68
2.2.	Milieu minimum M9-----	69
2.3.	Conditions de culture en milieu liquide -----	69
3.	Purification et concentration des biosurfactants	70
3.1.	Préparation des surnageants de culture -----	70
3.2.	Semi purification et concentration des biosurfactants par précipitation acide -----	70
3.3.	Purification par extraction en phase solide (EPS) -----	70
3.4.	Chromatographie liquide à haute performance-----	71
3.5.	Purification par Ultrafiltration/ Diafiltration -----	72
4.	Screening des souches ayant un potentiel de production des biosurfactants	72
4.1.	Test de 'Drop-collapse' -----	72
4.2.	Mesure de la tension de surface et de dilution critique micellaire F_{CMC} -----	73
4.3.	Mesure de l'activité émulsifiante -----	73
4.4.	Test de l'étalement d'huile -----	73

5.	Identification des souches productrices de molécules biosurfactantes	74
5.1.	Coloration de Gram.....	74
5.2.	Caractérisation biochimique des souches.....	74
5.3.	Identification moléculaire des souches.....	74
5.3.1.	Extraction de l'ADN génomique (ADNg).....	75
5.3.2.	Amplification de l'ADN 16S par PCR.....	75
5.3.3.	Electrophorèse sur gel d'agarose	76
5.3.4.	Purification des produits PCR	76
5.3.5.	Ligation et clonage plasmidique.....	76
5.3.6.	Transformation par compétence naturelle	76
5.3.7.	Extraction de l'ADN plasmidique.....	77
5.3.8.	Digestion enzymatique	77
5.3.9.	Séquençage et analyse phylogénétique	77
6.	Identification et caractérisation de la structure chimique des biosurfactants	78
6.1.	Chromatographie sur couche mince 'CCM'	78
6.2.	Spectrométrie de masse MALDI-ToF	79
6.3.	Chromatographie liquide couplée à la masse LC-MS.....	79
6.4.	Prédiction de la structure des biosurfactants par des outils bioinformatiques.....	80
7.	Optimisation de la production des lipopeptides par la souche de <i>Pseudomonas sp.</i> E313 par la méthode des plans d'expériences	81
7.1.	Optimisation des conditions de cultures.....	81
7.1.1.	Cinétique de la croissance bactérienne et de la production des lipopeptides	82
7.1.2.	Optimisation de la température.....	82
7.1.3.	Optimisation du pH	82
7.1.4.	Optimisation de l'aération-agitation	83
7.2.	Plans qualitatifs.....	83
7.3.	Plan composite RSM.....	86
7.4.	Méthodes d'analyses.....	87
7.4.1.	Suivi de la biomasse	87
7.4.2.	Mesure de la matière sèche	87
7.4.3.	Dosage des lipopeptides.....	87
7.4.4.	Dosage des sucres et des acides organiques.....	87
8.	Etude de l'application des biosurfactants	88
8.1.	Test de la stabilité des biosurfactants.....	88

8.2.	Production en bioréacteur Batch-----	89
8.3.	Biodégradation du diesel sur sable-----	90
Chapitre 3	92
Résultats et discussion	92
1. Isolement et screening des souches de <i>Pseudomonas sp.</i> ayant un potentiel de production des biosurfactants	93
1.1.	Introduction-----	94
1.2.	Isolement des <i>Pseudomonas</i> et caractérisation morphologiques des isolats-----	95
1.3.	Screening des souches productrices des molécules à activité biosurfactantes-----	95
1.4.	Identification des isolats sélectionnés pour leurs activités biosurfactantes-----	98
1.5.	Etude de la stabilité des biosurfactants-----	101
1.6.	Test de la dégradation du Diesel sur Sable-----	102
1.7.	Discussion-----	104
2. Purification des biosurfactants et identification de leurs structures	108
2.1.	Introduction-----	109
2.2.	Caractérisation des biosurfactants produits par les souches E39, E311 et E313-----	110
2.3.	Purification des biosurfactants par des techniques chromatographiques-----	113
2.4.	Semi-purification et concentration par précipitation acide-----	116
2.5.	Purification par un processus d'ultrafiltration/Diafiltration-----	117
2.6.	Identification de la structure chimique des biosurfactants-----	118
2.7.	Prédiction de la structure des biosurfactants par l'analyse du génome de la souche de <i>Pseudomonas sp. E313</i> par des outils bioinformatiques-----	120
2.8.	Discussion-----	123
3. Optimisation de la production des biosurfactants de <i>Pseudomonas sp. E313</i> moyennant la méthodologie des plans d'expériences	127
3.1.	Introduction-----	128
3.2.	Optimisation des conditions de cultures-----	129
3.2.1.	Cinétique de la croissance.....	129
3.2.2.	Optimisation de la température.....	130
3.2.3.	Optimisation du pH.....	131
3.2.4.	Optimisation de l'aération.....	131
3.3.	Optimisation de la composition du milieu de culture de <i>Pseudomonas sp. E313</i> pour la production des lipopeptides A et B-----	132
3.3.1.	Utilisation du plan qualitatif D-optimale.....	132

3.4.	Optimisation de la composition du milieu de culture de <i>Pseudomonas sp. E313</i> en utilisant un Plan composite centré	141
3.5.	Production des lipopeptides A et B de <i>Pseudomonas sp. E313</i> à l'échelle fermenteur 146	
	Discussion	149
	Conclusion	154
	&	154
	Perspectives.....	154
	Valorisations scientifiques	158
	Références bibliographiques.....	160
	Annexes	178
	Biosurfactant and bioemulsifying activities of syringafactin producing <i>Pseudomonas spp.</i> strains isolated from oil contaminated soils	186
	Fig. 3 Whole-cells MALDI-ToF mass spectra of the three selected biosurfactant isolates, (A): <i>Pseudomonas spp.</i> E39, (B): <i>Pseudomonas spp.</i> E311. (C): <i>Pseudomonas spp.</i> E313	226
	Table 1 Assessment of biosurfactant and emulsifying activities of <i>Pseudomonas</i> isolates obtained from oil contaminated soil.....	226

Remerciement

Je tiens à remercier Pr. Pascal Dhulster directeur de l'institut Charles Viollette et mon co-directeur de thèse, Ainsi que Pr. Samia Chaabouni directrice de l'unité enzymes et bioconversion pour la confiance qu'ils m'aient accordé afin de pouvoir réaliser ma thèse en cotutelle au sein de leurs établissements pendant ces 4 dernières années.

Je tiens à remercier particulièrement Pr. Philippe Jacques, mon directeur de thèse, pour sa confiance tout au long de ma thèse et ses conseils indispensables et ses compétences scientifiques qui m'ont aidé à diriger et orienter ma thèse. Je remercie également Dr. Dhouha Ghribi Aydi la co-directrice de thèse pour ses conseils, ses connaissances, son enthousiasme qui m'ont aidé à bien mené ce travail.

Je remercie Dr. Didier Lecouturier pour son co-encadrement durant mes 4 ans de thèse et mon stage de fin d'études d'ingénieur. Son aide précieux, sa grande disponibilité, et sa veille à l'avancée de mes travaux ont été indispensables pour le bon déroulement de mes travaux de recherche.

Je remercie également Dr. Gabrielle Châtaigné, ingénieur de recherche à l'institut Charles Violette, pour son aide indispensable dans les techniques analytique et ses conseils si précieux et notamment en biochimie.

Toute ma reconnaissance s'adresse également pour Dr. Alice Rochex qui a contribué efficacement à mes travaux par ses conseils et son aide précieux et notamment en microbiologie, et surtout ses relectures minutieuses de mon article scientifique et la correction de ma thèse.

Je tiens aussi à remercier Pr. Valérie Leclère pour ses formations dans le domaine bioinformatique qui m'ont été très bénéfiques et indispensables pour la complémentarité de ces travaux. Je remercie également Dr. Qassim Esmaeel pour son aide précieux dans les expériences de biologie moléculaire.

Je remercie l'ensemble du jury qui a accepté de d'évaluer mes travaux réalisés tout au long de ces derniers 4 ans. Je remercie Pr. Nicole Orange et Pr. Slim Tounsi d'avoir accepté de relire mon manuscrit de thèse et d'en être rapporteurs. Je remercie également Pr. Mohamed Chamkha et Pr. Christian Larroche d'avoir accepté d'en être examinateurs.

Merci aux étudiants que j'ai encadrés, Zarasoa, Mélina, Hanitra et Fabien pour leur contribution à mes travaux de thèse.

J'exprime ma reconnaissance également à Dr. Krasimir Dimitrov, Dr. Didier Lecouturier, Dr. Peggy Vauchel, Dr. François Coutte et particulièrement Mr. Bertrand Fertin, ingénieur de recherche à la Halle technologique avec lesquels j'ai effectué mes heures d'enseignements en génie des procédés au cours de ces derniers mois. Je les remercie pour leur sympathie, leur soutien et conseils. Je remercie Pr. Pascal Dhulster pour sa confiance en me permettant d'effectuer ces heures d'enseignement et d'acquérir une expérience pédagogique.

Je remercie toute l'équipe du l'institut Charles viollette et de l'unité enzymes et bioconversion et particulièrement Mr Max BECHET pour ses conseils, sa bonne humeur ainsi que pour ses aides pratiques en biologie moléculaires. Je remercie aussi l'équipe technique et notamment François LENO et Corinne BOISTEL pour tout le matériel fourni et pour les centaines de cycles d'autoclavages effectués. Un grand merci pour la fine équipe des doctorants ou docteurs avec lesquels j'ai travaillé au cours de ces dernières années.

Je remercie finalement, toute ma famille et plus particulièrement ma mère qui a toujours cru en moi et soutenu surtout dans les moments difficile. Mes réussites sont grâce à elle, qu'elle trouve dans ce travail la preuve de ma profonde reconnaissance et mon grand amour. Merci à mon père Najib, mon frère Alaa et ma sœur Mariem pour leur soutien et disponibilité. Je remercie aussi mon fiancé Omar, pour sa patience, ses encouragements et pour tout son amour qui était pour moi une source de motivation depuis que nous étions au lycée. Merci à mon oncle, mes tantes et plus particulièrement ma tante Hamida pour son grand soutien et à mes chers cousins et cousines.

Résumé

Des souches de *Pseudomonas* ont été isolées à partir d'échantillons de sol contaminés par les hydrocarbures ou par de l'huile végétale et d'effluent industriel en vue d'en sélectionner les bactéries ayant un potentiel de production des molécules biosurfactantes. Le criblage a été réalisé en s'appuyant essentiellement sur la mesure de la tension de surface et l'activité émulsifiante. Trois souches ont été choisies pour leurs activités biosurfactantes et émulsifiantes intéressantes. Une identification phénotypique et moléculaire des souches sélectionnées a été réalisée en se basant essentiellement sur le séquençage de leurs ARNr 16S et dont l'arbre phylogénétique a révélé qu'il s'agit de souches sont génétiquement très proches et appartiennent au groupe des *Pseudomonas putida* avec une grande similarité au *Pseudomonas alkylphenolica* KL28 (99%). L'étude de l'applicabilité des biosurfactants produits a été évaluée en testant leur stabilité à des conditions extrêmes de pH, Température et salinité. Les résultats ont révélés que ces biosurfactants ont maintenu leurs activités à un intervalle de pH compris entre 6 et 12, à une température allant jusqu'à 80°C et à une forte salinité (10%). L'étude du potentiel des souches productrices des biosurfactants dans la dégradation du diesel dans les sols contaminés a été réalisée pour une durée de 1 mois. Les résultats ont montré que les 3 souches possèdent une capacité de dégradation du diesel sur sable avec des débits d'élimination considérables. Une identification de la nature chimique des biosurfactants produits en utilisant une chromatographie sur couche mince (CCM) et la spectrométrie de masse MALDI-ToF sur des surnageants semi-purifiés par une précipitation acide a révélés que ces molécules sont de nature lipopeptidique et ayant des masses comprises à l'intervalle de masse des syringafactines. L'identification structurale de ces molécules a été effectuée en spectrométrie de masse faite sur les biosurfactants purifiés par des techniques chromatographiques et membranaires et des études bioinformatiques sur le génome bactérien séquencé. Les résultats de cette identification ont été obtenus en combinant les révélations issus de ces 2 dernières techniques a montré qu'il s'agit de 2 lipopeptides ayant des structures inconnus et qui sont ~89% similaires aux Syringafactines et aux cichofactines. Une optimisation des conditions de culture a été ensuite réalisée en utilisant des plans d'expériences qualitatifs et quantitatifs. La fermentation Batch réalisée dans les conditions optimisées a montré une augmentation de la production des lipopeptides d'un facteur de 2,6.

Mots clés : Pseudomonas, biosurfactants, bioémulsifiants, bioremédiation, syringafactines, Optimisation






Abstract:

Pseudomonas strains have been isolated from hydrocarbon-contaminated soil, industrial effluent and vegetable oil samples for the purpose of selecting bacteria having the potential of biosurfactant molecules production. The screening was carried out based essentially on the measurement of the surface tension and the emulsifying activity. Three strains have been chosen for their interesting biosurfactant and emulsifying activities. A phenotypic and molecular identification of the selected strains was carried out based essentially on 16S rRNA sequencing and whose phylogenetic tree revealed that the 3 selected strains are genetically very close and belong to the group *Pseudomonas putida* with great similarity to *Pseudomonas alkylphenolia* KL28 (99%). The study of the produced biosurfactants applicability, was evaluated by testing their stability under extreme conditions of pH, temperature and salinity. Results revealed that these biosurfactants maintained their activities at a pH range of 6 to 12, at a temperature of up to 80°C and high salinity (10%). The study of the biosurfactant-producing strains potential in diesel degradation in contaminated soils was carried out for duration of 1 month. Results showed that the 3 strains possess a capacity of diesel degradation on sand with considerable disposal rates. An identification of the produced biosurfactants chemical nature using thin layer chromatography (TLC) and MALDI-ToF mass spectrometry on semi purified supernatants by acid precipitation revealed that these molecules have lipopeptidic nature and having masses within syringafactins mass range. The structural identification of these molecules was carried out using purified biosurfactants on chromatographic and membrane techniques by mass spectrometry and bioinformatic studies of the bacterial genome sequenced. Identification results were obtained by combining the revelations resulting from these two techniques and showed that the produced molecules are 2 new octalipopeptides and are ~ 89% similar to Syringafactins and cichofactines. Optimization of the culture conditions of the produced lipopeptides was then carried out using qualitative and quantitative experimental designs. Batch fermentation carried out under the optimized conditions showed an increase in the production of the alkylfactins by a factor of 2.6.

Key words: *Pseudomonas*, biosurfactants, bioemulsifiers, bioremediation, syringafactin, optimization

Liste des Figures

- Fig.1** : Schéma d'une molécule biosurfactante
- Fig.2** : Schéma de la tension de surface, la tension interfaciale et la solubilisation une fonction de la concentration en tensioactif et représentation de la concentration micellaire critique (CMC) (Mulligan, 2005)
- Fig.3** : Propriété moussante et formation de bulles à l'interface liquide-air par une molécule surfactante
- Fig.4** : Propriété émulsifiante et la formation d'émulsions entre deux liquides immiscibles d'une molécule surfactante
- Fig.5** : Observation microscopique de cellules de *Pseudomonas aeruginosa* sp. (Brooks et al., 2013)
- Fig.6** : Schéma récapitulatif des fonctions biologiques potentielles des biosurfactants produits par des bactéries du genre *Pseudomonas* (D'aes et al., 2010)
- Fig.7** : Mécanisme de récupération des hydrocarbures par l'intervention des biosurfactants en fonction de leurs masses moléculaires (Pacwa-Płociniczak et al., 2011)
- Fig.8** : Structures de différentes NRPs sidérophores produits par des bactéries du genre *Pseudomonas*
- Fig.9** : Réaction d'activation d'un monomère sélectionné par les domaines A en aminoacyl adénylate et sa fixation sur le domaine (Kasai et al., 2012)
- Fig.10** : Schéma des différentes étapes de biosynthèse de peptide non ribosomial par une synthétase (Condurso et Bruner, 2012)
- Fig.11** : Localisation des domaines secondaires au niveau d'un module d'élongation (Stachelhaus et al., 2002)
- Fig.12** : Schéma de la biosynthèse linéaire pour les α -aminoadipyl-cysteinyl-D-valine (Mootz et al., 2002)
- Fig.13** : Schéma de la biosynthèse itérative : cas de l'entérobactine (Mootz et al., 2002)
- Fig.14** : Schéma de la biosynthèse non linéaire : cas de la vibriobactine (Mootz et al., 2002)
- Fig.15** : Schéma de la méthode de Du Noüy ring pour la mesure de la tension de surface
- Fig.16** : Représentation schématique d'un bioréacteur batch moussant (Coutte, 2009)
- Fig.17** : Représentation schématique d'un bioréacteur utilisé pour les essais de dégradation du diesel sur sable

- Fig.18** : Mesure de la F_{CMC} par une série de dilutions des surnageants de culture des souches E33b (), E38b (), E39 (), E311 () et E313 ()
- Fig.19** : Arbre phylogénétique des séquences de gène de l'ADNr 16S obtenu par la méthode du Neighbour-joining montrant la classification des souches productrices des biosurfactants avec différentes souches du genre *Pseudomonas* et une souche out-group: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145T
- Fig.20** : Etude des conditions environnementales sur la stabilité des biosurfactants produits par les souches E39, E311 et E313 par l'évaluation de l'effet de la température, le pH, et la salinité sur l'activité résiduelle tensioactive (a) et activité résiduelle émulsifiante (b)
- Fig.21** : Suivi de la biodégradation totale des hydrocarbures pétroliers (HPT) par les souches E39, E311 et E313 dans les sols diesel contaminés
- Fig.22** : Détection de la nature des biosurfactants produits par E39, E311 et E313 en chromatographie sur couches mince en utilisant la ninhydrine, l'antrone et le α -naphthol comme réactifs
- Fig.23** : Spectre de masse MALDI-ToF des colonies des trois isolats produisant de biosurfactants sélectionnés, (A): *Pseudomonas E39*, (B): *Pseudomonas E311*. (C): *Pseudomonas E313*
- Fig.24** : Chromatogrammes issus de l'analyse du surnageant de culture de la souche *Pseudomonas sp. E313* en HPLC/MS à travers une colonne C18 en utilisant deux gradients d'élutions différents
- Fig.25** : Chromatogrammes issus de l'analyse du surnageant de culture de la souche *Pseudomonas sp. E313* en RP-HPLC à travers une colonne C18
- Fig.26** : Spectre de masse des lipopeptides LPA et LPB après purification par HPLC du surnageant de *Pseudomonas sp. E313*
- Fig.27** : Chromatogrammes de HPLC-MS de l'extrait brut de biosurfactants et du surnageant de culture de la souche *Pseudomonas sp. E313* analysés à travers une colonne C18
- Fig.28** : Spectre de masse des filtrats issus de la purification par ultrafiltration/diafiltration des surnageants de culture des *Pseudomonas sp. E313* à travers des membranes de taille de seuil de coupure de 5 kDa (a) et 10 kDa (b)
- Fig.29** : Spectre MALDI-MS/MS issus de la rupture de la liaison entre l'acide gras et le premier acide aminé Analyse de la fragmentation ESI-MS / MS du lipopeptide A de masse $[M+H]^+$ à m/z 1068,6 et du lipopeptide B de masse $[M+H]^+$ à m/z 1082,6 avec la représentation des sites de clivage dans la structure proposée des métabolites qui produirait des ions b et y.

- Fig.30** : Représentation schématique des gènes et protéines impliqués dans la biosynthèse des lipopeptides produits par la souche de *Pseudomonas sp. E313* qui montre l'organisation modulaire des différents domaines des protéines codées par les gènes *ctg49_173* et *ctg49_173* ainsi que la spécificité des domaines d'adénylation qui est indiquée sous chaque module
- Fig.31** : Cinétiques de la croissance de *Pseudomonas sp. E313* (♦) et de la production des lipopeptides A et B (●) suivies pendant 72 heures
- Fig.32** : Evaluation de la croissance des souches de *Pseudomonas sp. E313* (a) et de la production des lipopeptides A et B (b) en fonction de la température à 48h de culture
- Fig.33** : Evaluation de la croissance de *Pseudomonas sp. E313* (a) et de la production des lipopeptides A et B (b) à différents pH initiaux de culture
- Fig.34** : Evaluation de la croissance des souches de *Pseudomonas sp. E313* (a) et de la production des lipopeptides A et B (b) à différentes vitesses d'agitation
- Fig.35** : Histogrammes des coefficients de corrélation du modèle de chaque réponse du plan D-optimale 1
- Fig.36** : Influence des facteurs du plan D-optimale 1 et de leurs interactions sur la croissance de *Pseudomonas sp. E313* présentée par ordre d'importance décroissant
- Fig.37** : Influence des facteurs du plan D-optimale 1 et de leurs interactions sur la production de lipopeptides présentée par ordre d'importance décroissant
- Fig.38** : Effet des interactions significatives des différents facteurs sur la production des lipopeptides selon le plan qualitatif 1
- Fig.39** : Influence des facteurs du plan D-optimale 2 et de leurs interactions sur la croissance de *Pseudomonas sp. E313* présentée par ordre d'importance décroissant
- Fig.40** : Ordre et tendance de l'influence des facteurs du plan D-optimale 2 sur la production des lipopeptides
- Fig.41** : Effet des interactions significatives sur la production des lipopeptides entre les différents facteurs du plan D-optimale 2
- Fig.42** : La courbe de surface de réponse de la croissance bactérienne en fonction des effets des facteurs X2 et X6
- Fig.43** : Courbe de surfaces de réponses de la production des lipopeptides en fonction des facteurs prépondérants
- Fig.44** : Cinétiques de croissance, de production des Lipopeptides A et B, des concentrations de glucose et d'oxygène dissous et évolution du pH lors des fermentations batch de la souche de *Pseudomonas sp. E313* en milieu M9 (BR1) (a) et en milieu M9 optimisé (BR2) (b)

Liste des tableaux

- Tableau 1** : Les lipopeptides biosurfactants produits par des bactéries du genre *Pseudomonas* et leurs activités biologiques
- Tableau 2** : Structure des lipopeptides appartenant à la famille des amphisines
- Tableau 3** : Structure des lipopeptides appartenant à la famille des plusbacines produits par des *Pseudomonas. Spp* (Shoji et al., 1992)
- Tableau 4** : Structure et masses des lipopeptides appartenant à la famille des viscosines
- Tableau 5** : Structure et masses des lipopeptides appartenant à la famille des syringomycines
- Tableau 6** : Structure et masses des lipopeptides appartenant à la famille des orfamides (Gross et al., 2007)
- Tableau 7** : Structure et masses des lipopeptides appartenant à la famille des Putisolvines (Kuiper et al., 2004)
- Tableau 8** : Structure des lipopeptides appartenant à la famille des syringopeptines
- Tableau 9** : Structure et masses des lipopeptides appartenant à la famille des syringafactines
- Tableau 10** : Structure et masses des lipopeptides appartenant à la famille des tolaassines (Bassarello et al., 2004)
- Tableau 11** : Structure des amorces universelles S1 et S2
- Tableau 12** : Gradient d'élution des biosurfactants étudiés en CLHP-MS en utilisant l'eau et l'acétonitrile comme phase mobile
- Tableau 13** : Facteurs et modalités du premier plan d'expériences qualitatif
- Tableau 14** : Facteurs et modalités du deuxième plan d'expérience
- Tableau 15** : caractérisation morphologiques des isolats bactériens
- Tableau 16** : Criblage qualitatif des isolats pour leur production des molécules ayant des activités biosurfactantes
- Tableau 17** : Evaluation de l'activité biosurfactante par le test de l'étalement d'huile pour les souches sélectionnées
- Tableau 18** : Evaluation de l'activité émulsifiante par mesure de l'indice d'émulsification (E24) des solutions de biosurfactants des souches sélectionnées

- Tableau 19** : Caractérisation biochimique par des tests réalisés en galerie API 20 NE des souches sélectionnées pour leurs activités biosurfactantes
- Tableau 20** : Caractérisation chimique préliminaire de la nature des biosurfactants produits par les souches E39, E311 et E313 après séparation par chromatographie sur couche mince
- Tableau 21** : Masses des différents adduits de lipopeptides obtenues par l'analyse des spectres MALDI-ToF des colonies des souches E39, E311 et E313 sur milieu solide milieu TSA
- Tableau 22** : Gradients d'éluion utilisés en CLHP-MS pour la séparation des lipopeptides A et B à travers une colonne C18
- Tableau 23** : Calcul des fragments d'acides aminés issus de la fragmentation de la partie peptidique du lipopeptide de masse $[M+H]^+$: m/z 1068,7
- Tableau 24** : Calcul des fragments d'acides aminés issus de la fragmentation de la partie peptidique du lipopeptide de masse $[M+H]^+$: m/z 1082,7
- Tableau 25** : Prédiction des acides aminés synthétisés par chaque module par l'analyse des codes spécifiques du domaine d'adénylation de chaque module
- Tableau 26** : Domaine expérimental des facteurs sélectionnés (g/l)
- Tableau 27** : Effet de facteurs ayant des effets significatifs et de leurs interactions significatives sur la croissance des souches de *Pseudomonas sp. E313*
- Tableau 28** : Effet des facteurs et de leurs interactions sur la production des lipopeptides par la souche *Pseudomonas sp. E313*
- Tableau 29** : Bilan de culture de la souche de *Pseudomonas sp. E313* en milieu M9 et milieu M9 optimisé en fermenteur

Liste des abréviations

AA	: Acide Aminé
ACN	: Acétonitrile
ADH	: Arginine Dihydrolase
ADN	: Acide Désoxyribonucléique
ADNr	Acide Désoxyribonucléique ribosomique
AG	: Acide Gras
ARNr	: Acide Ribonucléique ribosomique
ATP	: Adénosine Triphosphate
BR	: Bioréacteur
CLP	: Cycliques Lipopeptides
CCM	: Chromatographie sur Couche Mince
CMC	: Concentration Micellaire Critique
D	: Dextrogyre
DO	: Densité Optique
E24	: Indice d'émulsification
EA	: Activité émulsifiante
ES	: Stabilité de l'émulsion
GCMS	: Gas Chromatography coupled to Mass spectrometry
HLB	: Hydrophile-Lipophile Balance
IgE	: Immunoglobuline E
L	: Lévoxyre
LB	: Luria-Bertani
LC/MS	: Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry
RSM	: Reponse Surface Methodology
M9	: Milieu minimal M9
MALDI-ToF	: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight
MOPS	: Acide 3-[N-morpholino]- Propoane Sulfonique
MS	: Matière Sèche
MWCO	: Molecular Weight Cut-Off
NCBI	: National Centre for Biotechnology Information
NRP	: Non Ribosomal Peptide
NRPS	: Non ribosomal peptide synthetase

OD	: Oxygène Dissous
PCP	: Peptidyl Carrier Protein
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PES	: Polyéthersulfone
PKS	: Polyketide Synthetase
RP-HPLC	: Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography
RPM	: Tour Par Minute
SDS	: Dodécylsulfate de Sodium
SPE	: Solid Phase Extraction
TBE	Tri-Borate-EDTA
TFA	: Acide Trifluoroacétique
TLC	: Thin Layer Chromatography
TPH	: Total Petroleum Hydrocarbon
TSA	: Tryptic Soy Agar
TSB	: Tryptic Soy Broth
UV	: Ultra-Violet

Unités :

μJ	: Microjoules
μL	: Microlitres
μM	: Micromolaires
μm	: Micromètres
$^{\circ}\text{C}$: Degrés Celcius
cm	: Centimètres
gL^{-1}	: Grammes par Litre
g/gMS	: Grammes par gramme de Matière Sèche
gMS/g	: Grammes de Matière Sèche par gramme
gMS/h	: Grammes de Matière Sèche par heure
gMS/L	: Grammes de Matière Sèche par Litre
h	: Heures
kDa	: Kilodalton
kV	: Kilovolt

L	: Litres
L/h	: Litres par heure
M	: Molaires
mg/L	: Milligrammes par Litre
mL	: Millilitres
Mm	: Millimètres
mN/m	: Millinewton par mètre
nm	: Nanomètres
MS/h	: Matière sèche par heure
MS/L	: Matière sèche par litre
vvm	: Volume d'air par volume de milieu de culture par minute

Acides Aminés :

Ala	: Alanine
Arg	: Arginine
Asn	: Asparagine
Asp	: Aspartate
Dab	: Acide 2,4 diaminobutyrique
Dhb	: l'acide 2,3 dihydro-2-aminobutyrique
Gln	: Glutamine
Glu	: Acide glutamique
Gly	: Glycine
His	: Histidine
Ile	: Isoleucine
Leu	: Leucine
Lys	: Lysine
Phe	: Phénylalanine
Pro	: Proline
Ser	: Sérine
Thr	: Thréonine
Tyr	: Tyrosine
Val	: Valine

AVANT PROPOS

Les Surfactants sont des substances amphiphiles ayant des propriétés tensioactives et qui sont capables de réduire la tension inter-faciale entre deux liquides ou un liquide et un solide ce qui augmente de plus en plus leur intérêt pour leurs applications dans des différents domaines industriels. Cependant les surfactants d'origine chimique, notamment issus de la pétrochimie présentent une limite de leur utilisation à cause de leur forte toxicité et leur faible biodégradabilité d'où le recours à l'utilisation de substances de nature biologique comme un alternatif plus bénéfique pour l'environnement appelés **Biosurfactants**.

Les Biosurfactants sont des tensioactifs naturels produits par différents microorganismes notamment les bactéries, les champignons et les levures. Ces molécules sont généralement produites par des microorganismes isolés à partir des surfaces contaminés par les huiles organiques et les hydrocarbures et ayant la capacité d'utiliser ces substrats comme source de carbone. Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont bien connues pour leur capacité à utiliser certains contaminants comme les huiles végétales les hydrocarbures, les huiles minérales comme source de carbone pour produire les biosurfactants ce qui en fait de bons candidats notamment dans les processus de bioremédiation. En effet, les biosurfactants sont capables de s'accumuler entre deux phases immiscibles et réduire la tension inter-faciale augmentant ainsi la solubilisation des contaminants faiblement solubles dans l'eau et facilitant ainsi l'accès et la dégradation de ces substances par les bactéries.

Les biosurfactants dérivés des *Pseudomonas* sont aussi impliqués dans plusieurs fonctions bactériennes comme l'essaimage et la colonisation par le changement de la viscosité de surface comme c'est le cas pour les viscosines, l'attachement et la formation des biofilm comme pour les putisolvines et les arthrofactines. Ils ont aussi la capacité de protéger les bactéries contre les composés toxiques et les métaux lourds en les encapsulant à l'intérieur des micelles qu'ils forment. Ces différentes propriétés ainsi que leurs importantes activités biologiques démontrent l'étendue considérable de leur spectre d'application dans les domaines environnementaux, industriels et agronomiques.

Cependant, la production des biosurfactants à une grande échelle et leur commercialisation est une contrainte due aux faibles quantités produites et au coût relativement élevé des procédés de purification et des milieux de cultures bactériennes utilisés. D'où la nécessité de renforcer la maîtrise de la production de ces molécules et l'utilisation de procédés de bio-séparation plus efficaces et moins coûteux.

L'objectif de ce travail est de caractériser de nouveaux biosurfactants produits par des bactéries du genre *Pseudomonas* isolées à partir d'un sol contaminé par les hydrocarbures, d'étudier leur potentiel tensioactif et leurs propriétés émulsifiantes et de les identifier en utilisant une approche combinée entre la spectrométrie de masse et la bioinformatique. Une méthode simple de séparation et de purification de ces molécules sera ensuite élaborée ainsi que des conditions de culture optimales pour augmenter leur productivité.

CHAPITRE I :

INTRODUCTION

1. Synthèse bibliographique

1.1. Les biosurfactants

Les biosurfactants représentent un groupe divers de molécules tensioactives qui sont principalement synthétisés par différents types de microorganismes incluant les bactéries, les champignons et les levures et qui sont généralement produits d'une manière extracellulaire ou en faisant partie de la membrane cellulaire (Mata-Sandoval et al., 1999). La plupart des microorganismes produisant des biosurfactants sont isolés à partir des milieux contaminés des hydrocarbures provenant des huiles organiques comme le pétrole issus souvent des effluents industriels.

Les biosurfactants ont une structure amphiphile contenant une moitié hydrophobe qui est formée généralement d'une longue chaîne d'acide gras ou d'acide gras hydroxylé avec des différentes longueurs de chaîne, et la tête hydrophile qui peut être un acide aminé, un carbohydrate, un peptide, un alcool, un acide carboxylique ou du phosphate (figure 1). Ainsi les surfactants contiennent à la fois une partie soluble dans l'eau et une partie insoluble

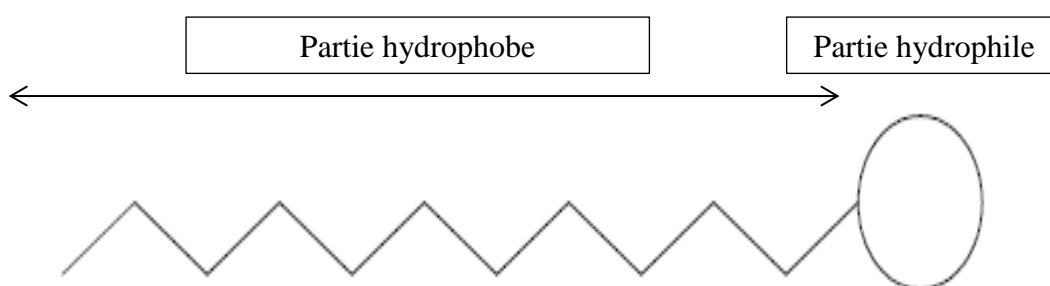


Fig. 1 : Schéma d'une molécule biosurfactante

Les biosurfactants agissent en s'accumulant entre deux liquides immiscibles ou une interface liquide/solide par la réduction de la tension de surface (Liquide/Air) ou de la tension interfaciale (Liquide/Liquide) responsables de la répulsion entre les différentes phases, ce qui permet de les mélanger et d'augmenter leurs propriétés de solubilisation, à l'identique des surfactants chimiques. Les biosurfactants permettent ainsi la solubilité des substrats faiblement solubles dans l'eau, et facilitent leur assimilation par les microorganismes. Ces molécules permettent aussi l'émulsification des substrats carbonés et de faciliter l'adhésion des cellules

aux hydrocarbures afin de l'utiliser comme un substrat pour croître (Navon-Venezia et al., 1995).

Récemment l'intérêt de l'utilisation des biosurfactants a augmenté en raison de leur diversité, et flexibilité dans les opérations unitaires industrielles, ainsi que leur impact réduit sur l'environnement par rapport aux surfactants de nature chimique en raison de leur faible toxicité et de leur forte biodégradabilité (Santos et al., 2016).

1.1.1. Classification des biosurfactants selon leur nature chimique

Les biosurfactants sont classés en se basant sur la diversité de leur structure qui est généralement dépendante du microorganisme qui la synthétise. Les biosurfactants se répartissent en deux groupes majeurs qui sont : les substances à un petit poids moléculaire subdivisés en six groupes principaux qui sont : les lipopeptides, les glycolipides, les phospholipides, les tréhaloses et les acides gras, et les substances avec un grand poids moléculaire comme les polymères microbiens.

1.1.1.1. Les lipopeptides

Les lipopeptides biosurfactants sont des molécules formées d'une chaîne d'acide gras lié à un peptide produites principalement par des bactéries du genre *Bacillus* et *Pseudomonas* ou également par des champignons et des levures comme *Streptomyces*, *Aspergillus*, *Serratia* et *Actinoplanes* (Liu et al., 2015). Les lipopeptides sont répartis en des molécules cycliques ou linéaires selon leurs structures chimiques. Les lipopeptides cycliques ont une structure moléculaire cyclique avec la formation d'une liaison entre le groupement carboxylique à l'extrémité C-terminale de la chaîne peptidique à un groupement amine de la chaîne ou au groupement hydroxylé de l'acide gras attaché, tandis que les lipopeptides linéaires contiennent une chaîne peptidique linéaire connecté à un acide gras attaché au groupement α -amine de la chaîne (Liu et al., 2005).

1.1.1.2. Les glycolipides

Les glycolipides sont les biosurfactants majoritairement produits. Leur structure est formée par une partie lipidique attachée à un carbohydrate dont la liaison est assurée par un

groupement ester ou éther. Parmi les glycolipides, on distingue principalement les rhamnolipides, les sophorolipides et les tréhaloses.

a) Les rhamnolipides

Les rhamnolipides forment un groupe de biosurfactant qui est largement étudié et qui est produit par différentes espèces de *Pseudomonas*. Ces molécules sont des glycolipides dans lesquels un ou deux rhamnoses sont attachés à une ou deux molécules d'acide β -hydroxydécanoïque. Ces résidus peuvent être à la fois saturés ou bien l'un peut être saturé et l'autre insaturé avec une ou deux doubles liaisons. La partie lipidique est attachée au rhamnose par une liaison O-glycosidique tandis que les deux groupes 3-hydroxyacylés sont réunis par la formation d'une liaison ester (Karanth et al., 1999, Shaw 1975). Les rhamnolipides sont majoritairement produits par *Pseudomonas aeruginosa* et sont des biosurfactants efficaces appliqués à la dégradation des substances hydrophobes des sols contaminés (Rahman et al., 2007).

b) Les sophorolipides

Les sophorolipides sont des groupes de biosurfactants produits par *Torulopsis sp.* Ils consistent à un sucre dimérique : le sophorose attaché à un acide gras hydroxylé par une liaison β -glycosidique (Asmer et al., 1988). Le sophorose consiste à un diholoside constitué de deux unités de glucoses reliées par une liaison osidique β . Il existe deux types de sophorolipides : les sophorolipides acides ayant un acide carboxylique libre dans la partie lipidique, et les sophorolipides lactoniques qui forment un anneau lactone macrocyclique avec le groupement 4-hydroxy du sophorose par une estérification intramoléculaire (Hu et Ju., 2001). Les sophorolipides sont appliqués dans le domaine cosmétique comme agents bactériostatiques et antipelliculaires.

c) Les tréhalolipides

Les tréhalolipides sont des biosurfactants principalement produits par des bactéries du genre *Mycobacteriums* et *Rhodococcus*, et présentent des propriétés biologiques et physicochimiques intéressantes. Ce sont des tréhaloses disaccharides liés en position C6 et C6' à l'acide mycolique et associé à la paroi. Les acides mycoliques sont des acides gras formés par une longue chaîne α -ramifiée β -hydroxylé (Lang et Philp, 1998). Les tréhalolipides des différents organismes se distinguent par la structure et la taille de leur acide mycolique, ainsi que de leur nombre d'atomes de carbones et leur degré d'insaturation. D'importants domaines

d'application ont été mis en évidence pour ces molécules et notamment les succinoyltrehalolipides qui possèdent une activité d'induction de la différenciation des lignées cellulaires de la leucémie (Sudo et al., 2000), et d'inhiber l'activité de la protéine Kinase C de la lignée cellulaire HL60 de la leucémie promyélocytaire humaine (Isoda et al., 1997).

1.1.1.3. Les phospholipides

Les phospholipides sont connus comme des composés majeurs qui forment les membranes cellulaires microbiens. Ce sont des lipides polaires qui se trouvent naturellement dans les membranes des cellules animales, végétales et des microorganismes. Les phospholipides forment une membrane semi-perméable qui joue un rôle important dans la séparation, le transport et la protection des constituants cellulaires, aussi bien que d'assurer l'intégrité cellulaire. Les phospholipides consistent en une structure d'un glycérol et de deux acides gras attachés à un acide phosphorique (Erikson., 2008). La chaîne d'acide gras constitue la queue lipophile apolaire, tandis que la partie contenant l'acide phosphorique et les groupements qui y sont attachés forment la moitié hydrophile.

1.1.1.4. Les acides gras

Certain microorganismes sont capables de former des acides gras libres lorsque ils sont cultivés en présence des n-alkanes par oxydation (Desai et Banat, 1997). Les acides gras ayant des longueurs de chaîne entre C₁₂ et C₁₄ se montrent les plus tensioactifs. Plusieurs acides gras d'origine microbienne présentent des groupements hydroxyles ou des résidus alkyles. Certains de ces acides gras complexes comme l'acide corynomycologique ont été définis des puissants surfactants (Fujii et al., 1999).

1.1.1.5. Les polymères microbiens

Les biosurfactants polymériques sont des polymères ayant un grand poids moléculaire et qui consistent en des polysaccharides, des protéines, des lipopolysaccharides, des lipoprotéines ou un mélange de ces polymères. Les polymères biosurfactants sont produits par une grande variété de microorganismes et ils possèdent des importantes propriétés comme la haute viscosité, la force élastique et la résistance au cisaillement. Parmi les polymères biosurfactants on distingue essentiellement l'émulsan produit par *Acinetobacter calcoaceticus*, le liposan produit par *Candida lipolytica* et le lipopamanan produit par *Candida tropicalis* (Karanth et al., 1999).

Les biosurfactants peuvent également être classés selon leur charge ionique de la partie polaire de la molécule, ainsi on distingue les biosurfactants anioniques, cationiques, anioniques et les zwitterioniques qui se caractérisent par la coexistence de parties chargées négativement et positivement (Van Ginkel, 1989). En outre, la classification des biosurfactants peut aussi être basée sur leur équilibre hydrophile-lipophile (HLB) qui affecte directement leurs propriétés physico-chimiques (Tiehm, 1994). Cette valeur indique si le biosurfactant favorise l'émulsion de l'eau dans l'huile ou l'huile dans l'eau en le comparant à une valeur HLB des biosurfactants connus.

1.1.2. Les propriétés fonctionnelles des biosurfactants

En raison de leur structure amphiphile, les biosurfactants augmentent la surface préoccupée par les molécules hydrophobes peu solubles dans l'eau et la biodisponibilité de ces substances dans l'eau en changeant les propriétés de surface. L'activité de surface rend les biosurfactants d'excellents agents émulsifiants, moussants et dispersants.

1.1.2.1. Propriétés tensioactive et micellaire

L'efficacité et le rendement sont les caractéristiques essentielles d'un bon biosurfactant : L'efficacité est mesurée par la concentration critique micellaire CMC, et le rendement est lié à la tension de surface (liquide/liquide) et la tension interfaciale (liquide/air) (Barros et al., 2007). La tension de surface est la force par unité de longueur exercée par un liquide en contact avec un autre liquide ou solide. Elle peut être aussi considérée comme une mesure de l'énergie libre par unité de surface. Parmi les liquides connus, l'eau possède la tension de surface la plus élevée qui de 72 mN/m et qui peut être réduite par l'ajout d'un surfactant (Satpute et al., 2010). La tension de surface et la tension interfaciale sont des propriétés importantes des biosurfactants. Les molécules d'eau sont tenues ensemble par de puissantes forces intermoléculaires attractives qui constituent cette tension à la surface. Les surfactants provoquent l'abaissement de la tension de surface, leur concentration micellaire critique (CMC) définie par McBrain (1913) est la concentration initiale à partir de laquelle on obtient la tension de surface minimale (figure 2). Au-dessus de la CMC, les biosurfactants s'agrègent pour former des micelles. La CMC conduit à un changement brusque des propriétés des surfactants comme leur conductivité, viscosité, densité, pression osmotique, et turbidité (Margaritis et al., 1979). La concentration micellaire critique est la concentration en surfactants qui favorise la formation des micelles. Elle est définie par la solubilité du surfactant dans une phase aqueuse et elle est 10 à 40 fois moins importante pour les biosurfactants naturels que pour les surfactants chimiques (Desai et Banat,

1997). Dans certaines études la détermination de la CMC est effectuée d'une manière indirecte par la mesure du facteur de dilution F_{CMC} qui représente la valeur de dilution des biosurfactants à partir de laquelle la CMC est atteinte (Guerra-Santos et al., 1984). La CMC des biosurfactants est incluse entre 1 à 2000 mg/L, tandis que la tension interfaciale (Huile/eau) et la tension de surface sont respectivement d'environ 1 mN/m et 30 mN/m. Un bon biosurfactant est capable de réduire la tension de surface de l'eau de 72 mN/m à 35 mN/m et la tension interfaciale de l'hexadécane de 40 mN/m à 1 mN/m (Santos et al., 2016).

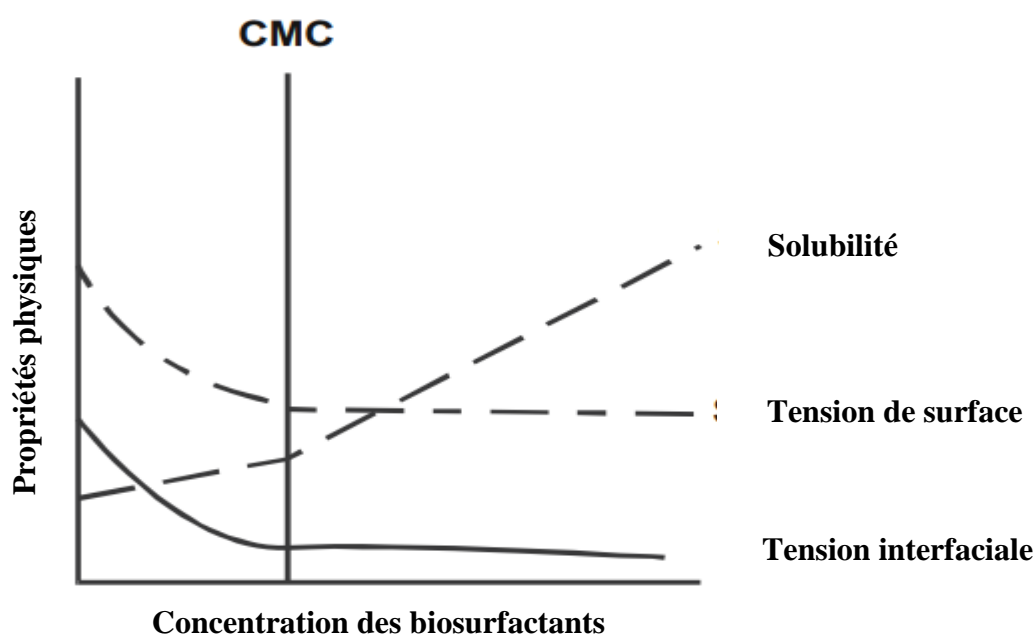


Fig. 2: Schéma de la tension de surface, la tension interfaciale et la solubilisation une fonction de la concentration en tensioactif et représentation de la concentration micellaire critique (CMC) (Mulligan, 2005)

1.1.2.2. Propriété moussante

Les mousses sont des dispersions de gaz dans une phase liquide continue. En effet, les surfactants se concentrent à l'interface liquide-air conduisant à la formation de bulles à l'interface par le liquide résultant la formation de mousse (figure 3). La formation de mousse peut être induit par bullage, qui consiste simplement à l'introduction des bulles de gaz dans la phase liquide, mais elle est majoritairement réalisée par la technique de battage qui consiste à l'incorporation de larges bulles de gaz dans un liquide avant qu'elles soient fractionnées par l'action d'une agitation violente en des plus petites bulles. Des études ont montré que certains

biosurfactants comme la surfactine possèdent d'excellentes propriétés moussantes en comparaison avec des surfactants chimiques comme la SDS (Dubey et al., 2005).

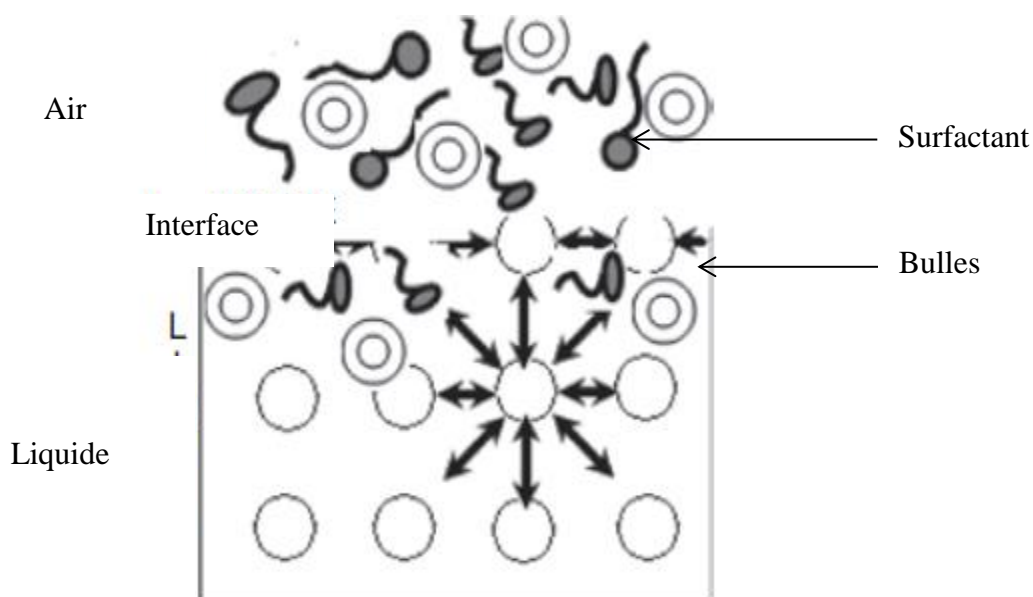


Fig. 3 : Propriété moussante et formation de bulles à l'interface liquide-air par une molécule surfactante

La phase dispersée constituée par les bulles va induire l'apparition d'une aire interfaciale importante et l'augmentation de la tension superficielle, ce qui va engendrer l'agrandissement de ces bulles et la réduction l'énergie libre du système afin de minimiser cette aire. Ainsi, les surfactants assurent la persistance des bulles formées en s'adsorbant à l'interface liquide-air et en réduisant de la tension de surface (Axelos et al., 2006). Le pouvoir moussant d'un surfactant augmente avec l'augmentation de la longueur de la chaîne carbonée, et la quantité de mousse formée est augmentée par la présence de ramifications dans la chaîne hydrophobe (Larpent et Chasseray, 1992). Comme les mousses forment des systèmes thermodynamiquement instables, leur stabilité représente un paramètre important pour caractériser les propriétés moussantes d'un surfactant. Cette stabilité est améliorée en utilisant des molécules amphiphiles à caractère ionique favorisant les répulsions électrostatiques (Larpent et Chasseray, 1992).

1.1.2.3. Propriété émulsifiante

L'émulsification est la dispersion d'un liquide dans une autre phase liquide sous forme de gouttelettes menant au mélange des deux liquides immiscibles (figure 4), ce qui représente

la solubilisation micellaire de manière que les particules qui en résultent sont plus volumineuses.

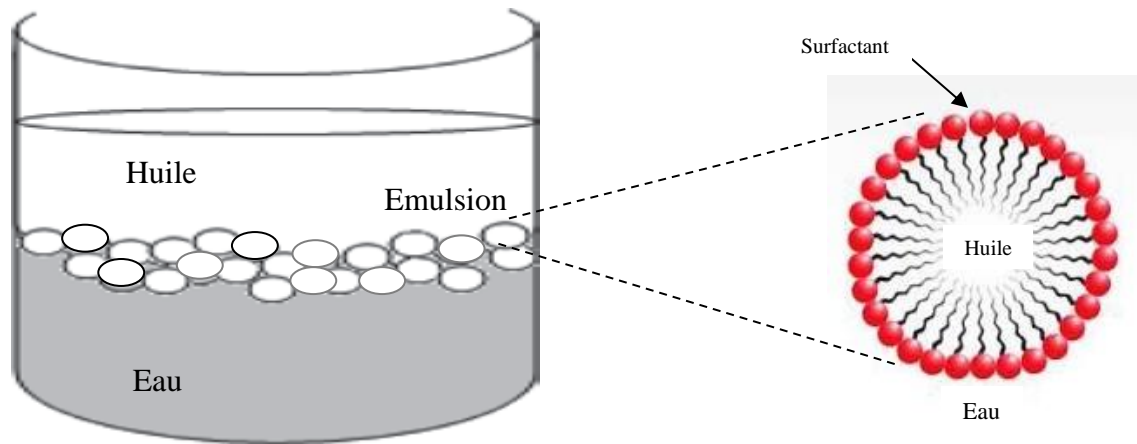


Fig. 4 : Propriété émulsifiante et la formation d'émulsions entre deux liquides immiscibles d'une molécule surfactante

Les propriétés émulsifiantes d'un surfactant sont déterminées par la mesure de l'activité émulsifiante (EA) qui est la capacité d'un surfactant de former une émulsion dans des conditions données. L'EA est directement liée à la taille des gouttelettes formées, qui sont d'autant petites que l'activité est importante. Cependant les émulsions sont des systèmes instables thermodynamiquement dont l'instabilité peut être provoquée par quatre phénomènes qui sont la floculation, la coalescence, le crémage et le murissement d'Ostwald qui est un processus qui mène à la fusion des gouttelettes dispersées pour former gouttelettes de taille supérieure par un phénomène de transfert de matière par l'entremise de la phase continue (Pearce et Kinsella, 1978). La stabilité de l'émulsion (ES) représente donc un autre paramètre qui définit les propriétés émulsifiantes d'un surfactant (Magdassi et al., 1996). L'utilisation d'un agent tension actif a pour rôle d'améliorer la stabilité de l'émulsion établie par la dispersion d'un liquide dans un liquide non miscible par la diminution de tension interfaciale entre ces deux liquides afin d'augmenter l'air interfaciale et de permettre la dispersion.

1.1.3. Méthodes de screening des biosurfactants

En général, le criblage des souches productrices de biosurfactants est basé sur les propriétés physiques des surfactants. En outre, la capacité des souches à interférer avec les interfaces hydrophobes peut être explorée. D'autre part, des méthodes de criblage spécifiques telles que le test colorimétrique ne conviennent que pour un groupe limité de biosurfactants. Les méthodes de criblage peuvent donner des résultats qualitatifs et/ou quantitatifs. Pour un premier criblage d'isolats, les méthodes qualitatives sont généralement suffisantes (Walter et al., 2010). Les principales méthodes de criblage des biosurfactants sont citées ci-après.

1.1.3.1. La mesure directe de la tension de surface et de la tension interfaciale

La mesure directe de l'activité interfaciale ou de surface du surnageant de culture est la méthode de criblage la plus simple et appropriée pour un criblage préliminaire de bactéries produisant des biosurfactants comme ils donnent une forte indication sur la production de biosurfactants. La tension de surface ou interfaciale d'un liquide peut être mesurée par diverses méthodes. La tension de surface diminue avec l'augmentation de la concentration de tensioactif jusqu'à ce que la CMC soit atteinte. Si la concentration de biosurfactant est supérieure à la CMC, l'augmentation de la concentration ne peut pas être détectée. Par conséquent, des échantillons ayant des concentrations différentes de biosurfactant peuvent présenter la même tension de surface. Ce problème peut être résolu par une dilution en série jusqu'à ce qu'à une augmentation brusque de la tension superficielle. La dilution correspondante du surnageant est appelée dilution micellaire critique (CMD) (Duvnjak et al., 1982). De plus, les mesures peuvent être fortement influencées par des facteurs extérieurs tels que le pH et la force ionique la tension interfaciale qui peut résulter de la présence des mono/diglycérides.

1.1.3.2. La méthode de Du-Noüy-Ring

La méthode de Du-Noüy-Ring est basée sur la mesure de la force nécessaire pour détacher un anneau ou une boucle de fil d'une surface ou une interface. La force de détachement est proportionnelle à la tension interfaciale qui peut être mesurée avec un tensiomètre automatisé. Il est important que l'anneau soit être exempt de contaminants, ce qui est généralement assuré par l'utilisation d'un anneau de platine flambé. Une plaque de platine, dite plaque de Wilhelmy, peut également être appliquée de la même manière (Tuleva et al., 2005). Le test de Du-Noüy-Ring est largement utilisé pour le criblage des bactéries productrices de biosurfactants. Cette méthode a pour avantage la précision et la facilité d'utilisation mais a pour

inconvenient que les mesures de différents échantillons ne peuvent pas être effectuées simultanément (Bodour et Miller-Maier, 1998).

1.1.3.3. Le test de 'Drop collapse'

Ce test repose sur la déstabilisation des gouttelettes liquide par des tensioactifs. Par conséquent, des gouttes d'une suspension cellulaire ou d'un surnageant de culture sont placées sur une surface solide revêtue d'huile. Dans le cas d'absence de tensioactifs, les molécules d'eau polaires sont repoussées de la surface hydrophobe et les gouttes restent stables. Dans le cas où le liquide contient des tensioactifs, les gouttes se propagent ou même s'affaissent en raison de la réduction de la force ou la tension interfaciale entre la goutte de liquide et la surface hydrophobe. La stabilité des gouttes dépend de la concentration en tensioactif et elle est en corrélation avec la tension de surface et interfaciale (Jain et al., 1991). De plus, Bodour and Miller-Maier, (1998) ont montré que pour un surfactant pur, ce dosage peut même être quantitatif en mesurant la taille de la goutte avec un micromètre. Le test d'effondrement des gouttes ou 'Drop collapse' est rapide et facile à réaliser, il ne nécessite aucun équipement spécialisé et ne nécessite qu'un petit volume d'échantillon. En revanche, ce test présente une sensibilité relativement faible puisqu'une concentration importante de composés tensioactifs doit être présente pour provoquer un effondrement des gouttes aqueuses sur les surfaces d'huile.

1.1.3.4. La méthode de l'étalement d'huile

Le test d'étalement d'huile a été développé par Morikawa et al., (2000) Une présence de biosurfactants dans le surnageant provoque le déplacement de l'huile et la formation d'une zone de dégagement dont le diamètre sur la surface de l'huile est corrélé avec l'activité tensioactive. Cette méthode est rapide et facile à réaliser, ne nécessite aucun équipement spécialisé et ne nécessite qu'un petit volume d'échantillon. De plus, elle peut être appliquée lorsque l'activité et la quantité de biosurfactant sont faibles. (Płaza et al., 2006; Youssef et al., 2004) ont démontré que la technique d'étalement d'huile est une méthode fiable pour détecter la production de biosurfactants par divers microorganismes.

1.1.3.5. L'activité émulsifiante

La capacité d'émulsification des biosurfactants est un test très connu qui a été développé par Cooper et Goldenberg., (1987). Cette valeur est mesurée en ajoutant le kérosène un échantillon aqueux contenant le biosurfactant. L'indice d'émulsification E24 est calculé en faisant le rapport entre la hauteur de la couche d'émulsion et la hauteur totale du liquide. L'E24

est corrélé avec la concentration en tensioactif. L'évaluation de la capacité d'émulsification est une méthode de criblage simple adaptée à un premier criblage de microorganismes producteurs des biosurfactants. En revanche, l'activité biosurfactante et la capacité d'émulsification ne sont pas toujours corrélées. Par conséquent, cette méthode donne juste une indication sur la présence de biosurfactants (Uzoigwe et al., 2015).

1.1.3.6. Solubilisation de l'antracène cristallin

Willumsen et Karlson., (1997) ont développé un test basé sur la solubilisation de l'antracène cristallin. Cette méthode de criblage est basée sur la solubilisation d'un composé cristallin hautement hydrophobe, l'antracène, par les biosurfactants. La concentration de l'antracène hydrophobe dissous qui corrèle avec la concentration des biosurfactants est mesurée par une méthode photométrique. C'est une méthode de criblage simple et rapide, mais l'antracène pourrait être toxique pour certains microorganismes.

1.1.3.7. Test d'adhésion bactérienne aux hydrocarbures ou 'BATH'

Rosenberg et al., (1980) ont développé la méthode d'adhésion bactérienne aux hydrocarbures, qui consiste en un test photométrique simple pour mesurer l'hydrophobicité des bactéries. Cette méthode est basée sur le degré d'adhérence des cellules à divers hydrocarbures liquides. Les cellules hydrophobes se lient aux gouttelettes d'hydrocarbure et montent avec l'hydrocarbure et sont éliminés de la phase aqueuse. La diminution de la turbidité de la phase aqueuse est corrélée à l'hydrophobicité des cellules. Le pourcentage de cellules liées à la phase hydrophobe (H) est calculé en utilisant l'équation suivante:

$$H = 1 - \frac{A}{A_0} \times 100$$

Avec A0 est l'absorbance de la suspension bactérienne sans ajout de la phase hydrophobe et A l'absorbance du mélange avec la phase hydrophobe. BATH représente une méthode de criblage simple mais indirecte. La capacité des bactéries à adhérer aux hydrocarbures est une caractéristique des microorganismes produisant des biosurfactants (Pruthi et Cameotra, 1997).

1.1.3.8. Test de la plaque d'agar 'CTAB'

La méthode de la plaque d'agar 'CTAB' représente un essai semi-quantitatif pour la détection des glycolipides extracellulaires ou des surfactants anioniques qui a été développée par (Siegmond and Wagner, 1991). Cette méthode consiste à la culture des microorganismes

d'intérêt sur une plaque de gélose contenant les sels minéraux de couleur bleue claire avec le bromure de cetyltriméthylammonium qui est un tensioactif cationique et le bleu de méthylène qui est un colorant basique. En cas de sécrétion de surfactants anioniques par les microorganismes, une paire d'ions insolubles bleu foncé avec le bromure de cetyltriméthylammonium et le bleu de méthylène est formée. Ainsi, les colonies productives sont entourées par des halos bleus foncés. Cette méthode de criblage est simple, mais elle est spécifique aux biosurfactants anioniques. Cependant ce test présente l'inconvénient que le CTAB est nocif et inhibe la croissance de certains microorganismes.

1.1.4. Les procédés de purification des biosurfactants

La purification des biosurfactants dépend principalement de sa solubilité dans les phases aqueuse ou organique, de sa charge ionique et de sa mode de production (intracellulaire ou extracellulaire). La plupart de ces molécules sont produits de façon extracellulaire d'où leur isolement se fait soit par filtration de la culture bactérienne ou par l'obtention d'un surnageant après l'élimination des cellules bactériennes. Pour des purifications plus performantes des procédés d'isolement des biosurfactant en aval sont définis (Desai et Banat, 1997).

1.1.4.1. La précipitation

Deux différents types de précipitations sont distingués : La précipitation au sulfate d'ammonium et la précipitation acide. Cette dernière consiste à l'acidification du milieu jusqu'à un pH aux alentours de 2 ainsi le précipitât est collecté par centrifugation après un dépôt à 4°C durant quelques heures et remis en suspension dans solvant approprié pour chaque biosurfactant (Déziel et al., 1999; Van Dyke et al., 1993; Zhang et Miller, 1994).

1.1.4.2. Extraction par des solvants chimiques

L'extraction des biosurfactants se fait en utilisant un solvant chimique comme le butanol, l'acide acétique, l'hexane, l'acétate d'éthyle ou un mélange de solvants comme le chloroforme/méthanol. Ce type de purification est souvent utilisé pour l'élimination des composés hydrophiles pour d'éventuels analyse des biosurfactants (Mata-Sandoval et al., 1999).

1.1.4.3. Adsorption

L'Adsorption est une technique de purification qui consiste à l'utilisation d'une résine généralement la Amberlite XAD 2 ou la 16 polystyrène pour absorber les molécules se trouvant dans le surnageant de culture et de les séparer en se basant sur les interactions hydrophobes en des substances hydrophobes et des substances hydrophiles (Dubey et al., 2005). La chromatographie d'adsorption représente une bonne alternative à l'extraction par des solvants chimiques comme elle a pour avantage d'en consommer moins.

1.1.4.4. Filtration sur membrane

La purification par filtration sur membrane représente une autre alternative pour la semi-purification des biosurfactants (Gruber., 1991). Généralement, l'ultrafiltration à travers une membrane de taille de seuil de coupure (MWCO) de 10 KDa amène à une rétention complète des biosurfactants même à un pH neutre lorsque la concentration des biosurfactant est au-dessus de la concentration micellaire critique (CMC) (Gruber., 1991). Récemment, un procédé de purification en continue basé sur des techniques membranaires a été développé pour la production et la purification des surfactines (Coutte et al., 2013).

1.1.4.5. Echangeuse d'ions

L'échangeuse d'anion représente une autre technique pour la purification d'un mélange de biosurfactants (Reiling et al., 1986). Comme certains biosurfactants sont chargés négativement à des valeurs de pH élevés, leur séparation est alors possible à travers une échangeuse d'anion faible comme la sépharose d'éthyle.

1.1.4.6. Techniques de séparation chromatographiques

Les méthodes chromatographiques représentent des techniques de séparation efficaces pour la séparation des biosurfactants. La TLC est une technique de séparation par chromatographie utilisée pour le traitement des petits volumes. Elle consiste à migrer les composants du surnageant de culture à travers un gel silice à l'aide d'un mélange de solvants de différentes polarités (Déziel et al., 1999). Pour des volumes assez élevés des chromatographies en phase normale ou phase inverses sont appliqués en faisant les séparations à travers des colonnes contenant généralement le gel silice comme phase stationnaire.

1.2. Rôles et applications des biosurfactants de *Pseudomonas*

1.2.1. Les *Pseudomonas* :

Les *Pseudomonas* est un groupe de bactéries très ubiquitaire et hétérogène appartenant à la famille des *Pseudomonadaceae*. Ces bactéries sont gram (-) et sont majoritairement catalase (+) et oxydase (+), et ont une mobilité très vive en aérobiose. Morphologiquement, les *Pseudomonas* ont une forme en bâtonnet fins et droits une flagelle polaire avec un diamètre généralement entre 0,5 µm et 1 µm et une longueur de 2 µm à 4 µm, et ils sont non sporulés, mais peuvent être parfois entourés par une pseudo-capsule appelée 'slime' qui peut éventuellement jouer un rôle primordial vis-à-vis de la pathogénicité de ces bactéries (figure 5). L'aspect des colonies de *Pseudomonas* peut être subdivisé en 3 types principaux :

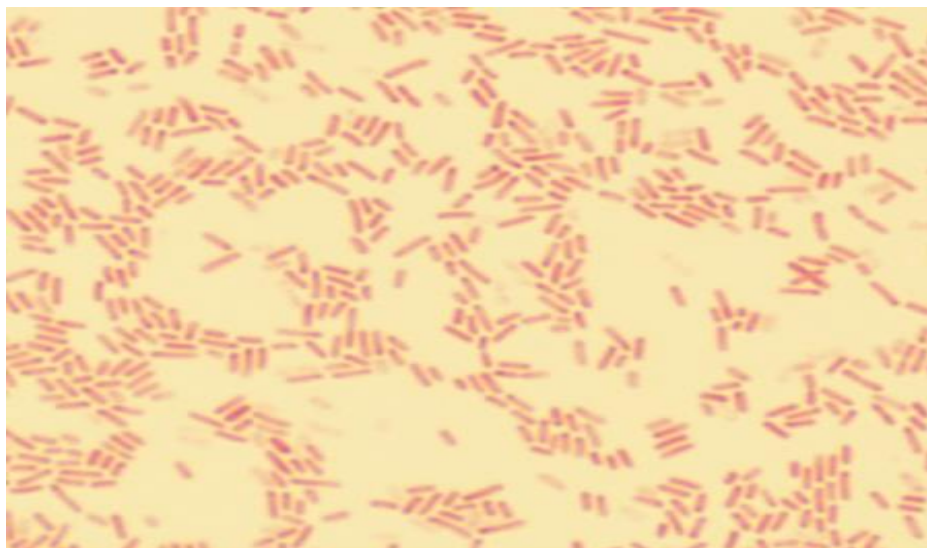
- Des colonies larges et isolées ayant la partie centrale ayant un bombage dans la partie centrale avec un contour irrégulier. Ces colonies se caractérisent par une autolyse donnant un aspect métallique d'une culture nappe dû à l'action des enzymes protéolytiques.
- Des colonies petites circulaires et mates qui sont légèrement bombées.
- Des colonies muqueuses, visqueuses et collantes qui sont opaques et bombées qui caractérise généralement l'aspect de colonies des souches de *Pseudomonas* pathogènes qui produisent des polysaccharides extracellulaires comme l'acide alginique.

La plupart des *Pseudomonas* sont mésophiles et peuvent se développer entre 5°C et 42°C ou psychrophiles ayant la capacité de se développer entre -2°C et 30°C. Leurs températures optimales de croissance est d'environ 30°C et 37°C respectivement. Ces espèces vivent essentiellement dans les eaux et les sols humides et peuvent être aussi rencontrées sur les plantes pour lesquelles certaines sont pathogènes comme *Pseudomonas syringae* et *Pseudomonas solanacearum*. Les *Pseudomonas* ont un métabolisme extrêmement polyvalent, ils sont chimiohétérotrophes avec un métabolisme strictement respiratoire ayant l'oxygène comme accepteur final d'électrons en cas d'aérobiose et le nitrate pour certaines espèces en cas d'anoxie en synthétisant la nitrate-réductase. En effet, ces bactéries sont aérobies et leur croissance dépend strictement de la quantité de l'oxygène dissoute dans le milieu (Ramos., 2004). Certaines espèces de *Pseudomonas* possèdent la capacité de produire des métabolites

secondaires et d'enzymes à des températures comprises entre 8°C et 22°C, ce sont les *Pseudomonas* 'psychrotrophe', qui sont très communs dans les environnements à basses températures comme les océans et dans certains aliments réfrigérés comme les viandes, les poissons et les volailles. Les principales espèces de *Pseudomonas* ayant été identifiées comme des psychrotrophes sont, les *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, et *Pseudomonas fragi* (Zachariah et Liston, 1973, Molin et Ternstrom, 1986)

Les *Pseudomonas* ont un métabolisme non fermentatif étant donné que les enzymes de glycolyse leurs sont absentes (Voie fermentative d'Embden-Meyerhof). Le glucose est alors assimilé par voie oxydative et son oxydation totale en aérobiose est réalisée par la voie Warburg-Dickens-Horecker qui utilise la 6 Phospho-gluconate comme intermédiaire et la voie d'Entner-Doudoroff qui utilise la 2-céto-3 désoxygluconate et qui aboutit à la formation du pyruvate utilisé dans le cycle de Krebs. La plupart des *Pseudomonas* ont la capacité de croître sur des milieux minéraux en utilisant une source simple de carbone comme le pyruvate et l'acétate.

Contrairement aux organismes strictement aérobies, les *Pseudomonas* sont capables dans les conditions anaérobies de tirer leur énergie par hydrolyse de l'arginine en utilisant de l'arginine dihydrolase (ADH), ce qui peut être utilisé à la base de l'identification des bactéries du genre *Pseudomonas*.



Source: Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA: *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology*, 26th Edition: www.accessmedicine.com

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

Fig. 5 : Observation microscopique de cellules de *Pseudomonas aeruginosa* sp. (Brooks et al., 2013)

Les bactéries du genre *Pseudomonas* ont été décrites pour la première fois par Migula en 1894 qui a défini les *Pseudomonas* comme étant des cellules ayant des organes de mobilité polaires et dont la formation des spores est rare, qui est une définition généralement acceptée et qui a permis d'attribuer plusieurs bactéries appartenant précédemment à d'autres genres comme des espèces de *Pseudomonas*. Au début du 20^{ème} siècle la classification des *Pseudomonas* a été complétée en se basant sur les caractères phénotypiques pour les classer en espèces. A partir de 1960, la classification des *Pseudomonas* est devenue principalement basée sur l'étude de l'homologie de leurs séquences d'ADN pour être subdiviser phylogénétiquement selon leurs séquences d'ARNr (Palleroni et al., 1973) et avec récemment l'addition de quelques autres séquences de gènes comme *atpD*, *gyrB*, *rpoB*, *recA*, et *rpoD* comme des marqueurs moléculaires dans les études taxonomiques des *Pseudomonas* (Tayeb et al., 2008), ce qui fait qu'au fil des années, le nombre des espèces de *Pseudomonas* ne fut que augmenter considérablement depuis sa découverte et qui a dépassé actuellement plus de 144 espèces (Gomila et al., 2015).

1.2.2. Les fonctions biologiques des biosurfactants de *Pseudomonas*

Les biosurfactants produits par *Pseudomonas* sont impliqués dans différentes fonctions bactériennes par la modification des propriétés de surface. Ils influent sur plusieurs paramètres comme la formation de biofilm, la capacité de colonisation et la motilité des souches en agissant sur trois activités différentes: la biodisponibilité, l'interaction avec les membranes et les interactions de surface (figure 6). Les biosurfactants peuvent également jouer un rôle important en tant que des agents de biocontrôle (D'aes et al., 2010).

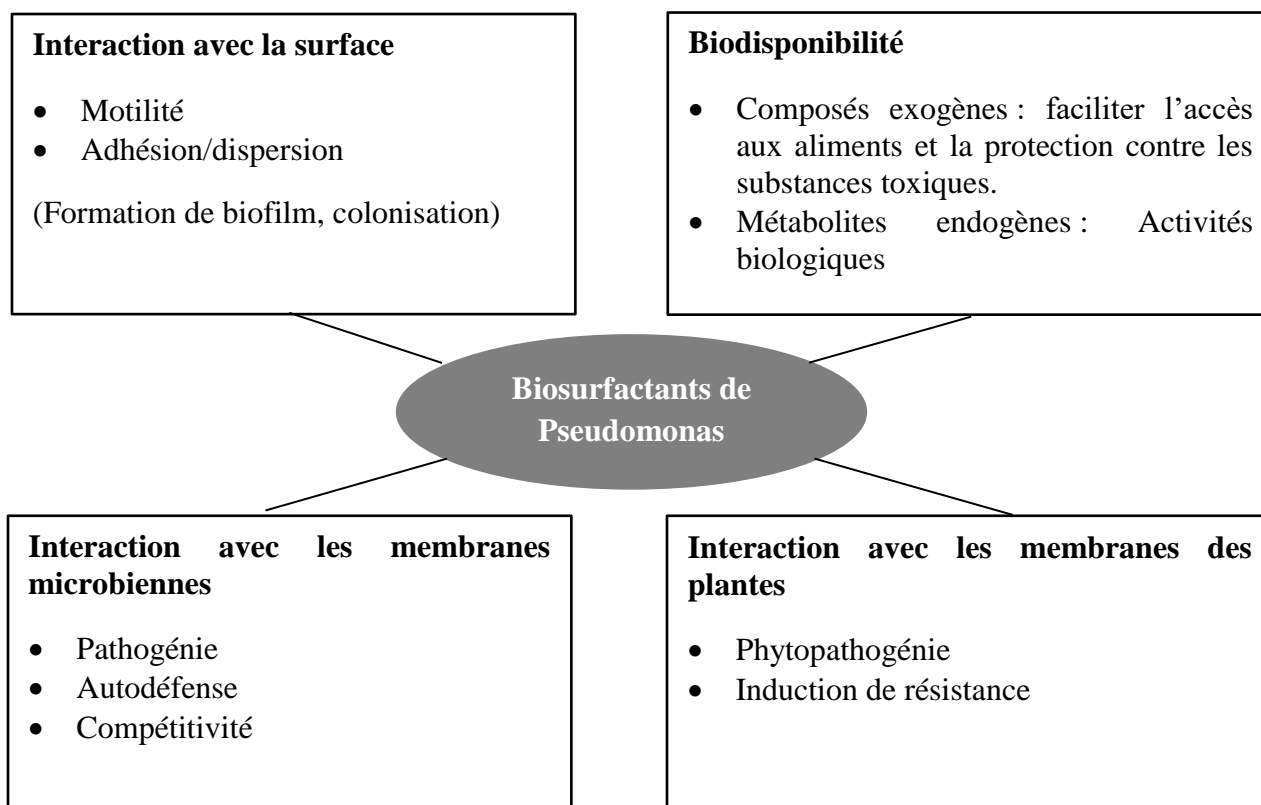


Fig. 6 : Schéma récapitulatif des fonctions biologiques potentielles des biosurfactants produits par des bactéries du genre *Pseudomonas* (D'aes et al., 2010)

1.2.2.1. Interaction avec la surface

Les biosurfactants réduisent la tension de surface des surfaces hydrophobes, spécialement celles des plantes et plus précisément les cuticules des feuilles, facilitant ainsi la mobilité bactérienne (Harshey, 2003). Ils peuvent aussi agir comme des agents mouillants en changeant la viscosité de surface en favorisant ainsi l'essaimage des cellules bactériennes (Lindow et Brandl, 2003). Les biosurfactants jouent un rôle aussi important dans l'adhésion et la formation des biofilms. Cette propriété a été étudiée chez différentes espèces et notamment chez les *Pseudomonas*. En effet, la formation des biofilms aide les bactéries à coloniser efficacement les surfaces des plantes (Bais, 2004) comme est le cas pour les biosurfactants produits par *Pseudomonas tolaassi* qui produit la tolassine et *Pseudomonas fluorescens* qui produit la viscocine, en augmentant la mouillabilité de la surface des plantes et en favorisant ainsi leur colonisation (Bunster et al., 1989; Hildebrand et al., 1998). La colonisation assure un rôle primordial en biocontrôle en fonctionnant comme un système de délivrance de métabolites

secondaires bactériens ayant des activités antifongiques pour les cellules des plantes pour assurer leur protection. Les différentes propriétés physico-chimiques des biosurfactants expliquent également en partie leurs rôles dans la formation des biofilms. ainsi certains lipopeptides cycliques comme la viscosine et la massetolide, possèdent un rôle dans la stabilité des biofilms formés, tandis que certains rhamnolipides sont plutôt impliqués dans la formation initiale de micro-colonies dans les surfaces et au développement et la maintenance d'un biofilm mature (D'aes et al., 2010).

1.2.2.2. Effet sur la biodisponibilité

Les biosurfactants facilitent l'accès aux nutriments pour les souches en augmentant la mouillabilité des surfaces, la solubilisation des substrats et leur diffusion, et en émulsifiant les composés insolubles dans l'eau (Lindow et Brandl, 2003; Ron et Rosenberg, 2001), en particulier les hydrocarbures par leur dispersion dans une phase aqueuse. Les biosurfactants peuvent aussi changer les propriétés de surface des cellules bactériennes pour faciliter la consommation des substrats ayant une nature hydrophobe par les bactéries. Des rhamnolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa* augmentent l'hydrophobicité de la surface cellulaire bactérienne causant ainsi la libération de polyliposaccharides de la membrane extracellulaire ce qui augmente par conséquent le contact entre les cellules bactériennes et le substrat hydrophobe. Les biosurfactants protègent également les souches qui les produisent contre les métaux lourds qui peuvent éventuellement avoir un effet négatif sur les bactéries, en les encapsulant à l'intérieur des micelles (D'aes et al., 2010).

En outre, les biosurfactants agissent aussi sur les métabolites endogènes secrétés par les bactéries en augmentant leur solubilité et par la suite leur bioactivité dans leur milieu environnant, ce qui est le cas des biosurfactants produits par *Pseudomonas aeruginosa* PNAI qui augmente l'efficacité de l'activité antimicrobienne des phénazines en augmentant leur solubilité (Perneel et al., 2008).

1.2.2.3. Interaction avec les membranes des plantes

Certains biosurfactants de nature lipopeptidique jouent un rôle dans la phytopathogénicité en s'insérant dans les membranes plasmiques des plantes causant ainsi la formation des pores, ce qui induit des nécroses dans les tissus des plantes. Ce phénomène résulte des flux ; transmembranaires des ions Ca^{2+} , K^+ , et H^+ qui va causer la chute du gradient de pH à travers la membrane plasmique provoquant ainsi la mort cellulaire. Les lipopeptides produits par

Pseudomonas syringae pv. *syringae* représentent un exemple des molécules biosurfactants jouant un rôle dans la phytopathogénicité.

Les lipopeptides biosurfactants peuvent provoquer aussi des réponses de défense chez les plantes appelées réponse systémique induite (RSI), qui représente une réponse médiée chez les plantes contre différents types de pathogènes, causée par la colonisation des racines par des champignons non pathogènes (De Vleeschauwer et Höfte, 2009). Ainsi le Massetolide A qui sont des biosurfactants produits par *Pseudomonas fluorescens* SS101, et qui induisant la résistance contre des maladies causées par des infections par *Phytophthora* chez les tomates (Tran *et al.*, 2007).

1.2.2.4. Interaction avec les membranes microbiens

Le potentiel antimicrobien des biosurfactants a été déjà mis en évidence d'après plusieurs études. Le mode d'action des biosurfactants dans le contrôle biologique consiste en la formation de canaux dans les parois cellulaires, ce qui crée une perturbation au niveau de la surface cellulaire de l'agent pathogène. Les lipopeptides cycliques sont les plus connus biosurfactants ayant un rôle en biocontrôle (Raaijmakers *et al.*, 2006), comme par exemple des lipopeptides cycliques produits par *Pseudomonas fluorescens* CMR12a qui possèdent un potentiel de protection des plantes contre les infections causées par *Pythium* et *Phytophthora* sp., et des rhamnolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa* PNA1 qui agissent en synergie avec les phénazines pour contrôler les infections causées par *Pythium* spp (Perneel *et al.*, 2008). L'activité antifongique des biosurfactants produits par certaines souches de *Pseudomonas fluorescens* a été bien détaillée dans la littérature, et ces études ont montré que les biosurfactants produits par *Pseudomonas fluorescens* inhibent divers champignons pathogènes qui infectent les plantes comme *Phytophthora cryptogea*, un champignon responsable des infections de la pourriture des fruits et des fleurs, *Fusarium oxysporum* qui cause la flétrissure des plantes, *Pythium ultimum* qui est l'agent causal des maladies racinaires (Hultberg *et al.*, 2008), et ils jouent aussi un rôle très important dans l'inhibition de croissance *in vitro* de certains champignons comme *Rhizoctonia solani* qui provoque la pourriture des racines des plantes de soja (D'aes *et al.*, 2011).

1.2.3. Domaines d'application potentielle des biosurfactants

Les biosurfactants sont de potentiels remplaçants des surfactants synthétiques dans plusieurs procédés industriels comme agents émulsifiants, de ramollissement, agents

moussants, stabilisateurs de dispersion et des fixateurs de colorants qui sont principalement utilisés dans les industries agroalimentaires, de pétrochimie, pharmaceutiques et dans les procédés de bioremédiation des contaminants organiques et inorganiques.

1.2.3.1. Les biosurfactants dans l'industrie cosmétique

Les biosurfactants ont diverses applications cosmétiques dues aux propriétés de surface exceptionnelles qu'ils possèdent comme la détergence, la mouillabilité, l'émulsification, la solubilisation, la dispersion, la formation de mousses (Rieger and Rhein, 1997). Les biosurfactants présentent certains avantages comparant aux surfactants chimiques comme un effet anti-irritant ou hydratant, ce qui les rend plus compatibles avec la peau. Les biosurfactants les plus utilisés en cosmétique sont les sophorolipides et les rhamnolipides. Les sophorolipides à une forme lactone sont aussi utilisés comme des stimulateurs du métabolisme cellulaire des fibroblastes dermiques, en particulier de la néosynthèse du collagène. Les rhamnolipides sont des surfactants et émulsifiants naturels. Certains rhamnolipides sont également utilisés pour les traitements antipelliculaires, antirides et contre les acnés (Piljac et Piljac, 1999).

1.2.3.2. Les biosurfactants dans l'industrie agroalimentaire

Certains biosurfactants sont des molécules non toxiques et biocompatibles, ceci leur donne des caractéristiques qui permet particulièrement leur application dans le domaine agroalimentaire spécialement comme des émulsifiants, solubilisants et moussants (Banat et al., 2000). En effet, certains biosurfactants sont utilisés dans les formulations alimentaires comme des additifs émulsifiants (Ron and Rosenberg, 2001) et notamment pour les produits à spécialement gras comme les produits laitiers en améliorant la texture de la crème. En outre, les biosurfactants polymériques sont utilisés pour couvrir les gouttelettes d'huile et aboutissent ainsi à la formation d'émulsions très stables. Les biosurfactants sont également utilisés pour contrôler la consistance dans les formulations des crèmes glacés et les produits céréaliers et sont aussi utilisés comme des stabilisants des acides gras, ils contrôlent leur agglomération et stabilise la matière grasse au sein des produits (Kachholz et al., 1987). L'activité anti-adhésive des biosurfactants est aussi utilisée comme un outil dans les industries agroalimentaires contre la formation des biofilms pour prévenir le contact des bactéries avec la surface des aliments qui présente une source potentielle de contamination (Nitschke et Costa, 2007).

1.2.3.3. Les biosurfactants dans les domaines pharmaceutiques et thérapeutiques

Les biosurfactants possèdent un large spectre d'applications dans les domaines pharmaceutiques. Certains lipopeptides sont de puissants adjuvants immunologiques non toxiques et non pyrogènes en contact avec les antigènes conventionnels (Gharaei-Fathabad, 2011). Les tests *in vivo* ont montré une amélioration de la réponse immunitaire en couplant la poly-L-lysine avec iturine-AL, herbicoline-A et microcystine (Rodrigues et al., 2006). De nombreux biosurfactants possèdent des activités antibactérienne et antifongique qui sont généralement liées à leur structure en agissant au niveau de la perméabilité de la membrane cellulaire des microorganismes. Les biosurfactants peuvent également présenter des activités antivirales comme les surfactine qui a un rôle dans l'inactivation potentielle des virus à enveloppe comme l'herpès et les rétrovirus (Vollenbroich et al., 1997). Cette inhibition pourrait être liée à l'interaction physico-chimique entre l'enveloppe virale et le biosurfactant. Un biosurfactant de la classe des rhamnolipides produit par une souche de *Pseudomonas sp.* a montré une activité antivirale significative contre le virus de l'Herpès de type I et II en mélange avec des alginates produits par la même souche (Remichkova et al., 2008). Cette activité est dépendante de la dose du biosurfactant utilisée et devient plus efficace à une concentration inférieure à la concentration micellaire critique (Banat et al., 2010). Les biosurfactants possèdent aussi un rôle en tant que des immunomodulateurs. Certains sophorolipides testés *in vivo* sur des rats atteints de sepsis ont montré une diminution de la mortalité par la modulation du taux d'oxyde nitrique, et la production de la cytokine qui ont un rôle de signalisation cellulaire. Les sophorolipides diminuent également la production des anticorps IgE, ce qui peut être probablement dû à l'affection de l'activité du plasma cellulaire, ce qui appuie l'utilité de ce biosurfactant comme agent anti-inflammatoire et comme régulateurs de IgE (Hagler et al., 2006, Cameotra et Makkar, 2004).

L'activité anticancéreuse représente une autre application dans le domaine thérapeutique qui a été récemment étudiée chez les biosurfactants. Certains glycolipides comme les mannosylerythritol lipides-A, mannosylerythritol lipides-B, les polyols, les sophoroses, les succinoyl trehalose lipide (STL)-1 et les succinoyl tréhalose lipide-3 ont montré d'excellentes activités anticancéreuses *in vitro*. Ils sont capables d'induire la différenciation cellulaire plutôt que la prolifération de la lignée cellulaire de la leucémie HL60 promyélocytaire chez l'Homme (Sudo et al., 2000).

1.2.3.4. Application des biosurfactants en bioremédiation

La production extensive de certaines substances chimiques comme les hydrocarbures présente une contrainte vis-à-vis de l'environnement causée par les contaminations générées par ces produits qui est due à leur toxicité et leur impact qu'il soit négatif ou positif sur la prolifération des microorganismes d'où l'importance d'effectuer des opérations de dépollution des sites contaminés. Les hydrocarbures sont des composés organiques hydrophobes qui présentent d'une part une faible solubilité à l'eau et qui d'autre part ont tendance à se cloisonner au sol où ils peuvent dépasser 95% de la masse totale des contaminants ce qui entraîne par conséquent, une faible récupération des hydrocarbures et une biodisponibilité limitée pour les microorganismes et les produits chimiques oxydants et réducteurs utilisés lors des applications *in-situ* et/ou *ex-situ*. L'utilisation des biosurfactants améliore significativement les processus de bioremédiation des hydrocarbures. Cette amélioration est généralement due à deux mécanismes qui est d'une part l'augmentation de la biodisponibilité de ces substrats pour les microorganismes, et d'autre part l'implication des interactions avec les surfaces cellulaires par l'augmentation de l'hydrophobicité à la surface ce qui va faciliter l'association aux cellules bactériennes (Wang et Mulligan, 2004). En effet, les biosurfactants augmentent la surface des composés insolubles par la réduction de la tension de surface et de la tension interfaciale menant ainsi à l'augmentation de la mobilité et la biodisponibilité des hydrocarbures. En outre, les biosurfactants sont susceptibles d'augmenter la biodégradation des hydrocarbures par les propriétés d'émulsification, de solubilisation et de mobilisation (Nguyen et al., 2008). Le mécanisme de mobilisation se produit à une concentration en biosurfactant qui est au-dessous de la CMC à laquelle le biosurfactant réduit la tension de surface et interfaciale entre les systèmes air/eau et sol/eau ce qui va augmenter l'angle entre le système huile/sol en réduisant la force capillaire qui attache l'huile au sol. D'autre part, au-dessus de la CMC un phénomène de solubilisation se produit comme à partir de cette concentration les biosurfactants sont plutôt organisés sous forme de micelles ce qui va augmenter considérablement la solubilisation des huiles qui consiste à l'incorporation des molécules hydrophobes à l'intérieure des micelles (Urum et Pekdemir, 2004). En outre, les biosurfactant à une haute masse moléculaire sont utilisés comme des agents émulsifiants qui sont utilisés comme des additifs qui stimulent le processus de bioremédiation et de l'élimination des substances hydrophobes de l'environnement (figure 7).

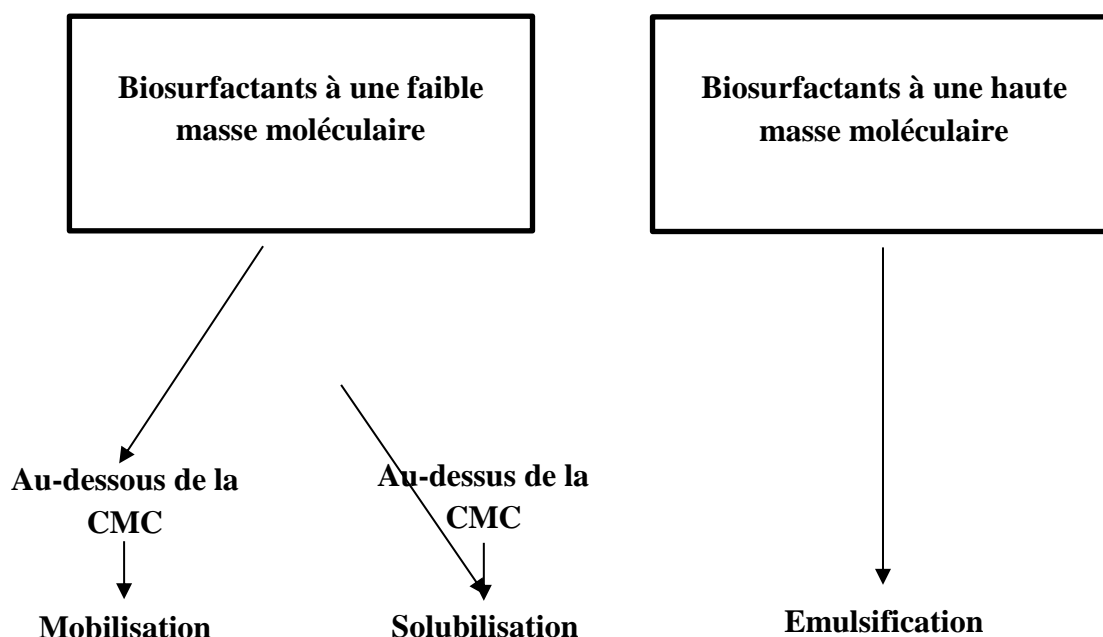


Fig. 7 : Mécanisme de récupération des hydrocarbures par l'intervention des biosurfactants en fonction de leurs masses moléculaires (Pacwa-Płociniczak et al., 2011)

Des études précédents ont permis de mettre en évidence trois types d'interactions entre les microorganismes et les hydrocarbures qui sont : L'accès au hydrocarbures solubles dans l'eau, un contact direct entre les hydrocarbures et les larges gouttelettes d'huile et le contact avec des gouttelette pseudosolubilisés ou émulsifiés (Franzetti et al., 2010). Les biosurfactants des *Pseudomonas* sont largement impliqués dans les processus de bioremédiation comme est l'exemple des viscosines qui sont des lipopeptides ayant une bonne activité émulsifiante et qui stimulent la minéralisation des n-hexadecanes (Bak et al., 2014) , des lipopeptides biosurfactants produits par *Pseudomonas aeruginosa* Lbp3 qui augmentent la biodisponibilité et la biodégradabilité des hydrocarbures polycycliques aromatiques (Bezza et Chirwa, 2017), Ainsi que les amphisines produits *Pseudomonas fluorescens* DSS73 qui interviennent à la mobilisation des hydrocarbures polycycliques fortement adsorbés aux sédiments (Groboillot et al., 2011) .

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont bien connues par la production des biosurfactants appartenant au groupe des lipopeptides issus d'un mécanisme de synthèse particulier par voie non ribosomique. Ce groupe de biosurfactants se caractérisent par un large

spectre d'application et notamment dans les domaines du contrôle biologique dans bioremédiation ainsi que de la grande diversité des familles qui en sont issus, d'où est l'intérêt de focaliser notre étude sur ce groupe de biosurfactant davantage cette diversité structurale et fonctionnelle.

1.3. La diversité des peptides issus de la synthèse non ribosomique chez les

Pseudomonas

Les *Pseudomonas* sont des bactéries connus par la production de peptides comme métabolites secondaires, par des voies non ribosomiaux. Ces peptides sont ainsi appelés des NRPs. La biosynthèse de ces métabolites secondaire implique l'intervention d'un complexe multi-enzymatique appelé 'Non Ribosomal Peptide Synthetase' ou NRPS. Cette voie de biosynthèse a été mise en évidence pour la première fois chez *Bacillus brevis* par Lipmann et al., en 1971. Chez les bactéries du genre *Pseudomonas* la biosynthèse des peptides non ribosomique amène principalement à la production des sidérophores et des lipopeptides.

1.3.1. La diversité structurale des lipopeptides de *Pseudomonas* : Rôle et classification

Parmi les lipopeptides produits par les différentes espèces de *Pseudomonas*, il existe une grande diversité structurale due à la longueur et la composition de la moitié lipidique ainsi que le nombre et la configuration des acides aminés qui constitue la chaîne peptidique (Gross and Loper, 2009; Nybroe et Sørensen, 2004; Ongena et Jacques, 2008; Raaijmakers et al., 2006; Stein et al., 2005). En se basant sur les caractéristiques de la structure de ces molécules, on peut distinguer les lipopeptides à une chaîne peptidique linéaire et d'autres à une chaîne peptidique cyclique appelés lipopeptides cycliques ou CLP. En général, les lipopeptides ont une chaîne lipidique formée de 6 à 16 atomes de carbones et une chaîne peptidique qui contient de 8 à 25 acides aminés. Selon leurs structures et fonction les lipopeptides de *Pseudomonas* sont classés en plusieurs groupes : Les amphisines, les plusbacines, les viscosines, les syringomycines, les orfamides, les putisolvines, les syringopeptides, les syringafactines et les tolaasines (Tableau 1).

Tableau 1 : Les lipopeptides biosurfactants produits par des bactéries du genre *Pseudomonas* et leurs activités biologiques

Famille	Lipopeptide	Espèce	Activités	Référence
Amphisines	Lokisin	<i>Pseudomonas sp. DSS41</i>	Antifongique	(Nielsen et al., 2002)
	Arthrofactin	<i>Pseudomonas sp. MIS38</i>	Inhibition biofilm	(Roongsawang et al., 2003)
	Amphisin	<i>Pseudomonas sp. DSS73</i>	Antifongique	(Sorensen et al., 2001)
	Pholipeptin tensin	<i>Pseudomonas fluorescens sp.</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Antimicrobien	(Ui et al., 1997) (Nielsen et al., 2000)
Putisolvines	Putisolvine	<i>Pseudomonas putida</i>		
	I, II, III	<i>PCL1445</i>	Inhibition biofilm	(Kuiper et al., 2004)
Syringafactines	Syringafactines	<i>Pseudomonas syringae pv.</i>	Essaimage	(Berti et al., 2007)
	A, B, C, D, E, F	<i>tomato DC3000</i>		
Syringomycines	Syringomycines	<i>Pseudomonas syringae pv</i>	Antimicrobien	(Segre et al., 1989)
	A1, G, E	<i>syringae</i>		
	Pseudomycines	<i>Pseudomonas syringae sp.</i>	Biocontrôle	(Ballio et al., 1994)
	A, B, C, C2			
	Syringostatines	<i>Pseudomonas syringae pv</i>	Antifongiques	
A, B	<i>syringae</i>	Fongicides	(Sorensen et al., 1996)	
Syringomycines	Syringotoxine B	<i>Pseudomonas syringae pv</i>	Antimicrobien	(Ballio et al., 1990)
		<i>syringae</i>		
	Cormycine A	<i>Pseudomonas corrugata</i>	Antimicrobien	(Scaloni et al., 2004)
Tolaassines	Tolaasines	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	Antimicrobiens	(Bassarello et al., 2004)
	A, B, C, D, E			
Viscosines	Tolaasines	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	Antibactériens	(Nutkins et al., 1991)
	I, II			
	Viscosinamide	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Antifongique	(Nielsen et al., 1997)
	DR54			
Viscosines	Massetolides	<i>Pseudomonas sp.</i>	Antimycobactériens	(Gerard et al., 1997)
	A, B, C, D, E, F, G, H			
	Viscosine	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Phytopathogène	(Alsohim et al., 2014)
		<i>SBW25</i>		
Pseudofactine	Pseudofactine	<i>P. fluorescens</i>	Antifongiques	(Quail et al., 2002)
		<i>BRG100</i>		
Pseudofactine	Pseudofactine	<i>P. fluorescens</i>	Emulsifiant	(Janek et al., 2010)
		<i>BD5</i>		
Orfamides	Orfamide	<i>Pseudomonas sp. CMR5c</i>	Antifongiques	(Ma et al., 2016)
	A, B, C			
Plusbacines	Plusbacine			
	A1, A2, A3, A4 B1, B2, B3, B4	<i>Pseudomonas spp.</i>	Antibactériens	(Shoji et al., 1992)

- **Les amphisines :**

Les amphisines est une famille de lipopeptides composé d'un acide gras à 10 atomes de carbones (C₁₀HO) et de 11 monomères (tableau 2). C'est un groupe qui contient 5 lipopeptides selon Norine, ayant tous des activités antibiotique et surfactante (Sorensen et al., 2001).

Tableau 2 : Structure des lipopeptides appartenant à la famille des amphisines

Lipopeptide	Souche	Masse (Da)	Structure	Références
Lokisine	<i>Pseudomonas</i> sp. DSS41	1340.6	FA-β-OH-D-Leu-D-Asp-D-αThr-D-Leu-D-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Leu-L-Ile-L-Asp	(Nielsen et al., 2002)
Arthrofactine	<i>Pseudomonas</i> sp. MIS38	1354.6	FA-β-OH-D-Leu-D-Asp-D-αThr-D-Leu-D-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Gln-L-Leu-L-Ile-L-Asp	(Roongsawan g et al., 2003)
Amphisine	<i>Pseudomonas</i> sp. DSS73	1395.6	FA-β-OH-D-Leu-D-Asp-D-αThr-D-Leu-D-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Gln-L-Leu-L-Ile-L-Asp	(Sorensen et al., 2001)
Pholipeptide	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		FA-β-OH-D-Leu-L-Asp-L- Thr-D-Leu-D-Leu-D-Ser-D-Leu-D-Ser-D-Leu-L-Ile-D-Asp	(Ui et al., 1997)
Tensine	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1408.6	FA-β-OH-D-Leu-D-Asp-D-αThr-D-Leu-D-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Gln-L-Leu-L-Ile-L-Glu	(Nielsen et al., 2000)

- **Les plusbacines**

Les plusbacines sont aussi des lipopeptides produits par des *Pseudomonas* et qui a une structure très similaire aux tripropeptides et empedopeptides produits par des bactéries à gram (-). Il s'agit d'un groupe de 6 lipopeptides cycliques qui possèdent comme en commun la présence de l'arginine, proline, serine, hydroxylorine et deux résidus d'acide hydroxyaspartique, et de chaîne d'acide gras contenant entre 14 et 16 atomes de carbones (tableau 3). Comme est le cas pour les arthrofactines ces lipopeptides ont aussi le caractère de former un cycle lactone entre l'acide gras et le dernier acide aminé de la chaîne peptidique. Les plusbacines sont des lipopeptides qui possèdent une bonne activité antimicrobienne qui a été mise en évidence chez les plusbacines A3 qui possède la capacité

de bloquer le processus de transglycosylation et toutes les étapes de synthèse de membrane cellulaire peptidoglycanique (Hashizume et Nishimura, 2008).

Tableau 3 : Structure des lipopeptides appartenant à la famille des plusbacines produits par des *Pseudomonas. Spp* (Shoji et al., 1992)

Molécule	Structure	Masse (Da)
plusbacine A1	CH ₁₄ OH D- α Thr- D-Ala – L-Pro(3OH) – L-Arg- L-Asp(3OH) – D-Ser – L-Pro(3OH) – L-Asp(3OH)	1130,5
Plusbacine A2	CH ₁₅ OH D- α Thr- D-Ala – L-Pro(3OH) – L-Arg- L-Asp(3OH) – D-Ser – L-Pro(3OH) – L-Asp(3OH)	1144,5
Plusbacine A3	ⁱ CH ₁₆ OH D- α Thr- D-Ala – L-Pro(3OH) – L-Arg- L-Asp(3OH) – D-Ser – L-Pro(3OH) – L-Asp(3OH)	1158,5
Plusbacine A4	ⁱ CH ₁₆ OH D- α Thr- D-Ala – L-Pro(3OH) – L-Arg- D-Asp(3OH) – D-Ser – L-Pro(3OH) – L-Asp(3OH)	1158,5
Plusbacine B1	CH ₁₄ OH D- α Thr- D-Ala – L-Pro– L-Arg- L-Asp(3OH) – D-Ser – L-Pro(3OH) – L-Asp(3OH)	1114,5
Plusbacine B2	CH ₁₅ OH D- α Thr- D-Ala – L-Pro– L-Arg- L-Asp(3OH) – D-Ser – L-Pro(3OH) – L-Asp(3OH)	1128,5
Plusbacine B3	ⁱ CH ₁₆ OH D- α Thr- D-Ala – L-Pro– L-Arg- L-Asp(3OH) – D-Ser – L-Pro(3OH) – L-Asp(3OH)	1142,5
Plusbacine B4	ⁱ CH ₁₆ OH D- α Thr- D-Ala – L-Pro– L-Arg- D-Asp(3OH) – D-Ser – L-Pro(3OH) – L-Asp(3OH)	1142,5

- **Les viscosines**

Les viscosines est une famille de lipopeptides qui contient 14 molécules ayant une chaîne d'acide gras composée entre 10 et 12 atomes de carbone, et d'une chaîne peptidique formée de 9 monomères (tableau 4). Dans la plupart des cas la chaîne d'acide gras de ce groupe se trouve sous forme d'un acide 3-hydroxydécanoïque. Chez les viscosines cycle lactone est formé entre l'acide aminé en l'extrémité C-terminal de la chaîne peptidique et le troisième acide aminé qui est l' α -trhéonine (Nybroe et Sorensen, 2004). Les lipopeptide qui

appartiennent à ce groupe sont produit par des *Pseudomonas fluorescens* et possèdent généralement des activités antimicrobiennes et biosurfactantes

Tableau 4 : Structure et masses des lipopeptides appartenant à la famille des viscosines

Lipopeptide	Masse m/z (M+H ⁺)	Structure	Référence
Viscosine	1126,3	C10-3OH-L-Leu-D-Glu-D- <i>α</i> Thr-D-Val-L-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Ile	(De Bruijn et al., 2007)
Viscosinamide	1125,3	C10-3OH-L-Leu-D-Gln-D- <i>α</i> Thr-D-Val-L-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Ile	(Nielsen et al., 1999)
Massetolide A	1140,4	C10-3OH-L-Leu-D-Glu-D- <i>α</i> Thr-D- <i>α</i> Ile-L-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Ile	(De Bruijn et al., 2008)
Massetolide B	1154,4	C11-3OH-L-Leu-D-Glu-D- <i>α</i> Thr-D- <i>α</i> Ile-L-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Ile	
Massetolide C	1168,4	C12-3OH-L-Leu-D-Glu-D- <i>α</i> Thr-D- <i>α</i> Ile-L-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Ile	
Massetolide D	1140,4	C10-3OH-L-Leu-D-Glu-D- <i>α</i> Thr-D- <i>α</i> Ile-L-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Leu	
Massetolide E	1112,4	C10-3OH-L-Leu-D-Glu-D- <i>α</i> Thr-D-Val-L-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Val	
Massetolide F	1126,3	C10-3OH-L-Leu-D-Glu-D- <i>α</i> Thr-D-Val-L-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Leu	
Massetolide G	1140,4	C11-3OH-L-Leu-D-Glu-D- <i>α</i> Thr-D-Val-L-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Ile	
Massetolide H	1154,4	C12-3OH-L-Leu-D-Glu-D- <i>α</i> Thr-D-Val-L-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Ile	
Pseudophomine A	1140,4	C10-3OH-L-Leu-D-Glu-D- <i>α</i> Thr-D- Ile-D-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Ile	(Quail et al., 2002)
Pseudophomine B	1168,4	C12-3OH-L-Leu-D-Glu-D- <i>α</i> Thr-D- Ile-D-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Ile	(Quail et al., 2002)
Pseudodesmine A	1140,4	C10-3OH-L-Leu-D-Gln-D- <i>α</i> Thr-D- Val -D-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Ile	(Sinnaeve et al., 2009a)
Pseudodesmine B	1168,4	C10-3OH-L-Leu-D-Gln-D- <i>α</i> Thr-D- Val -D-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Val	(Sinnaeve et al., 2009b)
WLIP	1126,3	C10-3OH-L-Leu-D-Glu-D- <i>α</i> Thr-D- Val -D-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-D-Ile	(Coraiola et al., 2006)

- **Les syringomycines**

Les syringomycines représentent un groupe de 11 lipopeptides ayant une chaîne peptidique de 9 acides aminés comme est le cas des viscocines attachées à un acide gras 3-hydroxylé ou 3,4 dihydroxylé ayant une longueur de chaînes qui varie entre 10 et 14 atomes de carbone (Raaijmakers et al., 2006) (tableau 5). Les viscocines possèdent de plus une présence d'acides aminés rares comme l'acide 2,3 dihydro-2-aminobutyrique (Dhb), l'acide 2,4 diamino-butyrique (Dab), et la présence d'un résidu L-thréonine chloré (4-Cl-L-Thr) à l'extrémité C-terminal (4-Cl-L-Thr) qui est responsable à l'activité antifongique des syringomycines (Grgurina et al., 1994). La cyclisation des syringomycines se fait entre la serine présente dans l'extrémité N-terminal et le 4-Cl-L-Thr de l'extrémité C-terminal. Les syringomycines sont majoritairement produits par des *Pseudomonas syringae* A l'exception des cormycines qui sont produits par *Pseudomonas corrogata*.

Tableau 5 : Structure et masses des lipopeptides appartenant à la famille des syringomycines

Molécule	Structure	Masse (Da)	Référence
Syringomycines A1	CH ₁₀ (OH)- L-Ser-D-Ser-D-Dab-L-Dab-L-Arg-L-Phe-Z-DhAbu-OH-L-Asp-4cl-L-Thr	1111,7	(Guenzi et al., 1998)
Syringomycine E	CH ₁₂ (OH)- L-Ser-D-Ser-D-Dab-L-Dab-L-Arg-L-Phe-Z-DhAbu-OH-L-Asp-4cl-L-Thr	1125,7	(Segre et al., 1989)
Syringomycine G	CH ₁₄ (OH)- L-Ser-D-Ser-D-Dab-L-Dab-L-Arg-L-Phe-Z-DhAbu-OH-L-Asp-4cl-L-Thr	1149,7	(Segre et al., 1989)
Pseudomycine A	CH ₁₄ (3,4OH)- L-Ser-D-Dab-L-Asp-D-Lys-L-Dab-L-αThr-Z-Dhb-L-Asp-4Cl-L-Thr	1223,7	(Ballio et al., 1994)
Pseudomycine B	CH ₁₄ (3OH)- L-Ser-D-Dab-L-Asp-D-Lys-L-Dab-L-αThr-Z-Dhb-L-Asp-4Cl-L-Thr	1207,7	
Pseudomycine C	CH ₁₆ (3,4OH)- L-Ser-D-Dab-L-Asp-D-Lys-L-Dab-L-αThr-Z-Dhb-L-Asp-4Cl-L-Thr	1251,8	
Pseudomycine C2	CH ₁₆ (3OH)- L-Ser-D-Dab-L-Asp-D-Lys-L-Dab-L-αThr-Z-Dhb-L-Asp-4Cl-L-Thr	1235,8	
Syringostatine A	CH ₁₄ (3OH)- L-Ser-D-Dab-L-Dab-D-Hse-L-Orn-L-αThr-Z-Dhb-L-Asp-4Cl-L-Thr	1179,7	(Sorensen et al., 1996)
Syringostatine B	CH ₁₄ (3,4OH)- L-Ser-D-Dab-L-Dab-D-Hse-L-Orn-L-αThr-Z-Dhb-L-Asp-4Cl-L-Thr	1195,7	
Syringotoxine	CH ₁₄ (3OH)- L-Ser-D-Dab-L-Gly-D-Hse-L-Orn-L-αThr-Z-Dhb-L-Asp-4Cl-L-Thr	1136,6	(Ballio et al., 1990)
Cormycine	CH ₁₆ (3,4OH)-L-Ser-D-Orn-L-Asn-D-Hse-L-His-L-αThr-Z-Dhb-L-Asp-L-Thr		(Scaloni et al., 2004)

- **Les orfamides**

Les orfamides est une nouvelle classe de lipopeptide dont la production est découverte en 2007 chez les *Pseudomonas fluorescens pf5* (Gross et al., 2007). Ces lipopeptides se caractérisent par la présence d'un acide 3-hydroxydécanoïque ou d'un acide tétradécanoïque connecté à l'extrémité N-terminale d'une chaîne peptidique composée de 10 acides aminés qui forment le peptide cyclique (tableau 6).

Tableau 6 : Structure et masses des lipopeptides appartenant à la famille des orfamides (Gross et al., 2007)

Molécule	Structure	Masse (Da)
Orfamide A	CH ₁₄ OH-L-Leu-D-Glu-D- α Thr-D- α Ile-L-Leu-D-Ser-L-Leu-L-Leu-D-Ser-L-Val	1295,6
Orfamide B	CH ₁₄ OH-L-Leu-D-Glu-D- α Thr-L-Val-L-Leu-D-Ser-L-Leu-L-Leu-D-Ser-L-Val	1281,6
Orfamide C	CH ₁₄ OH-L-Leu-D-Glu-D- α Thr-L-D- α Ile-L-Leu-D-Ser-L-Leu-L-Leu-D-Ser-L-Val	1267,6

- **Les putisolvines**

Les putisolvines est une groupes de lipopeptides cycliques ayant une activité biosurfactante produits par des souches de *Pseudomonas putida PCL 1445*. Ce groupe inclut trois lipopeptides qui sont les putisolvines I, II et III et qui sont tous caractérisés par une moitié lipidique de nature hexanoïque et une chaîne peptidique composé de 12 acides aminés. La cyclisation de ces lipopeptides se fait entre l'extrémité C-terminale et le neuvième acide aminé de la chaîne peptidique (Kuiper et al., 2004) (tableau 7).

Tableau 7 : Structure et masses des lipopeptides appartenant à la famille des Putisolvines (Kuiper et al., 2004)

Molécule	Structure	Masse (Da)
Putisolvine I	C ₆ -D-Leu-D-Glu-D-Leu-D-Ile-D-Gln-D-Ser-D-Val-D-Ile-D-Ser-L-Leu-L-Val-X-Ser	1380
Putisolvine II	C ₆ D-Leu-D-Glu-D-Leu-D-Ile-D-Gln-D-Ser-D-Val-D-Ile-D-Ser-L-Leu-L-leu-X-Ser	1394
Putisolvine III	C ₆ D-Leu-D-Glu-D-Leu-D-Ile-D-Gln-D-Ser-D-Val-D-Ile-D-Ser-L-Leu-L-Ile-X-Ser	1394

- **Les syringopeptides**

Les syringopeptides est une famille composée de 11 lipopeptides qui sont produits par des souches de *Pseudomonas syringae* et ayant des activités antimicrobiennes. Il s'agit de lipopeptides cycliques formés de 22 à 25 monomères qui sont connectés à un acide 3-hydroxy-décanoïque. La cyclisation de ces lipopeptides se fait entre les 8 derniers acides aminés de la chaîne peptidique. Les syringopeptides sont aussi des cytotoxines qui agissent par la formation des pores et la favorisation d'un flux transmembranaire passif d'ions qui est responsable à l'activité phytotoxique de ces molécules (Bidwai et al., 1987; Fukuchi et al., 1992; Segre et al., 1989) (tableau 8).

Tableau 8 : Structure des lipopeptides appartenant à la famille des syringopeptides

Lipopeptide	Structure	Références
SP22A	C ₁₀ (OH)-Dhb-Pro-Val- Val -Ala -Ala- Val---- Val-Dhb-Ala-Val-Ala-Ala-Dhb- α Thr-Ser-Ala-Dhb-Ala-Dab-Dab-Tyr	(Ballio et al., 1991)
Syringopeptide 22B	C ₁₂ (3OH)- dhAbu- D-Pro- D-Val- Val- D-Ala- D-Ala- D-Val- D-Val- dhAbu- D-Ala- D-Val- Ala- D-Ala- dhAbu- D- α Thr- D-Ser- D-Ala- dhAbu- Ala- Dab- D-Dab- Tyr	(Guenzi et al., 1998)
SP25A	C ₁₀ (OH)-Dhb-Pro-Val- Ala -Ala -Val- Leu-Ala- Ala- Dhb- Val-Dhb-Ala-Val-Ala-Ala-Dhb- α Thr-Ser-Ala-Val-Ala-Dab-Dab-Tyr	(Ballio et al., 1994)
Phe25-SP25A	C ₁₀ (OH)-Dhb-Pro-Val- Ala -Ala -Val- Leu-Ala- Ala- Dhb- Val-Dhb-Ala-Val-Ala-Ala-Dhb- α Thr-Ser-Ala-Val-Ala-Dab-Dab- Phe	(Moro, 1997)
Syringopeptide 25B	C ₁₂ (3OH)- dhAbu- D-Pro- D-Val- Ala- D-Ala- Val- D-Leu- D-Ala- D-Ala- dhAbu- D-Val- dhAbu- D-Ala- D-Val- D-Ala- D-Ala- dhAbu- D- α Thr- D-Ser- D-Ala- Val- Ala- Dab- D-Dab- Tyr	(Dalla Serra et al., 1999)
syringopeptide 22 PhvA	C ₁₀ (3OH)-dhAbu- Pro- Val- Leu- Ala- Ala- Ala- Val- dhAbu- Ala- Val- Ala- Ala- dhAbu- α Thr- Ser- Ala- dhAbu- Ala- Dab- Dab- Tyr	(Grgurina et al., 2002)
syringopeptide 22 PhvB	C ₁₂ (3OH)- dhAbu- Pro- Val- Leu- Ala- Ala- Ala- Val- dhAbu- Ala- Val- Ala- Ala- dhAbu- α Thr- Ser- Ala- dhAbu- Ala- Dab- Dab- Tyr	
syringopeptide 508A	C ₁₂ (3OH)- dhAbu- Pro- Val- Leu- Ala- Ala- Leu- Val- Ala- Ala- Val- Ala- Ala- dhAbu- α Thr- Ser- Ala- dhAbu- Ala- Dab- Dab- Tyr	(Grgurina et al., 2005)
syringopeptide 508B	C ₁₄ (3OH)- dhAbu- Pro- Val- Leu- Ala- Ala- Leu- Val- Ala- Ala- Val- Ala- Ala- dhAbu- α Thr- Ser- Ala- dhAbu- Ala- Dab- Dab- Tyr	
syringopeptide SC1	C ₁₀ (3OH)- dhAbu- Pro- Val- Leu- Ala- Ala- Leu- Val- dhAbu- Ala- Ala- Val- Ala- Ala- dhAbu- α Thr- Ser- Ala- dhAbu- Ala- Dab- Dab- Tyr	(Isogai et al., 1995)
syringopeptide SC2	C ₁₂ (3OH)- dhAbu- Pro- Val- Leu- Ala- Ala- Leu- Val- dhAbu- Ala- Ala- Val- Ala- Ala- dhAbu- α Thr- Ser- Ala- dhAbu- Ala- Dab- Dab- Tyr	

- **Les syringafactines**

Les syringafactines sont des lipopeptides qui sont produits par des souches de *Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000*. Il est composé d'une chaîne peptidique linéaire formée de 8 acides aminés et connecté à un acide gras 3-hydroxylé. Le quatrième résidu d'acide aminé de la chaîne peptidique peut être soit une valine ou une leucine selon la molécule. La longueur de la chaîne d'acide gras des syringafactines varie entre 10 et 12 atomes de carbones (Berti et al., 2007). Les syringafactines possèdent une importante activité biosurfactante et contribue aussi à l'essaimage de la souche qui les produit. Récemment, de nouveaux lipopeptides linéaires produits par *Pseudomonas cichorii* qui possèdent les mêmes séquences de la chaîne peptidique des syringafactines avec une différence au niveau du 5^{ème} acide aminé, soit la glutamine qui substitue la serine chez les syringafactines (Pauwelyn et al., 2013) (tableau 9).

Tableau 9 : Structure et masses des lipopeptides appartenant à la famille des syringafactines

Molécule	Structure	Masse (Da)	Référence
Syringafactine A	C10(3OH)- Leu- Leu- Gln- Leu- Thr- Val- Leu- Leu	1081,7	Berti et al., 2007
Syringafactine B	C10(3OH)- Leu- Leu- Gln- Leu- Thr- Leu- Leu- Leu	1095,7	
Syringafactine C	C10(3OH)- Leu- Leu- Gln- Leu- Thr- Ile- Leu- Leu	1095,7	
Syringafactine D	C12(3OH)- Leu- Leu- Gln- Leu- Thr- Val- Leu- Leu	1109,7	
Syringafactine E	C12(3OH)- Leu- Leu- Gln- Leu- Thr- Leu- Leu- Leu	1123,7	
Syringafactine F	C12(3OH)- Leu- Leu- Gln- Leu- Thr- Ile- Leu- Leu	1123,7	
Cichofactine A	C12(3OH)- Leu- Leu- Gln- Leu- Gln- Val- Leu- Leu	1108,7	Pauwelyn et al., 2013
Cichofactine B	C14(3OH)- Leu- Leu- Gln- Leu- Gln- Val- Leu- Leu	1136,7	

- **Les tolaassines**

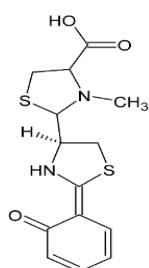
Les tolaassines sont des lipopeptides cycliques produits par des *Pseudomonas tolaassi* et qui se distinguent des autres groupes par la présence de la plus courte chaîne d'acide gras qui peut être soit un acide 3-hydroxypentanoïque ou un acide 3-hydroxyoctanoïque, et la présence de la plus longue chaîne peptidique qui peut-être composée de 19 à 25 acides aminés (tableau 10). Les tolaassines contiennent un acide aminé spécifique qui est le homosérine (Hse). Le cycle lactone se forme entre le résidu allo-Thr et l'acide aminé de l'extrémité C-terminale de la chaîne peptidique et il contient entre 5 à 8 acides aminés (Bassarello et al., 2004; Nutkins et al., 1991). Les tolaassines sont des lipopeptides produits par des souches pathogènes de *Pseudomonas* et ils représentent un important facteur de virulence.

Tableau 10 : Structure et masses des lipopeptides appartenant à la famille des tolaassines (Bassarello et al., 2004)

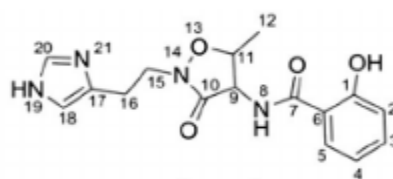
Molécule	Structure	Masse (Da)
Tolaassine A	C ₅ (3OH) - Dhb-Pro-Ser-Leu-Val-Ser-Leu-Val-Val-Gln-Leu - - - Val-Dhb- α Thr-Ile-Hse-Dab-Lys	1959.3
Tolaassine B	C ₈ (3OH) - Dhb-Pro-Ser-Leu-Val-Ser-Leu-Val-Val-Gln-Leu - - - Val-Dhb- α Thr-Val-Hse-Dab-Lys	1973.3
Tolaassine C	C ₈ (3OH) - Dhb-Pro-Ser-Leu-Val-Ser-Leu-Val-Val-Gln-Leu - - - Val-Dhb- α Thr-Val-Hse-Dab-Lys	2005.4
Tolaassine D	C ₈ (3OH) - Dhb-Pro-Ser-Leu-Val-Ser-Leu-Val-Val-Gln-Leu - - - Val-Dhb- α Thr-Val-Hse-Dab-Lys	1987.4
Tolaassine E	C ₈ (3OH) - Dhb-Pro-Ser-Leu-Val-Ser-Leu-Val-Val-Gln-Leu - - - Val-Dhb- α Thr-Val-Hse-Dab-Lys	1943.3
Tolaassine I	C ₈ (3OH) - Dhb-Pro-Ser-Leu-Val-Ser-Leu-Val-Val-Gln-Leu - - - Val-Dhb- α Thr-Ile-Hse-Dab-Lys	1987.4
Tolaassine II	C ₈ (3OH) - Dhb-Pro-Ser-Leu-Val-Ser-Leu-Val-Val-Gln-Leu - - - Val-Dhb- α Thr-Ile-Gly-Dab-Lys	1943.3

1.3.2. Les sidérophores

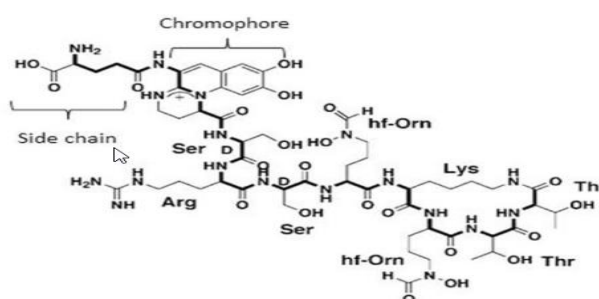
Les sidérophores sont des molécules secrétés par le microorganisme en cas de carence de Fer dans le milieu environnant afin de combler le besoin du microorganisme de permettre d'assurer le bon fonctionnement des voies métaboliques liées à la présence du Fer. Après leur libération ces molécules agissent en captant le Fer qui se trouve dans leur environnement à son état ferrique pour ensuite réincorporés par les récepteurs membranaires spécifiques qui se trouvent à la surface de la cellule microbienne. Les sidérophores sont des molécules qui présentent une grande diversité structurale (figure 8). Chez les *pseudomonas* les sidérophores les plus connu sont les pyoverdines qui sont des sidérophores à haute affinité pour le Fer, produit principalement par des *Pseudomonas fluorescens* (Neilands, 1995), mais peuvent être aussi produits par des *Pseudomonas putida* et des *Pseudomonas aeruginosa*, en outre d'autres sidérophores sont aussi mis en évidence chez les *Pseudomonas* comme la pyocheline (Cox et al., 1981), la pseudomonine (Anthoni et al., 1995) et la thioquinolobactine (Matthijs et al., 2007).



Pyocheline (Adler et al., 2012)



Pseudomonine (Denaro et al., 2014)



Pyoverdine produit par *P.aeruginosa* (Cornelis and Dingemans, 2013)

Fig. 8 : Structures de différentes NRPs sidérophores produits par des bactéries du genre *Pseudomonas*

1.4. Les domaines des synthétases NRPS chez les *Pseudomonas*

De nombreux peptides secondaires synthétisés par des *Pseudomonas* impliquent l'utilisation d'un complexe multienzymatique formé par des synthétases non ribosomiales appelés en anglais 'Non Ribosomal Peptide Synthetase' ou NRPS qui sont codés par un ensemble de gènes regroupés en opéron ou Cluster à l'intérieur du génome. Ce mécanisme de biosynthèse a été découvert pour la première fois par Lipmann et al., 1971. Les NRPSs s'organisent en modules dont chacun est responsable à l'incorporation d'un acide aminé spécifique dans la chaîne peptidique du métabolite en formation. A leur tour, les modules sont subdivisés en domaines qui sont impliqués dans l'activation du monomère, l'élongation de la chaîne peptidique et la libération du peptide synthétisé (Sieber et Marahiel, 2005). La taille d'une synthétase varie entre 2 et une vingtaine de modules (Stachelhaus et Marahiel, 1995). Les modules sont composés principalement par des domaines d'adénylation (A), de thiolation (T), de condensation (C) et de thioestérase (Te) dont chacun possède une activité enzymatique essentielle pour la biosynthèse du peptide en formation.

- **Le domaine d'adénylation :**

Le domaine d'adénylation (A) est composé par 550 acides aminés et a pour rôle la reconnaissance et l'activation d'un monomère. La sélection de l'acide aminé se fait après une réaction d'hydrolyse d'une molécule d'ATP qui fait intervenir des ions Mg^{2+} pour donner une forme active du monomère appelée aminoacyl-adénylate (Dieckmann et al., 1995; May et al., 2002; Stachelhaus et Marahiel, 1995). La sélection du monomère par le domaine d'adénylation se fait en fonction des acides aminés présents dans des positions bien définies de leurs sites actifs.

- **Le domaine de thiolation:**

Le domaine de Thiolation (T) appelé aussi domaine PCP (Peptidyl Carrier Protein), est un domaine formé d'environ 100 acides aminés. C'est le domaine qui permet la fixation d'une manière covalente le l' aminoacyl adénylate activé par le domaine A par un lien thioester et aboutit à la formation d'un aminoacyl-thioester (figure 9). Le transfert de l' aminoacyl adénylate sur le domaine T est assurée à l'aide d'un cofacteur phosphopantéthéinique, ainsi la transformation du domaine PCP contenant le cofacteur de sa forme inactive 'Halo' à la forme active 'Apo' est réalisée par l'intermédiaire d'une phosphopantéthéine transférase (Quadri et al., 1998).

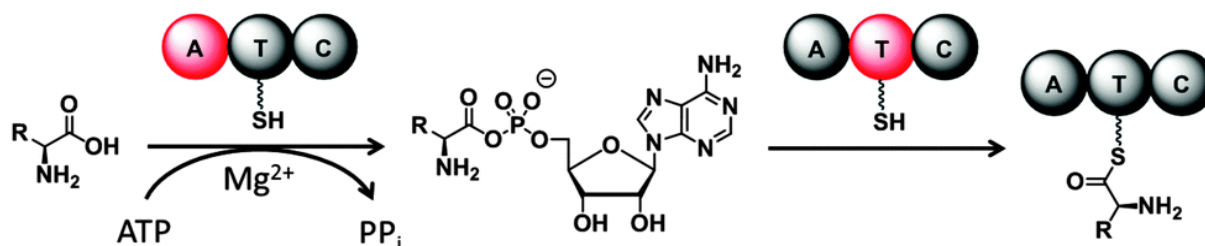


Fig. 9 : Réaction d'activation d'un monomère sélectionné par les domaines A en aminoacyl adénylate et sa fixation sur le domaine (Kasai et al., 2012)

- **Le domaine de condensation:**

Le domaine de condensation C est formé de 450 acides aminés, il est impliqué à la formation d'une liaison peptidique entre deux acides aminés de deux modules adjacents. En général, le nombre de liaisons peptidiques formées est égale au nombre des domaines C au niveau de la synthétase. En effet, la liaison peptidique est établie par une attaque nucléophile de l'acide aminé fixé sur le domaine T1 du module 1 par l'acide aminé fixé sur le domaine T2 du module 2 (Eppelmann et al., 2002). Selon la littérature, 4 types de domaines C qui ont été mis en évidence (Rauch et al., 2007) :

- Le domaine ^DC_L qui se situe après un domaine d'épimérisation et qui est responsable à assurer la liaison peptidique entre deux acides aminés dont l'un est sous forme D et l'autre sous forme L.
- Le domaine ^LC_L qui est responsable à assurer une liaison peptidiques entre deux acides aminés de forme L.
- Le domaine C/E ou 'dual condensation épimérisation' qui a été mis en évidence chez les NRPS dont le premier module contient une double fonction d'épimérisation de l'acide aminé. Ce domaine a été mis en évidence chez les NRPS qui contiennent pas d'activité spécifique d'épimérisation mais dont le produit final contient des acides aminés sous formes D, telle est le cas des NRPS responsables à la synthèse des syringomycines, des arthrofactines et les syringomycines (Balibar et al., 2005).

- Le domaine C_{starter} qui est situé à l'extrémité N-terminale de la synthétase et qui est responsable à établir la liaison entre l'acide aminé sélectionné par le module d'initiation de la synthétase et l'acide gras situé au début de la chaîne peptidique.

- **Le domaine de thioestérase (TE):**

Le domaine TE est situé à l'extrémité C-terminale de la synthétase et il est composé par 280 acides aminés. Ce domaine est responsable à libération du peptide formé en effectuant l'hydrolyse de de la liaison thioester établie entre le peptide et le domaine T du dernier module de la synthétase. Ce domaine peut aussi assurer la cyclisation du peptide quand il est présent avec un autre domaine Te en tandem comme est le cas des divers lipopeptides produit par *Pseudomonas*, Ainsi le deuxième domaine Te intervient à la libération des domaines de thiolation ayant acétylé d'une manière erronée (Sieber et Marahiel, 2003).

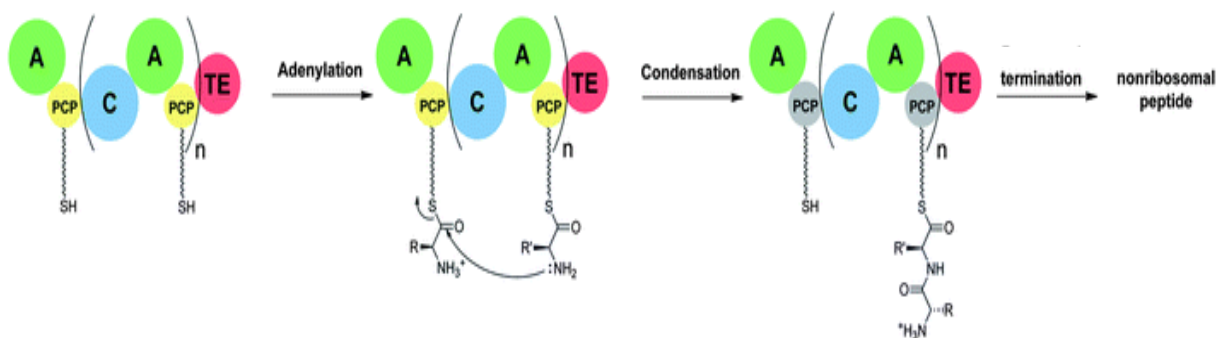


Fig. 10 : Schéma des différentes étapes de biosynthèse de peptide non ribosomal par une synthétase (Concurso et Bruner, 2012)

En plus des 4 domaines principaux précédemment cités (figure 10), certaines modules font intervenir des domaines secondaires qui interviennent dans la biosynthèse du peptide non ribosomal. Ainsi on peut trouver des domaines d'épimérisation (E), de oxydation (Ox), de réduction (Re), de cyclisation (Cy), de méthylation (M) et de formylation (F) (figure 11). Ces domaines secondaires ont pour rôle l'obtention de différents variants du peptide synthétisé et d'offrir ainsi une diversité importante au niveau des activités biologiques des peptides non ribosomiaux.

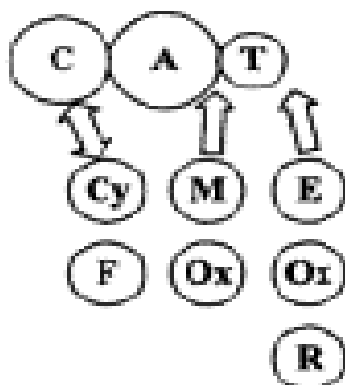


Fig. 11 : Localisation des domaines secondaires au niveau d'un module d'élongation (Stachelhaus et al., 2002)

Ces différents domaines sont organisés en modules à l'intérieur d'une synthétase NRPS, ainsi on y distingue 3 types de modules : Le module d'initiation qui est composé d'un domaine d'adénylation (A) et d'un domaine de thiolation (T), un module d'élongation qui se compose d'un domaine d'adénylation (A), d'un domaine de thiolation (T) et d'un domaine de condensation (C), cette organisation dans le module d'élongation se répète n fois la longueur du peptide synthétisé, et finalement un module de terminaison qui est formé d'un domaine de condensation (C) et d'un domaine de thioestérase (Te) (Mootz et al., 2002). Ainsi, la structure modulaire générique d'une protéine NRPS s'organise de la manière suivante :



1.5. Les voies de biosynthèse des lipopeptides chez les *Pseudomonas*

Trois différents mécanismes de biosynthèse des NRPS ont été définis selon l'organisation des différents modules dans la synthétase (Mootz et al., 2002).

- **La biosynthèse linéaire**

La biosynthèse linéaire correspond à l'organisation des monomères du peptide synthétisé selon l'ordre et le nombre de modules de la synthétase NRPS (figure 12). Ainsi la séquence du peptide néoformé correspond alors au nombre et à l'ordre des modules dans la synthétase.

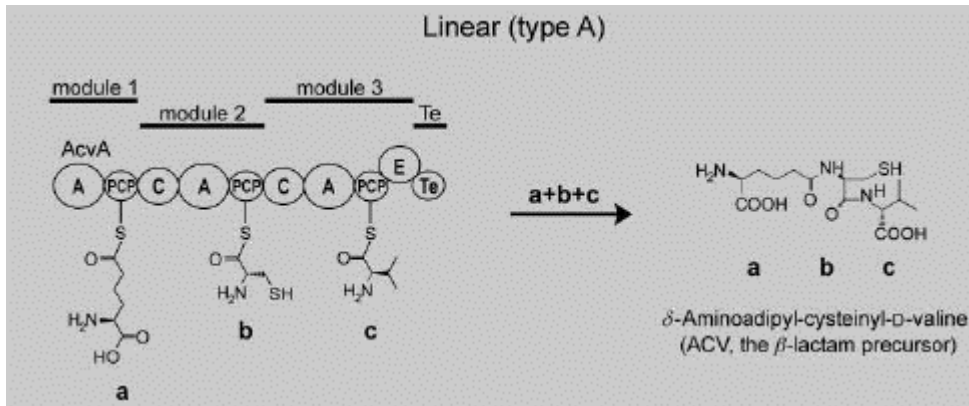


Fig. 12 : Schéma de la biosynthèse linéaire pour les δ -aminoadipyl-cysteinyl-D-valine (Mootz et al., 2002)

- **La biosynthèse Itérative**

La biosynthèse itérative est un mécanisme où l'utilisation de chaque module peut être effectuée plusieurs fois pour l'assemblage des monomères du même peptide.

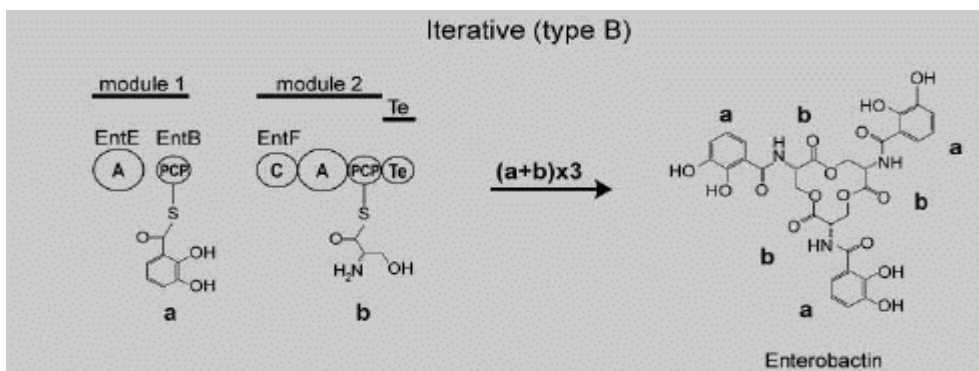


Fig. 13 : Schéma de la biosynthèse itérative : cas de l'entérobactine (Mootz et al., 2002)

- **La biosynthèse non linéaire**

La biosynthèse non linéaire est le mécanisme qui correspond à un ordre de l'assemblage des monomères différent à l'organisation des modules dans une synthétase (figure 14).

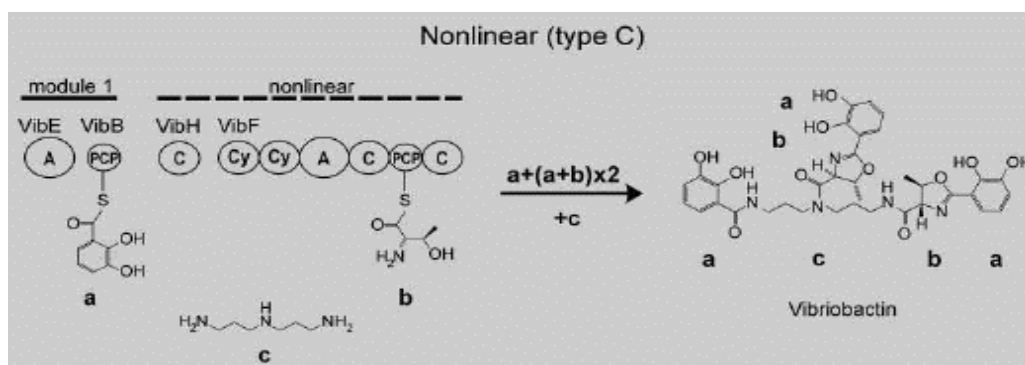


Fig. 14 : Schéma de la biosynthèse non linéaire : cas de la vibriobactine (Mootz et al., 2002)

1.6. Les nutriments influents la production des lipopeptides

Afin d'incorporer les lipopeptides dans les procédés de production à l'échelle industrielle, il est important de définir un milieu de fermentation permettant de réduire les coûts de production et d'augmenter le taux de production des lipopeptides. Ces molécules sont définies comme des métabolites dont la production n'est pas associée à la croissance et qui est induite quand les cellules bactériennes ont épuisé un ou plusieurs substrats essentiels. L'optimisation du milieu de culture est un facteur important dans la production des lipopeptides. La nature des sources de carbone, d'azote et des oligoéléments et leurs concentrations influent significativement sur la nature et la quantité des lipopeptides produits.

1.6.1. Les sources de carbone

La source de carbone a un impact important sur le métabolisme bactérien ainsi que le coût de production par les procédés fermentaires. Ainsi, la nature et la concentration de la source de carbone représente un facteur potentiellement intéressant qui affecte la production des lipopeptides. Certaines bactéries comme les *Pseudomonas* se caractérisent par leur capacité d'assimiler certaines sources de carbones insolubles dans l'eau comme les huiles végétales et les hydrocarbures pour la production des lipopeptides comme est le cas des *Pseudomonas sp. DSM 2874* qui utilisent l'huile de colza comme source de carbone pour la production des lipopeptides biosurfactants. Cependant les études sur l'optimisation de la production des lipopeptides par des bactéries du genre *Pseudomonas* à partir des sources de carbones simples restent très restreintes. L'exemple par *Bacillus amyloliquefaciens* montre bien l'influence des sources de carbones simples sur la production des lipopeptides. En effet, l'utilisation du

dextrose, le glycérol, et le sucrose mène à la production des surfactines, les iturines et les fengycines, tandis que l'utilisation du maltose, du lactose et du sorbitol comme sources de carbones aboutit uniquement à la production des iturines (Singh et al., 2014).

1.6.2. Les sources d'azote

Plusieurs sources d'azote inorganique ont été mises en évidence pour la production des lipopeptides comme le nitrate d'ammonium, le nitrate de sodium, le sulfate d'ammonium et l'urée. En outre, d'autres sources d'azote complexes ayant un faible coût sont également montrées efficaces pour la production des lipopeptides comme la farine de soja, les peptones et les hydrolysats acides de caséine (Liu et al., 2012). Les sources d'azote organique comme le tryptone possèdent également un effet positif sur la production des lipopeptides différents L-acides aminés généralement homologues à ceux trouvés dans leurs chaînes peptidiques (Zhao et al., 2013), comme il a été similairement observé en milieu Landy modifié en substituant l'acide glutamique par différents L- α -acides aminés. Le tourteau de colza représente un bon exemple de sources d'azote utilisé pour l'augmenter de la production de l'iturine A par des *Bacillus subtilis* qui atteint une amélioration 8 fois plus haute comparant à d'autres sources d'azote (Jin et al., 2014).

1.6.3. Les minéraux

La composition du milieu de culture en oligoéléments représente un facteur aussi important l'optimisation de la production des lipopeptides comme il s'agit des éléments qui interviennent dans les voies métaboliques de la biosynthèse de ces molécules. Ainsi certains cations bivalents comme le Fe^{2+} possèdent un rôle crucial pour la production des lipopeptides comme est l'exemple des surfactines produits par *Bacillus subtilis* dont la production a augmenté de 8 à 10 fois en supplémentant un milieu de culture minimum par des ions Fe^{2+} (Wei et al., 2007). D'autres études ont montré aussi l'effet positif de la présence de certains minéraux comme les $MnSO_4$, $FeSO_4$ et $Fe_2(SO_4)_3$ sur l'augmentation de la production des lipopeptides comme est le cas des surfactines produits par des souches de *Bacillus* (Yeh et al., 2005). L'optimisation de la composition du milieu en cations bivalents se fait généralement à travers des plans d'expériences, ce qui est le cas des surfactines dont la concentration a doublé en utilisant un plan statistique de Taguchi (Weng et al., 2007).

1.7. Les plans d'expériences

Les plans d'expériences consistent à une série d'essais qui permettent d'analyser simultanément l'effet des variables d'entrée appelés 'Facteurs' qui représentent une grandeur physique modifiable par l'expérimentateur afin d'étudier son influence sur les variables de sortie appelées 'Réponses' qui représentent les grandeurs physiques étudiées. Ces outils sont appliqués généralement dans les expériences qui accompagnent les procédés industriels et la recherche scientifique afin d'identifier les paramètres ayant une influence sur la qualité des résultats et de déterminer par conséquent les facteurs aboutissant à des réponses optimales (Goupy, 2006). Il existe deux types d'investigations de plans d'expériences qui peuvent être utilisés dans les expériences d'optimisation : les plans de criblage ou de screening et les plans de surface de réponse (RSM).

1.7.1. Les plans de criblage

Le plan de criblage ou de screening représente une technique qui permet de distinguer parmi les facteurs étudiés par l'expérimentateur, ceux qui ont une influence sur la variation de la réponse non négligeable statistiquement. Ainsi cette technique permet de sélectionner et de retenir les paramètres ayant une influence digne d'intérêt en testant l'effet de plusieurs facteurs avec un maximum d'amplitude de sa borne supérieure à sa borne inférieure. Le plan de criblage nécessite l'application du principe statistique d'orthogonalité qui consiste à répéter l'expérience précédente pour chacune des variables en maintenant les autres fixés successivement à leurs deux niveaux possibles. Ainsi ce système représente 'un plan factoriel complet' et conduit à la génération de 2^k expériences. Malgré l'avantage présenté par cette méthode comme aucun facteur ne présente aucun biais de calcul dans le calcul des effets des autres, cette technique présente aussi un inconvénient de vue des nombres d'expériences générés quand k devient important. D'autres alternatives de criblage moins coûteuse peuvent alors être utilisés dont :

- Les plans factoriels fractionnaires : cette méthode permet de réduire significativement le nombre de points par plan en introduisant la notion de la confusion des effets.
- Le plan de Taguchi : il s'agit du même principe qu'un plan factoriel fractionnaire tenant compte des interactions entre les facteurs considérés importants. Cette

technique est développée principalement pour des expériences réalisées à l'échelle industrielle.

- Le plan de Plackett-Burman : c'est un plan dont les effets principaux sont aliasés avec les interactions à deux facteurs et qui n'est par ailleurs utilisé que lorsque les interactions à deux facteurs sont considérés négligeables.

Les plans d'expériences par criblage permettent d'avancer sur la compréhension qualitative du système étudié en permettant de sélectionner les paramètres ayant une influence significative, cependant pour réaliser une étude à caractère principalement quantitatif des méthodologies des surfaces de réponses peuvent être réalisés.

1.7.2. Les méthodologies de surface de réponse (RSM)

La méthodologie des surfaces de réponse constitue une technique qui vise à la détermination d'une manière quantitative les variations de la réponse vis-à-vis des facteurs ayant une influence significative (Jacques, 2000). Cette méthode est précédée généralement par des plans de criblage qualitatif et ne prend en compte que les facteurs ayant une influence significative sur la réponse. La surface de réponse a donc pour objectif de mener une étude plus complète de la fonction réponse qui peut servir de base de recherche des conditions optimales. On utilise ainsi un concept d'optimisation indirecte. La méthodologie de surface de réponse est donc considérée comme un ensemble d'outils qui permettent l'exploitation d'objets simplificateurs de la réponse étudiée.

2. Situation et objectif du travail

Les lipopeptides sont des molécules produites par une grande variété de genres bactériens dont les *Pseudomonas*. Ils sont composés d'un acide gras lié à un oligopeptide court et possèdent une grande variété de structures et d'activités biologiques dont des activités biosurfactante, anti-microbiennes et élicitrices (induction d'une réponse de résistance aux pathogènes chez les plantes). Les lipopeptides sont également de puissants biosurfactants susceptibles de remplacer à terme certains surfactants de synthèse notamment dans les activités de bioremédiation.

Le groupe taxonomique des *Pseudomonas* est intéressant à explorer car il possède un potentiel important de synthèse de lipopeptides encore peu exploité. Les présentes travaux consistent à sélectionner des bactéries du genre *Pseudomonas* isolés à partir d'un sol d'ateliers de mécanique tunisiens souillés par des hydrocarbures afin d'en rechercher des molécules bioactives ayant des propriétés biosurfactantes et émulsifiante. Un criblage des molécules produites sur milieu riche par spectrométrie de masse de type MALDI-ToF va être réalisé pour mettre en évidence la production des lipopeptides.

Une première purification visant pour la caractérisation structurale va être développée en utilisant des techniques d'extraction en phase solide et de séparation par chromatographie. Ensuite pour la purification des lipopeptides produits à une plus grande échelle des processus d'ultrafiltration et de diafiltration, souvent utilisés pour la production des lipopeptides purifiés à l'échelle pilote, vont être adoptés pour servir au test à la mise en évidence des activités biologiques de ces lipopeptides ainsi que de leur potentiel de dégradation des hydrocarbures.

L'identification de la structure chimique des lipopeptides produits par les souches criblées va être réalisée en utilisant une approche combinée alliant la spectrométrie de masse à la bioinformatique en utilisant des logiciel de prédiction de la structure de la chaîne peptidique des lipopeptides en analysant les gènes codant à leurs biosynthèse et l'organisation modulaire des synthétases qui en sont issues.

Enfin, une optimisation des conditions de production de la molécule en milieu liquide pour la méthode des plans d'expériences en testant des modèles qualitatifs et quantitatifs est aussi en cours de développement pour la détermination d'une composition optimale du milieu de culture en nutriments et oligoéléments afin d'améliorer le niveau de production des molécules d'intérêt. La définition des conditions de production sera exploitée pour la mise en

oeuvre d'une production en bioréacteurs. Une production et purification à l'échelle pilote de ces nouveaux biosurfactants sera réalisée afin d'obtenir une quantité importante de biomolécules pour tester leurs activités biologiques potentielles.

Chapitre 2

Matériels et méthodes

1. Isolement des souches de *Pseudomonas*

1.1. Echantillonnage et purification des souches de *Pseudomonas*

Les colonies bactériennes ont été isolées à partir de 3 trois différents emplacements :

- Un sol d'un atelier de mécanique contaminé par des hydrocarbures
- Un effluent d'une industrie pétrolière
- Un sol contaminé par des huiles végétales d'une huilerie

Les échantillons de sol ont été prélevé à partir de la surface, et des profondeurs de 5 cm et de 10 cm. 1 g de chaque échantillon a été mélangé avec 10 ml d'eau physiologique et vortexer pendant 10 minutes. Ensuite, une série de dilution par l'eau physiologique allant de 10^{-1} jusqu'à 10^{-4} a été préparée. 1 ml de chaque dilution a été étalé sur une gélose LB et incubé à 30°C pendant 24 heures. Ensuite, les colonies bactériennes ont été purifiées en étalant chaque colonie isolée sur une gélose cétrimide un milieu spécifique pour l'isolement des bactéries du genre *Pseudomonas* et ont été incubées à 30°C et à 37°C pendant 24 heures. Les souches de *Pseudomonas* ainsi obtenues ont été conservées pour les expériences ultérieures.

1.2. Les milieux de culture

Deux milieux de culture ont été utilisés pour l'isolement et la purification des souches de *Pseudomonas*

1.2.1. Milieu Cétrimide

Le milieu cétrimide est un milieu sélectif des *Pseudomonas* et qui est généralement utilisé pour l'identification des *Pseudomonas aeruginosa* comme il contient le bromure de cétyltriméthylammonium qui est responsable à l'inhibition des bactéries autre que les *Pseudomonas* en causant la libération de l'azote et des formes phosphorés de la cellule bactérienne. Le milieu cétrimide est composé de : digestât pancréatique de gélatine 20 gL^{-1} , chlorure de magnésium $1,4\text{ gL}^{-1}$, sulfate de potassium 10 gL^{-1} , glycérol 10 mL, bromure de cétyltriméthylammonium $0,3\text{ gL}^{-1}$, agar $13,6\text{ gL}^{-1}$; pH $7,2 \pm 0,2$. La stérilisation du milieu

Cétrimide est effectuée par autoclavage avec un traitement thermique de 121°C pendant 15 minutes.

1.2.2. Milieu Luria-Bertani LB

Le milieu Luria-Bertani (LB) a été utilisé sous forme gélosée pour la purification des colonies des souches de *Pseudomonas* précédemment isolées. Ce milieu est composé de : Extrait de levure 5 gL⁻¹, Tryptone 10 gL⁻¹, Chlorure de Sodium 10 gL⁻¹, Agar 17 gL⁻¹ ; pH 7,2. La stérilisation du milieu est effectuée par autoclavage avec un traitement thermique de 121°C pendant 20 minutes.

1.2.3. Conservation des souches

Pour la suite des expériences un stock des *Pseudomonas* isolés a été conservé en répartissant les colonies purifiées sur la gélose LB dans des cryotubes contenant 40% de glycérol qui ont été stockés à -80°C pour une conservation à longue durée. Les souches de *Pseudomonas* isolées ont été conservées dans des tubes à billes (Technical service consultants, Ltd, Heywood UK) et stockées à -20°C pour une conservation à courte durée.

2. Cultures des souches de *Pseudomonas sp.* en fioles d'Erlenmeyer

Durant ce travail, deux milieux de cultures ont servis pour la réalisation des cultures bactériennes en fioles d'erenmeyer qui sont le milieu TSB et le milieu minimum M9.

2.1. Milieu TSB

Le milieu TSB est constitué de : Digestion pancréatique de caséine 17 gL⁻¹, Digestion peptique de semoule de Soja 3 gL⁻¹, Glucose 2,5 gL⁻¹, Chlorure de Sodium 5 gL⁻¹, Phosphate bipotassique d'hydrogène 2,5 gL⁻¹ ; pH 7,3. La gélose TSA est préparée en ajoutant aux composants du milieu TSB précédemment cités 17 gL⁻¹ d'agar bactériologique. La stérilisation du milieu TSB est effectuée par autoclavage avec un traitement thermique de 121°C pendant 20 minutes.

2.2. Milieu minimum M9

Le milieu M9 est un milieu minimum composé de : Hydrogénophosphate de sodium 6 gL⁻¹, Phosphate de potassium monobasique 3 gL⁻¹, Chlorure de sodium 0,5 gL⁻¹, Chlorure d'ammonium 1 gL⁻¹, Sulfate de magnésium 0,24 gL⁻¹, Glucose 2 gL⁻¹ ; pH 7,4. Pour assurer une reproductibilité de la composition du milieu des solutions stocks concentrés sont préalablement préparées et stérilisés séparément.

- La solution saline concentrée 10X composée de : Na₂HPO₄ 60 gL⁻¹, KH₂PO₄ 30 gL⁻¹, NaCl 5 gL⁻¹, NH₄Cl 10 gL⁻¹. La solution est stérilisée par autoclavage à 121°C pendant 20 minutes après avoir ajuster le pH à 7,4 en utilisant une solution de NaOH 10M.
- Une solution de MgSO₄ 1M, stérilisée par autoclavage à 121°C pendant 20 minutes.
- Une solution de glucose (40%, P/V), stérilisée par filtration à travers des membranes de porosité de 0,22 µm.

Le milieu M9 gélosé est préparé en préparant une solution contenant 20 gL⁻¹ d'agar bactériologique dans 900 ml d'eau qui sont stérilisés par séparément par autoclavage à 121°C pendant 20 min et y ajouter après refroidissement à 50°C les différents composants du milieu M9 conformément aux proportions précédemment citées.

2.3. Conditions de culture en milieu liquide

Les cultures en milieu liquide sont réalisées dans le milieu TSB ou M9 à 30°C et à 160 rpm. Pour chaque expérience, une préculture est préparée à partir d'une colonie isolée issue d'un repiquage sur boîte TSA d'un cryo-tube à bille conservé à -20°C. La préculture est réalisée dans un Erlenmeyer de 50 ml contenant 10 ml du milieu et incubée pendant 16 heures. Pour ensemercer la culture, la préculture est transférée dans un Erlenmeyer de 500 ml contenant 90 ml de milieu, la culture est incubée 72 h.

3. Purification et concentration des biosurfactants

3.1. Préparation des surnageants de culture

Les cultures bactériennes réalisées sont centrifugées à 10.000 g pendant 10 minutes pour en extraire le surnageant de culture qui est filtré à travers une membrane de porosité de 0,22 μm afin d'en extraire toutes traces de cellules bactériennes. Les surnageants de culture ainsi préparés sont conservés à 4°C pour des utilisations ultérieures

3.2. Semi purification et concentration des biosurfactants par précipitation acide

Les biosurfactants ont été précipités conformément à la méthode décrite par (Cooper et Goldenberg, 1987; Peypoux et al., 1999) pour en préparer des extraits bruts. Cette méthode consiste à l'addition de l'acide chlorhydrique au surnageant de culture jusqu'à atteindre un pH= 2. Le mélange est ensuite incubé pendant une nuit à 4°C. Ainsi, les biosurfactants contenus dans le surnageant de culture précipitent et sont extraits par récupération du culot après une centrifugation à 10,000 RPM pendant 20 minutes. Le culot est finalement resuspendu dans l'eau ultra-pure et le pH de la solution est ajusté à 8 en utilisant une solution de NaOH à 1 M. Le mélange est ensuite conservé à 4°C pour des utilisations ultérieures.

3.3. Purification par extraction en phase solide (EPS)

Une purification par l'extraction des biosurfactants contenus dans les surnageants de culture en phase solide a été effectuée à travers des colonnes C18 Maxiclean ayant pour phase stationnaire un gel de silice octadécyl (Alltech, Templemars, France). La colonne est d'abord reconditionnée avec 10 mL d'acétonitrile pur puis hydratée avec 10 ml d'eau ultra-pure. Un volume de 2 mL des échantillons d'extraits bruts des surnageants de culture est ensuite passé à travers la colonne. Un gradient d'eau/acétonitrile est alors appliqué pour l'élution des différentes fractions : la première fraction est éluée avec 10 mL d'eau ultra-pure pour l'élimination des contaminants les plus hydrophiles comme les sels minéraux, la deuxième fraction est de 10 mL d'acétonitrile/eau (30% V/V) pour l'élimination des peptones, finalement une dernière fraction de 10 ml d'acétonitrile pur contenant les biosurfactants est éluée et

recupérée pour être séchée sous vide à l'aide d'un concentrateur (SpeedVac Plus, Ramsey, USA) à une température de 42°C et conservée à 4°C pour des utilisation ultérieures.

3.4. Chromatographie liquide à haute performance

La chromatographie à haute performance (CLHP) est une méthode de purification et de quantification des biosurfactants. Des surnageants de culture semi-purifiés sur des colonnes EPS sont ainsi filtrés à travers une membrane de porosité 0,22µm. L'échantillon est ensuite injecté dans le système HPLC (Waters, Milford, MA, USA). Le mélange des molécules contenues dans l'échantillon sont séparés par gradient d'affinité entre la phase stationnaire et la phase mobile. La phase stationnaire qui consiste en une phase C18 (218 Vydac TP, Fischerscientific, Strasbourg, France) de nature gel de silice et ayant pour dimension 5 µm x 250 mm x 2,5 mm. 50 µL de l'échantillon sont injectés dans la colonne par un injecteur automatique (717 Autosample Waters, Milford, MA, USA). L'élution des différentes molécules est effectuée avec un débit de la phase mobile de 0,6 mL/minute à l'aide d'une pompe (626 Pump Waters, Milford, MA, USA) en suivant les proportions d'un gradient Eau/Acétonitrile/TFA suivant : 95/5/0,1 (V/V/V) pendant 5 minutes, puis passé à 40/60/0,1 (V/V/V) pendant 5 minutes, puis à 15/85/0,1 (V/V/V) pendant 15 minutes pour passer ensuite en isocratique à 0/100/0,1 (V/V/V) pendant 5 minutes et finalement équilibrer la colonne à 50/50/0,1 (V/V/V) pour 1 minute. Les molécules sont détectées à la sortie de la colonne grâce à un détecteur (2996 PhotoDiode Array Waters, Milford, MA, USA) réglé sur une longueur d'onde de 214 nm pour détecter les liaisons de nature peptidique. Les différents composés de l'échantillon sont caractérisés entre 200 nm et 400 nm par des pics dont les temps de rétention et les dérivés seconds sont analysés automatiquement par le logiciel Millenium. Les échantillons ont été analysés en mode préparatif par la collecte en sortie des molécules séparés qui ont été séchés au speedvac et conservés à 4°C pour des utilisations ultérieures. L'analyse des échantillons en mode analytique a été effectuée pour leur quantification par la mesure des aires des pics des molécules séparées à partir des chromatogrammes obtenus. Dans certains cas, les résultats ont été exprimés en équivalent surfactine à partir d'un étalon de surfactine préparé au laboratoire qui a été utilisé comme standard.

3.5. Purification par Ultrafiltration/ Diafiltration

Les extraits bruts des surnageants de culture filtrés à travers des membranes de porosité de 0,22 μm , ont été purifiés à travers des tubes microcentrifuges contenant des membranes en polyethersulfone (PES) de tailles de seuil de coupure de 5 KDa et 10 KDa (Millipore, Molsheim, France). Ainsi, une première ultrafiltration par centrifugation de l'extrait brut est effectuée avec une vitesse de rotation de 4500 g pendant 20 minutes. Cette étape est importante pour l'élimination d'une grande partie des substances résiduelles et les métabolites primaires quant aux biosurfactants ils restent concentrés dans le retentât quand ils se trouvent au-dessus de leurs CMC grâce à la formation de complexes micellaires. Le retentât est ensuite diafiltré par trois lavages successifs à l'eau ultra-pure en effectuant des centrifugations dans les mêmes conditions précédentes afin d'éliminer les micromolécules et les sels minéraux de l'échantillon. Enfin, l'échantillon est ultrafiltré au méthanol à 25% afin de détruire les liaisons micellaires et éluer le biosurfactants qui est récupéré au cours de cette étape dans le filtrat. La pureté des filtrats et des retentât est ensuite vérifiée par évaluation en CLHP ou CLHP couplée à la masse, ainsi un rapport de purification peut être établi

4. Screening des souches ayant un potentiel de production des biosurfactants

4.1. Test de 'Drop-collapse'

Pour identifier les souches ayant le potentiel de produire des biosurfactants, un test de 'Drop-collapse' a été effectué. Ce test réalisé à travers une plaque à 96 puits, consiste à placer 2 μl d'huile de paraffine à l'intérieur de chaque puit et le laisser équilibrer pendant 1 heure à la température ambiante. Ensuite, 5 μl de surnageant de culture des isolats bactériens ont été ajoutés à la surface de l'huile et le résultat a été observé après 1 minute. Les cultures contenant des biosurfactants donnent une goutte plate et sont marquées positives tandis que celles qui donnent une goutte ronde sont marquées négatives et soulignent une déficience des surnageants de culture en biosurfactants (Youssef et al., 2004).

4.2. Mesure de la tension de surface et de dilution critique micellaire F_{CMC}

La tension de surface a été mesurée à la température ambiante sur des solutions des extraits bruts des surnageants de culture des souches de *Pseudomonas* précédemment isolées en utilisant un tensiomètre (TD1 LAUDA, Lauda-Königshofen, Allemagne) conformément à la méthode de Du Noüy ring (figure 15). Ainsi des dilutions des extraits bruts avec l'eau ultrapure de: 0; 1/20; 1/10; 1/5; 1/4; 1/2; 1 ont été réalisées pour la détermination de la CMC qui est estimée de la dilution à partir de laquelle on obtient une augmentation brusque de la tension de surface (Chakraborty et al., 2011).

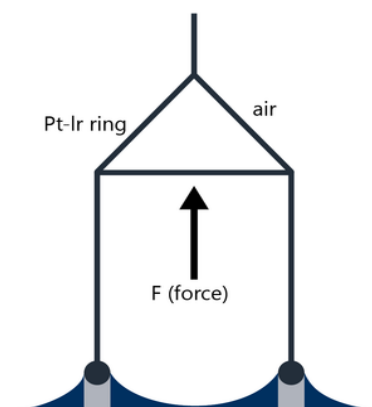


Fig. 15 : Schéma de la méthode de Du Noüy ring pour la mesure de la tension de surface

4.3. Mesure de l'activité émulsifiante

L'activité émulsifiante a été mesurée conformément à la méthode de (Cooper et Goldenberg., (1987). Ainsi, 4 ml d'extrait brut de surnageant de culture (1% p/v) ont été mélangés avec 4 ml de n-hexadécane et vortexés pendant 2 minutes. Le mélange est laissé précipiter pendant 24 heures. L'indice d'émulsification est déterminé ensuite comme suit :

$$E24 (\%) = \frac{\text{Hauteur de l'émulsion}}{\text{Hauteur totale}} \times 100$$

4.4. Test de l'étalement d'huile

Ce test consiste à placer 300 μ l d'eau distillés dans la surface d'une boîte de Pétri à 150 mm de largeur et d'y ajouter 15 μ l de huile organique : le diesel et 20 μ l de surnageant de

culture des isolats de *Pseudomonas* au centre du film de l'huile. Ensuite le diamètre de l'halo formé est visualisé à la lumière visible et mesuré après 30 secondes (Rodrigues et al., 2006).

5. Identification des souches productrices de molécules biosurfactantes

Une identification phénotypique et moléculaire des souches de *Pseudomonas* sélectionnées pour leurs activités biosurfactante et émulsifiante a été effectuée.

5.1. Coloration de Gram

Une caractérisation phénotypique des isolats a été réalisée par une observation microscopique de l'aspect et la morphologie des colonies, et la coloration de Gram. Le principe de la coloration de gram consiste à fixer un frottis sur une lame microscopique et le recouvrir de violet de gentiane (1% P/V) pendant 1 minute puis le rincer à l'eau, la lame est ensuite recouverte de lugol (1% P/V) pendant 1 minute puis un deuxième rinçage à l'eau est effectué. Le violet est ensuite éliminé avec une solution d'éthanol 90° ce qui va permettre de distinguer les bactéries à gram négatif de celles à gram positive. Une fois la lame est rincée, une dernière coloration avec la fushine pendant 1 minute est réalisée et la lame est laissée sécher à l'air avant l'observation microscopique à l'objectif 100X à immersion.

5.2. Caractérisation biochimique des souches

Pour caractériser les isolats sélectionnés pour leurs activités biosurfactantes, des tests biochimiques ont effectués en réalisant différents 20 tests d'assimilation et de détection de métabolites dont les tests oxydase et de fermentation des carbohydrates. Ces tests sont réalisés à l'aide d'un système standardisé utilisé pour l'identification des bacilles à gram négatif : la galerie API 20 NE. L'identification est ensuite faite à l'aide du logiciel APIWEB associé au système.

5.3. Identification moléculaire des souches

L'identification a été réalisée par l'analyse des séquences du gène codant l'ARNr 16S.

5.3.1. Extraction de l'ADN génomique (ADNg)

L'extraction d'ADN g a été faite avec le kit promega « Wizard® Genomic DNA Purification Kit » (Promega corp, Madison, USA), à partir d'une culture bactérienne incubée pendant une nuit en milieu à 30°C. L'extraction de l'ADN g des souches à gram négatif consiste à la lyse des cellules bactériennes, la purification de l'ADN par l'élimination des protéines, et des acides nucléiques comme l'ARN et à la concentration de l'ADN par précipitation à l'éthanol 70% et à l'isopropanol. Une quantification de l'ADN g extrait est effectuée grâce au spectrophotomètre NanodropTM 1000 avant sa conservation à -20°C pour les expériences ultérieures.

5.3.2. Amplification de l'ADN 16S par PCR

L'amplification génique de l'ADN in vitro est réalisée grâce à une réaction en chaîne par polymérase (PCR) qui est une réaction qui permet d'obtenir un grand nombre de copies d'un fragment d'ADN en utilisant des amorces spécifiques des séquences à amplifier. Au cours de cette expérience deux amorces ont été utilisés : S1 et S2 (Tableau 11).

Tableau 11 : Structure des amorces universelles S1 et S2

Amorce	Séquence	Concentration initiale
S1 (F)	5'AGAGTTTGATC(A,C)TGGCTCAG-3'	20 µM
S2 (R)	5'GG(A,C)TACCTTGTTACGA(T,C)TTC-3'	20 µM

Pour réaliser la réaction, on place dans un tube PCR : 5 µL d'ADN de concentration supérieure à 25 ng/µL, 2,5 µL de chacune des deux amorces, 25 µL de Master Mix et 15 µL d'eau. L'amplification est ensuite réalisée sur 30 cycles comportant les étapes suivantes : une dénaturation initiale à 94°C pendant 3 minutes, une dénaturation à 94°C pendant 40s, une hybridation à 55°C pendant 50s, une élongation à 72°C pendant 2 minutes et une élongation finale à 72°C pendant 10 minutes.

5.3.3. Electrophorèse sur gel d'agarose

Cette étape est importante pour la vérification de la pureté et de la quantité des produits PCR. Le gel d'agarose est préparé dans le tampon TBE 0,5X à une concentration de 0,7%, avec l'addition du Gel Red TM, un colorant qui s'introduit dans les acides nucléiques fourni par FluoProbes®. Les échantillons d'ADN sont mélangés avec le bleu de bromophénol et déposés sur le gel d'agarose pour migration. Les bandes d'acides nucléiques sont ensuite visualisées à l'aide du Gel Doc 2000 de Biorad® sous UV.

5.3.4. Purification des produits PCR

Les bandes du gel contenant les fragments d'ADN sont coupés et purifiés selon le protocole décrit par le kit de purification fourni par le kit QIA quick gel extraction kit de QIAGEN (Qiagen, Hilden, Allemagne).

5.3.5. Ligation et clonage plasmidique

Cette étape consiste à l'insertion du fragment d'ADN précédemment purifié dans le vecteur pGEMT-Easy (Promega) qui est un plasmide linéaire qui permet le clonage des produits PCR grâce à la désoxythymidine débordante à chaque extrémité 5'. Les produits de ligation sont constitués d'un mélange de ligase d'ADN T4, un tampon de ligation et une quantité d'ADN déterminée comme suit :

$$\text{Quantité d'insert} = \frac{\text{Taille del'insert}}{\text{taille du vecteur}} * 3 * \text{quantité du vecteur}$$

Les produits de ligations sont conservés à 16°C pendant une nuit.

5.3.6. Transformation par compétence naturelle

Le vecteur de clonage est transféré le vecteur de clonage pGEMT-Easy dans une cellule compétente E. coli JM109 (Promega Corp, USA). La transformation est réalisée en mélangeant 2 µl de produit de ligation 25 µl de cellules compétentes et incubé le mélange dans la glace pendant 15 à 20 minutes. Un choc thermique de 45 secondes à 42°C est ensuite exercé, puis 1

ml de milieu SOC, et l'ensemble est incubé à 37°C pendant 1,5 à 2 heures. Le mélange est ensuite étalé dans la gélose LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline, X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside), et l'IPTG (isopropyl-β-D-thio-galactopyranoside) pour la sélection des clones transformés après incubation à 37°C pendant une nuit. Les colonies blanches qui correspondent aux bactéries qui n'ont pas la capacité de la production β-galactosidase à cause de l'inactivation du gène LacZ désignent les bactéries ayant inséré le fragment PCR dans le plasmide, et sont alors sélectionnées. Tandis que les colonies bleues témoignent que le gène LacZ est intact, l'insertion n'a donc pas eu lieu.*

5.3.7. Extraction de l'ADN plasmidique

Après une culture d'une nuit d'une colonie blanche recombinante dans le milieu LB dont l'ampicilline est additionnée à une concentration finale de 100 µg/ml, l'extraction du plasmide est réalisée à l'aide le kit QIA prep Spin Miniprep de QIAGEN en suivant le protocole du fournisseur.

5.3.8. Digestion enzymatique

Une digestion par l'enzyme EcoRI (Fermentas, France) est effectuée pour la vérification de l'efficacité du clonage. Ainsi 2 µL d'enzyme de restriction EcoRI sont mélangés avec 2 µL de tampon EcoRI et 3 µl de l'ADN plasmidique de concentration entre 50-100 ng/µL et incubés à 37°C pendant 1 heure et demi.

5.3.9. Séquençage et analyse phylogénétique

Les fragments d'ADN clonés ont été séquencés par la société Eurofins Genomics (Ebersberg, Allemagne). Les amorces utilisées lors du séquençage sont pUC-M13-R et pUC-M13-F dans le système ABI PRISM DYE Terminator cycle sequencing kit. Ces séquences ont été comparées aux bases de données GenBank à l'aide du logiciel BLAST (Basic Local Search Tool) fourni en ligne par le National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, États-Unis). Les séquences des souches les plus proches du gène de l'ARNr 16S des isolats ont été téléchargées à partir des bases de données du NCBI. Un alignement de séquences

obtenues est ensuite réalisé avec le logiciel MUSCLE. L'arbre phylogénétique est ensuite reconstruit à partir des séquences alignées en utilisant le logiciel Mega 7.0 avec la méthode de Neighbour-joining appliquée aux distances de deux paramètres. Toutes les séquences ont été soumises à la base de données GenBank avec des numéros d'accèsion: MG183696 (E39), MG183695 (E311), and MG188738 (E313).

6. Identification et caractérisation de la structure chimique des biosurfactants

La nature chimique des biosurfactants a été en premier lieu caractérisée par des réactions spécifiques en chromatographie sur couche mince (CCM), puis l'identification de la structure chimique en utilisant une approche combinée qui relie la spectrométrie de masse MALDI-Tof aux outils bioinformatiques.

6.1. Chromatographie sur couche mince 'CCM'

La caractérisation de la nature chimique des biosurfactants a été effectuée à travers une chromatographie sur couche mince CCM, ou 'Thin layer chromatography' comme est son nom en anglais. Cette technique consiste à faire migrer les constituants de l'échantillon à analyser à travers une phase stationnaire qui est une couche mince d'un matériel absorbant. Ainsi, 40 μ L des extraits bruts des surnageants de culture des souches productrices des biosurfactants ont été déposés sur des plaques en gel de silice (F-254; Fisher), en utilisant un échantillonneur automatique 'CAMAG TLC Sampler'. La migration des échantillons a été assurée en utilisant une phase mobile constituée de CHCl_3 : CH_3OH : H_2O (65:15:2. V/V/V). Les plaques ont été ensuite séchées à l'air, pulvérisées avec des réactifs standards et chauffées à 105 ° C pendant 5 minutes. La ninhydrine (0,5 g de ninhydrine + 100 ml d'acétone) a été utilisé pour la détection des peptides, l'antrone (1 g d'antrone + 5 ml d'acide sulfurique + 95 ml d'éthanol) pour la détection des glycolipides et le α -naphtol (3,75 g de naphtol + 25 ml d'acide sulfurique) pour la détection des glucides.

6.2. Spectrométrie de masse MALDI-ToF

La spectrométrie de masse MALDI-ToF est une technique d'analyse qui permet de détecter et d'identifier les molécules selon leurs charges électriques et leurs masses moléculaires. L'analyse a été effectuée en utilisant un spectromètre de masse (Bruker, Bremen, Allemagne). Les analyses sont effectués sur une colonie bactérienne isolée sur la gélose TSA et remise en suspension avec 10 μ L de matrice composée d'une solution saturée d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique mélangée dans une solution de CH₃CN/H₂O ; 3/2 ; v/v avec 0,1% d'acide trichloracétique. Les molécules des surnageants de culture ont été également analysées en mélangeant 1 μ L de surnageant de culture avec 10 μ L de la solution matrice. Les échantillons ont été déposés sur des plaques MALDI-ToF à 384 cibles en suivant la méthode de préparation des gouttelettes séchées. L'appareil est équipé d'un laser à azote opérant à 337 nm dont la puissance est de 116.8 μ J et ayant un voltage d'accélération en mode positif de 25 kV avec une matrice de détection au-dessus de 500 mV. La calibration de l'appareil est effectuée avec un mélange peptidique allant de 1046,54 à 3147,47 (Bruker part.206195). Les masses des molécules à analyser ont été mesurés dans intervalle de masse m/z entre 800 et 2000.

6.3. Chromatographie liquide couplée à la masse LC-MS

La chromatographie liquide couplée à la masse LC/MS a été réalisée en phase reverse CLHP-MS (Waters, Acquity class H), qui est couplée à une quadruple MS unique (SQDetector, Waters, Acquity). Les analyses ont été effectués à travers une colonne C18 (Waters) de dimensions 2,1 x 50 mm x 50 μ m. L'élution a été faite en utilisant une phase mobile composée de Eau/Acétonitrile et acidifiée avec 0,1% d'acide formique. L'élution des molécules a été effectuée en suivant un gradient suivant :

Tableau 12: Gradient d'élution des biosurfactants étudiés en CLHP-MS en utilisant l'eau et l'acétonitrile comme phase mobile

Durée (minutes)	Acétonitrile (%)	Eau (%)
5	5	95
5	60	40
15	85	15
5	100	0
1	50	50

L'ionisation et les conditions de la source ont été configurés comme suit: La température de la source : 130°C; la température de désolvatation : 400°C; Le flux d'azote : 1000 L/h; La tension de cône, 120 V.

6.4. Prédiction de la structure des biosurfactants par des outils bioinformatiques

Les outils bioinformatiques ont été utilisés pour analyser le NRPS des génomes complets de souches isolés et sélectionnés pour leur production de molécules d'intérêt.

6.4.1. Norine

Norine est une base de données dédiée aux peptides non ribosomiaux (NRPs). Il contient plus de 1100 peptides et est accessible <http://bioinfo.lifl.fr/norine/>. Pour chaque peptide, il fournit sa structure, son activité biologique, ses organismes producteurs et ses références bibliographiques. La base de données Norine contient un outil de calcul complet pour l'étude systématique des NRPs dans plusieurs espèces et permet d'obtenir une meilleure connaissance de ces produits métaboliques.

6.4.2. AntiSMASH

Il s'agit d'une base de données utilisée pour l'analyse des peptides antibactériens et des métabolites secondaires (antiSMASH). Ce logiciel constitue un nouveau pipeline complet utilisé pour l'extraction automatisée des données des génomes microbiens annotés ou d'un ensemble de séquences de 'contig' contenus dans le génome. Il permet ainsi l'analyse rapide des groupes complets de gènes NRPS ou même des génomes entiers contenant plusieurs groupes de gènes NRPS pour la détection et l'annotation de groupes de gènes de métabolites secondaires afin d'en définir la présence de gènes de biosynthèse de métabolites secondaires. Ce logiciel est disponible sur le site Web:

<http://antismash.secondarymetabolites.org>

6.4.3. NRPS predictor 2

Il s'agit d'un outil utilisé pour la prédiction de la spécificité des domaines A de chaque monomère de la protéine NRPS en fonction de la séquence et des informations structurales concernant le site actif de chaque domaine. La spécificité des domaines A est prédite en utilisant des systèmes vectorielles qui se basent sur quatre niveaux hiérarchiques, allant des propriétés physico-chimiques qui se décomposent en trois parties différentes déterminant si elles sont hydrophiles, hydrophobes-aromatiques ou hydrophobes-aliphatiques brutes des substrats, jusqu'aux substrats d'acides aminés uniques. Le niveau final prédit le substrat que code la protéine NRPS donnée. Ce logiciel est accessible sur le site Web:

<http://nrps.informatik.uni-tuebingen.de>

6.4.4. Napdos

Il s'agit d'un outil qui permet l'analyse et la détection rapide des gènes des métabolites secondaires. Il est conçu pour détecter et extraire les domaines C et KS des séquences d'ADN ou d'acides aminés. Il est utile de déterminer les types de domaine C, qu'il s'agisse des domaines C_{start}, ^DC_L, ^LC_L ou dual C/E. Les domaines sont identifiés en fonction de la comparaison des séquences avec un large ensemble de gènes de référence à guichets manuels à partir de voies chimiques bien caractérisées. Ce logiciel est accessible gratuitement sur le site web:

http://napdos.ucsd.edu/run_analysis.html

7. Optimisation de la production des lipopeptides par la souche de *Pseudomonas sp.* E313 par la méthode des plans d'expériences

7.1. Optimisation des conditions de cultures

Pour la détermination des conditions de culture optimales, les expérimentations ont été effectuées indépendamment les unes des autres. Les facteurs environnementaux influant les cultures bactériennes et qui représentent des paramètres à contrôler durant le processus de fermentation sont le pH, la température et l'aération, ce qui permettra de définir les conditions

de culture optimales à appliquer pour la production des lipopeptides. Ces expériences ont été réalisées en utilisant un milieu complet : Le milieu TSB, en tant qu'un milieu de base

7.1.1. Cinétique de la croissance bactérienne et de la production des lipopeptides

La cinétique de la croissance des souches et de leur production en lipopeptides ont été effectuées jusqu'à la phase de déclin cellulaire des cultures. Les suivis de la croissance ont été effectuées toutes les 3 h dans les 9 premières heures de culture, ensuite toutes les 24h jusqu'au déclin des bactéries dans les cultures. Ces données sont complétées par les valeurs de la matière sèche (MS) mesuré à partir du culot des échantillons de fin de culture La production de lipopeptides a été suivie en collectant, des surnageant de culture toutes les 24h. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata.

7.1.2. Optimisation de la température

La température de culture des souches représente un facteur substantiel à optimiser, afin d'augmenter la production des souches en lipopeptides. Lors de ces expériences les souches bactériennes ont été cultivées dans trois conditions de températures différentes: 22°C, 30°C, 37°C. Ces expériences ont été réalisées en fixant une vitesse d'agitation de 160 RPM. La croissance et la production ont été suivies à 24h et 48h (conditions issues des premiers résultats de l'étude des 3 souches).

7.1.3. Optimisation du pH

Afin de déterminer le pH optimal des milieux de culture, permettant la meilleure production de lipopeptides, 5 niveaux de pH ont été étudiées dont les pH 6 à pH 8 avec un pas de variation de 0.5. Les conditions de culture ont été réalisées en fixant une vitesse d'agitation de 160 RPM et une température de 30°C. La solution MOPS de concentration 420 g/L a été utilisée comme tampon à raison de 10% (v/v).

7.1.4. Optimisation de l'aération-agitation

L'aération du milieu de culture était un paramètre à optimiser en testant l'influence de la vitesse d'agitation de la culture sur la production des lipopeptides. Ainsi 3 gammes agitation ont été testées, soit : 100 RPM, 160 RPM et 240 RPM.. Les cultures bactériennes ont été réalisées en fixant la température à 30°C.

7.2. Plans qualitatifs

Les plans d'expérience qualitatifs consistaient à déterminer les éléments du milieu de culture qui permettrait d'avoir la production optimale de lipopeptides. Les expériences consistaient à apporter des éléments jugés nécessaires à la croissance bactérienne et ayant un effet positif à la synthèse de lipopeptides, à savoir les acides aminés, les cations, les sources d'azote et de carbone et l'extrait de levure. Ainsi 2 plans d'expériences qualitatifs ont été établis. Dans ces expériences d'optimisation, le plan d'expériences a été réalisé pour estimer l'influence qualitative (absence/présence) d'un élément sur les réponses étudiées. D'où les tests comportent deux niveaux de concentration : -1 correspondant à l'absence de l'élément et +1 pour signifiant qui veut dire la présence de l'élément à la concentration indiquée (tableau 13). Les différentes cultures réalisées ont été tamponnés avec la solution MOPS (10% v/v). Les substrats utilisés ont été préparés séparément en solutions stocks concentrées et stérilisées d'une manière adéquate pour chaque substrat (autoclavage ou filtration). Les milieux de culture ont été inoculés à partir d'une préculture de 8h en raison de 0,4% (v/v).

Le premier plan qualitatif était réalisé en fixant le milieu minéral M9 dépourvu en glucose et en sulfate de magnésium comme milieu de base et en fixant les conditions de culture aux valeurs optimales (température, pH, aération) issues des expériences précédentes. Les facteurs testés sont : la source de carbone, la source d'azote, les acides aminés et les minéraux. Ce plan qualitatif est établi comme décrit dans l'annexe 2.

Tableau 13 : Facteurs et modalités du premier plan d'expériences qualitatif

Facteur	Modalité	Concentration (+1)
Source de carbone	Glucose	2,5 g.L ⁻¹
	Glycérol	2,5 g.L ⁻¹
	Succinate de Sodium	2,5 g.L ⁻¹
Source d'azote	Acide glutamique	5 g.L ⁻¹
	Chlorure d'ammonium	2 g.L ⁻¹
Peptones	Extrait de levure	5 g.L ⁻¹
Acides aminés	Valine	1,25 g.L ⁻¹
	Serine	
	Isoleucine	
Minéraux	MgCl ₂	4 mM
	MnCl ₂	0,035 mM
	ZnSO ₄ – 7H ₂ O	0,0125 mM

Les facteurs optimaux issus des résultats obtenus lors l'analyse du premier plan qualitatif ont été fixés pour la réalisation du deuxième plan qualitatif en les additionnant au milieu de base. Les facteurs utilisés lors du deuxième plan qualitatif sont : les acides aminés et les oligoéléments (tableau 14). La matrice utilisée pour la réalisation de ce plan est décrite dans l'annexe 3.

Tableau 14 : Facteurs et modalités du deuxième plan d'expérience

Facteurs	Modalité	Concentration
Acides aminés	Glutamine	2,5 g.L ⁻¹
	Aspartine	
	Leucine	
	Thréonine	
	Histidine	
	Proline	
Oligoéléments	CoCl ₂ -6H ₂ O	0,42 mg.L ⁻¹
	FeSO ₄ - 7H ₂ O	0,1 mg.L ⁻¹
	CuSO ₄ -5H ₂ O	1 mg.L ⁻¹
	Na ₂ MoO ₄	0,39 mg.L ⁻¹
	KI- 6H ₂ O	0,66 mg.L ⁻¹
	CaCl ₂	0,02 g.L ⁻¹

Ces expériences sont réalisées selon des plans D-optimaux dont le principal objectif est de voir l'effet de chaque élément sur chaque réponse. Le D-optimal consiste à composer une matrice de façon à avoir un déterminant maximum et à représenter l'ensemble du domaine expérimental : un facteur est enlevé, un autre injecté, et ceci jusqu'à avoir le déterminant le plus

grand (Gauchi, 2005). Le modèle mathématique qui permet d'évaluer la réponse est le suivant :

$$y=b_0+ b_1X_1+ b_{11} X_1^2+ b_{12}X_1X_2+\dots+ \varepsilon$$

où y est la réponse étudiée, X_i : les facteurs, b_i : l'effet principal, b_{ii} : l'effet quadratique, b_{ij} : l'interaction double de deux facteurs continus, ε : l'erreur.

7.3. Plan composite RSM

Le modèle de second degré permet de mieux déterminer les optimums que ce soit en minimum ou en maximum. En effet, après avoir identifié les facteurs les plus influents, un plan d'expériences quantitatif qui est un plan composite avec 5 paramètres, est réalisé pour essayer d'en retirer une composition optimale du milieu. Le domaine de chaque facteur est limité par deux niveaux -1 et +1. Les différents facteurs constituant le plan composite et leurs niveaux seront présentés ultérieurement.

Le coefficient α est calculé par la formule suivante $\sqrt[4]{16}$, où 16 représente le nombre d'expériences de la matrice complète. Ensuite les différents niveaux sont calculés par la formule suivante :

$$U_i= U_0+ (\Delta U \times x)$$

où U_0 la moyenne entre les deux valeurs des niveaux -1 et +1. U_i est la variable naturelle au niveau i (soit ici la concentration), ΔU la différence entre deux niveaux consécutifs qui encadrent la valeur du niveau à mesurer et x la variable codée qui est les 5 niveaux soit $-\alpha$, -1, 0, +1 et $+\alpha$. (Jacques, 2000).

L'analyse et le traitement des réponses se font avec le logiciel (MODDE 5.0 Umetrics, Sweden). Lors du traitement des données, le modèle est valide si R^2 et Q^2 sont proches de 1. R^2 représente coefficient de corrélation expliquée par le modèle et Q^2 représente la fraction de la variation de réponse prédite par le modèle. Ce sont des coefficients de régression linéaire qui montre que les modèles mathématique et expérimental sont bons et que le modèle mathématique explique bien le modèle expérimental.

7.4. Méthodes d'analyses

7.4.1. Suivi de la biomasse

La croissance a été suivie en faisant la cinétique de la turbidité des cultures bactériennes en mesurant la densité optique (DO) de chaque culture au spectrophotomètre Prim (SECOMAM, Domont, France) à une absorbance de 600nm.

7.4.2. Mesure de la matière sèche

A partir des cultures bactériennes, 5 mL ont été centrifugés à 10.000*g pendant 10 minutes, le culot a été ainsi récupéré et lavé deux fois avec 10 ml d'eau distillée. Le culot ainsi obtenu est repris avec 5 ml eau distillée et déposé dans des coupelles préalablement pesées et placées à l'étuve pendant 48 heures à 105°C. Les coupelles sont alors pesées et la matière sèche (MS) est déterminée de la manière suivante :

$$MS (mg) = (masse\ coupelle + culot) - masse\ coupelle$$

7.4.3. Dosage des lipopeptides

Afin de récupérer les lipopeptides, les cultures bactériennes ont été centrifugés à 10.000*g pendant 10 minutes pour en récupérer les surnageants de culture. Les lipopeptides ont été ensuite extraits en traitant les surnageants de culture en EPS selon le protocole précédemment décrit (p.55). Les lipopeptides extraits, ont été ensuite séchés sous vide au speedvac à une température de 42°C et re-solubilisés dans 200 µL de méthanol (25%) afin d'obtenir des échantillons concentrés 10X. Le dosage des lipopeptides a été effectué en RP-CLHP selon le programme décrit auparavant (p.56).

7.4.4. Dosage des sucres et des acides organiques

Les concentrations des sucres et des acides organiques ont été analysés en CLHP Spectra SYSTEM P1000 XR fournie par Thermo Electron Corporation (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, États-Unis) à partir des surnageants de culture filtrés à travers

un filtre de porosité de 0,22 μm en utilisant une colonne de Fast fruit juice (150 \times 7,8 mm, WATERS) conformément à la méthode décrite par Guez et al., (2008). Une colonne de garde en co-polymères de sulfonate et styrène-divinylbenzène est placée en amont de la colonne. Le dosage a été effectué en utilisant les conditions opératoires suivantes : un débit de 0,8 ml/min, une température de colonne a été maintenue à 55°C. L'élution a été effectuée par une solution de H_3PO_4 (0,05%). Le volume des échantillons injectés a été de 20 μL , et a été analysé à l'aide d'un réfractomètre spectra-system RI-150 (Thermoelectron cooperation) pendant 10 minutes. Les pics qui correspondent au glucose ont été identifiés par leur temps de rétention et quantifiés à l'aide du logiciel Azur 4.6 (Azur software, Datalys, France) par rapport à un standard de glucose préalablement injecté.

8. Etude de l'application des biosurfactants

8.1. Test de la stabilité des biosurfactants

L'étude de la stabilité des biosurfactant a été effectuée sur des solutions d'extraits bruts de biosurfactants de concentration de 1 gL^{-1} préparée à partir de la précipitation acide des biosurfactants (p. 55). La stabilité des molécules a été étudiée vis-à-vis de trois différents paramètres : la température, le pH, la salinité. La stabilité thermique a été mise en évidence en incubant les solutions brutes de biosurfactants pendant 24 heures à différentes valeurs de températures : 4 – 25 – 45 – 65 – 80 – 105°C. Les échantillons sont ensuite refroidis à la température ambiante pour les analyses ultérieures. L'effet du pH a été testé en ajustant le pH des solutions brutes de biosurfactants à des valeurs de : 2 – 4 – 6 – 8 -10 -12, en utilisant des solutions de HCL (3M) et de NaOH (1M), et tamponnées avec des solutions de tampon citrate (50 mmolL^{-1}) pour les pH inclus entre 3 et 6, tampon phosphate (50 mmolL^{-1}) pour les pH inclus entre 6 et 8 et un tampon Glycine – NaOH (50 mmolL^{-1}) pour les pH inclus entre 9 et 12. L'effet de la salinité sur la stabilité des biosurfactants a été examiné en ajustant la concentration spécifique des solutions brutes de biosurfactants en NaCl à : 2% - 4% - 6% - 8% - 10%. La stabilité des biosurfactants a été évaluée en testant leur activité résiduelle par la mesure de l'activité émulsifiante (E24) et la tension de surface.

8.2. Production en bioréacteur Batch

Deux fermentations ont été réalisées dont une en milieu minimal M9 et l'autre en utilisant le milieu préalablement optimisé comme un milieu de culture. La fermentation est réalisée à pH 7, une température de 30°C et une agitation de 160 rpm (conditions optimisées). Les fermenteurs ont été ensemencés à partir d'une culture bactérienne de 8h de manière à obtenir une absorbance initiale à 600 nm dans la cuve de 0,1. Le pH à l'intérieur de la cuve est contrôlé par l'ajout régulé des solutions de NaOH (3M) et de K₃HPO₄ (1M) stériles, grâce à des pompes intégrées dans le système. La quantité d'oxygène dissous pO₂ est mesurée à travers une sonde d'oxygène qui est calibrée après la stérilisation de la cuve de fermentation une fois que le milieu de culture ayant atteint la température ambiante, par le réglage du niveau 0% de pO₂ en reliant le câble de la sonde à la masse et le niveau 100% de pO₂ en injectant à la cuve de l'air saturé (1000 tpm et 1 vvm) et filtré à travers une membrane de 0,2 µm.

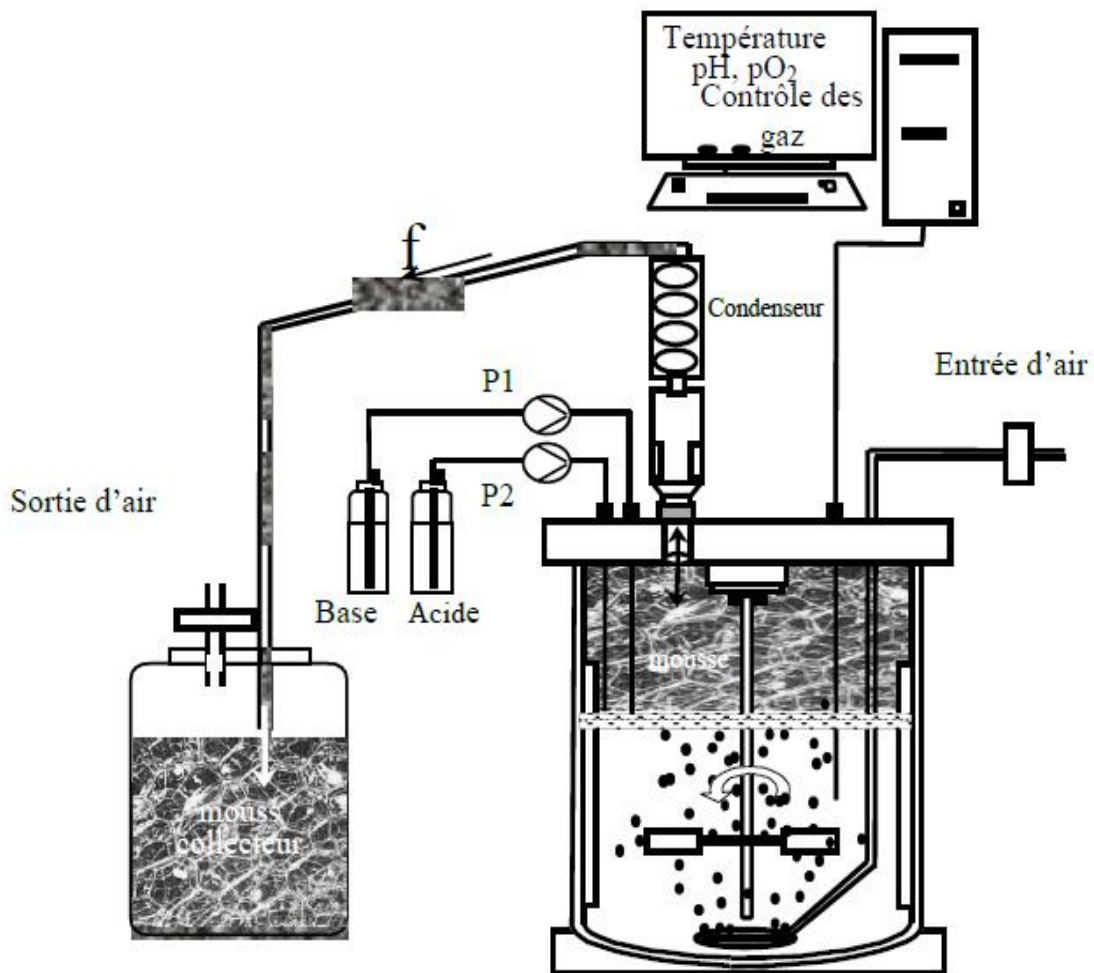


Fig. 16 : Représentation schématique d'un bioréacteur batch moussant (Coutte, 2009)

Une cuve de collecte de mousse préalablement stérilisé a été branchée à la sortie du condenseur de la cuve de fermentation afin de recueillir la mousse produite tout au long du processus (figure 16). Les données de pH et de pO_2 ont été enregistrées grâce à un logiciel d'acquisition des données. Les échantillons de 5 mL ont été prélevés régulièrement pour le suivi de la cinétique de croissance bactérienne, de matière sèche et de la production des lipopeptides (p. 63, p.64)

8.3. Biodégradation du diesel sur sable

Pour la réalisation des tests de biodégradation du diesel sur sable, des pots en plastique de volume de 500 ml ont été préparés en tant que des systèmes de bioréacteurs (figure 17). Les bioréacteurs disposaient d'une entrée d'air comprimé qui a été continuellement pompé à travers un tube plongeant à l'intérieur du système, sous une pression de 0,3 Bar, et d'une entrée permettant l'approvisionnement quotidienne en milieu de culture M9 stérile dépourvu en glucose. Le bioréacteur est équipé d'un tube placé en aval du système pour l'évacuation des effluents issus de la percolation quotidienne par le milieu de culture. Chaque bioréacteur contenait 200 mL de sol qui a été contaminé par 10% (v/v) de diesel stérilisé par filtration à travers une membrane de 0,2 μm . Le sol contaminé a été inoculé avec 20 mL de culture bactérienne de 8 heures pour l'obtention d'un sol artificiellement contaminé.

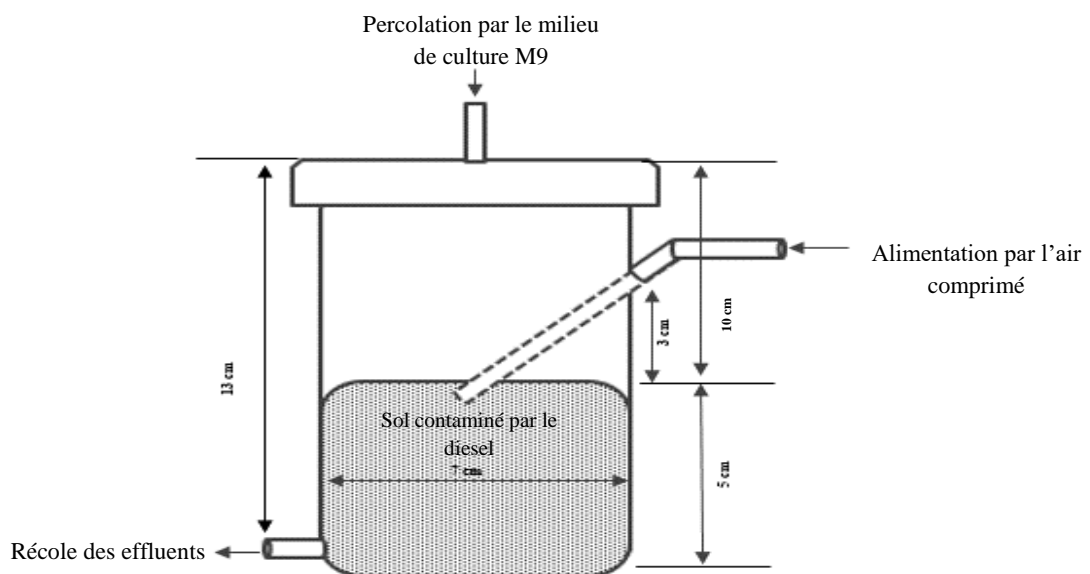


Fig. 17 : Représentation schématique d'un bioréacteur utilisé pour les essais de dégradation du diesel sur sable

Des bioréacteurs inoculés avec des souches de *Rhodococcus erythropolis T902.1* ont servi de témoins positifs. Des bioréacteurs inoculés le milieu de culture dépourvu de bactérie ont été utilisés comme témoins négatifs. Les bioréacteurs ont été incubés à 30°C pendant 28 jours, et la dégradation du diesel a été suivie en faisant des prélèvements hebdomadaires des échantillons durant la période d'incubation. Les analyses de la quantité du diesel résiduelle a été faite par le mélange de 1 g des échantillons de sols avec 2 mL de toluène et l'extraction de la fraction organique ainsi obtenue pour la mesure de son absorbance à 420 nm (Rahman et al., 2002). Le contenu des bioréacteurs a été aéré par retournement du sol toutes les 48 heures pour éviter les conditions anaérobies. Le pourcentage d'élimination des hydrocarbures pétroliers totaux (HPT) est déterminé comme suit:

$$\%HPT = \left(\frac{ODi - ODx}{ODi} \right) * 100$$

Toutes les expériences ont été réalisées en triplicat.

Chapitre 3

Résultats et discussion

1. Isolement et screening des souches de *Pseudomonas sp.* ayant un potentiel de production des biosurfactants

1.1. Introduction

Les recherches qui s'intéressent à l'étude des biosurfactants et leurs applications sont récemment en train de se développer. L'intérêt porté à ces molécules est essentiellement due à leur diversité, leur aspect écologique, leur forte biodégradabilité et leur faible toxicité, ainsi que leurs excellentes propriétés moussantes. Ces composés se caractérisent également par une stabilité considérable vis-à-vis à différents facteurs environnementaux extrêmes et notamment la température, le pH et la salinité ce qui permet d'élargir leur spectre d'application et plus particulièrement dans le domaine de bioremédiation. En effet, les biosurfactants ont montré un potentiel important à être impliqués dans la protection de l'environnement, la biodégradation des huiles organiques, ainsi que dans les industries agroalimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques.

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont considérées comme les producteurs les plus communs des biosurfactants. En effet, de nombreuses études menées sur les biosurfactants produits par les *Pseudomonas* ont montré que ces molécules sont impliquées dans plusieurs fonctions bactériennes comme la protection des souches contre les composés toxiques comme les métaux lourds, ils jouent aussi un rôle important dans la biodisponibilité et la biodégradabilité des nutriments se trouvant dans le milieu environnant. En outre, Ces bactéries se caractérisent par leur capacité d'utiliser plusieurs sources de carbone comme les huiles végétales, les hydrocarbures, le glycérol et l'huile de paraffine pour la production des molécules tensioactives. Ce qui fait que ces bactéries sont capables d'utiliser des sources de carbone disponibles et non couteux pour synthétiser des molécules d'intérêt. Ceci rend donc les *Pseudomonas* des candidats promettant pour la production des biosurfactants. Par conséquent, ces caractéristiques rendent les *Pseudomonas* des souches intéressantes à étudier pour leur production des biosurfactants et d'explorer leurs activités et leur application dans différents domaines. Dans ce contexte, le travail présenté dans cette première partie de la thèse s'intéresse à l'isolement des bactéries du genre *Pseudomonas* à partir de différents échantillons de sol contaminés par les huiles organiques et à partir des effluents des industries pétrolières pour en sélectionner les souches ayant le potentiel à produire des molécules tensioactives.

1.2. Isolement des *Pseudomonas* et caractérisation morphologiques des isolats

Les souches bactériennes ont été isolées à partir de trois types d'échantillons contaminés par des huiles organiques situées dans la région de Sfax au sud tunisien: un sol contaminé par les hydrocarbures d'un atelier de mécanique, un sol d'une raffinerie contaminé par de l'huile d'olive, un effluent d'une industrie pétrolière. Parmi les isolats obtenus, les souches de *Pseudomonas* ont été ensuite sélectionnées en repiquant les colonies sur un milieu sélectif des *Pseudomonas*: La gélose cétrimide et en les incubant dans les températures favorables à leur croissance. Cette sélection a abouti totalement à l'obtention de 11 différentes colonies bactériennes issues de l'échantillon de sol contaminé par les hydrocarbures d'un atelier de mécanique. Ces souches désignées par : E32, E33a, E33b, E36, E37, E38a, E38b, E39, E311, E312, E313 avaient subi une caractérisation morphologique par une observation microscopique et une coloration de Gram pour la vérification de la conformité de leur caractéristiques avec les bactéries du genre *Pseudomonas* (tableau 15).

Tableau 15 : caractérisation morphologiques des isolats bactériens

Forme	Bacilles
Gram	Négatif
Couleur	Blanchâtre – jaunâtre
Mobilité	Bactéries très mobiles
Pigmentation	Colonies fluorescentes des souches E32 et E312

Ces caractères morphologiques sont bien conformes avec celles qui ont été déjà décrit pour les bactéries appartenant au genre des *Pseudomonas*. Parmi les bactéries premièrement sélectionnées, dans ce travail on s'est intéressé au criblage des souches ayant le potentiel de produire des molécules biosurfactantes.

1.3. Screening des souches productrices des molécules à activité biosurfactantes

Le criblage des souches productrices des molécules ayant une activité biosurfactantes a été réalisé en utilisant différents tests qualitatifs connus pour la détection de ces molécules

comme le test de l'effondrement de l'huile, la mesure de la tension de surface, le test d'étalement d'huile et l'activité émulsifiante (Satpute et al., 2008).

Un premier criblage a été réalisé en s'appuyant sur les tests de l'effondrement d'huile et les mesures de la tension de surface des surnageants de cultures des différents isolats (tableau 16).

Tableau 16 : Criblage qualitatif des isolats pour leur production des molécules ayant des activités biosurfactantes

Isolats	Test de l'effondrement d'huile	Tension de surface (mN/m)
E33a	-	55,93±0,2
E33b	+	30,33±1,2
E36	-	47,4±0,8
E37	-	50,36±0,8
E38a	-	49,13±0,2
E38b	+	30,33±1,6
E39	+	29,93±0,7
E310	-	52,86±0,5
E311	+	34±0,6
E312	-	39,63±0,6
E313	+	30,26±0,6

Cinq isolats parmi 11 présentent une réaction positive avec le test de l'effondrement d'huile. Les mesures de la tension de surface ont été effectuées en appliquant la méthode Du Nouy et en utilisant l'eau comme témoin négatif qui avait une valeur de tension de surface de 72 mN/m. Ces 5 souches E33b, E38b, E39, E311 et E313 avaient la capacité de réduire considérablement la tension de surface à 30,3±1,6 mN/m, 30,5±1,8 mN/m, 29,9±0,7 mN/m, 34±0,6 mN/m et 30,3±0,6 mN/m respectivement. La F_{CMC} a été ensuite évaluée en effectuant

une série de dilution allant de 1 jusqu'à 1/20^{ème} des surnageants de culture des 5 souches qui avaient montré des activités biosurfactantes (figure 18).

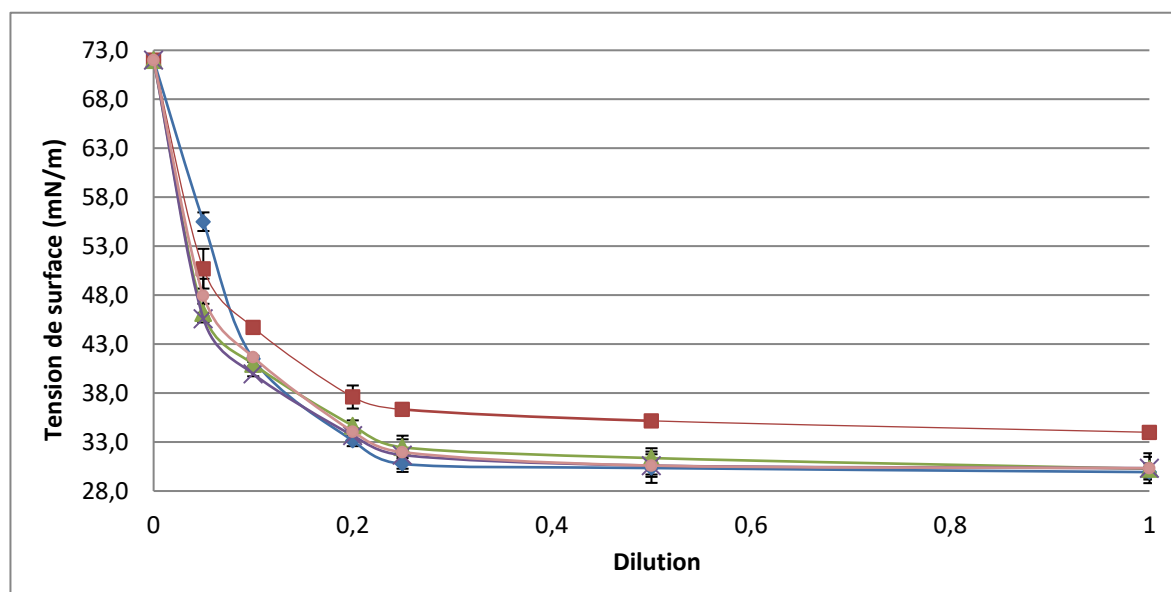


Fig. 18 : Mesure de la F_{CMC} par une série de dilutions des surnageants de culture des souches E33b (—), E38b (—), E39 (—), E311 (—) et E313 (—)

Les résultats montrent que pour les 5 souches testées la valeur de la CMC a été atteinte à partir d'une dilution de 1/4^{ème}.

Les surnageants de culture des souches ayant montré les activités biosurfactantes les plus élevées ont ensuite été soumises aux tests d'étalement d'huile et d'émulsification (tableau 17).

Tableau 17 : Evaluation de l'activité biosurfactante par le test de l'étalement d'huile pour les souches sélectionnées

Echantillon	Etalement d'huile (mm)
E33b	16,2±1,1
E38b	17±1,1
E39	19,4±0,6
E311	19±2,7
E313	19,4±0,6

Les résultats ont montré que les surnageants de culture des souches E39, E311 et E313 ont abouti à la formation des halos avec des diamètres importants, qui sont de $19,33\pm 0,6$ mm, $19\pm 2,7$ mm et $19,33\pm 0,6$ mm respectivement.

Tableau 18 : Evaluation de l'activité émulsifiante par mesure de l'indice d'émulsification (E24) des solutions de biosurfactants des souches sélectionnées

Echantillon	Indice d'émulsification (E24)
E33b	$53\pm 0,5\%$
E38b	$62,7\pm 1,1\%$
E39	$79\pm 2\%$
E311	$78\pm 0,2\%$
E313	$79\pm 0,4\%$

Les souches E39, E311 et E313 possèdent également des indices d'émulsification élevées qui sont de $79\pm 2\%$, $78\pm 0,2\%$ et $79\pm 0,4\%$ respectivement (tableau 18) et que les émulsions formées étaient stables pour une durée de 30 jours. Les indices d'émulsification étaient moins importantes pour les souches E33b et E38b et qui sont de $53\pm 0,5\%$ et $62,7\pm 1,1\%$ respectivement. Les tests de criblage réalisés ont montré que les souches E39, E311 et E313 possèdent les meilleures propriétés biosurfactantes et émulsifiantes, et ont été par conséquent sélectionnées pour la continuité de ces travaux.

1.4. Identification des isolats sélectionnés pour leurs activités biosurfactantes

L'identification des isolats sélectionnés après le criblage de l'activité biosurfactante et leur caractérisation a été effectuée par des outils biochimiques et moléculaires. Une première caractérisation des souches a été alors réalisée en se basant sur leur profil de fermentation des carbohydrates en utilisant une galerie API 20 NE servant à la caractérisation des bactéries à gram négatif et particulièrement les *Pseudomonas*, par des différents tests d'assimilation et de

fermentation. La lecture des tests réalisée a été effectuée après 24 heures d'incubation de la galerie à 30°C en s'appuyant sur la base de données APIWEB. Les résultats donnés par le logiciel montrent que les trois bactéries sélectionnées appartiennent au genre *Pseudomonas* (tableau 19).

Tableau 19 : Caractérisation biochimique par des tests réalisés en galerie API 20 NE des souches sélectionnées pour leurs activités biosurfactantes

Tests	Isolats		
	E39	E311	E313
Gram	-	-	-
Oxydase	+	+	+
Nitrate	-	-	-
Tryptophane	-	-	-
Glucose	-	-	-
Arginine	+	+	+
Urée	-	-	-
Esculine de Citrate de Fer	-	-	-
Gélatine	-	-	-
4-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside	-	-	-
Glucose (assimilation)	+	+	+
Arabinose	-	-	-
Mannose	-	-	-
Mannitol	+	-	-
N-acetyl-glucosamine	-	-	-
Maltose	-	-	-
Gluconate de potassium	-	+	+
Acide caprique	-	+	+
Acide adipique	-	-	-
Acide malique	-	+	+
Citrate trisodique	+	+	-
Acide phénylacétique	-	-	-
Identités API 20 NE	<i>C.testosteroni</i> / <i>P.alcaligenes</i>	<i>P.putida</i>	<i>P.putida</i>

En outre, un séquençage de l'ADNr 16S des souches E39, E311 et E313 a été effectué afin de réaliser une étude phylogénétique qui aboutit à une identification plus approfondie des isolats sélectionnés. En effet, le gène codant ARNr16S est un gène chromosomique présent chez toutes les espèces bactériennes dont l'amplification de régions conservées au niveau de l'ADN aboutit à une séquence de taille 1500 pb permettant l'identification moléculaire des bactéries. Les séquences des 3 souches étudiées obtenus ont été analysées à l'aide du logiciel

BLASTn fourni par le centre national de l'information en biotechnologie (NCBI) afin de les comparer avec les séquences existantes dans la base des données. Les résultats ont confirmé celles obtenu précédemment et ont montré que les 3 souches étudiées appartiennent au genre *Pseudomonas* (figure 19).

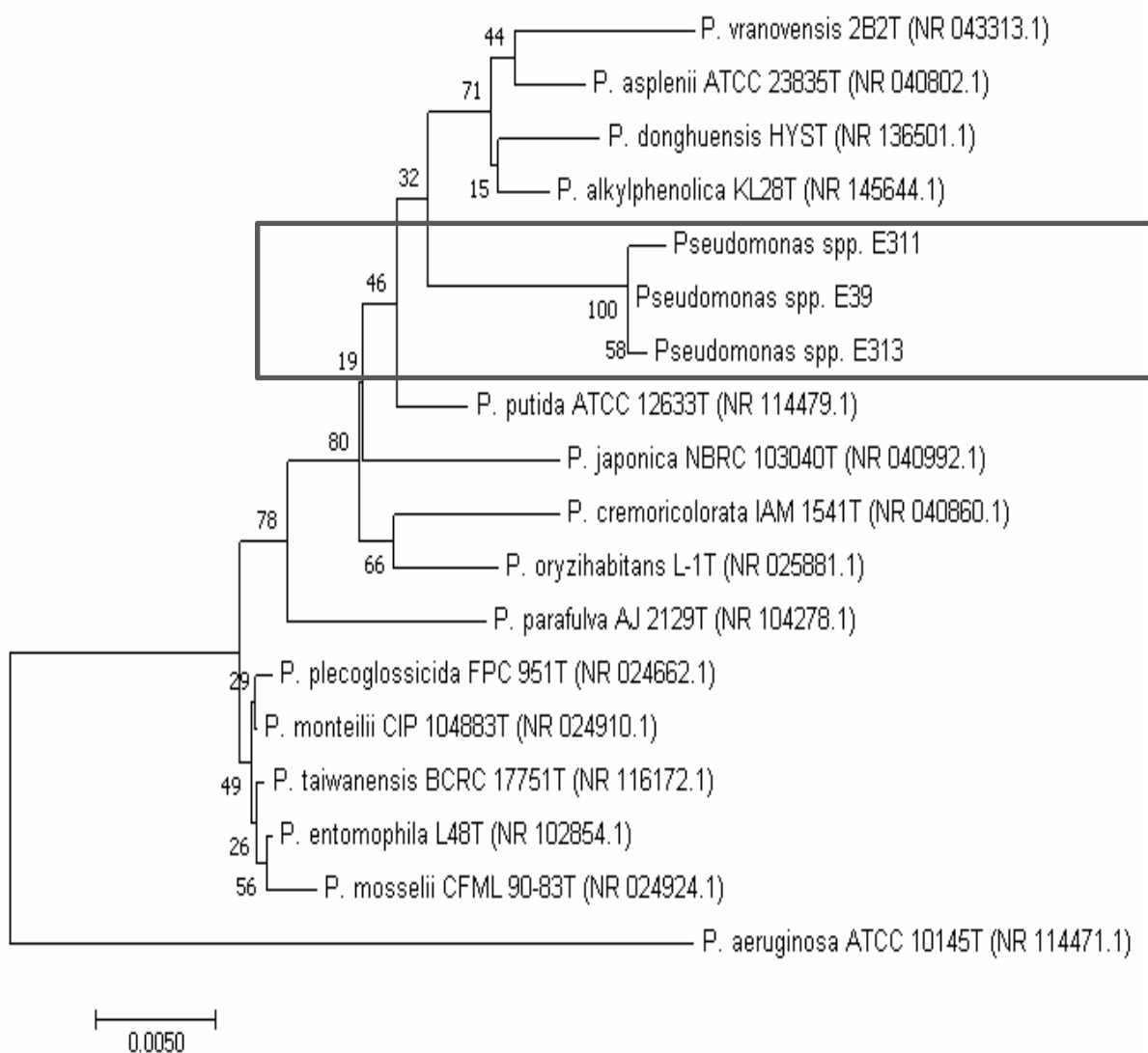


Fig. 19 : Arbre phylogénétique des séquences de gène de l'ADNr 16S obtenu par la méthode du Neighbour-joining montrant la classification des souches productrices des biosurfactants avec différentes souches du genre *Pseudomonas* et une souche out-group: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145T.

Les souches E39, E311 et E313 sont regroupées ensemble et présentent une haute similarité entre elles avec des pourcentages d'homologie de 99%. L'arbre phylogénétique montre les relations de ces souches avec les souches de référence du genre *Pseudomonas* les

plus proches (pourcentage d'identité > 97,9%). L'arbre phylogénétique montre que les 3 souches sont localisées dans une branche séparée appartenant au groupe des *Pseudomonas putida*. Les souches les plus étroitement apparentées étaient *Pseudomonas donghuensis* (98,7% d'identité) et *Pseudomonas alklyphenolica KL28T* (98,6% d'identité) qui ont été récemment proposées comme représentants d'espèces nouvelles du groupe *Pseudomonas putida* (Gao et al., 2015; Mulet et al., 2015). Ils sont inclus dans un cluster avec *Pseudomonas vranovensis 2B2T* (98,1% d'identité) et *Pseudomonas asplenii ATCC 23835T* (98,1% d'identité)

1.5. Etude de la stabilité des biosurfactants

La stabilité des biosurfactants vis-à-vis des différentes conditions environnementales comme le pH, la température et la salinité représente un facteur important à étudier pour leur caractérisation. Dans ce travail, la stabilité des biosurfactants produits par les souches E39, E311 et E313 a été étudiée en mesurant l'activité biosurfactante résiduelle par la mesure de la tension de surface et l'activité émulsifiante résiduelle à des différentes gammes de température (4°C - 105°C), pH (2 – 12) et salinité (2% - 10%). Les résultats montrent que les biosurfactants produits par les 3 souches ont retenu leurs activités émulsifiante et tensioactive résiduelles dans une gamme de température située entre 4°C et 80°C. La tension de surface des biosurfactants produits par les 3 souches testées a été relativement maintenue à pH alcalin dans une gamme de pH allant de 6 à 12. Les moyennes enregistrées étaient de $31 \pm 1,6$ mN/m pour les biosurfactants produits par la souche E39, $30,6 \pm 1,1$ mN/m pour les biosurfactants produit par la souche E311 et $30,3 \pm 1,1$ mN/m pour le E313. A pH acide, on a observé une légère augmentation des tensions de surfaces avec les biosurfactants des 3 souches. L'activité émulsifiante a été relativement stable entre pH 6 et 10, avec une activité optimale obtenue à pH 7, tandis que une diminution importante a été détectée à pH 12 et au-dessous de pH 4 (E24 <41% pour E39, E24 <40,6% pour E311 et E24 <40,2% pour E313). La stabilité maximale du biosurfactant a été observée à une concentration de NaCl à 2% (figure 20), tandis que des changements légers ont été observés à des concentrations accrues de NaCl avec la rétention de 81%, 77% et 75% des propriétés tensioactives chez les souches E39, E311 et E313 respectivement. En outre, 85% de l'activité émulsifiante a été retenue pour tous les isolats jusqu'à 10% de NaCl (P/V) (figure 20).

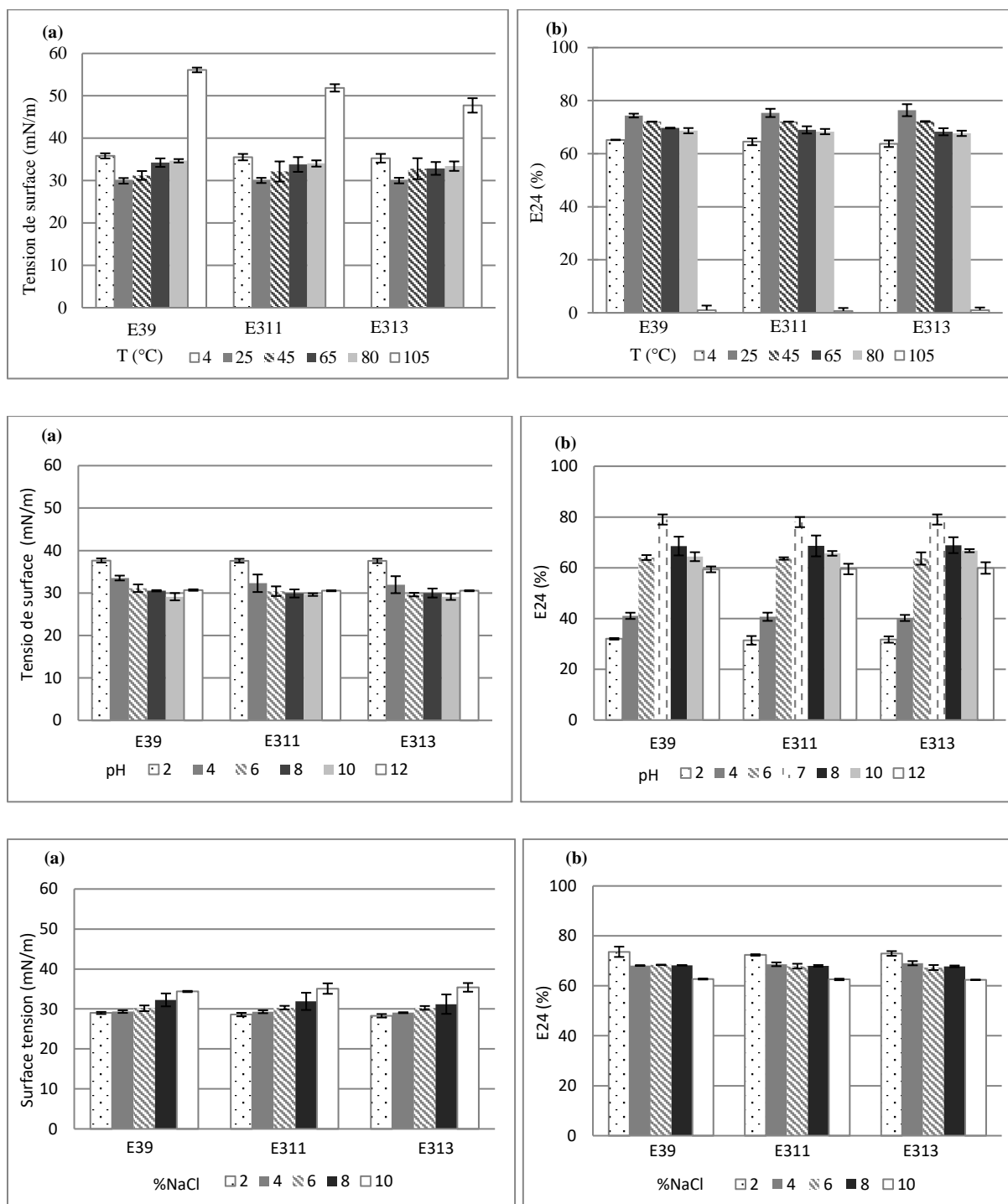


Fig. 20 : Etude des conditions environnementales sur la stabilité des biosurfactants produits par les souches E39, E311 et E313 par l'évaluation de l'effet de la température, le pH, et la salinité sur l'activité résiduelle tensioactive (a) et activité résiduelle émulsifiante (b).

Dans cette expérience, les souches ont utilisé du diesel comme seule source de Carbone. Le pourcentage d'élimination de l'hydrocarbure pétrolier total (HPT) dans les sols pour différents bioréacteurs du sol est illustré à la figure 21. Il y a eu une diminution rapide de la HPT dans tous les sols de traitement inoculés avec les trois souches productrices de biosurfactants par rapport aux sols non inoculés. Au bout de 21 jours, l'ampleur totale de la dégradation des hydrocarbures dans les sols contaminés par le diesel a été comprise entre 45,8% et une réduction de HPT de 60,2% dans le sol inoculé avec des souches productrices biosurfactants par rapport au sol utilisé comme contrôle négatif avec une dégradation de l'huile de 2,8% probablement en raison de la volatilisation de l'hydrocarbure pétrolier total. Des pourcentages élevés de dégradation du diesel ont été obtenus après 28 jours, dont $55,5 \pm 4,8\%$, $68,3 \pm 2,4\%$ et $56,9 \pm 5,1\%$ chez les bioréacteurs inoculés avec des souches E39, E311, E313 respectivement contre 3,4% dans le bioréacteur témoin négatif.

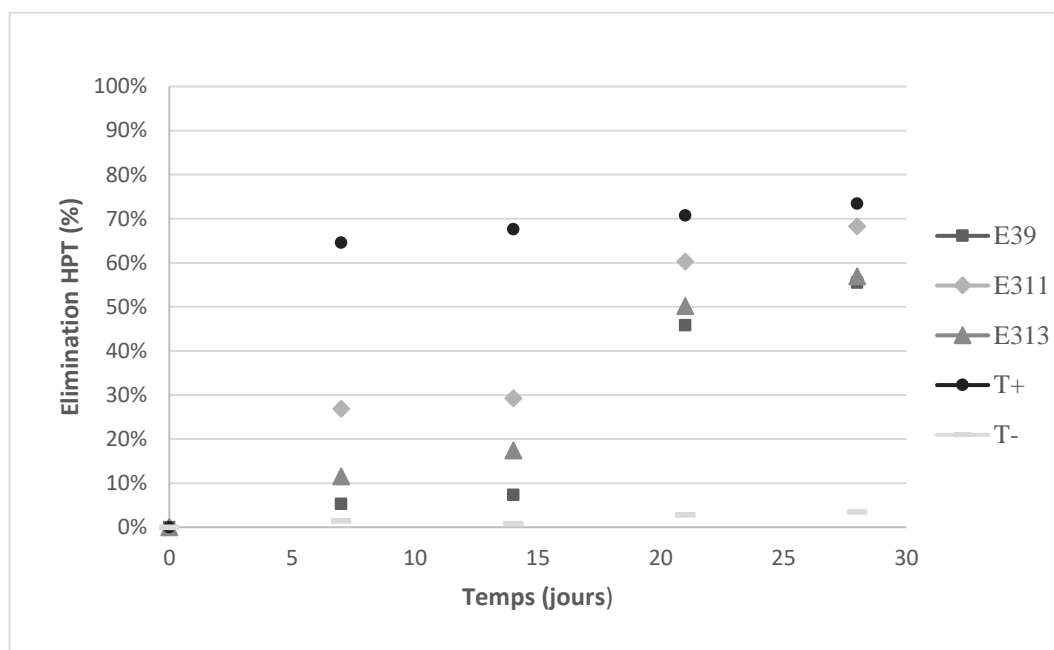


Fig. 21 : Suivi de la biodégradation totale des hydrocarbures pétroliers (HPT) par les souches E39, E311 et E313 dans les sols diesel contaminés

1.7. Discussion

Dans les travaux présentés dans ce chapitre, des bactéries du genre *Pseudomonas* ont été isolées à partir d'un sol contaminé par des huiles organiques et criblés pour leur potentiel de production des molécules ayant des propriétés biosurfactantes et bio-émulsifiantes vu l'importance de ces molécules dans l'application dans différents domaines industriels ainsi que dans les processus de bioremédiation des eaux et des sols comme une alternative écologique des surfactants chimiques (Ron et Rosenberg, 2002, 2001). 11 souches de *Pseudomonas* ont été obtenu à partir d'un sol contaminé par les hydrocarbures d'un atelier de mécanique et testés ensuite pour leurs activités biosurfactantes et émulsifiantes pour en sélectionner les souches actives. Le test de l'effondrement d'une huile organique a été réalisé en premier car cette méthode est une méthode simple et sensible pour la détection de la présence des molécules ayant des propriétés biosurfactantes. Les surnageants de cultures testés des souches désignées par E33b, E38a, E39, E311 et E313 ont montré de réactions positives pour ce test ce qui indique la présence des molécules biosurfactantes synthétisées par ces souches bactériennes d'une manière extracellulaire. La mesure de la tension de surface a révélé que ces 5 souches possèdent le potentiel le plus efficace de réduction de la tension de surface de l'eau. En effet, les valeurs obtenus sont compris entre $29,9 \pm 0,66$ mN/m et $34 \pm 0,6$ mN/m ce qui mène à conclure que les biosurfactants produits sont d'une bonne qualité comme ils ont la capacité de réduire la tension de surface au-dessous de 35 mN/m (Wang et Mulligan, 2004). Comparant à d'autres surfactants étudiés, les valeurs obtenues sont inférieures à des surfactants de nature chimique comme la SDS (Suk et al., 1999) et des biosurfactants produits par des souches de *Pseudomonas* comme les biosurfactants de *Pseudomonas putida* qui réduisent la tension de surface à 35 mN/m (Kanna et al., 2014) et comparables avec les biosurfactants de nature rhamnolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa* qui réduisent la tension de surface à 33,3 mN/m (Zhao et al., 2015) mais qui peuvent présenter une limite dans leur application vu la pathogénicité de ces souches pour l'homme. La F_{CMC} a été déterminée en réalisant une série de dilution sur les surnageants de culture des 5 souches ayant montré des propriétés tensioactives. Les résultats ont montré que la valeur de la F_{CMC} a été atteinte à partir de la dilution $1/4^{\text{ème}}$ pour tous les échantillons, ce qui prouve que les biosurfactants sont produits par ces souches bactériennes au-dessus de leur CMC. En outre, Les résultats obtenus ont été vérifiés et confirmés par la réalisation du test d'étalement d'huile : Le diesel. Ce test a montré que les meilleures valeurs d'étalement d'huile ont été obtenues avec les surnageants de cultures des souches E39, E311 et E313. Il est bien connu que plus un biosurfactant est de bonne qualité plus il génère des abaissements de la

tension de surface et un indice d'émulsification élevé. L'indice d'émulsification du n-hexadécane des extraits bruts des 5 souches sélectionnées pour leurs activités biosurfactantes a été mesuré pour l'évaluation de leurs activités émulsifiantes. Les valeurs obtenues sont comprises entre 78,2% et 79,2% pour les souches E39, E311 et E313 qui sont comparables avec les indices d'émulsification maximums des biosurfactants produits par des souches de *Pseudomonas aeruginosa* (80%) (Aparna et al., 2012) comme il a été décrit dans des études similaires, et plus élevée que des valeurs obtenus avec des surfactants de nature chimique comme la SDS (78%) et le Tween 80 (67%), et certains biosurfactants naturels comme la surfactine produite par *Bacillus subtilis* E8 (68%) (Gong et al., 2009). Tandis que pour les solutions d'extrait brut des souches E33b et E3b, les valeurs de E24 obtenues ont été moins importantes ($53 \pm 0,5\%$ et $62,7 \pm 1,1\%$ respectivement). Les tests de l'activité ont également montré que les émulsions formées avaient une stabilité qui dépasse 30 jours. Cette stabilité suggère l'application de ces molécules comme un bon agent émulsifiant dans les domaines industriels. Ainsi, tous les résultats précédemment obtenus ont montré que les biosurfactants produits par les souches E39, E311, E313 sont producteurs de biosurfactants avec des propriétés tensioactives et émulsifiantes intéressantes. Ces 3 souches ont été alors sélectionnées pour poursuivre ce travail.

L'identification phénotypique et moléculaire des souches sélectionnées a été effectuée. L'arbre ainsi obtenue révèle que les 3 isolats étudiés étaient situées dans une branche distincte du groupe *Pseudomonas putida* tel que défini par (Gomila et al., 2015). Ainsi, les souches E39, E311 et E313 isolées d'une espèce contaminée par l'huile appartiennent au groupe de *Pseudomonas putida* fréquemment représenté dans les sols et dans l'eau. Ces isolats qui produisent des biosurfactants ayant des propriétés émulsifiantes et tensioactives considérables, ces caractéristiques rendent intéressant l'étude de l'application de ces biosurfactants notamment dans le domaine environnementale. Cependant l'applicabilité des biosurfactants dépend étroitement de leur stabilité vis-à-vis des conditions environnantes comme la température, le pH et la salinité. Dans ce travail, la stabilité des biosurfactants produits par les souches E39, E311 et E313 a été évaluée en mesurant leurs activités émulsifiantes et tensioactives résiduelles à des différentes gammes de température, de pH et à différentes concentration de NaCl. Les biosurfactants produits par les trois souches étudiées se sont ainsi révélés thermostables comme ils conservaient leurs activités après un traitement de 24 heures à des températures comprises entre 4 et 80°C. La résistance thermique des biosurfactants lipopeptidiques jusqu'à 80°C ou 100°C a été rapportée par (Anyanwu et al., 2011; Das et Mukherjee, 2007; de Sousa et Bhosle,

2012). Cette thermostabilité est relativement plus élevée par rapport aux tensioactifs synthétiques tels que le dodécylsulfate de sodium qui présente une perte significative d'activité résiduelle d'émulsification à partir de 70°C (Khopade et al., 2012). Cette propriété rend intéressant l'étude de l'applicabilité des biosurfactants produits dans de nombreux domaines industriels tels que les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques où les processus de chauffage sont d'une importance primordiale. Les essais de stabilité au pH ont montré que l'activité de réduction et d'émulsion des tensions de surface des biosurfactants testés est restée stable sur une plage de pH de 6 à 12 mais a été affectée dans les conditions acides à des pH inférieures à 4. La stabilité au pH alcalin des biosurfactants lipopeptidiques a été démontrée par (Anyanwu et al., 2011; de Sousa et Bhosle, 2012; Mukherjee, 2007). Une diminution de l'activité émulsifiante à pH acide a également été observée par (de Sousa et Bhosle, 2012) pour un bioémulsifiant non connu. Il convient également de noter que la solution de biosurfactant devient trouble au pH 4 comme l'ont observé Khopade et al., (2012). La précipitation du biosurfactant pourrait expliquer la perte partielle de l'activité. L'addition de NaCl jusqu'à 10% a légèrement diminué l'activité des biosurfactants. La tolérance des biosurfactants lipopeptidiques a été rapportée par (Anyanwu et al., 2011) jusqu'à 20% de NaCl et par (de Sousa et Bhosle, 2012) jusqu'à 25% de NaCl. La stabilité des biosurfactants brutes dans une large gamme de conditions de température, de pH et de salinité a confirmé leur potentiel d'utilisation dans de nombreux domaines et en particulier dans l'application de bioremédiation. En outre, afin d'aller plus loin dans l'étude de l'applicabilité des souches isolés dans le domaine de la bioremédiation, des essais de dégradation sur sable ont été effectués en utilisant des bioréacteurs contenant du sable artificiellement contaminés par du diesel et inoculés par les souches E39, E311 et E313 et sont la dégradation été suivie pendant 4 semaines. Ces expériences ont montré qu'au bout de 28 jours une élimination de 70% de TPH a été observée dans les bioréacteurs inoculés avec les souches E39, E311 et E313. Cependant, pour les souches de *R.erythropolis* qui a été utilisé comme témoin positif ce niveau de biodégradation a été atteint plus tôt (14 jours). Le pourcentage d'élimination a été inférieur pour les souches E39 et E313 (environ 55%) probablement en raison d'un taux d'élimination plus faible. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus dans d'autres études similaires (Das et Mukherjee, 2007; Mnif et al., 2017) indiquent que ces souches de *Pseudomonas spp.* pourraient être appliqués dans les essais de bioremédiation et que les biosurfactants qu'ils produisent pourraient améliorer la biodégradation des hydrocarbures dans les sols (Pacwa-Płociniczak et al., 2011).

Les souches de *Pseudomonas* isolées à partir d'un sol contaminé par les hydrocarbures ont été criblées pour leurs propriétés émulsifiantes et biosurfactantes. Trois d'entre elles ont montrés la présence de molécules dans leurs surnageants avec un potentiel biosurfactant et émulsifiants considérables, pour lesquels elles ont été sélectionnées pour poursuivre ces travaux. L'identification des souches d'intérêts a montré que les trois isolats sont étroitement liés entre elles et appartiennent au groupe de *Pseudomonas putida*. En outre, l'étude de l'applicabilité des biosurfactants produits par les souches E39, E311 et E313 a montré que ces biosurfactants possèdent une bonne stabilité vis-à-vis des conditions environnementales (Température, pH et salinité) et que ces souches possèdent la capacité de dégrader les hydrocarbures présents dans le sol avec un débit de dégradation relativement élevé. Dans la suite de ce travail, on s'intéresse à la purification des molécules biosurfactantes pour l'identification de leurs natures et leurs structures chimiques.

2. Purification des biosurfactants et identification de leurs structures

2.1. Introduction

Les biosurfactants microbiens sont connus par leur diversité structurale et fonctionnelle considérable. Ainsi les biosurfactants les plus communs sont essentiellement les rhamnolipides, les glycolipides, les lipopeptides (Rodrigues et al., 2006). Les lipopeptides représentent les des métabolites secondaire à activité biosurfactante dont la production est très répandue chez les bactéries du genre *Pseudomonas*. Ces molécules sont produits par un mécanisme codé par des synthétases non ribosomales à travers un grand nombre de gènes clusters. En effet, les synthétases sont organisées en modules dont chacun permet l'incorporation d'un acide aminé spécifique, dont la combinaison est essentiellement à l'origine de la diversité des lipopeptides. Une souche peut également synthétiser plusieurs isoformes d'un même lipopeptide issues de l'incorporation d'acides gras différents.

Cette partie de la thèse est consacré à la purification des molécules produites par les souches ayant montré une activité biosurfactante par des techniques chimiques, chromatographiques et membranaires, et leur identification chimique au moyen de réactions réalisées après séparation par chromatographie sur couche mince et leur identification structurale en utilisant une approche combinée alliant la spectrométrie de masse et la bioinformatique. la spectrométrie de masse (MALDI-ToF et LC/MS) permettra de déterminer le poids moléculaire ainsi que la structure de la chaîne peptidique des lipopeptides, et les outils bioinformatiques permettront à partir de l'analyse du génome des souches productrices de lipopeptides de réaliser une prédiction de la structure de ces derniers. La combinaison entre ces techniques analytiques et bioinformatiques permettra de définir la structure des biosurfactants produits, ce qui représente une étape importante pour une caractérisation plus approfondie de leurs propriétés fonctionnelles liées à leur structure chimique.

2.2. Caractérisation des biosurfactants produits par les souches E39, E311 et E313

Afin de caractériser la nature chimique des biosurfactants produits, différentes techniques de révélation ont été effectuées après séparation par chromatographie sur couche mince. L'anthrone a été utilisée pour la détection des glycolipides, le α -naphtol pour la détection des carbohydrates et la ninhydrine pour la détection des amines et donc potentiellement des lipopeptides. Les résultats ont montré qu'il n'y avait pas eu de réactions positives dans les plaques traitées avec l'anthrone et le α -naphtol (tableau 20). Tandis que dans les plaques traitées avec la ninhydrine, des spots rouges ont été révélés pour les 3 souches étudiées. Ces résultats indiquent l'absence de molécules de nature glycolipidique et de carbohydrates et la présence de chaînes peptidiques dans les échantillons, ce qui mène à conclure que les biosurfactants produits par ces souches sont très probablement de nature lipopeptidique (figure 22).

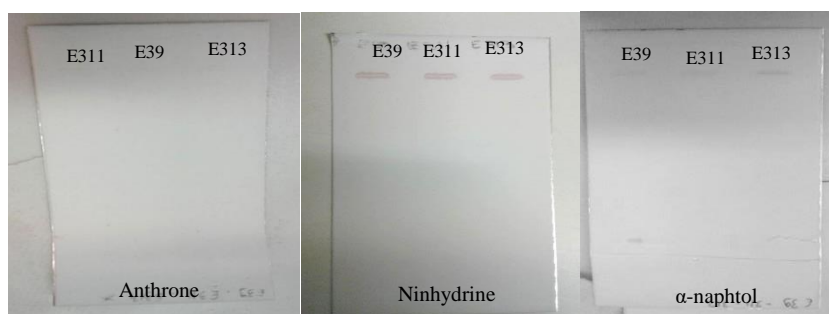


Fig. 22 : Détection de la nature des biosurfactants produits par E39, E311 et E313 en chromatographie sur couches mince en utilisant la ninhydrine, l'anthrone et le α -naphtol comme réactifs

Tableau 20 : Caractérisation chimique préliminaire de la nature des biosurfactants produits par les souches E39, E311 et E313 après séparation par chromatographie sur couche mince

Souches de <i>Pseudomonas</i> spp.	Ninhydrine	Anthrone	1-naphtol
E39	+	-	-
E311	+	-	-
E313	+	-	-

Afin d'aller plus loin dans l'identification des biosurfactants produits par les 3 souches sélectionnées et en vue de confirmer les résultats obtenus par les analyses en chromatographie sur couche mince, des analyses en spectrométrie de masse MALDI-ToF sur les colonies

bactériennes cultivées sur milieu TSA ont été réalisées. L'analyse des spectres de masses obtenus a permis de détecter des pics avec des rapports m/z entre 1090,7 et 1189,5 (figure 23).

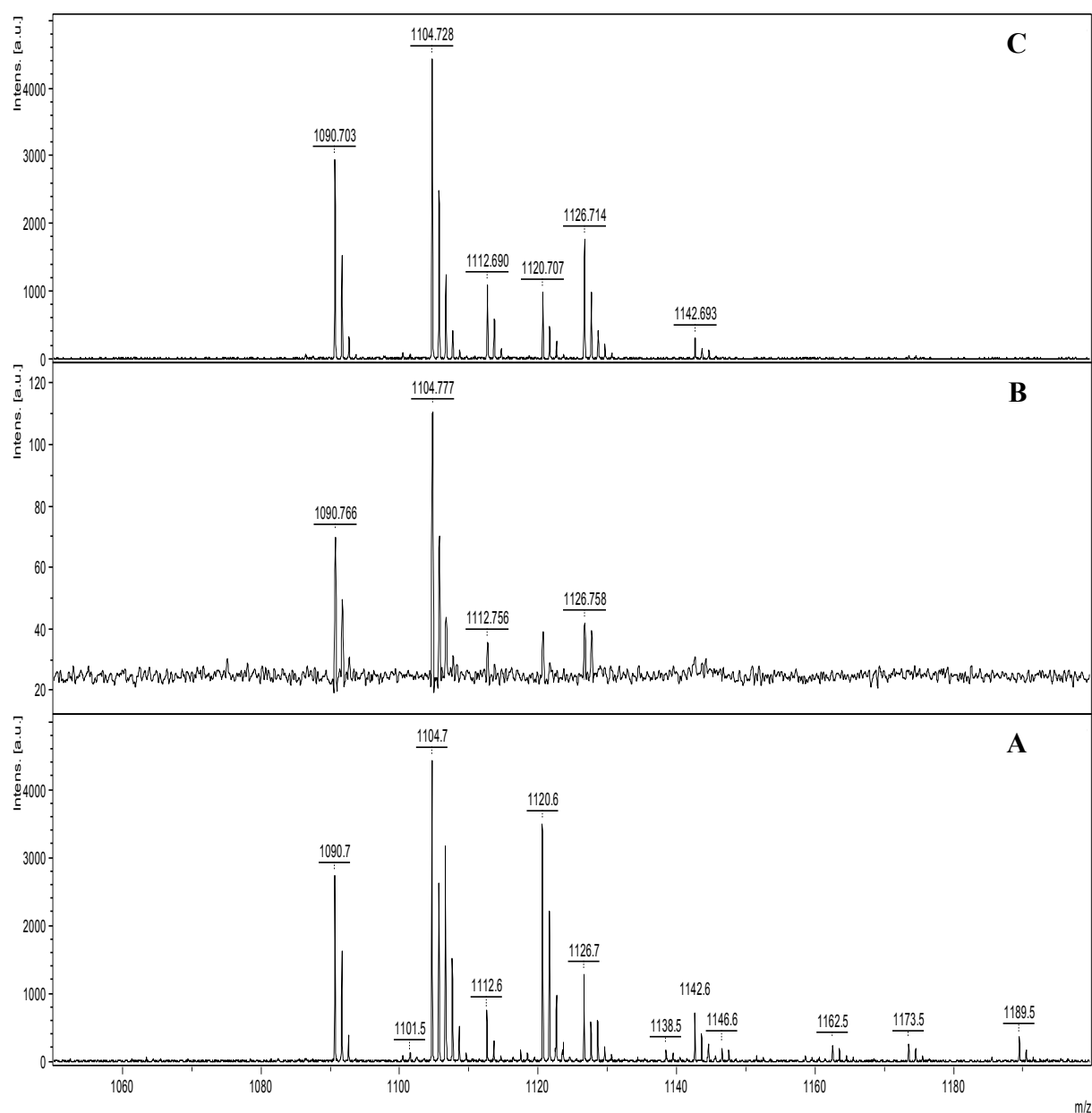


Fig. 23 : Spectre de masse MALDI-ToF des colonies des trois isolats produisant de biosurfactants sélectionnés, (A): *Pseudomonas E39*, (B): *Pseudomonas E311*. (C): *Pseudomonas E313*

L'analyse des spectres (figure 21) a mis en évidence des masses incluses dans l'intervalle de masse des lipopeptides, i. e. m/z 800 à 2000. a mis en évidence des pics à des valeurs de m/z comprises entre 1090,7 et 1189,5. Des pics de masse identique aux différents adduits de la syringafactine A (m/z 1104,7 $[M + Na]^+$, 1120,7 $[M + K]^+$, 1126,8 $[(M-H) + 2Na]^+$, 1142,7 $[(M-H) + Na + K]^+$) ont été détecté pour les trois isolats E39, E311 et E313 (Berti et al.,

2007). D'autres pics de masse produits par E39, E311 et E313 ont été également détectés et attribués à différents adduits d'un lipopeptide (m/z 1090.7 $[M+Na]^+$, 1106.7 $[M+K]^+$, 1112.7 $[(M-H)+2Na]^+$, 1126,7 $[(M-H)+Na+K]^+$). Ces masses sont séparées par 14 Da des masses à m/z 1104,7 $[M + Na]^+$, 1120,7 $[M + K]^+$, 1126,8 $[(MH) + 2Na]^+$ et 1142,7 $[(M MH) + Na + K]^+$ respectivement. Cet écart pourrait s'expliquer par un groupe méthyle supplémentaire situé dans la région C-terminale de l'acide gras ou une différence d'acides aminés situés dans la chaîne peptidique du lipopeptide. Chez la souche E39, deux masses correspondant à des adduits du stylopeptide II (m/z 1173,5 $[M+Na]^+$ et 1189,5 $[M+K]^+$), un peptide cyclique à activité anti-tumorale ont été observées. Chez cette souche une masse inconnue (m/z 1162,5) a été également détectée.

Chez les trois isolats deux molécules lipopeptidiques ont été donc mis en évidence, l'une de masse 1067,7 appelée lipopeptide A (LPA) et l'autre de masse 1081,7 appelée lipopeptide B (LPB) (tableau 21).

Tableau 21 : Masses des différents adduits de lipopeptides obtenues par l'analyse des spectres MALDI-ToF des colonies des souches E39, E311 et E313 sur milieu solide milieu TSA

Masse	Lipopeptide A	Lipopeptide B
$[M + H]^+ a$	1068.7	1082.7
$[M + Na]^+ b$	1090.7	1104.7
$[M + K]^+ b$	1106.7	1120.7
$[(M-H) + 2Na]^+ b$	1112,7	1126,7
$[(M-H) + Na+K]^+ b$	1128,7	1142,7

*a : masse théorique calculée, b : masse observée attribuée aux ions adduits

Afin de pouvoir aller plus loin dans l'identification de ces molécules, la partie suivante de ce travail a consisté à purifier ces molécules par de différentes techniques de séparation biochimiques et membranaires.

2.3. Purification des biosurfactants par des techniques chromatographiques

Vu la grande similarité des profils obtenus par l'analyse des métabolites secondaires produits par les souches de *Pseudomonas sp. E39*, *E311* et *E313*, cette partie du travail a été poursuivie avec les biosurfactants produits par la souche de *Pseudomonas sp. E313*. Afin de purifier les biosurfactants produits et pouvoir les doser, les surnageants de culture ont été analysés en premier lieu en HPLC-MS sur une colonne C18 en utilisant 2 gradients d'élution différents (tableau 22):

Tableau 22 : Gradients d'élution utilisés en CLHP-MS pour la séparation des lipopeptides A et B à travers une colonne C18

%ACN	/	Durée	Gradient 1	Gradient 2
5%			3 min	3 min
60%			2 min	7 min
85%			10 min	9 min
100%			1 min	1 min

Les profils des chromatogrammes obtenus montrent la présence des deux formes des lipopeptides de masses m/z $[M + H]^+$: 1068,6 et 1082,6 qui sont secrétés dans le surnageant de culture de la souche de *P. sp. E313*. Ces molécules ont été éluées à des temps de rétention de 8,34 min et 8,76 min avec le gradient 1 et de 15,06 min et 15,58 min respectivement. Ces résultats montrent une meilleure séparation avec le 2^{ème} gradient d'élution (figure 24).

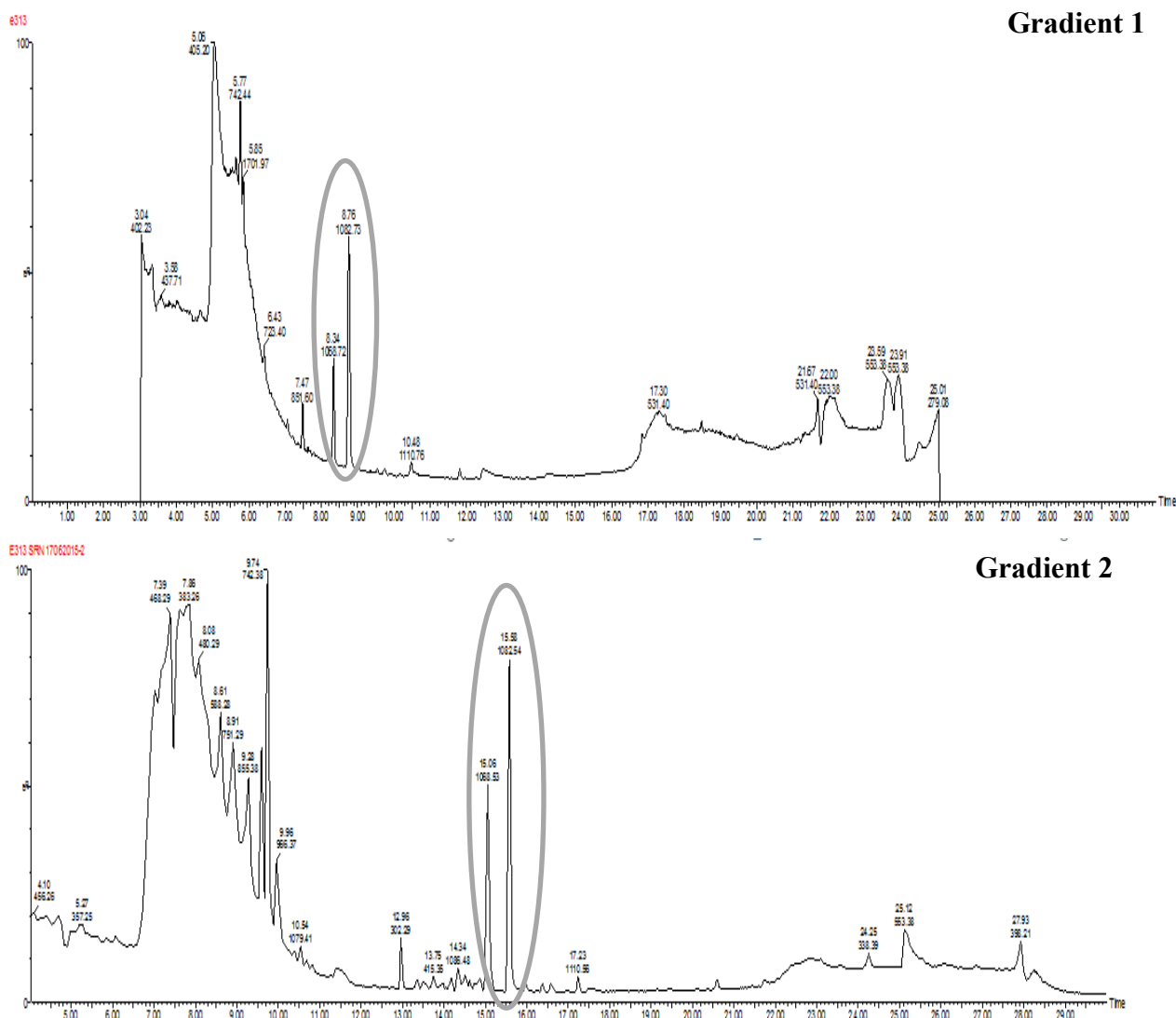


Fig. 24 : Chromatogrammes issus de l’analyse du surnageant de culture de la souche *Pseudomonas sp.* E313 en HPLC/MS à travers une colonne C18 en utilisant deux gradients d’élutions différents

Les deux molécules sont éluées à des pourcentages d’acétonitrile de 68,5% et 69,3% respectivement. En se basant sur ces résultats une pré-purification des surnageants de culture à travers des colonnes EPS C18 a été effectuée en procédant à une élution par pallier d’acétonitrile (0%, 30%, 60%, 100%). La dernière fraction a été alors collectée et concentrée au speedvac pour être analysée en RP-HPLC en suivant le deuxième gradient d’élution précédemment utilisé. Les chromatogrammes obtenus ont donné des profils comparables à ceux obtenus par l’analyse des surnageants en HPLC-MS (figure 25).

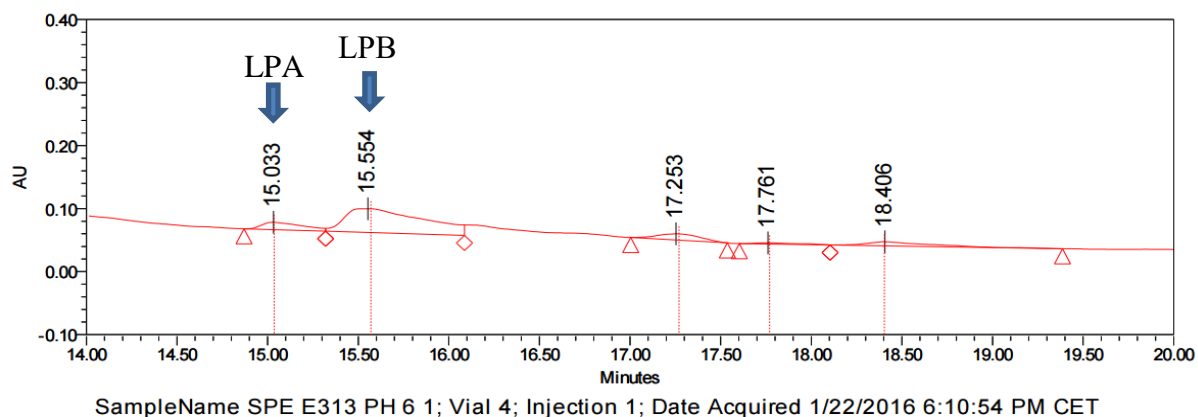


Fig. 25 : Chromatogrammes issus de l'analyse du surnageant de culture de la souche *Pseudomonas sp.* E313 en RP-HPLC à travers une colonne C18

En se basant sur les résultats préalablement obtenus les molécules sortant à des temps de rétention de 15,03 min et 15,54 min ont été récoltées et concentrées pour être analysées en spectrométrie de masse MALDI-ToF, afin que la masse et la pureté des molécules soient vérifiées (Annexe 5).

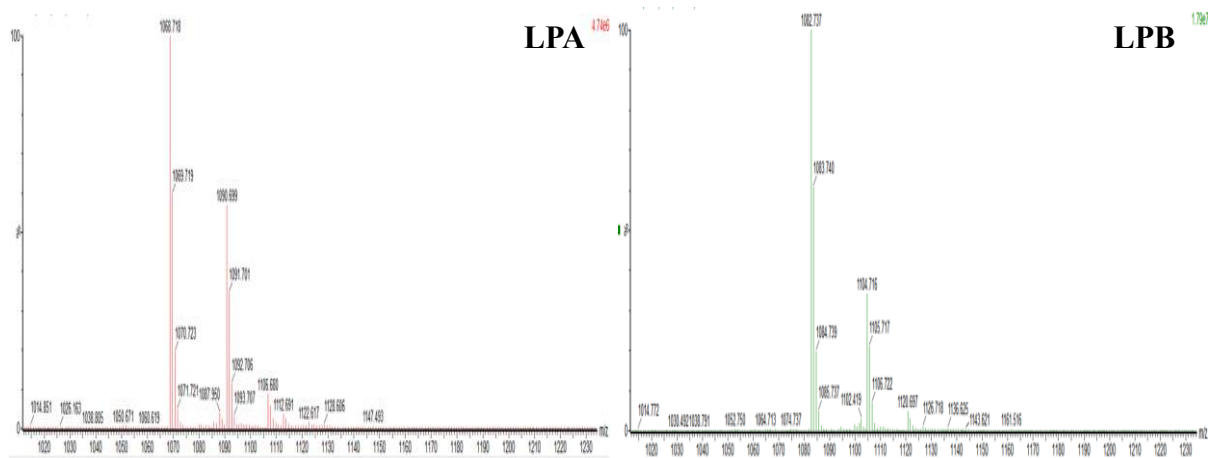


Fig. 26 : Spectre de masse des lipopeptides LPA et LPB après purification par HPLC du surnageant de *Pseudomonas sp.* E313

Les spectres obtenus montrent que les deux pics récoltés sont purs et qu'ils correspondent bien aux deux lipopeptides A et B, qui ont été détectés sous leurs formes $[M+H]^+$, $[M + Na]^+$ et $[M + K]^+$ (figure 26).

2.4. Semi-purification et concentration par précipitation acide

Une première étape de purification utilisée pour la purification des surfactines produites par des *Bacillus subtilis* a été testée. (Peypoux et al., 1999). Elle consiste à induire la précipitation sélective des molécules comportant une structure peptidique par la baisse du pH au-dessous du pH_i et d'en récupérer le précipitât contenant les molécules d'intérêt. Dans ce travail, les biosurfactants lipopeptidiques issus d'une culture en milieu TSB ont été précipités à pH 2, séparés du surnageant puis resolubilisés dans une solution aqueuse dont le pH a été ensuite ajusté à 7 pour en obtenir un extrait brut de biosurfactants. Afin d'évaluer le degré de pureté et le rendement de cette étape de purification, les extraits bruts ont été analysés par HPLC-MS et comparés aux profils obtenus avec les surnageant de cultures (figure 27).

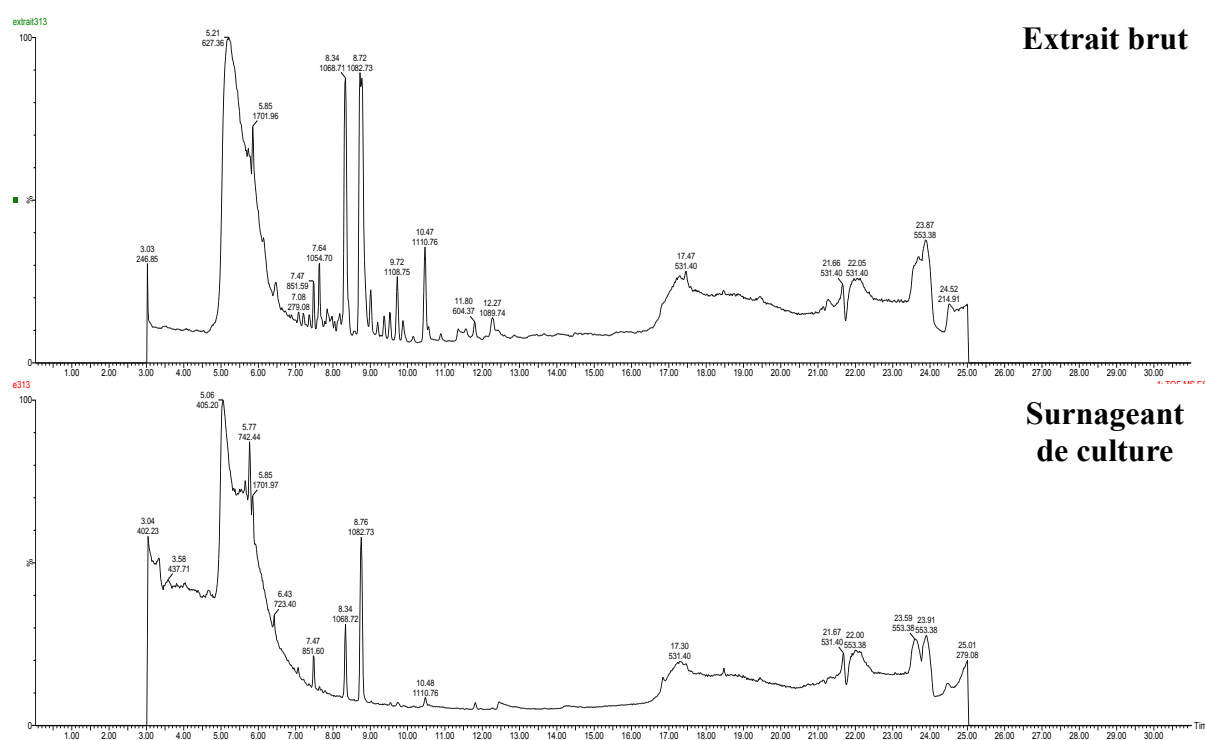


Fig. 27 : Chromatogrammes de HPLC-MS de l'extrait brut de biosurfactants et du surnageant de culture de la souche *Pseudomonas sp. E313* analysés à travers une colonne C18

La quantification des deux chromatogrammes obtenus montre que les 2 molécules étudiées ont été concentrées d'un facteur de 2,3. Cependant d'autres composants présents dans le surnageant de culture ont été également concentrés et la pureté des lipopeptides n'apparaît donc pas augmentée. Cette technique ne semble donc pas appropriée pour la purification des lipopeptides A et B.

2.5. Purification par un processus d'ultrafiltration/Diafiltration

Les essais de purification par ultrafiltration/diafiltration des lipopeptides ont été effectués sur les surnageants de culture produits par les souches de *Pseudomonas sp. E313* sur un milieu minimum M9. Les processus d'ultrafiltration et diafiltration ont été effectués à travers deux membranes de taille de seuil de coupure de 5 kDa et 10 kDa. Les solvants d'élutions utilisés ont été l'eau pour les processus d'ultrafiltration et le méthanol 25% pour la diafiltration. Les filtrats issus de cette expérience ont été analysés en spectrométrie de masse MALDI-ToF pour détecter les molécules qui y sont présentes (figure 28).

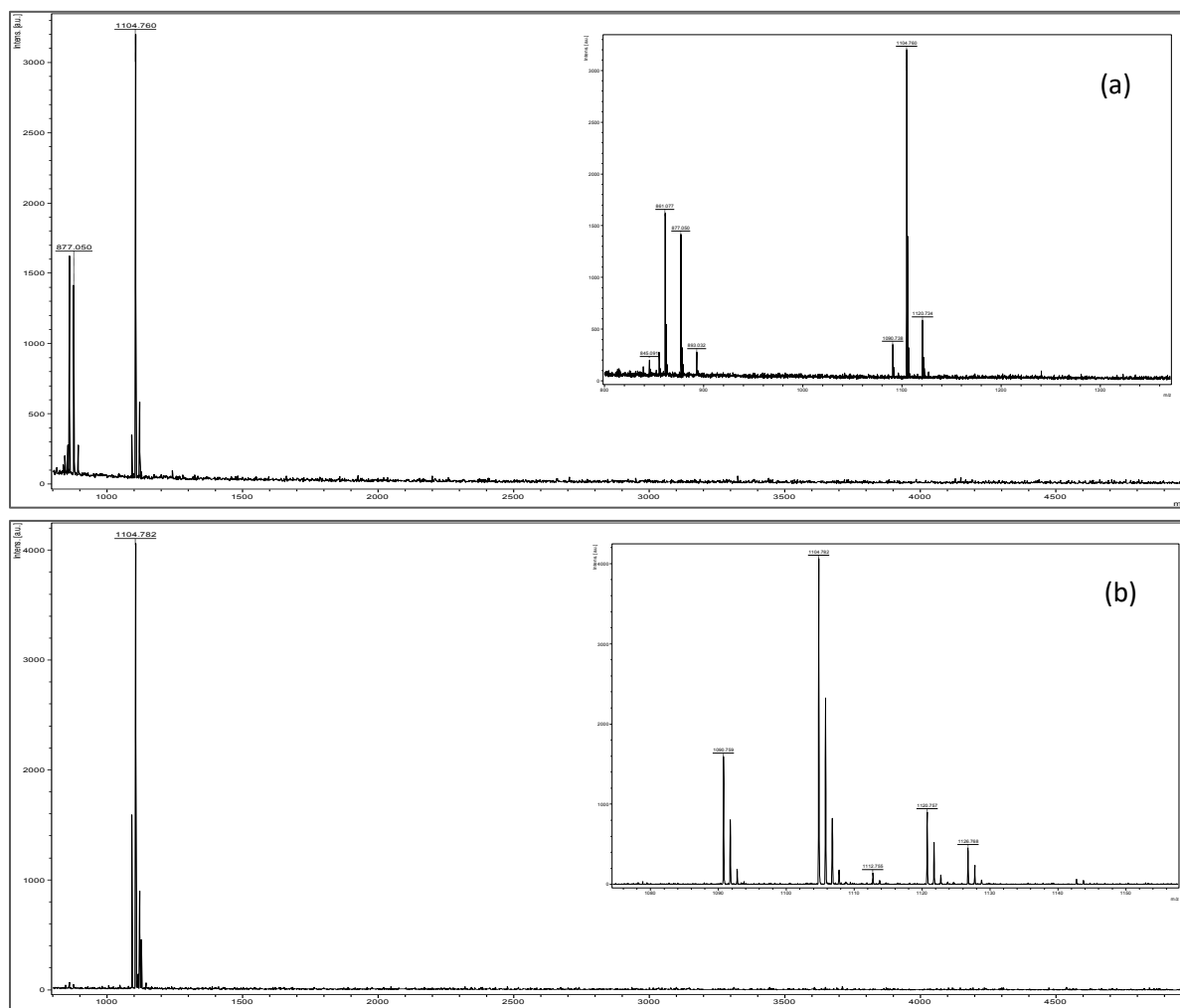


Fig. 28 : Spectre de masse des filtrats issus de la purification par ultrafiltration/diafiltration des surnageants de culture des *Pseudomonas sp. E313* à travers des membranes de taille de seuil de coupure de 5 kDa (a) et 10 kDa (b)

Sur la membrane de 5kDa, des impuretés ont été détecté dans le filtrat final. Leur rapport m/z se situe entre 845,09 et 893,07. L'écart entre les valeurs de m/z correspond à une masse de 16 daltons. Il pourrait s'agir d'un contaminant car il n'est pas présent dans les autres échantillons.

Dans le filtrat final issu de la purification sur la membrane 10 kDa les différentes formes des 2 lipopeptides ont été détectés et dont l'analyse du profile de masse montre qu'ils sont purs.

2.6. Identification de la structure chimique des biosurfactants

L'identification de la structure chimique des biosurfactants a été effectuée sur les deux molécules qui sont produites en quantités suffisantes pour assurer la fiabilité des analyses en spectrométrie de masse et dont les procédés de séparation ont abouti à des molécules pures ayant les masses 1067,6 et 1081,6. L'identification de la structure peptidique de ces lipopeptides a été effectuée en premier lieu par une fragmentation des pics correspondant à ces molécules par spectrométrie de masse MS/MS. Les résultats de la fragmentation obtenus sont présentés dans la figure 29.

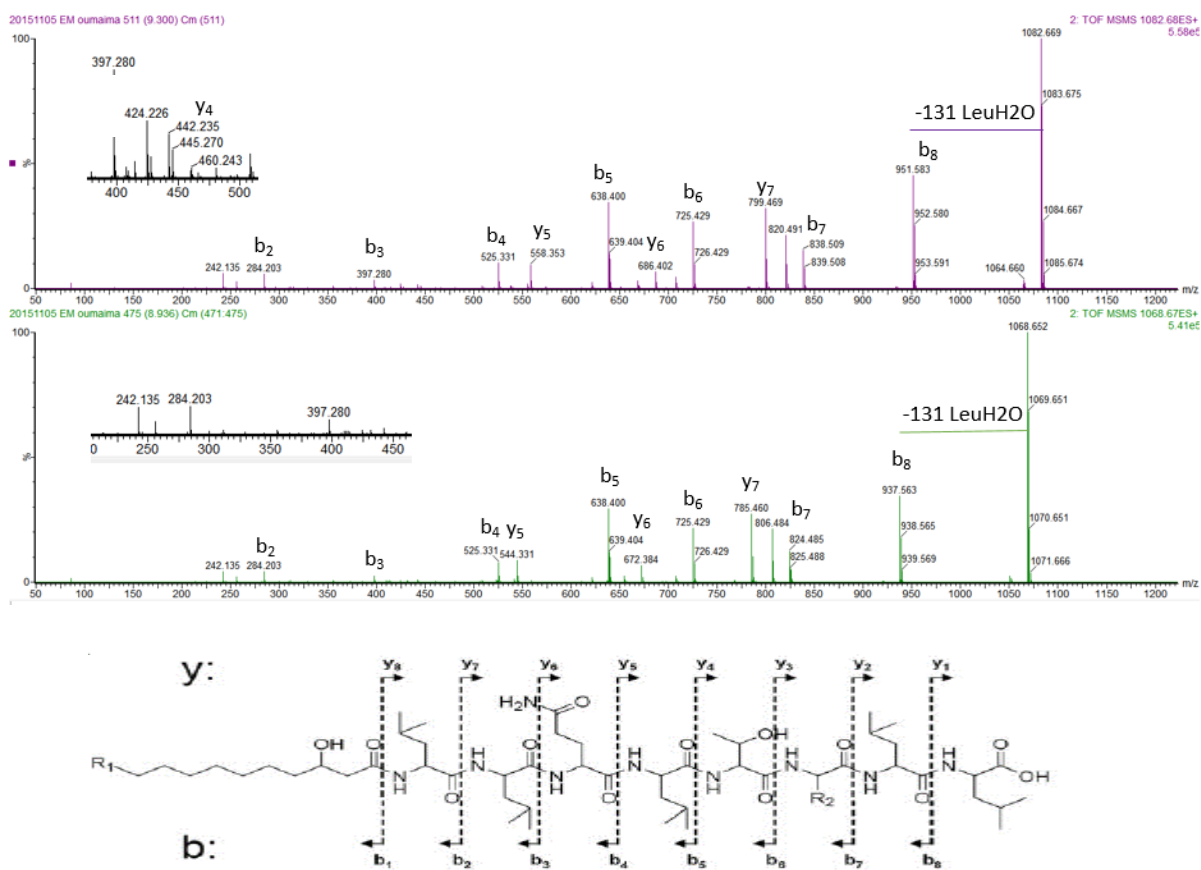


Fig. 29 : Spectre MALDI-MS/MS issu de la rupture de la liaison entre l'acide gras et le premier acide aminé Analyse de la fragmentation ESI-MS / MS du le lipopeptide A de masse $[M+H]^+$ à m/z 1068,6 et du lipopeptide B de masse $[M+H]^+$ à m/z 1082,6 avec la représentation des sites de clivage dans la structure proposée des métabolites qui produirait des ions b et y.

Dans le cas de l'ouverture par coupure de la liaison ester, les ions de série b et y ont été produits. La fragmentation de la partie peptidique des deux molécules biosurfactantes montre qu'il s'agit de deux lipooctapeptides dont les structures des différents fragments qui y sont issus sont présentées dans les tableaux 23 et 24.

Tableau 23 : Calcul des fragments d'acides aminés issus de la fragmentation de la partie peptidique du lipopeptide de masse $[M+H]^+$: m/z 1068,7

Fragments	Masse	Acide aminé libéré	Fragments	Masse	Acide aminé libéré
b1	ND	AG-AA1	Y1	132,3	Leu/Ile
b2	284,2	Leu/Ile	Y2	245,3	Val
b3	397,2	Gln	Y3	344,4	Ser
b4	525,3	Leu/Ile	Y4	431,4	Leu/Ile
b5	638,4	Ser	Y5	544,5	Gln
b6	725,4	Val	Y6	672,4	Leu/Ile
b7	824,4	Leu/Ile	Y7	785,4	AG-AA1
b8	937,6	Leu-H ₂ O/Ile- H ₂ O			
[M+Na]⁺	1090,7	Lipopeptide A			

Tableau 24 : Calcul des fragments d'acides aminés issus de la fragmentation de la partie peptidique du lipopeptide de masse $[M+H]^+$: m/z 1082,7

Fragments	Masse	Acide aminé libéré	Fragments	Masse	Acide aminé libéré
b1	ND	AG-AA1	Y1	131,2	Leu-H ₂ O/Ile-H ₂ O
b2	284,2	Leu/Ile	Y2	245,2	Leu/Ile
b3	397,2	Gln	Y3	358,2	Ser
b4	525,3	Leu/Ile	Y4	445,2	Leu/Ile
b5	638,4	Ser	Y5	558,5	Gln
b6	725,4	Leu/Ile	Y6	686,4	Leu/Ile
b7	838,5	Leu/Ile	Y7	799,4	AG-AA1
b8	951,5	Leu-H ₂ O/Ile-H ₂ O			
[M+Na]⁺	1104,7	Lipopeptide B			

Selon les résultats présentés dans les tableaux ci-dessus 7 acides aminés de la chaîne peptidiques des deux lipopeptide ont pu être identifiés. Le premier acide aminé de chaque molécule lié à l'acide gras n'a pas pu être déterminé. Les fragments b2 ont pour masse : $AG+AA_1 = 284,2$. Le dernier acide aminé libéré issu du clivage du fragment b8 avait une masse de 131 chez les deux lipopeptide, ce qui correspond à la masse monoisotopique de Leu⁸ attachée à une molécule

d'eau (Leu⁸-H₂O). Ceci prouve que le dernier acide aminé a un groupement hydroxylé libre et que les lipopeptides étudiés possèdent une structure linéaire. Les structures ainsi déterminées des deux lipopeptides sont respectivement : AG-AA₁- Leu/Ile² – Gln³- Leu/Ile⁴ – Ser⁵ – Val⁶ – Leu/Ile⁷ – Leu/Ile⁸ pour le lipopeptide A et AG-AA₁- Leu/Ile² – Gln³- Leu/Ile⁴ – Ser⁵ – Leu/Ile⁶ – Leu/Ile⁷ – Leu/Ile⁸ pour le lipopeptide B. Ces résultats montrent une structure très proche des deux lipopeptide avec une différence localisée au niveau du 6eme acide aminé qui est la Valine pour le lipopeptide A et la Leucine pour le lipopeptide 2. Une recherche dans la base de données NORINE des molécules correspondantes aux masses obtenues par l'analyse en spectrométrie de masse a été effectuée. Les résultats des recherches montrent effectivement une correspondance de la masse du lipopeptide B avec celle de la syringafactine. La comparaison entre la structure des lipopeptides étudiés et la structure de la syringafactine B montre une grande similarité entre ces molécules avec une différence au niveau du 5^{ème} acide aminé qui est la thréonine chez les syringafactines et la sérine chez les lipopeptides produits par les *Pseudomonas sp. E313*.

Pour confirmer les résultats précédemment obtenus et aboutir à une identification complète de la chaîne peptidique des deux lipopeptides étudiés, des outils bioinformatiques analysant le génome complet de la souche étudiée ont été utilisés.

2.7. Prédiction de la structure des biosurfactants par l'analyse du génome de la souche de *Pseudomonas sp. E313* par des outils bioinformatiques

Une analyse du génome complet de *Pseudomonas sp. E313* par des outils bioinformatiques a été effectuée dans le but de révéler les différents clusters de gènes présents, d'en définir les structures des synthétases produites et de prédire la structure de la molécule produite.

Le génome de la souche analysée a été automatiquement annoté à l'aide du logiciel Rast. L'annotation révèle que le génome étudié a une taille de 4,83 mb et qu'il est constitué de 88 contigs et 31 clusters. Deux clusters ont été identifiés comme des gènes de biosynthèse de peptides NRPS. Le premier cluster de gènes NRPS est 100% similaire aux gènes de biosynthèse de la pseudomonine qui est un sidérophore produit par des souches de *Pseudomonas fluorescens*. Ce gène est composé de 4 domaines de condensation et 2 domaines d'adénylation

ce qui écarte l'hypothèse que ce gène soit responsable à la synthèse des molécules étudiées. Les résultats de blast du deuxième cluster de gènes NRPS montre qu'il sont similaires à 66% au cluster de gène de biosynthèse des cichofactines qui est un lipopeptide appartenant à la famille des syringafactines, synthétisé par des souches de *Pseudomonas cichorii* (Pauwelyn et al., 2013). L'analyse du génome par le logiciel Antismash montre que ce cluster est constitué d'un groupe de gènes contenant des gènes de régulation et de transport ainsi que 2 grands gènes nommés ctg49_174 et ctg49_173 d'une taille de 9 479 pb et 17 738 pb respectivement comportant des domaines de condensation (C), d'adénylation (A) et de thiolation (T) spécifiques (figure 30). L'analyse des NRPS codées par les gènes ctg49_173 et ctg49_174 montre la présence de 8 modules qui activent 8 monomères ce qui suggère que le NRP correspondant est un octapeptide. L'organisation modulaire montre que le module d'initiation contient un domaine C_{starter} du côté N-terminal du gène ctg49_174 qui est une organisation qui suggère que le peptide non ribosomal synthétisé pourrait incorporer un lipide à l'extrémité N-terminal. En outre, le gène ctg49_173 se termine avec deux domaines de Thioestérase (Te) présents en tandem qui catalysent pour la libération des peptides NRP. Ces deux caractéristiques sont des signatures typiques chez les NRPS impliqués dans la biosynthèse des lipopeptides. Afin de prédire la séquence peptidique des lipopeptides étudiés à partir des données du génome séquencé, des analyses bioinformatiques des domaines A de chaque module NRPS ont été effectuées en combinant les codes de Stachelhaus et la prédiction de Minowa (Minowa et al., 2007; Stachelhaus and Marahiel, 1995) et en utilisant le logiciel de prédiction nrpspredictor2. La prédiction (tableau 25) a révélé que chaque domaine A des 8 modules code pour un acide aminé spécifique à l'exception du domaine A du module 6 qui code soit pour la synthèse de l'isoleucine ou soit pour la valine. L'analyse *in silico* montre donc que cette synthétase est responsable de la biosynthèse d'un lipo-octapeptide dont la séquence pourrait être: AG-Leu-Leu-Gln-Leu-Ser-Val-Leu-Leu ou AG-Leu-Leu-Gln-Leu-Ser-Ile-Leu-Leu. En outre, la configuration D / L des résidus d'acides aminés a été déterminée par l'analyse phylogénétique des séquences peptidiques des domaines C. Chez les bactéries du genre *Pseudomonas*, les domaines dual C/E qui contiennent à la fois une fonction de condensation et d'épimérisation sont responsables de l'incorporation de résidus de type D (Rausch et al., 2007). Ainsi ces analyses ont révélé que les domaines 2, 3, 4, 6 et 8 sont de configuration dual C/E alors que les domaines 5 et 7 sont de type ^LCL. Ainsi la structure du lipopeptide prédite est : AG-D-Leu-D-Leu-D-Gln-D-Leu-L-Ser-D-Val-L-Leu-D-Leu ou AG-D-Leu-D-Leu-D-Gln-D-Leu-L-Ser-D-Ile-L-Leu-D-Leu.

Tableau 25 : Prédiction des acides aminés synthétisés par chaque module par l'analyse des codes spécifiques du domaine d'adénylation de chaque module

Domaine A	Code spécifique	AA prédit
ctg49_174 A1	D A W F L G N V	Leu
ctg49_174 A2	D A W P L G N V	Leu
ctg49_174 A3	D A W Q V G V V	Gln
ctg49_173 A1	D A W P L G N V	Leu
ctg49_173 A2	D V W H L S L V	Ser
ctg49_173 A3	D A L F F G V T	Ile/Val
ctg49_173 A4	D A W P L G N V	Leu
ctg49_173 A5	D A W P L G N V	Leu

*AA : acide aminé

2.8. Discussion

Dans ce chapitre, on s'est intéressé essentiellement à l'identification des molécules produites par les souches de *Pseudomonas* isolées et sélectionnées pour leur production des biosurfactants, ainsi que de leur purification et l'identification de leur structure chimique en utilisant une approche qui allie la spectrométrie et la bioinformatique. Les souches sélectionnées ont été examinées pour leur capacité à produire des lipopeptides en utilisant la spectrométrie de masse de MALDI-ToF qui est un dispositif efficace pour leur détection (Vater et al., 2002). Dans les milieux solides et liquides, les spectres de masse ont révélé des séries de pics proéminents allant de 1090,7 à 1142,7. Les souches de *Pseudomonas sp. E39, E311* et *E313* produisent des molécules avec des masses m/z identiques à la masse de la syringafactine A. Les syringafactines sont des lipo-octapeptide liés à un acide gras C10 ou C12 produit par des *Pseudomonas syringae DC3000* (Berti et al., 2007). Plus récemment, Pauwelyn et al., (2013) ont également identifié des lipopeptides produits par *Pseudomonas cichorii SF1-54* en tant que nouveaux membres de la famille des syringafactines. Ces lipopeptides appelée cichofactines, ont une masse 1108,7 et 1136,7. D'autres pics de masse correspondant à une molécule également produite par les souches de *Pseudomonas E39, E311 et E313* qui diffèrent de 14 Da

par rapport aux pics de masse précédemment décrits, pourraient être attribués à des lipopeptides inconnus de la famille des syringafactines. Cette différence de masse pourrait s'expliquer par la production d'isoformes possédant un groupe méthyle en moins dans la région C-terminale de l'acide gras ou une différence d'acides aminés dans la chaîne peptique du lipopeptide. Des co-productions d'isoformes de lipopeptides de *Pseudomonas* ont déjà été démontrées dans le cas de plusieurs syringopeptines (Ballio et al., 1991) et des syringafactines (Berti et al., 2007). Des études antérieures ont montré que les lipopeptides de la famille des syringafactines possèdent également des propriétés biosurfactantes (Berti et al., 2007; Pauwelyn et al., 2013) ce qui suggèrent que ces molécules sont impliquées dans l'activité biosurfactante des souches de *Pseudomonas sp. E9, E311 et E313*. Afin d'aboutir à une identification plus complète de ces lipopeptides, la purification de ces molécules devient une étape indispensable. Selon les résultats de spectrométrie de masse les profils de masses des 3 souches étudiés sont identiques, ainsi le travail a été poursuivi avec les lipopeptides produits par la souche de *Pseudomonas sp. E313*. La purification a été effectuée en utilisant différentes méthodes de séparation. Une purification des lipopeptides biosurfactants par des techniques chromatographiques en LC-ESI-MS été d'abord réalisée. Les molécules de masse $[M+H]^+$ m/z : 1068,6 et 1082,6 ont été séparées d'une manière efficace et l'analyse en spectrométrie de masse a montré qu'ils étaient bien purifiés. Les pourcentages d'élution de ces 2 molécules sont très proches ce qui signifie qu'elles possèdent des propriétés physico-chimiques et des structures chimiques proches.. Des essais de purification ont été relayés par précipitation acide (Ghribi et Ellouze-Chaabouni, 2011; Mnif et al., 2017; Peypoux et al., 1999) et d'ultrafiltration/diafiltration (Coutte et al., 2013). Cette dernière technique a permis d'obtenir des échantillons purifiés des deux lipopeptides. L'identification de la structure peptidique a été ensuite réalisée à partir des molécules purifiées en LC-MS par une fragmentation en ESI-MS-MS. Les structures obtenues ont été AG-AA₁- Leu/Ile² – Gln³- Leu/Ile⁴ – Ser⁵ – Val⁶ – Leu/Ile⁷ – Leu⁸ pour la molécule A et AG-AA₁- Leu/Ile² – Gln³- Leu/Ile⁴ – Ser⁵ – Leu/Ile⁶ – Leu/Ile⁷ – Leu/Ile⁸ pour la molécule B correspondant aux lipopeptides de masse $[M+H]^+$ m/z : 1068,6 et 1082,6 respectivement. Ces résultats montrent une grande similarité aux structures des syringafactines avec une différence au niveau du 5^{ème} acide aminé qui est la thréonine chez les syringafactines (Berti et al., 2007), et la glutamine chez les cichofactines (Pauwelyn et al., 2013). Ces résultats ont également montré que les 2 lipopeptides produits par *Pseudomonas sp. E313* présentent des structures très similaires avec une différence au niveau du 6^{ème} acide aminé qui est la valine pour le lipopeptide A et la leucine ou l'isoleucine pour le lipopeptide B. Cette différence entre les lipopeptides

isoformes a été également observée chez les syringafactines où les formes A et D possèdent la valine en 6^{ème} position de la chaîne peptidique tandis que la leucine occupait la même position pour les formes B, C et E et l'isoleucine pour la forme F (Berti et al., 2007). Cette même différence a été également observée entre les 2 lipopeptides des cichofactines (Pauwelyn et al., 2013). Ces résultats appuient bien l'hypothèse que les 2 molécules étudiées correspondent à des nouveaux lipopeptides qui appartiennent à la famille des syringafactines. Des analyses bioinformatiques des données du génome de la souche de *Pseudomonas sp. E313* ont ensuite été réalisées afin d'avoir des informations plus complètes de la structure des lipopeptides produits à partir de l'analyse du ou des gènes codant les NRPS intervenant dans leur synthèse. Deux clusters de gènes codant pour la biosynthèse de peptides non ribosomiaux ont été identifiés dans le génome de *P. sp E313* dont un était 100% similaire au gène de biosynthèse de la pseudomonine, un sidérophore produit par des *Pseudomonas fluorescens*. Le deuxième cluster de gènes présentait une grande similarité avec le gène de biosynthèse des cichofactines (66%) et des syringafactines (66%). La séquence peptidique putative des lipopeptides synthétisés a été prédite par l'analyse *in silico* des domaines A de chaque module des NRPS et le résultat est parfaitement corrélé avec la séquence peptidique déterminé par les analyses en ESI-MS-MS. L'analyse de la spécificité du premier domaine A correspondant à la synthèse du 1^{er} monomère a permis de déterminer que ce domaine permet à l'adénylation de la leucine. Une particularité a été constatée au niveau du 6^{ème} module dont la prédiction de l'acide aminé activé correspond à la valine ou à l'isoleucine ce qui permet d'expliquer la présence des deux formes de lipopeptides dans le surnageant des souches étudiées. Ceci révèle la présence d'un mécanisme de synthèse NRPS alternatif. Ce mécanisme a été récemment identifié chez les *Pseudomonas aeruginosa* pour la production des pyoverdines (Calcott et al., 2014). Chez *Pseudomonas syringae* un seul gène NRPS est à l'origine de la synthèse de 3 formes différentes de syringafactine avec des séquences peptidiques qui diffèrent au niveau du 6^{ème} acide aminé (Berti et al., 2007). L'analyse des domaines de condensations présents dans le gène de biosynthèse étudié a permis la prédiction de la configuration des acides aminés de chaque monomère. Ainsi la combinaison des résultats d'identification a permis de définir la structure suivantes : AG-D-Leu-D-Leu-D-Gln-D-Leu-L-Ser-D-Val-L-Leu-D-Leu et AG-D-Leu-D-Leu-D-Gln-D-Leu-L-Ser-D-Ile-L-Leu-D-Leu correspondant au lipopeptides A et B respectivement. Le dernier fragment issu de la fragmentation en ESI-MS-MS correspondait à l'acide gras lié au premier acide aminé qui a été identifié en tant que la Leucine, avait une masse de 284,2 pour les 2 lipopeptides. Ainsi, après calcul, la masse de l'acide gras incorporé dans la structure des

lipopeptides a pu être déterminé ($282,2 - 113 = 171,2$). Cette masse correspond à la masse d'un résidu 3-hydroxydécanoïque (C10-3OH) qui représente ainsi l'acide gras attaché aux chaînes peptidiques des 2 lipopeptides. Ceci correspond aux acides gras des syringafactines A, B et C.

**3. Optimisation de la production des biosurfactants de *Pseudomonas sp. E313*
moyennant la méthodologie des plans d'expériences**

3.1. Introduction

Les biosurfactants sont des molécules tensioactives, structuralement variées et douées de propriétés assez intéressantes. En effet, Ils sont connus par leur activité de surface et d'interface, leur faible toxicité vis-à-vis de l'Homme et de l'environnement, leur biodégradabilité...Ils présentent également de nombreuses activités biologiques notamment une activité antibactérienne, antitumorale, antivirale, anti-inflammatoire... De ce fait, les biosurfactants constituent une voie de recherche émergente, notamment dans le domaine alimentaire, environnemental, cosmétique et médical. Cependant, pour des raisons technico-économiques, ils ne sont pas encore utilisés de manière intensive, vu les faibles taux de production et les coûts de mises en œuvre et la charge de récupération assez élevés. Afin de réduire ce coût, différents moyens ont été proposés comme le développement de procédés d'ingénierie économique, l'utilisation des souches hyperproductrices (souches mutantes et recombinantes) (Perfumo et al., 2010; Wei et al., 2004), le recours à l'optimisation de la production de biosurfactants, la réduction du temps de traitement en aval par la définition d'un milieu de culture permettant l'augmentation de la croissance des bactéries et de la production des biosurfactants lipopeptidiques (Mercade et Manresa, 1994). Cette méthode consiste en la sélection de composants du milieu appropriés et des conditions de culture optimales pour améliorer essentiellement la productivité des lipopeptides tensioactifs. La concentration des métabolites est fortement influencée par la composition du milieu de culture en sources de carbone, d'azote et en sels minéraux (Siddiqui et Shaukat, 2004). Il existe un grand nombre d'études sur l'optimisation de ces composants avec la méthode classique qui consiste à la modification d'une variable indépendante tout en fixant toutes les autres à un niveau fixe. Cette méthode est très consommatrice de temps et coûteuse pour un grand nombre de variables et nécessite un grand nombre d'expériences afin de définir les niveaux optimaux. Par contre, l'optimisation des différents paramètres par des modèles expérimentaux statistiques peut éliminer les limites d'une optimisation par facteur unique par une conception expérimentale statistique. Le plan D-optimale qui a été utilisé pour cette étude, permet le criblage initial des composants influents du milieu de culture tout en montrant l'importance de leur effet sur la production, en prenant compte de l'influence des interactions entre les différents facteurs et en permettant l'estimation de l'effet combiné sur la réponse finale. Les composants optimaux ainsi définis sont sélectionnés pour l'optimisation quantitative par la méthode des surfaces de réponse (RSM). Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés au cours de ce travail, à optimiser les conditions et le milieu de culture de *Pseudomonas sp. E313* afin d'augmenter la productivité

des lipopeptides A et B par une optimisation qualitative faisant impliquer un modèle statistique D-optimale ainsi qu'une optimisation quantitative des facteurs sélectionnés par la méthode de surface de réponse (RSM). Par la suite, afin de mettre en évidence l'augmentation de la productivité et la rentabilité du processus d'optimisation ainsi réalisé, des fermentations en bioréacteurs en batch simple ont été effectuées en comparant le milieu de culture optimisé au milieu M9 de départ.

3.2. Optimisation des conditions de cultures

L'optimisation des conditions de culture de *Pseudomonas sp. E313* a été réalisée en étudiant l'effet des trois paramètres suivants : la température, la vitesse d'agitation et le pH du milieu de culture. Pour chaque modalité des paramètres étudiés, les expériences ont été effectuées en évaluant, d'une part, la croissance de la souche par la mesure de l'absorbance à 600 nm des surnageants des cultures, et d'autre part, la production des lipopeptides par la mesure des aires des pics correspondant par les analyses en CLHP.

3.2.1. Cinétique de la croissance

Afin de bien maîtriser les différents paramètres d'optimisation de la production des lipopeptides tensioactifs, nous avons étudié les cinétiques de croissance et de production de *Pseudomonas sp. E313* (figure 31).

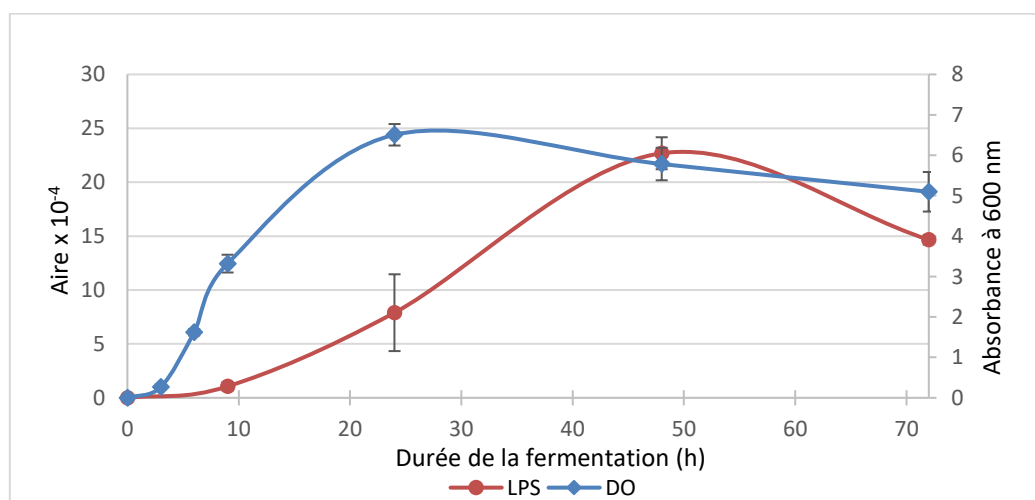


Fig. 31 : Cinétiques de la croissance de *Pseudomonas sp. E313* (♦) et de la production des lipopeptides A et B (●) suivies pendant 72 heures

La cinétique de la croissance de *Pseudomonas sp. E313* montre que cette souche démarre rapidement sa croissance pour atteindre son maximum vers 24 heures de culture après lesquelles la phase stationnaire est atteinte et la concentration cellulaire commence à se stabiliser pour atteindre une absorbance à 600 nm voisine de 5 après 72 h de culture. La production des lipopeptides commence au cours de la phase de croissance exponentielle et atteint son maximum au bout de 48 h de fermentation, au-delà desquelles la concentration en lipopeptides diminue. De ce fait, dans toutes les expériences réalisées dans la suite de ce travail la production en lipopeptides a été mesurée après 48 heures de culture partir de cultures bactérienne suivies pendant 72 h.

3.2.2. Optimisation de la température

Les cinétiques de croissance et de production de lipopeptides tensioactifs ont été évaluées en incubant les cultures de *Pseudomonas sp. E313* à 22°C, 30°C et 37°C à une agitation de 160 rpm (figure 32).

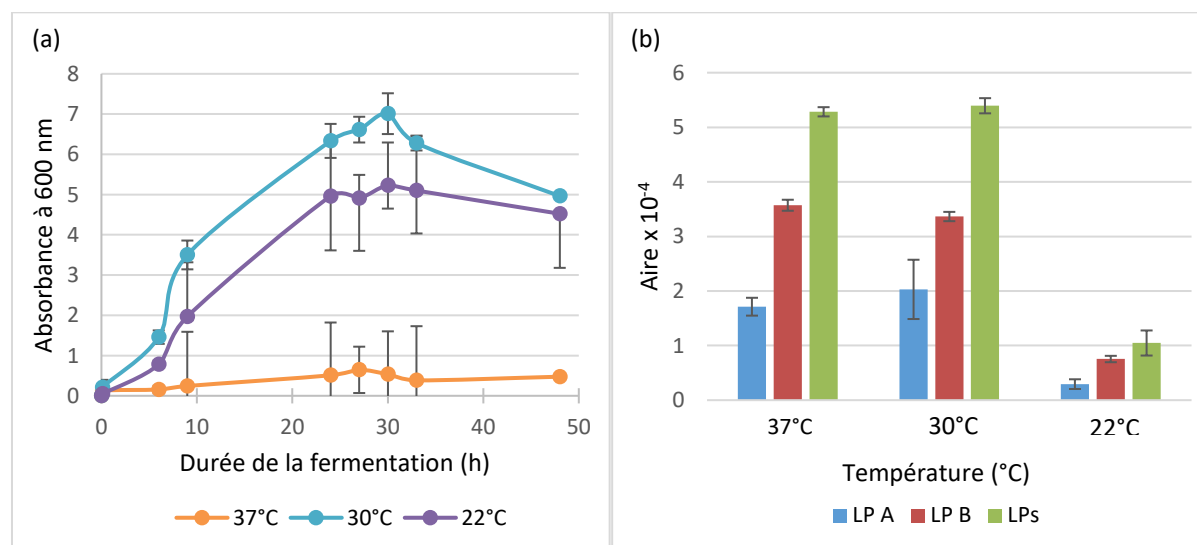


Fig. 32 : Evaluation de la croissance des souches de *Pseudomonas sp. E313* (a) et de la production des lipopeptides A et B (b) en fonction de la température à 48h de culture

Il en ressort de la figure 32 que la croissance de la souche étudiée ainsi que sa production de biosurfactants sont fortement dépendantes de la température d'incubation de la culture. Nous remarquons également que la croissance bactérienne et la production des lipopeptides sont en parfaite corrélation. Ainsi, les meilleures croissances et productions ont été obtenues à une

température de 30°C, avec un très faible écart avec les résultats obtenus à 22°C. À une température de 37°C, la croissance et la production des lipopeptides tensioactifs sont fortement affectées.

3.2.3. Optimisation du pH

La croissance des cellules de *Pseudomonas sp. E313* ainsi que leur production des biosurfactants lipopeptidiques ont été étudiées dans des cultures initiées à des pH de 6, 6.5, 7, 7.5 et 8 et incubées à une température de 30°C sous une agitation de 160 rpm (figure 33). Les pH des milieux de cultures ont été tamponnés par du MOPS et ajustés par l'ajout des solutions de NaOH (1 M) et de HCL (6 M). Nous remarquons que les cellules de la souche testée peuvent tolérer une large gamme de pH pour croître et pour produire les biosurfactants, toutefois, la croissance et la production les plus élevées ont été obtenues à pH de 6,5 et 7, avec un effet particulièrement remarqué sur la production des lipopeptides.

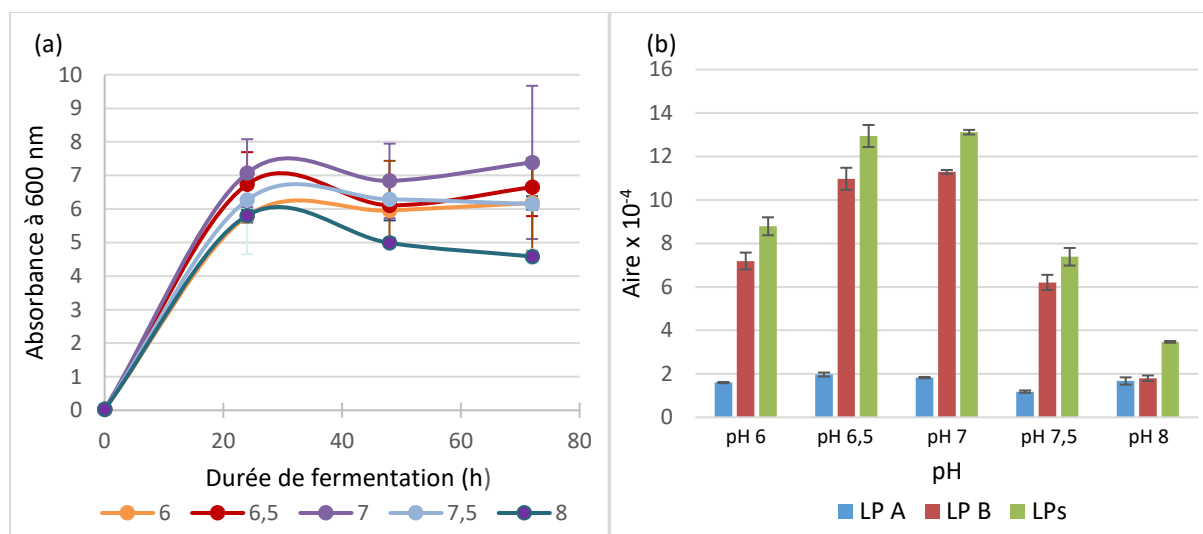


Fig. 33 : Evaluation de la croissance de *Pseudomonas sp. E313* (a) et de la production des lipopeptides A et B (b) à différents pH initiaux de culture

3.2.4. Optimisation de l'aération

Dans cette partie, la souche de *Pseudomonas sp. E313* est incubée à 30°C en testant 3 agitations différentes: 100 rpm, 160 rpm et 240 rpm. Les résultats de croissance et de production obtenus sont présentés dans la figure 31. L'agitation joue un rôle important dans l'aération du

milieu de culture. Ainsi, en fixant le pH du milieu de culture à 7, la température d'incubation à 30°C et en variant la vitesse d'agitation, nous remarquons que la meilleure production des lipopeptides a été obtenue à une vitesse d'agitation de 240 rpm (figure 34). De même les meilleures croissances de la souche E313 ont été mesurées à des vitesses d'agitation de 160 rpm et 240 rpm. A une agitation plus faible (100 rpm), la croissance était plus lente et la phase stationnaire a été atteinte plus tardivement, vers 48 h de culture.

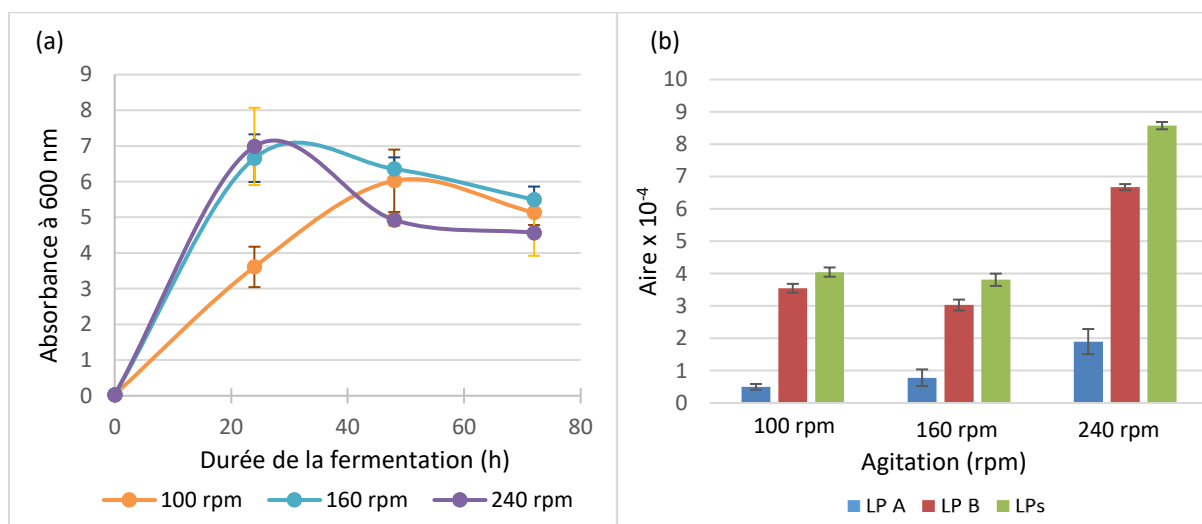


Fig. 34: Evaluation de la croissance des souches de *Pseudomonas sp. E313* (a) et de la production des lipopeptides A et B (b) à différentes vitesses d'agitation

A l'issu de ces résultats, nous avons fixé les conditions physico-chimiques des cultures des prochaines expériences à une température de 30 °C, un pH de 7 et une vitesse d'agitation de 240 rpm.

3.3. Optimisation de la composition du milieu de culture de *Pseudomonas sp. E313* pour la production des lipopeptides A et B

3.3.1. Utilisation du plan qualitatif D-optimale

L'optimisation du milieu de culture de *Pseudomonas sp. E313* a été conduite suivant un plan à 46 expériences, en testant l'influence des différents éléments du milieu figurant dans l'Annexe 1. Cinq facteurs qui sont composés de deux à trois modalités ont été étudiés ; X1 : source de carbone (glucose, glycérol, succinate de sodium), X2 : source d'azote (Acide

glutamique, chlorure d'ammonium), X3 : extrait de levure (absence ou présence), X4 : Minéraux ($MgCl_2$, $MnCl_2$, $ZnSO_4$), X5 : Acides aminés (valine, sérine, isoleucine). Les sources de carbones choisies représentent des sources simples et pas chers. Le glucose a été couramment utilisé pour la production des lipopeptides des bactéries du genre *Bacillus* ainsi que pour la production des rhamnolipides par des *Pseudomonas*, le glycérol a été également utilisé pour la production des glycolipides par des *Pseudomonas* et des lipopeptides par des *Bacillus* (Ndlovu et al., 2017) et le succinate de sodium qui a été utilisé pour la production des fengycines par des *Bacillus* (Kulimushi et al., 2017). L'acide glutamique et le chlorure d'ammonium ont été couramment utilisés comme source d'azote pour la production des lipopeptides par des *Bacillus*, ainsi le $MgCl_2$ et le $MnCl_2$ utilisés comme oligoéléments. Le $ZnSO_4$ a été également utilisé comme une source efficace d'oligoélément pour la production de biosurfactants par des *Pseudomonas aeruginosa* (Sahoo et al., 2011). L'effet de l'extrait de levure a été étudié comme il représente une source importante de vitamine, de facteur de croissance ainsi qu'une source supplémentaire d'azote organique. Les acides aminés utilisés dans ce plan représentent des acides aminés qui sont présents dans la structure des lipopeptides produits par les souches de *Pseudomonas sp. E313*. Deux réponses ont été ainsi suivies : la croissance bactérienne et leur production en lipopeptides à 48h. Les résultats ont été traités avec le logiciel MODDE. Ce logiciel a été utilisé pour l'analyse de la régression des données obtenues à partir de l'ensemble de 46 expériences afin d'estimer l'équation de régression. L'analyse de la variance (ANOVA) et des termes d'interaction ont été appliqués pour tester la signification de chaque terme dans l'équation. Le coefficient de corrélation R^2 représente la fraction de la variation de réponse expliquée par le modèle, tandis que Q^2 représente la fraction de la variation de réponse qui peut être prédite par le modèle.

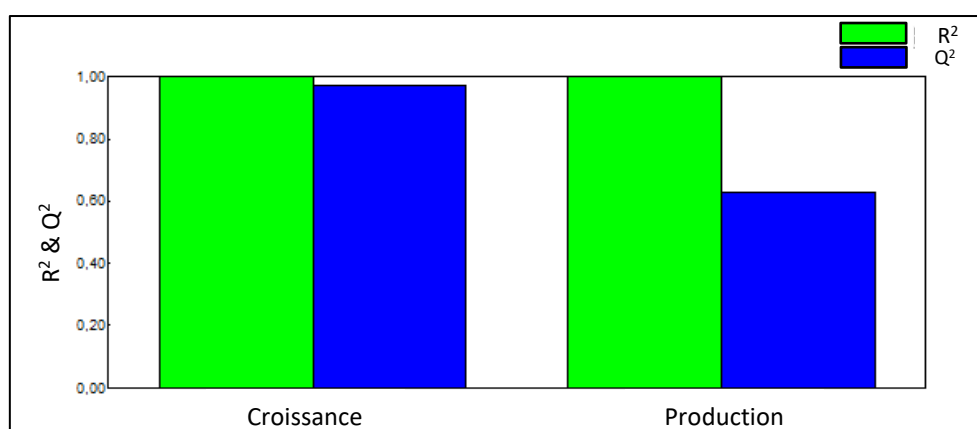


Fig. 35 : Histogrammes des coefficients de corrélation du modèle de chaque réponse du plan D-optimale 1

L'effet des différents facteurs sur la croissance bactérienne et la production des lipopeptides a été étudié. Les données retenues donnent un très bon modèle pour la réponse croissance avec des coefficients de régression linéaire R et Q proche de 1. Pour la production des biosurfactants d'E313, le coefficient R est proche de 1 et le coefficient Q est supérieur à 0,5 (figure 35).

Les deux figures 33 et 34 présentent l'influence des facteurs par ordre d'influence de leurs effets avec leurs tendances d'influence pour chacune des deux réponses, calculées par le logiciel MODDE.

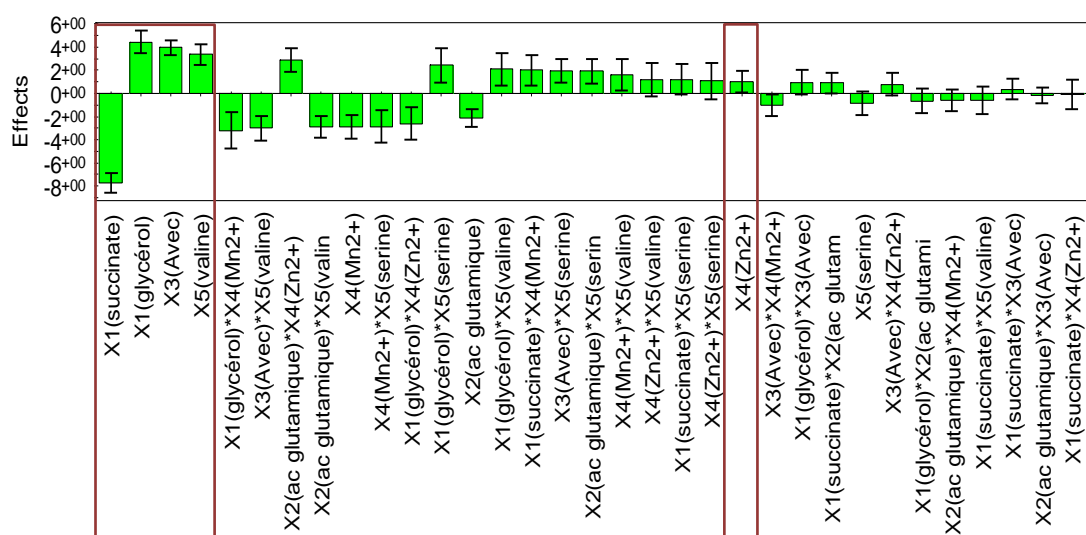


Fig. 36 : Influence des facteurs du plan D-optimale 1 et de leurs interactions sur la croissance de *Pseudomonas sp.* E313 présentée par ordre d'importance décroissant.

En tenant compte de l'influence des différents facteurs testés sur la croissance de *Pseudomonas sp.* E313 (figure 36), nous remarquons que le succinate est le facteur le plus influent cette réponse, avec un effet négatif. Par contre, nous remarquons que la croissance de cette souche est favorablement influencée par le glycérol comme source de carbone, la valine comme acide aminé, la présence de l'extrait de levure comme source de facteur de croissance et de vitamines et des facteurs de croissance et le Zn^{2+} comme principal oligo-élément. Ces éléments pourraient faire partie des premiers facteurs à considérer dans le milieu de culture.

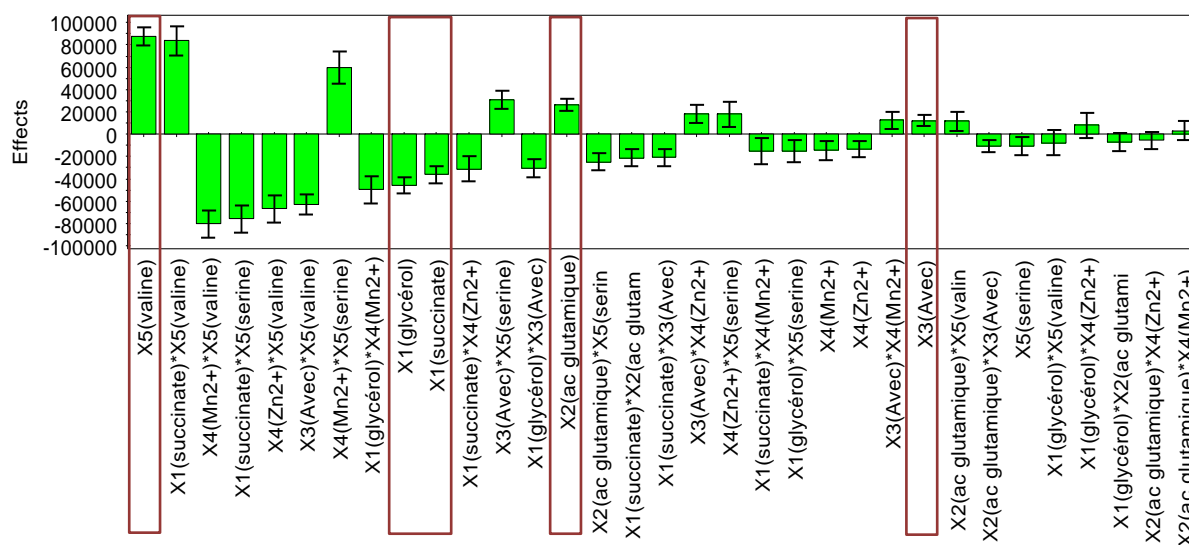


Fig. 37 : Influence des facteurs du plan D-optimale 1 et de leurs interactions sur la production de lipopeptides présentée par ordre d'importance décroissant.

L'analyse de l'influence des différents facteurs étudiés sur la production des lipopeptides de *Pseudomonas sp. E313* montre que la valine possède l'effet positif le plus influant sur cette réponse (figure 37). En analysant l'effet des différentes modalités des autres facteurs du plan d'expérience séparément, nous remarquons que le succinate de sodium et le glycérol ont un effet visiblement négatif sur la production des lipopeptides. En outre, il s'avère que l'acide glutamique (X2) et l'extrait de levure (X3) ont un effet importants en influençant favorablement la production de ces lipopeptides quoique leur niveau d'influence reste faible par rapport à celui mesuré avec la valine.

Etant donné que notre objectif était la formulation d'un milieu de culture favorisant la meilleure production des lipopeptides par *Pseudomonas sp. E313*, il est important d'étudier l'effet des interactions entre les différents facteurs du modèle envisagé sur la production des lipopeptides cherchés (figures 38). L'analyse de ces différentes interactions montre clairement que le glucose possède un effet considérablement favorable en interaction avec l'acide glutamique (X1 * X2), il est donc considéré comme la source de carbone optimale (figure 38a). En outre, il s'avère que le Mg^{2+} a également un effet favorable en interaction avec l'acide glutamique (X2 * X4) (figure 38b), en absence de l'extrait de levure (X3 * X4) (figure 38c) et en présence de la valine qui avait l'effet le plus favorablement influant sur la production (X4 *

X5) (figure 38d). Ces graphes montrent également que l'effet favorable de la valine augmente visiblement en absence de l'extrait de levure (X3 * X5) (figure 38e). La sérine possède également un effet favorablement non négligeable en interaction avec le glucose (X1 * X5) (figure 38f) qui a été fixé comme une source de carbone optimale. Ainsi, en tenant compte des effets de chaque facteur seul et de leurs interactions sur la croissance et la production des lipopeptides de *Pseudomonas* sp. E313, nous avons sélectionné les facteurs X1 : (glucose), X2 (L'acide glutamique), X3(Absence de l'extrait de levure), X4 (Mg²⁺) et X5 (valine et sérine).

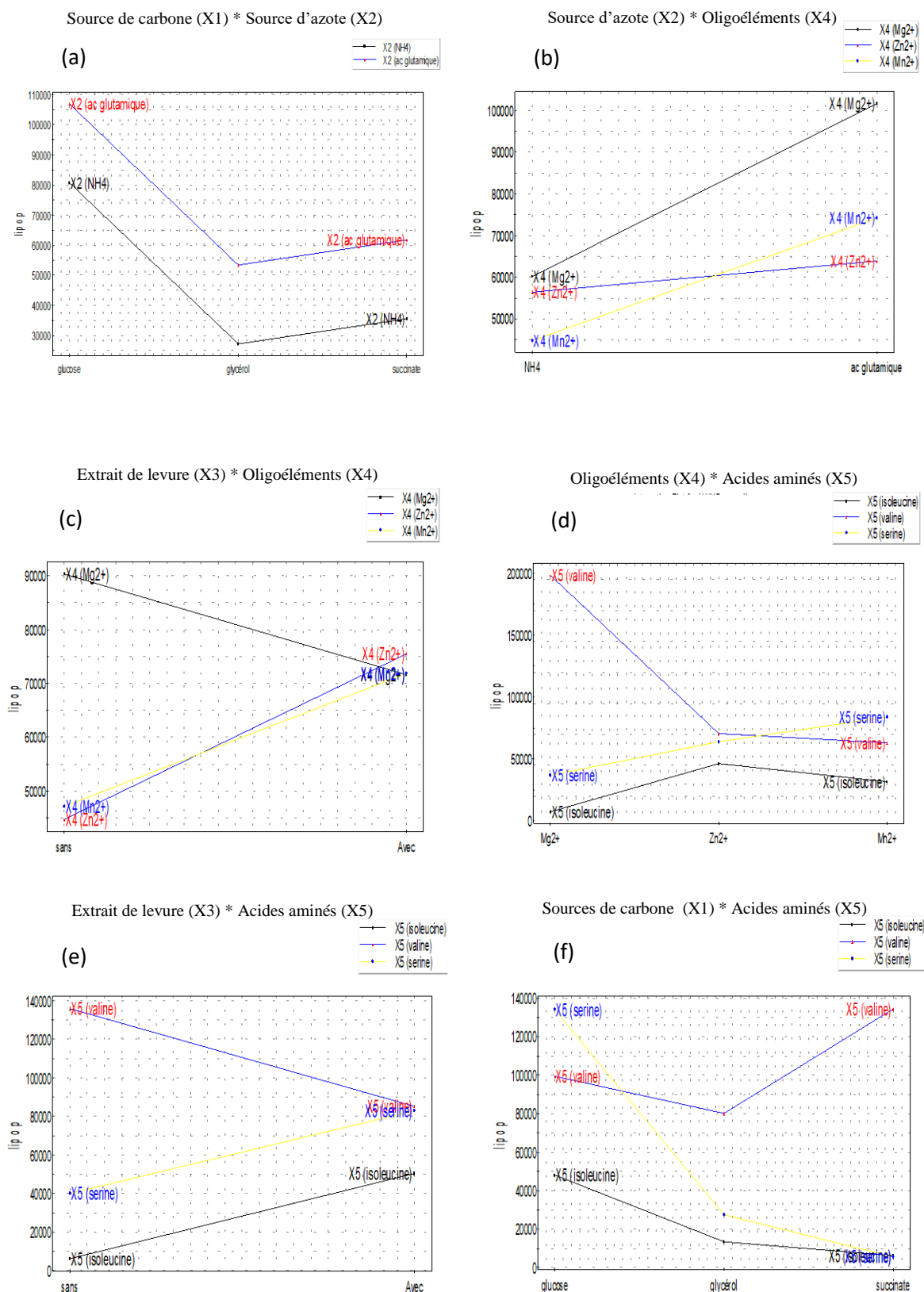


Fig. 38: Effet des interactions significatives des différents facteurs sur la production des lipopeptides selon le plan qualitatif 1

Afin d'étudier l'influence d'un plus grand nombre de paramètres sur la croissance bactérienne et la production des lipopeptides, un deuxième plan qualitatif D-optimal a été réalisé en conservant les éléments optimaux obtenus lors du premier plan qualitatif comme des composants du milieu de base qui s'ajoutent au milieu M9. Ce plan contenant 60 expériences, a été réalisé étudiant essentiellement 2 éléments : les oligoéléments et les acides aminés. Dans ce plan les oligoéléments testés sont décomposés en 2 facteurs du même type de construction : X1 (Co, Ca, Cu) et X2, (Mo, Fe, I). Les acides aminés testés sont décomposés à leur tour en 3 facteurs du même type de construction : X3 (Lys, Asp, Thr), X4 (Leu, Pro, His) et X5 (Phe, Try, Arg) (Annexe 2). Conformément au premier plan, l'effet des différents facteurs sur la croissance bactérienne et leur production des lipopeptides a été analysé par le logiciel MODDE. L'effet des différents facteurs sur la croissance est présenté par ordre d'importance dans le graphique (figure 39).

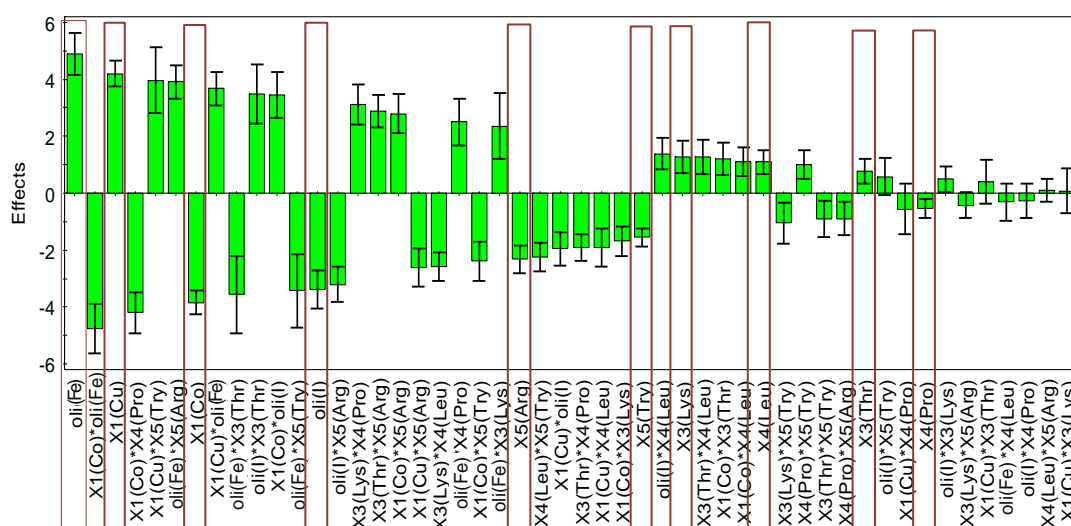


Fig. 39 : Influence des facteurs du plan D-optimale 2 et de leurs interactions sur la croissance de *Pseudomonas sp. E313* présentée par ordre d'importance décroissant.

Ces résultats montrent que les influences les plus visibles sur la croissance bactériennes sont celles des oligoéléments. Certains oligoéléments ont une influence très favorable sur la croissance (Fe, Cu), par contre d'autres ont une influence considérablement inhibitrice sur la croissance des souches (I, Co). Les acides aminés présentent un effet moins influant sur la croissance. En effet, la lysine, la leucine et la thréonine ont un effet légèrement favorable, tandis que l'arginine, la tryptophane et la proline avaient un effet faiblement inhibiteur.

Contrairement aux résultats observés sur la croissance de *Pseudomonas sp. E313*, les acides aminés semblent être les éléments les plus influents sur la production des lipopeptides (figure 40). Certains oligoéléments possèdent toutefois un effet non négligeable. Il est également à noter que les effets des deux facteurs (oligoéléments et acides aminés) étaient visiblement plus faibles en comparaison avec ceux observés lors de l'analyse du 1^{er} plan D-optimale. Par ailleurs, le tryptophane présente l'effet favorable le plus important sur la production des lipopeptides. De même, la leucine a une influence positive sur la production mais avec un effet légèrement plus faible. L'iode est le facteur le plus inhibiteur sur la production des lipopeptides de *Pseudomonas sp. E313*, comme dans le plan précédent, tandis que le fer, le cuivre et le calcium montrent des effets positifs avec des degrés plus faibles.

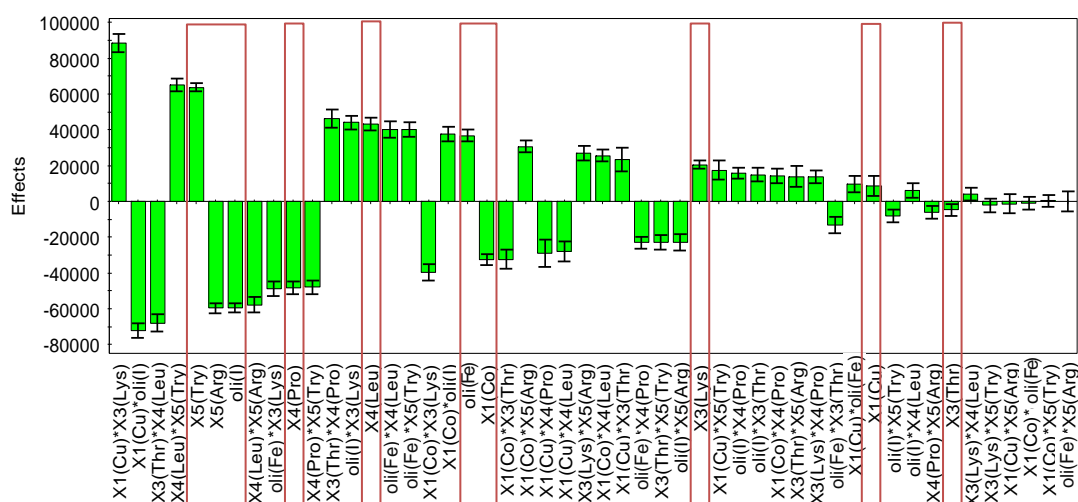


Fig. 40 : Ordre et tendance de l'influence des facteurs du plan D-optimale 2 sur la production des lipopeptides

L'étude des interactions entre les différents facteurs montre qu'il existe 2 interactions ayant un effet significatif (figure 41).

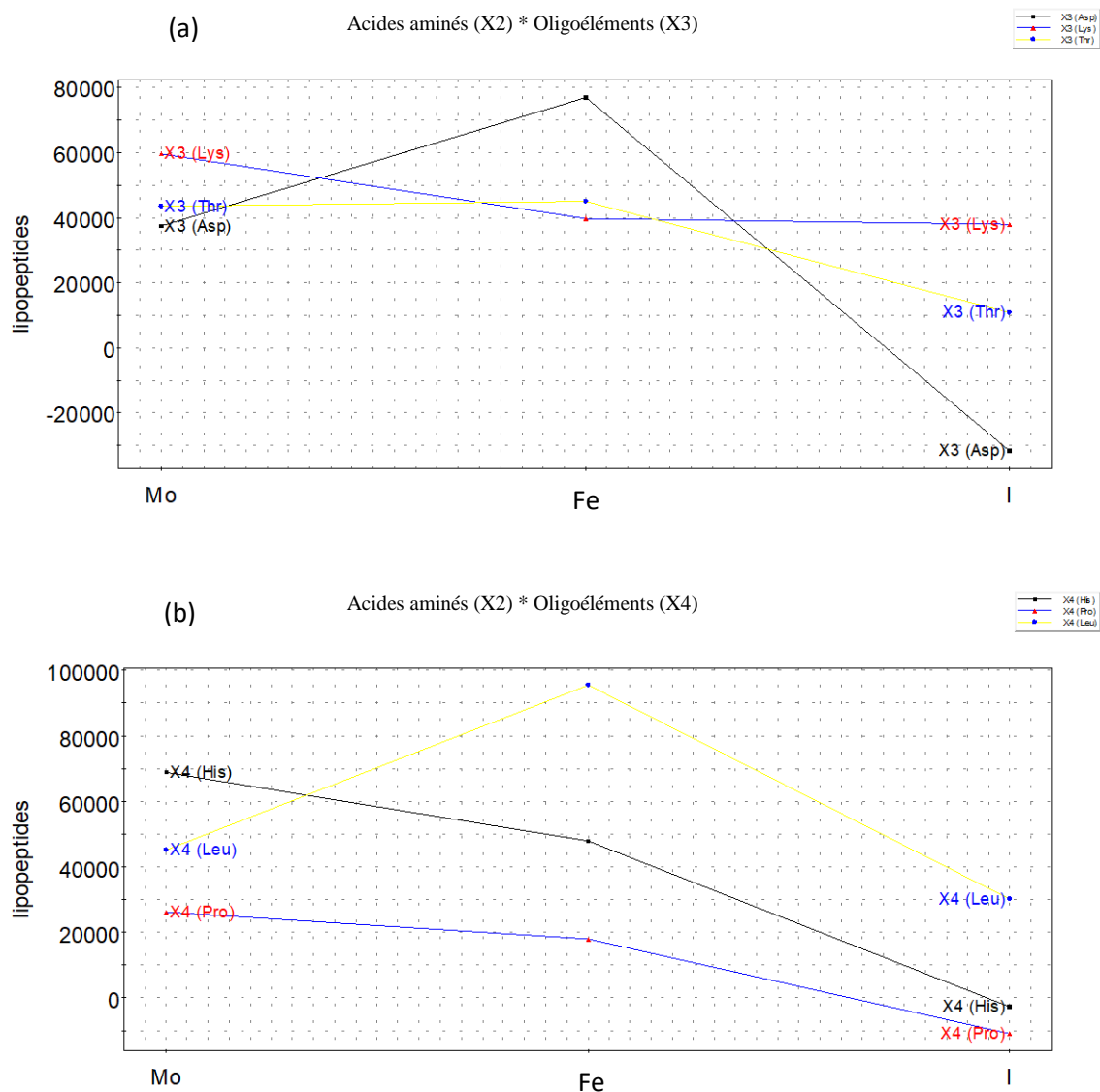


Fig. 41 : Effet des interactions significatives sur la production des lipopeptides entre les différents facteurs du plan D-optimale 2

Il en ressort de ces résultats que l'aspartine (figure 38a) et la leucine (figure 38b) possèdent un effet très favorable en présence du fer.

A partir des résultats des deux plans qualitatifs D-optimale réalisés, les facteurs optimaux ayant les effets positifs les plus importantes sur la production des lipopeptides de *Pseudomonas sp. E313* ont été retenus pour la réalisation d'une étude quantitative par un plan composite centré.

3.4. Optimisation de la composition du milieu de culture de *Pseudomonas sp. E313* en utilisant un Plan composite centré

Parmi les composants du milieu de culture précédemment étudiés dans les deux plans qualitatifs, 6 facteurs, ayant donné les meilleurs effets sur la croissance des souches de *Pseudomonas sp. E313* et la production des lipopeptides, ont été sélectionnés pour la réalisation d'un plan composite centré, afin d'optimiser leur concentration. Ainsi, seulement six facteurs ayant les effets favorables les plus importants sur la production des lipopeptides déduits à partir des 2 plans D-optimale précédemment réalisés ont été testés pour éviter de complexifier le plan d'expérience quantitatif. Dans ce cadre, le milieu M9 a été utilisé comme un milieu de base, et les 6 composants étudiés sont le glucose (X1), l'acide glutamique (X2), le Mg^{2+} (X3), la valine (X4), le Ca^{2+} (X5), et la sérine (X6) (Annexe 3). Afin de déterminer les conditions optimales des facteurs choisis, nous avons adopté un plan Composite centré. Les niveaux attribués aux facteurs sélectionnés sont présentés dans le tableau 26.

Tableau 26 : Domaine expérimental des facteurs sélectionnés (g/l)

Variable	Facteur	Niveau				
		-1	- α	0	+ α	+1
X1	Glucose	2,177	7	10,5	14	18,823
X2	A. glutamique	1,933	4	5,5	7	9,067
X3	Mg_2SO_4	0,1555	0,5	0,75	1	1,3445
X4	Valine	0,6488	1	1,2	1,6	2,5512
X5	$CaCl_2$	0	0,005	0,01	0,015	0,0218
X6	Sérine	0,6488	1	1,2	1,6	2,5512

Les conditions opératoires des 47 expériences du plan composite centré à 6 variables sont décrites par les lignes du plan d'expérimentation représentées dans le tableau 25. Pour chaque expérience nous avons déterminé l'absorbance à 600 nm (Y1) et la quantité du

biosurfactant produite (Y2). Les valeurs présentées correspondent à la moyenne des résultats de deux répétitions de deux expériences séparées.

Les résultats obtenus ont été analysés en utilisant le test statistique ANOVA. Ainsi, La p-value a été utilisée comme outil pour déterminer la signification de chaque coefficient, qui est, à son tour, nécessaire pour comprendre le modèle d'interaction mutuelle entre les variables du test. Plus les p-values sont petites, plus leur coefficient correspondant est significatif. Les facteurs ayant eu une p-value $>0,005$ sont considérés d'influence non significatifs. Pour chaque modèle, les coefficients R2 et Q2 qui représentent, respectivement, la variation des réponses expérimentales décrites et la variation des réponses prédites par le modèle ont été déterminés.

Pour le 1^{er} modèle qui étudie la croissance bactérienne (Y1), les valeurs de R2 et Q2 montrent une similarité élevée (0,978 et 0,809, respectivement) ce qui signifie que ce modèle a un bon ajustement aux données expérimentales. L'ensemble des facteurs dont la concentration a un effet significatif ainsi que leurs interactions significatives sont alors représentés dans le tableau 27. Selon l'étude des effets de chaque facteur et de leurs interactions, les éléments dont la concentration influe le plus sensiblement sur la croissance bactérienne sont l'acide glutamique et le Mg^{2+} (P-value = 6,07E-09 et 8,42E-05, respectivement), tandis que la variation de la concentration du Ca^{2+} n'a pas eu un effet significatif sur la croissance (P-value= 0,591011).

Tableau 27 : Effet de facteurs ayant des effets significatifs et de leurs interactions significatives sur la croissance des souches de *Pseudomonas sp. E313*

Y1*	Coeff. SC*	Std. Err. *	P-value
Constante	3,32667	0,191493	2,23 x 10 ⁻¹⁰
X1	0,257438	0,0532898	3,28 x 10 ⁻⁴
X2	-0,363752	0,0647918	8,42 x 10 ⁻⁵
X3	-0,839295	0,0631415	6,07 x 10 ⁻⁹
X4	-0,248126	0,0647918	2,08 x 10 ⁻³
X6	0,270586	0,0543604	2,53 x 10 ⁻⁴
X2 * X2	-0,902985	0,137176	1,76 x 10 ⁻⁵
X1 * X4	-0,256955	0,0631415	1,33 x 10 ⁻³
X3 *X4	0,214295	0,0631415	4,8 x 10 ⁻³
X3*X5	0,261331	0,0631415	1,16 x 10 ⁻³

*Y1 : croissance, Coeff.Sc : coefficients stœchiométriques des facteurs, Std.Err : erreur standard

Le modèle mathématique validé de la réponse s'écrit comme suit:

$$Y_1 = 3,32667 + 0,257438X_1 - 0,363752X_2 - 0,839295X_3 - 0,248126X_4 + 0,270586X_6 - 0,902985X_2^2 - 0,256955X_1X_4 + 0,214295X_3X_4 + 0,261331X_3X_5 + 0,146955X_3X_6.$$

Y1 désigne l'absorbance à 600 nm de la culture de *Pseudomonas sp. E313* et X1, X2, X3, X4, X5 et X6 sont, respectivement, les valeurs codées de glucose, de l'acide glutamique, du Mg²⁺, de la valine, et de la Sérine. Les combinaisons de facteurs (comme X1X2) représentent une interaction entre les facteurs individuels.

Afin de bien comprendre et définir l'effet des variables étudiées sur la croissance de la souche de *Pseudomonas sp. E313*, le modèle prédit est présenté en surfaces de réponses (figure 42). Les surfaces de réponses bidimensionnelles sont tracées pour étudier l'interaction entre les facteurs du milieu et pour déterminer leur concentration optimale de ces composés. Par ailleurs, l'analyse des effets des différents facteurs et de leurs interactions montre qu'une croissance optimale est prédite en maintenant la concentration du glucose et du Ca²⁺ à leurs niveaux +1, la concentration de valine et de Mg²⁺ à leurs niveau -1 et la concentration d'acide glutamique à son niveau 0.

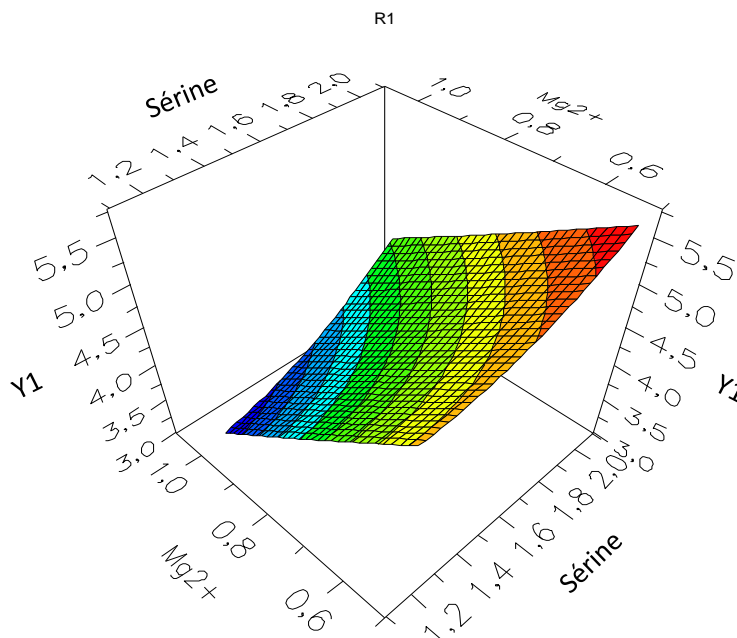


Fig. 42 : La courbe de surface de réponse de la croissance bactérienne en fonction des effets des facteurs X2 et X6

Pour le 2^{ème} modèle étudié dans lequel on s'est intéressé à la production des lipopeptides (Y2), les valeurs de R² et Q² montrent un bon ajustement du modèle aux données expérimentales (0,975 et 0,975, respectivement), avec un niveau de confiance de 95% ce qui signifie que ce modèle est bon. Les coefficients des différents facteurs et leurs interactions sont ainsi représentés dans le tableau 28. L'analyse des effets de la concentration de chaque facteur et leurs interactions montre que les 2 éléments les plus significatifs sont l'acide glutamique (X2) et le Mg²⁺ (X3) avec des P-values de 1,17x10⁻⁶ et 1,10x10⁻⁶ respectivement, ainsi que l'effet de l'interaction entre le Mg²⁺ et la valine (X3 * X4) ayant une P-value de 7,86x10⁻⁵.

Tableau 28 : Effet des facteurs et de leurs interactions sur la production des lipopeptides par la souche *Pseudomonas sp. E313*

Y2*	Coeff. SC*	Std. Err. *	P-value
Constante	1,07x10 ⁶	139322	9,59x10 ⁻⁶
X2	-384607	40265,3	1,17x10 ⁻⁶
X3	387011	40265,3	1,10x10 ⁻⁶
X2*X2	-210334	41895,9	3,9x10 ⁻⁴
X3*X3	322782	41895,9	9,33x10 ⁻⁶
X1*X5	-159688	41934,5	2,9x10 ⁻³
X1*X6	156969	39391,3	2,14x10 ⁻³
X2*X6	203338	41212,7	4,47x10 ⁻⁴
X3*X4	-245666	40347,7	7,86x10 ⁻⁵
X5*X6	-174736	41934,5	1,57x10 ⁻³

*Y2 : production des lipopeptides, Coeff.Sc : coefficients stœchiométriques des facteurs, Std.Err : erreur standard

Le modèle mathématique de la réponse Y2 exprimant la quantité des lipopeptides produits à partir des facteurs à optimiser s'exprime comme suit:

$$Y2 = 1,07 \times 10^6 - 384607X_2 + 387011X_3 - 210334X_2^2 + 322782X_3^2 - 159688X_1X_5 + 156969X_1X_6 + 203338X_2X_6 - 245666X_3X_4 - 174736X_5X_6.$$

Les surfaces de réponse de l'influence des concentrations des différents facteurs et leurs interactions sont présentées dans la figure 43. L'analyse de ces résultats montre que la meilleure production des lipopeptides (Y2) est obtenue en maintenant une concentration du glucose et de valine à leurs niveaux 0, une concentration de sérine à son niveau +1, une concentration de Mg²⁺ à son niveau +α et des concentrations de Ca²⁺ et d'acide glutamique à leurs niveaux -1.

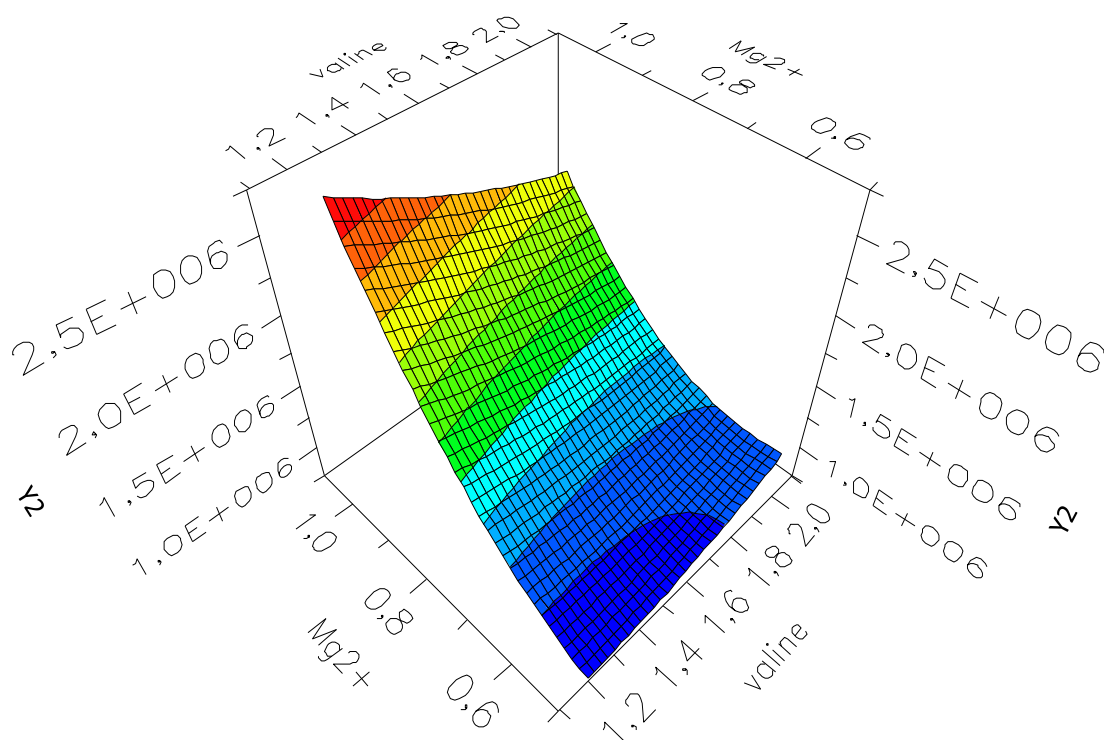


Fig. 43 : Courbe de surfaces de réponses de la production des lipopeptides en fonction des facteurs prépondérants

3.5. Production des lipopeptides A et B de *Pseudomonas sp. E313* à l'échelle

fermenteur

Afin de valider l'amélioration des conditions de culture et de production des lipopeptides, deux fermentations batch en bioréacteur ont été réalisées avec la souche de *Pseudomonas sp. E313* en utilisant le milieu minimal M9 d'une part (BR1), et le milieu M9 optimisé d'autre part (BR2). Le milieu optimisé utilisé est celui déterminé par le 2^{ème} modèle du plan composite centré qui visait à l'amélioration de la production des lipopeptides. Il est composé de: milieu minimal M9 supplémenté en glucose (10,5 g.L⁻¹), en sérine (2,55 g.L⁻¹), en valine (1,2 g.L⁻¹), en MgSO₄ (1 g.L⁻¹) et en acide glutamique (1,9 g.L⁻¹). Les deux fermentations ont été réalisées à une température de 30 °C, en un pH de 7 et en une agitation de 160 rpm qui a été réduite par rapport à l'agitation optimale afin de limiter la formation de mousse. La croissance bactérienne et la production des lipopeptides ont été suivies pour une durée de 68 h. Les quantités de lipopeptides produits ont été exprimées en concentration de surfactine équivalente à partir d'un étalon de surfactine produit au laboratoire. La surfactine est heptalipopeptide, qui ne porte pas d'acides aminés aromatiques et constitue en l'absence de lipopeptides A et B un bon représentant pour mesurer les concentrations des lipopeptides produits.

Les résultats montrent que dans le bioréacteur BR1 la phase de croissance a duré 18 h. La croissance maximale (de 0,47 g.MS.L⁻¹) a été atteinte après 21 h de culture (tableau 29). Au-delà la culture montre une phase stationnaire (figure 44). La production des lipopeptides se produit à la fin de la phase de croissance, entre la 21^{ème} heure et la 24^{ème} heure de culture et atteint une concentration de 21 mg.L⁻¹ d'équivalent surfactine. Au cours de cette période la consommation de glucose ralentit.

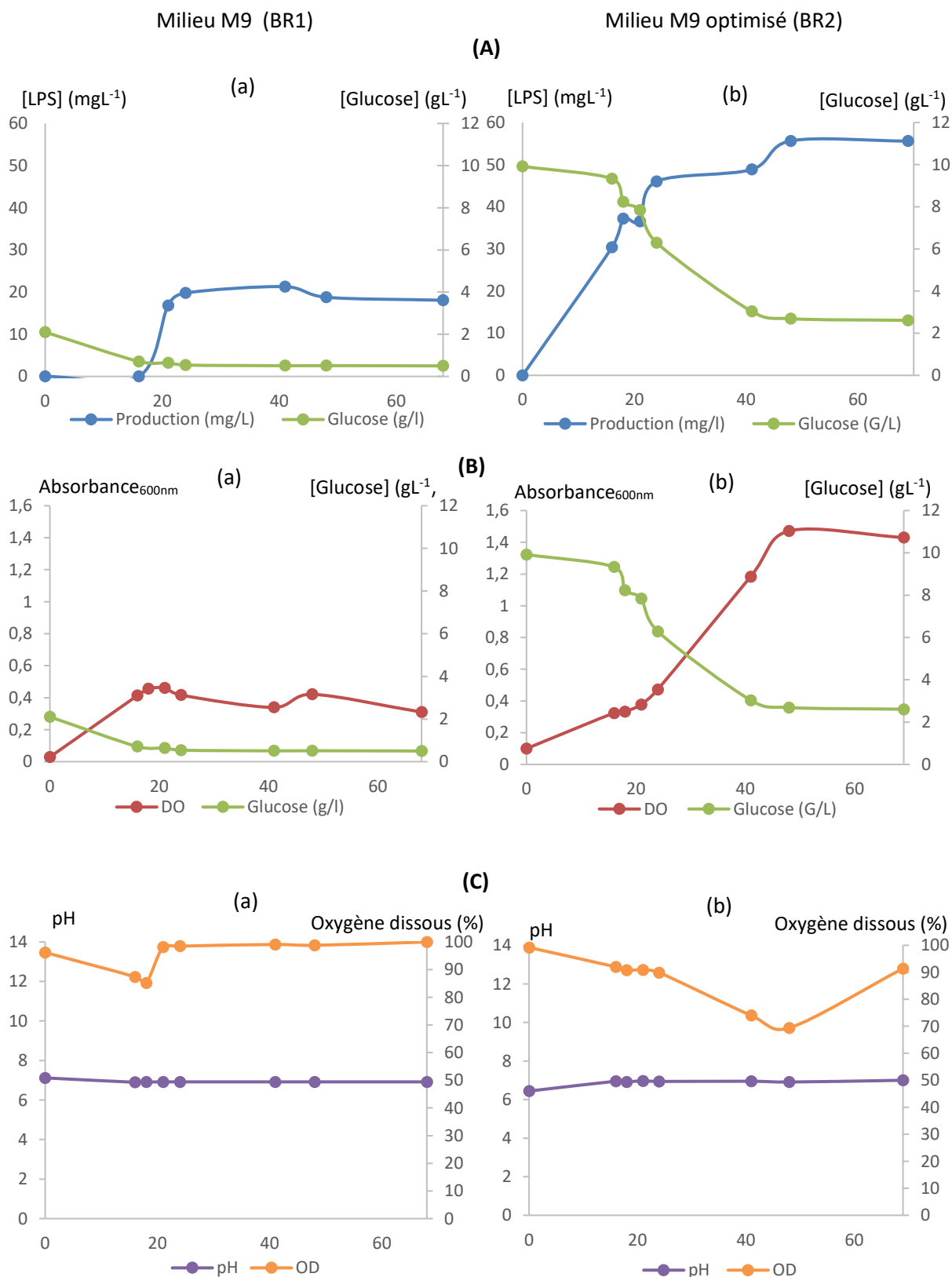


Fig. 44 : Cinétiques de croissance, de production des Lipopeptides A et B, des concentrations de glucose et d’oxygène dissous et évolution du pH lors des fermentations batch de la souche de *Pseudomonas sp. E313* en milieu M9 (BR1) (a) et en milieu M9 optimisé (BR2) (b)

Au niveau du bioréacteur BR2, la phase de croissance se prolonge jusqu'à la 48^{ème} heure de la culture, où la concentration de biomasse atteint 1,42 gMS.L⁻¹. Durant la croissance, la consommation du glucose est d'abord lente avec une vitesse de 0,036 g.L⁻¹.h⁻¹ jusqu'à 16h de culture et accélère ensuite pour atteindre une vitesse de 0,24 g.L⁻¹.h⁻¹ entre la 16^{ème} heure et la 41^{ère} heure de culture (figure 44). La production des lipopeptides a lieu tout au long de la phase de croissance. Elle est rapide au cours des 24 premières heures de culture, puis ralentit dans la seconde partie de la phase de croissance exponentielle avec une consommation rapide de glucose mais qui se ralentit lors de la 2^{ème} phase de croissance. En outre, comme le montre le tableau 29, les taux de conversion de substrats en biomasse ($Y_{x/s}$) est de 0,25 g/g pour le bioréacteur (BR1) tandis qu'il est de 0,17 g/g pour le bioréacteur (BR2). Le taux de conversion du substrat en produit $Y_{p/x}$ est pratiquement le même pour les deux fermentations (0,013 g/g et 0,01 g/g, respectivement pour BR1 et BR2). La vitesse de conversion de biomasse en produit était environ 2 fois plus élevée dans le fermenteur (BR2) ($Y_{p/x} = 0,059$ g/g) que dans BR1 (0,054 g/g). D'un autre côté, nous notons que nous avons remarqué la formation de mousse à partir de 16 h de culture dans le fermenteur (BR2) ce qui correspond bien à la phase pendant laquelle la production des lipopeptides ait commencé. Par contre, dans le bioréacteur (BR1), la mousse s'est été formée plus tard (vers la 24^{ème} heure de culture), quelques heures après le début de la production des lipopeptides. La production maximale des lipopeptides est de l'ordre de 21,29 mg/L dans le fermenteur BR1 et de 55,64 mg/L dans le fermenteur BR2 ce qui signifie que la production a été améliorée d'un facteur de 2,61 avec le milieu M9 optimisé. De même, la croissance bactérienne a été améliorée d'un facteur de 3,1 en milieu M9 optimisé (quantité de biomasse de 0,471 g/l/h dans le fermenteur BR1 et de 1,464 g/l/h dans le fermenteur BR2).

Tableau 29 : Bilan de culture de la souche de *Pseudomonas sp. E313* en milieu M9 et milieu M9 optimisé en fermenteur

Paramètre	BR1	BR2
Biomasse maximale (gMS.L⁻¹)	0,471	1,464
Production maximale (mgL⁻¹ équivalent surfactine)	21,3	55,6
Y_x/glucose (g MS/g)	0,25	0,17
Y_p/glucose (g/g)	0,013	0,01
Y_p/x (g/g MS)	0,054	0,059

Discussion

Dans ce chapitre, on s'est intéressé à l'optimisation des conditions de cultures de la souche *Pseudomonas sp.E313* en milieu liquide et de la composition du milieu en nutriments et en oligoéléments moyennant la méthodologie des plans d'expériences. Nous avons commencé notre étude par l'optimisation de ces trois paramètres (température, pH et agitation). Nous avons montré que la température a une grande influence sur la production des lipopeptides. En effet, Le maximum de production a été observé à 30°C qui était comparable à celui obtenu à 22°C, mais qui était au moins 4,5 fois plus élevé que celui obtenu à 37°C. Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'à cette température la croissance bactérienne a été très faible (10 fois inférieure) par rapport à celle déterminée à 30°C. Des études similaires ont montré que la croissance de *Pseudomonas putida* est optimale à une température de 30 °C (Fonseca et al., 2011; Md. Sakil Munna, 2015) et elle décline à des températures supérieures à 33 °C (Sakil Munna, 2015). En outre, cette température était aussi optimale pour la production des biosurfactants par des *Pseudomonas aeruginosa OCD1* et *Pseudomonas aeruginosa F231* (Patil et al., 2014; Sahoo et al., 2011). L'optimisation du pH du milieu de culture a montré que la production des lipopeptides était optimale à pH neutre (pH 6,5 -7), tandis que la croissance bactérienne a été faiblement influencée par la variation du pH entre 6 et 8. Ceci pourrait

s'expliquer par l'influence de la biosynthèse des lipopeptides par certaines conditions extracellulaires comme le pH, qui peut influencer sur le niveau d'expression des gènes de biosynthèse des lipopeptides comme il a été démontré chez les surfactines (Cosby et al., 1998). Ainsi, le pH neutre était optimal pour la production des biosurfactants lipopeptidiques de *Pseudomonas* (Nalini et Parthasathi, 2013) ainsi que pour la production de la surfactine par *Bacillus subtilis* (Abdel-Mawgoud et al., 2008). L'aération du milieu était aussi un facteur important à étudier car il peut impacter sur l'activité respiratoire des cellules bactériennes. L'aération du milieu dépend du volume du milieu de culture dans les fioles erlenmeyer et de la vitesse d'agitation mécanique. La production des lipopeptides de *Pseudomonas sp. E313* et notamment celle du lipopeptide B est favorisée par une forte vitesse d'agitation (240 rpm). Les niveaux de croissance bactérienne a été comparable pour les 3 vitesses d'agitation testées après 48h de culture, cependant à une agitation de 100 rpm, la phase de croissance est ralentie, ce qui peut s'expliquer par une limitation de la vitesse de transfert d'oxygène dans le milieu de culture. Des études similaires ont montré que le transfert d'oxygène dans le milieu de culture joue un rôle primordial dans la production des lipopeptides (Coutte et al., 2010; Guez et al., 2008; Jacques et al., 1999). De même, Elarbi et al., (2016) ont montré que la production des surfactines par *Bacillus pumilus I2* corrèle positivement avec l'apport d'oxygène.

Les conditions de la production des lipopeptides ainsi optimisées ont été utilisées pour l'optimisation de la composition d'un milieu de culture pour l'amélioration de la production des lipopeptides. La valine avait un effet très favorable sur la production des lipopeptides et que cet effet est amélioré par l'ajout du magnésium en absence d'extrait de levure. Cependant en interaction avec le glucose qui a été conservé comme source de carbone pour la production des lipopeptides, la sérine avait également un effet positif significatif sur la production des lipopeptides. L'acide glutamique avait également un effet favorable sur la production des lipopeptides et notamment en interaction avec le magnésium. L'efficacité de l'acide glutamique dans l'amélioration de la production des lipopeptides a été également mise en évidence pour la production des surfactines par des souches de *Bacillus subtilis* (Motta Dos Santos et al., 2016) et pour la production des lichenysine-A par *Bacillus licheniformis BAS50* (Yakimov et al., 1996). Le magnésium intervient dans la voie de biosynthèse des lipopeptides comme un cofacteur d'enzymes comme la phosphopantetheinyl transférase qui intervient à la biosynthèse des surfactines et dont l'activité dépend strictement du magnésium (Stuible et al., 1997; Walsh et al., 1997). Son effet considérablement favorable sur la production des lipopeptides de *Pseudomonas sp. E313* peut être alors due aux mêmes raisons. L'analyse des effets des sources

de carbone a montré que le succinate de sodium a un effet favorable sur la production des lipopeptides mais très défavorable sur la croissance bactérienne et inversement pour le glycérol, tandis que le glucose avait un effet moins visible mais favorable à la production et la croissance bactérienne. L'effet favorable du glucose sur la production est accentué en interaction avec l'acide glutamique et en absence d'extrait de levure. Similairement, l'effet positif de l'utilisation du glucose comme source de carbone a été également mis en évidence pour l'amélioration de la production des surfactines (Ghribi et Ellouze-Chaabouni, 2011). Les résultats obtenus par l'analyse du 1^{er} plan d'expériences ont permis de fixer le glucose, la valine, la sérine, l'acide glutamique et le magnésium en privilégiant les composants un effet favorable direct et en interaction sur la production des lipopeptides de *Pseudomonas sp. E313* et ils ont été, par conséquent, introduits dans la composition du milieu de base utilisé lors de la réalisation du 2^{ème} plan qualitatif D-optimale. Ce 2^{ème} plan visait à l'étude de l'effet d'un amendement en acides aminés et en oligoéléments sur la croissance bactérienne et la production des lipopeptides. Les résultats ont montré que le tryptophane possèdent un effet très favorable pour la production des lipopeptides mais qui était tout de même défavorable pour la croissance des souches. La leucine avait un effet favorable pour la croissance et la production mais qui était moins significatif en comparaison à celui du tryptophane. Récemment, des études d'optimisation de la production des lipopeptides ont mis en évidence le rôle important des acides aminés dans l'amélioration de leur production qui est probablement dû à leurs assimilation plus facile par rapport au catabolisme de sources d'azote plus complexes (Liu et al., 2012). La leucine représente l'acide aminé qui est majoritairement présent dans la chaîne peptidique des deux lipopeptides de *Pseudomonas sp. E313*, ce qui explique probablement son effet positif sur l'amélioration de leur production. Des études similaires, ont montré que la leucine, qui représente l'acide aminé principal du fragment peptidique de la surfactine, peut avoir un impact direct sur le rendement de production (Coutte et al., 2015). Concernant l'effet des oligoéléments, l'influence de l'iode a été fortement inhibitrice sur la production, tandis que, le fer avait un effet très favorable, en plus du cuivre et du calcium mais à un degré plus faible. Ces oligoéléments sont également impliqués comme des cofacteurs dans la voie de biosynthèse des lipopeptides. L'effet du Fer a été mis en évidence pour l'amélioration de la production des surfactines par *Bacillus subtilis* MZ-7 à 300 mg/l (Al-Ajlani et al., 2007). Une augmentation de la production des biosurfactants par *Bacillus subtilis* MTCC 2423 de 0,342 à 1,230 g /l a été également obtenue lorsque le milieu de culture a été complété simultanément par les concentrations optimales de magnésium, de fer et de calcium (Makkar et Cameotra, 2002). Le

plan de surface de réponse composite centré réalisé par la suite sur des fioles d'Erlenmeyer à 48h de culture a permis de définir un milieu M9 optimisé contenant du glucose à 10,5 g.L⁻¹, l'acide glutamique à 5,5 g.L⁻¹, le MgSO₄ à 1,93 g.L⁻¹, la valine à 1,93 g.L⁻¹ et la sérine à 2,55 g.L⁻¹. Ce milieu a été ensuite testé en bioréacteur. Les résultats montrent une phase de croissance prolongée (48 h) au cours de laquelle, la consommation du glucose est plus lente au départ pour s'accélérer par la suite. La vitesse de croissance déterminée au cours de la phase de croissance dans le milieu M9 optimisé est plus importante que celle déterminée avec la souche cultivée sur le milieu M9. La consommation de l'oxygène dissous dans le milieu se poursuit, en milieu M9 optimisé, jusqu'à la fin de la phase de croissance exponentielle, tandis que cette dernière s'arrête beaucoup plus tôt lors de la fermentation réalisée avec le milieu M9, pourtant le glucose n'est pas encore épuisé. L'arrêt de la consommation du glucose par les cellules bactériennes pourrait s'expliquer par le fait que celles-ci utilisent des voies catalytiques faisant impliquer des cofacteurs qui sont très tôt épuisés dans le milieu M9, mais qui sont présents à des quantités suffisantes dans le milieu optimisé ce qui permet la continuité du processus de fermentation de glucose comme le magnésium qui est présent à une concentration beaucoup plus importante dans le milieu optimisé. La production des lipopeptides avait commencé un peu plus tôt et atteint un niveau de production visiblement plus élevé en milieu optimisé par comparaison au milieu M9. Ceci peut mettre en évidence la présence de composants dans le milieu optimisé qui sont impliqués dans la voie de biosynthèse de ces molécules ce qui peut engendrer une production plus rapide et élevée. En terme quantitatif, la croissance bactérienne beaucoup plus élevée lors de la fermentation réalisée avec le milieu optimisé par comparaison à celle obtenue avec le milieu M9 (0,34 g/h et 0,024 g/h, respectivement) ainsi qu'une croissance maximale qui est 3 fois plus élevée dans le fermenteur contenant le milieu optimisé. Evidemment le niveau de production des lipopeptides a été considérablement plus élevé dans la fermentation avec le milieu optimisé (21,29 mg/L pour BR1 et 55,64 mg/L pour BR2) ainsi que le taux de conversion de biomasse en produit qui est 2 fois plus élevé dans le fermenteur contenant le milieu optimisé. Toutefois les niveaux de croissance bactérienne et de production des lipopeptides A et B restent plus faible en bioréacteurs comparant à celles obtenues en fioles d'Erlenmeyer. Ceci pourrait être expliqué par la formation importante de la mousse en bioréacteur qui est probablement due des concentrations relativement élevées d'oxygène dissous dans le milieu de culture ce qui peut présenter une des condition de stresse pour les souches de *Pseudomonas sp. E313* ce qui peut être à l'origine de la fixation des cellules

bactériennes dans les parois de la cuve du bioréacteur observée au cours des 2 fermentations réalisées.

Ces résultats permettent donc de mettre en évidence l'efficacité des modèles d'optimisation de la production des lipopeptides élaborées, cependant le passage de la production de l'échelle erlenmeyer à l'échelle fermenteur reste à étudier pour la maîtrise de la production de ces molécules à différentes échelles et notamment en optimisant la concentration de l'oxygène dissous dans le milieu de culture.

Conclusion & Perspectives

Les lipopeptides sont des molécules produites par une grande variété de bactéries appartenant au genre *Bacillus*, *Pseudomonas*... Ils sont composés d'un acide gras lié à un oligopeptide et possèdent une grande variété de structures et d'activités fonctionnelles et biologiques. En effet, plusieurs lipopeptides représentent de puissants biosurfactants susceptibles de remplacer certains surfactants chimiques notamment dans les activités de bioremédiation. Le groupe taxonomique des *Pseudomonas* est intéressant à explorer car il possède un potentiel important de synthèse de lipopeptides encore peu exploité. Le présent travail consiste à sélectionner des bactéries du genre *Pseudomonas* isolées à partir d'un sol d'ateliers de mécanique tunisiens souillés par des hydrocarbures afin d'en rechercher des molécules bioactives ayant des propriétés biosurfactante et émulsifiante. Un criblage des molécules produites sur milieu riche a été fait en utilisant des tests caractéristiques à la détection des activités biosurfactantes, comme la mesure de la tension de surface, l'étalement d'huile et de l'effondrement d'huile ainsi que la mesure de l'activité émulsifiante. Ces tests ont permis de mettre en évidence la présence de 5 souches de *Pseudomonas* productrices de biosurfactants parmi 11 souches, dont 3 souches désignées par E39, E311 et E313 avaient des activités biosurfactantes et émulsifiantes particulièrement marquées et très intéressantes. L'identification moléculaire par le séquençage de l'ARNr 16S a montré que ces 3 souches sont phylogénétiquement très proches et forment un sous-groupe qui appartient au groupe des *Pseudomonas putida*, et ayant une grande similarité avec les souches de *Pseudomonas alkylphenolia* KL28. Les tests de stabilité des biosurfactants produits par ces 3 souches vis-à-vis des conditions environnementales qui ont été effectués par la mesure de leurs activités biosurfactante et émulsifiante résiduelles a montré que ces molécules possèdent une bonne stabilité vis-à-vis des conditions extrêmes de pH, de température et de salinité. Ceci suggère l'applicabilité de ces biosurfactants dans plusieurs domaines et notamment en bioremédiation. Des tests de dégradation de diesel sur sable ont été réalisés et suivis pour une durée de 1 mois. Les résultats ont montré l'efficacité des 3 souches productrices des biosurfactants dans la dégradation du diesel sur sable avec des taux d'élimination considérables.

Pour l'identification, la quantification, et la mise en oeuvre des activités potentielles des biosurfactants produits, des essais de purification de ces molécules ont été réalisés par précipitation acide, extraction en phase solide C18 et ultrafiltration à 5 et 10 kDa. Une identification préliminaire de la nature chimique des biosurfactants en chromatographie sur couche mince a été d'abord réalisée. Une réaction positive avec la ninhydrine a été révélée pour les biosurfactants produits par les 3 souches, indiquant ainsi que ces molécules sont de nature

lipopeptidique. La caractérisation des biosurfactants par spectrométrie de masse de type MALDI-ToF a montré que les 3 souches possèdent des profils de masses très similaires et a mis en évidence la production de deux lipopeptides attribués à l'intervalle de masses de la famille des syringafactines, une famille de lipopeptides incluant 6 isoformes de syringafactines (A – F) et 2 isoformes de cichofactines (A et B) qui sont des octalipopeptides produits par des souches de *Pseudomonas syringae* et de *Pseudomonas cichorii* respectivement. Ces lipopeptides sont connus pour leurs propriétés tensioactives et pour leur capacité à favoriser la croissance des cellules qui les produisent dans des environnements naturels. La purification développée en utilisant des techniques de séparation par chromatographie en LCMS et en RP-HPLC des 2 molécules produites par la souche de *Pseudomonas sp. E313a* permis de séparer des lipopeptides des composants du surnageant de culture. Cette purification servira à la quantification des lipopeptides par le dosage des liaisons peptidiques en RP-HPLC, et pour l'identification biochimique de leurs structures par une fragmentation en ESI-MS/MS. La purification des lipopeptides par des processus d'ultrafiltration et de diafiltration visant à l'obtention de ces molécules pures à des quantités suffisantes pour leurs utilisation à une plus grande échelle et notamment la mise en évidence de leurs activités biologiques éventuelles. Les analyses des échantillons qui y sont issus par spectrométrie de masse MALDI-ToF a permis l'obtention de ces molécules pures dans le filtrat issu de la purification à travers une membrane de taille de seuil de coupure de 10 kDa. La caractérisation structurale de la chaîne peptidique de ces 2 lipopeptides a été réalisée en utilisant une approche combinée reliant la spectrométrie de masse et la bioinformatique, la spectrométrie fournissant des informations liée à la masse de la molécule et au clivage des acides aminés de la chaîne peptidique, et la bioinformatique qui fournissant des prédictions des monomères d'acides aminés de la chaîne peptidique en analysant le gène de biosynthèse de ces molécules identifiés au niveau du génome bactérien séquencé par des outils bioinformatiques de prédiction se basant essentiellement sur le code de Stachellaus et de Minowa. L'association de données issues de ces 2 analyses a permis d'identifier deux variants de la famille des syringafactines nommées lipopeptide A et lipopeptide B.

L'optimisation de la composition du milieu de culture pour la production des lipopeptides de la souche de *Pseudomonas sp. E313* a été réalisée moyennant la méthodologie des plans d'expériences en testant des modèles qualitatifs et quantitatifs pour la détermination d'une composition optimale en source de carbone, d'azote, d'acides aminés et oligoéléments. Ainsi, la meilleure production des lipopeptides produits a été définie en complétant le milieu

de base M9 avec du glucose (10,5 g.L⁻¹), l'acide glutamique (5,5 g.L⁻¹), le MgSO₄ (1,93 g.L⁻¹), la valine (1,2 g.L⁻¹) et la sérine (2,55 g.L⁻¹). Les conditions de production ainsi définies ont été exploitées pour la mise en œuvre d'une production en bioréacteur en batch. Ceci a permis de mettre en évidence un niveau de production amélioré d'un facteur de 2,6 en milieu optimisé.

En perspective, nous envisageons :

- Des essais de production des biosurfactants des différentes souches de *Pseudomonas* en batch alimenté et continu afin de déterminer le procédé de fermentation le plus adéquat à cette production ;
- l'application des biosurfactants produits par les différentes souches de *Pseudomonas* isolées dans la bioremédiation des sols contaminés par différents types d'hydrocarbures ;
- Construction d'une souche mutante avec la délétion du gène de biosynthèse des lipopeptides pour mettre en lumière le rôle de ces molécules dans l'amélioration du processus ;

La mise en évidence du mécanisme de biosynthèse en alternance des lipopeptides par la construction d'un mutant dans lequel le gène en question sera supprimé du génome bactérien et l'identification d'une manière plus approfondie du mécanisme permettant la sélection alternative des 2 formes de lipopeptide.

Valorisations scientifiques

Publications:

- 1) Oumaima Zouari, Didier Lecouturier, Gabrielle Chataigné, Alice Rochex, Pascal Dhulster, Philippe Jacques, Dhouha Ghribi. Biosurfactant and bioemulsifying activities of syringafactin producing *Pseudomonas* spp. strains isolated from oil contaminated soils
- 2) Oumaima Zouari, Didier Lecouturier, Gabrielle Chataigné, Alice Rochex, Pascal Dhulster, Dhouha Ghribi, Philippe Jacques. Purification and structural identification of two biosurfactant lipopeptides produced by *Pseudomonas* sp. E313 strains (en cours)
- 3) Oumaima Zouari, Didier Lecouturier, Muriel Bigan, Gabrielle Chataigné, Alice Rochex, Pascal Dhulster, Dhouha Ghribi, Philippe Jacques. Optimization of two novel lipopeptides production: Alkylfactin A and B produced by *Pseudomonas* sp. E313 strains (en cours)

Communications orales:

- 1) Oumaima Zouari, Didier Lecouturier, Pascal Dhulster, Dhouha Ghribi, Philippe Jacques. Optimisation de la production des lipopeptides par des bactéries du genre *Pseudomonas*. (Journée des doctorants 2014 de l'Institut Charles Violette) 20 novembre 2014, Lille-France.
- 2) Oumaima Zouari, Didier Lecouturier, Gabrielle Chataigné, Muriel Bigan, Pascal Dhulster, Samia Chaabouni, Dhouha Ghribi, Philippe Jacques. Optimization and characterization of new biosurfactant lipopeptides produced by *Pseudomonas* sp. E313 strains. (JIB 2016), 18 - 22 décembre 2016, Sousse - Tunisie.

Posters:

- 1) Oumaima Zouari, Didier Lecouturier, Alice Rochex, Zaraso Adiantomanga, Gabrielle Chataigné, Monica Hofte, Pascal Dhulster, Philippe Jacques. Optimisation of nutrient requirements and culture conditions for the production of sessiline, an antifungal lipopeptide (ESBES 2014), 7-10 septembre 2015, Lille-France.
- 2) Oumaima Zouari, Didier Lecouturier, Gabrielle Chataigné, Alice Rochex, Pascal Dhulster, Dhouha Ghribi, Philippe Jacques. Optimization of an antifungal lipopeptide production by *Pseudomonas fluorescens* CMR12a. (JIB 2014), 20-24 décembre 2014, Hammamet-Tunisie.
- 3) Oumaima Zouari, Didier Lecouturier, Dhouha Ghribi, Pascal Dhulster, Philippe Jacques. Optimisation de la production de lipopeptides par des bactéries du genre *Pseudomonas*. (Les doctorales 2015) 12-17 avril 2015, Lille-France
- 4) Oumaima Zouari, Didier Lecouturier, Gabrielle Chataigné, Alice Rochex, Pascal Dhulster, Dhouha Ghribi, Philippe Jacques. Identification of a novel biosurfactant lipopeptide produced by *Pseudomonas* bacteria. (ECAB 2015), 27 septembre – 1^{er} octobre 2015, Nice-France.
- 5) Oumaima Zouari, Didier Lecouturier, Gabrielle Chataigné, Alice Rochex, Pascal Dhulster, Dhouha Ghribi, Philippe Jacques. Purification and optimization of two new lipopeptides production belonging to syringafactin group by *Pseudomonas alkylphenolia*. (MFBS 2016), 19 - 22 mars 2016, Hammamet - Tunisie.

Références bibliographiques

- Abdel-Mawgoud, A.M., Aboulwafa, M.M., Hassouna, N.A.H., 2008. Characterization of surfactin produced by bacillus subtilis isolate BS5. Appl. Biochem. Biotechnol. 150, 289–303. doi:10.1007/s12010-008-8153-z
- Abdel-Mawgoud, A.M., Lépine, F., Déziel, E., 2010. Rhamnolipids: Diversity of structures, microbial origins and roles. Appl. Microbiol. Biotechnol. doi:10.1007/s00253-010-2498-2
- Adler, C., Corbalán, N.S., Seyedsayamdost, M.R., Pomares, M.F., de Cristóbal, R.E., Clardy, J., Kolter, R., Vincent, P.A., 2012. Catecholate Siderophores Protect Bacteria from Pyochelin Toxicity. PLoS One 7. doi:10.1371/journal.pone.0046754
- Al-Ajlani, M., Sheikh, M., Ahmad, Z., Hasnain, S., 2007. Production of surfactin from Bacillus subtilis MZ-7 grown on pharmamedia commercial medium. Microb. Cell Fact. 6, 17. doi:10.1186/1475-2859-6-17
- Alsohim, A.S., Taylor, T.B., Barrett, G.A., Gallie, J., Zhang, X.X., Altamirano-Junqueira, A.E., Johnson, L.J., Rainey, P.B., Jackson, R.W., 2014. The biosurfactant viscosin produced by Pseudomonas fluorescens SBW25 aids spreading motility and plant growth promotion. Environ. Microbiol. 16, 2267–2281. doi:10.1111/1462-2920.12469
- Anthoni, U., Christophersen, C., Nielsen, P.H., Gram, L., Petersen, B.O., 1995. Pseudomonine, an isoxazolidone with siderophoric activity from pseudomonas fluorescens ah2 isolated from lake victorian Nile perch. J. Nat. Prod. 58, 1786–1789. doi:10.1021/np50125a026
- Anyanwu, C.U., Obi, S.K.C., Okolo, B.N., 2011. Lipopeptide Biosurfactant Production by Serratia marcescens NSK-1 Strain Isolated from Petroleum-contaminated Soil. J. Appl. Sci. Res. 7, 79–87.
- Aparna, A., Srinikethan, G., Smitha, H., 2012. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel Pseudomonas sp. 2B. Colloids Surfaces B Biointerfaces 95, 23–29. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.01.043
- Asmer, H.J., Lang, S., Wagner, F., Wray, V., 1988. Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids. J. Am. Oil Chem. Soc. 65, 1460–1466. doi:10.1007/BF02898308
- Bais, H.P., 2004. Biocontrol of Bacillus subtilis against Infection of Arabidopsis Roots by Pseudomonas syringae Is Facilitated by Biofilm Formation and Surfactin Production. PLANT Physiol. 134, 307–319. doi:10.1104/pp.103.028712
- Bak, F., Bonnichsen, L., Jørgensen, N.O.G., Nicolaisen, M.H., Nybroe, O., 2014. The biosurfactant viscosin transiently stimulates n-hexadecane mineralization by a bacterial consortium. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99, 1475–1483. doi:10.1007/s00253-014-6054-3
- Balibar, C.J., Vaillancourt, F.H., Walsh, C.T., 2005. Generation of D amino acid residues in assembly of arthrofactin by dual condensation/epimerization domains. Chem. Biol. 12, 1189–1200. doi:10.1016/j.chembiol.2005.08.010
- Ballio, A., Barra, D., Bossa, F., Collina, A., Grgurina, I., Marino, G., Moneti, G., Paci, M., Pucci, P., Segre, A., Simmaco, M., 1991. Syringopeptins, new phytotoxic

- lipodepsipeptides of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. FEBS Lett. 291, 109–112. doi:10.1016/0014-5793(91)81115-O
- Ballio, A., Bossa, F., Collina, A., Gallo, M., Iacobellis, N.S., Paci, M., Pucci, P., Scaloni, A., Segre, A., Simmaco, M., 1990. Structure of syringotoxin, a bioactive metabolite of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. FEBS Lett. 269, 377–380. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(90)81197-V
- Ballio, A., Bossa, F., Di Giorgio, D., Ferranti, P., Paci, M., Pucci, P., Scaloni, A., Segre, A., Strobel, G.A., 1994. Novel bioactive lipodepsipeptides from *Pseudomonas syringae*: The pseudomycins. FEBS Lett. 355, 96–100. doi:10.1016/0014-5793(94)01179-6
- Banat, I.M., 1997. 97/02677 Microbial production of surfactants and their commercial potential. Fuel Energy Abstr. 38, 221. doi:10.1016/S0140-6701(97)84559-6
- Banat, I.M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M.G., Fracchia, L., Smyth, T.J., Marchant, R., 2010. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. Appl. Microbiol. Biotechnol. doi:10.1007/s00253-010-2589-0
- Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S., 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. Appl. Microbiol. Biotechnol. 53, 495–508. doi:10.1007/s002530051648
- Barros, F.F.C., De Quadros, C.P., Maróstica, M.R., Pastore, G.M., 2007. Surfactina: Propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. Quim. Nova. doi:10.1590/S0100-40422007000200031
- Bassarello, C., Lazzaroni, S., Bifulco, G., Lo Cantore, P., Iacobellis, N.S., Riccio, R., Gomez-Paloma, L., Evidente, A., 2004. Tolaasins A-E, five new lipodepsipeptides produced by *Pseudomonas tolaasii*. J. Nat. Prod. 67, 811–816. doi:10.1021/np0303557
- Bento, F.M., De Oliveira Camargo, F.A., Okeke, B.C., Frankenberger, W.T., 2005. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. Microbiol. Res. 160, 249–255. doi:10.1016/j.micres.2004.08.005
- Berti, A.D., Greve, N.J., Christensen, Q.H., Thomas, M.G., 2007. Identification of a biosynthetic gene cluster and the six associated lipopeptides involved in swarming motility of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. J. Bacteriol. 189, 6312–6323. doi:10.1128/JB.00725-07
- Bezza, F.A., Chirwa, E.M.N., 2017. Pyrene biodegradation enhancement potential of lipopeptide biosurfactant produced by *Paenibacillus dendritiformis* CN5 strain. J. Hazard. Mater. 321, 218–227. doi:10.1016/j.jhazmat.2016.08.035
- Bidwai, A.P., Zhang, L., Bachmann, R.C., Takemoto, J.Y., 1987. Mechanism of Action of *Pseudomonas syringae* Phytotoxin, Syringomycin 1. Plant Physiol. 83, 39–43.
- Bodour, A.A., Drees, K.P., Maier, R.M., 2003. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. Appl. Environ. Microbiol. 69, 3280–3287. doi:10.1128/AEM.69.6.3280-3287.2003
- Bodour, A.A., Miller-Maier, R.M., 1998. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. J.

- Microbiol. Methods 32, 273–280. doi:10.1016/S0167-7012(98)00031-1
- Brooks, T.M., Unterweger, D., Bachmann, V., Kostiuk, B., Pukatzki, S., 2013. Lytic activity of the *Vibrio cholerae* type VI secretion toxin VgrG-3 is inhibited by the antitoxin TsaB. J. Biol. Chem. 288, 7618–25. doi:10.1074/jbc.M112.436725
- Bunster, L., Fokkema, N.J., Schippers, B., 1989. Effect of surface-active *Pseudomonas* spp. on leaf wettability. Appl. Environ. Microbiol. 55, 1340–5.
- Calcott, M.J., Owen, J.G., Lamont, I.L., Ackerley, D.F., 2014. Biosynthesis of novel pyoverdines by domain substitution in a nonribosomal peptide synthetase of *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol. 80, 5723–5731. doi:10.1128/AEM.01453-14
- Cameotra, S.S., Makkar, R.S., 2004. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. Curr. Opin. Microbiol. doi:10.1016/j.mib.2004.04.006
- Cameotra, S.S., Makkar, R.S., Kaur, J., Mehta, S.K., 2010. Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind. Adv. Exp. Med. Biol. 672, 261–280. doi:10.1007/978-1-4419-5979-9_20
- Campos, J.M., Montenegro Stamford, T.L., Sarubbo, L.A., de Luna, J.M., Rufino, R.D., Banat, I.M., 2013. Microbial biosurfactants as additives for food industries. Biotechnol. Prog. 29, 1097–1108. doi:10.1002/btpr.1796
- Chakraborty, T., Chakraborty, I., Ghosh, S., 2011. The methods of determination of critical micellar concentrations of the amphiphilic systems in aqueous medium. Arab. J. Chem. 4, 265–270. doi:10.1016/j.arabjc.2010.06.045
- Condurso, H.L., Bruner, S.D., 2012. Structure and noncanonical chemistry of nonribosomal peptide biosynthetic machinery. Nat. Prod. Rep. 29, 1099. doi:10.1039/c2np20023f
- Cooper, D.G., Goldenberg, B.G., 1987. Surface-Active Agents from Two *Bacillus* Species. Appl. Environ. Microbiol. 53, 224–229. doi:0099-2240/87/020224
- Cooper, D.G., Goldenberg, B.G., 1987. Surface-active agents from two *Bacillus* species. Appl. Environ. Microbiol. doi:0099-2240/87/020224
- Cooper, D.G., Zajic, J.E., 1980. Surface-Active Compounds from Microorganisms. Adv. Appl. Microbiol. 26, 229–253. doi:10.1016/S0065-2164(08)70335-6
- Coraiola, M., Lo Cantore, P., Lazzaroni, S., Evidente, A., Iacobellis, N.S., Dalla Serra, M., 2006. WLIP and tolaasin I, lipodepsipeptides from *Pseudomonas reactans* and *Pseudomonas tolaasii*, permeabilise model membranes. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 1758, 1713–1722. doi:10.1016/j.bbamem.2006.06.023
- Cornelis, P., Dingemans, J., 2013. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. Front. Cell. Infect. Microbiol. 3. doi:10.3389/fcimb.2013.00075
- Cosby, W.M., Vollenbroich, D., Lee, O.H., Zuber, P., 1998. Altered srf expression in *Bacillus subtilis* resulting from changes culture pH is dependent on the SpoOK oligopeptide permease and the ComQX system of extracellular control. J. Bacteriol. 180, 1438–1445.

- Coutte, F., 2009. Production Selective De Lipopeptides Par *Bacillus Subtilis* En Bioreacteur a Membrane Du Genie Moleculaire Au Genie Des Procèdes 243.
- Coutte, F., Leclère, V., Béchet, M., Guez, J.S., Lecouturier, D., Chollet-Imbert, M., Dhulster, P., Jacques, P., 2010. Effect of pps disruption and constitutive expression of *srfA* on surfactin productivity, spreading and antagonistic properties of *Bacillus subtilis* 168 derivatives. *J. Appl. Microbiol.* 109, 480–491. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04683.x
- Coutte, F., Lecouturier, D., Leclère, V., Béchet, M., Jacques, P., Dhulster, P., 2013. New integrated bioprocess for the continuous production, extraction and purification of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* in membrane bioreactor. *Process Biochem.* 48, 25–32. doi:10.1016/j.procbio.2012.10.005
- Coutte, F., Niehren, J., Dhali, D., John, M., Versari, C., Jacques, P., 2015. Modeling leucine's metabolic pathway and knockout prediction improving the production of surfactin, a biosurfactant from *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. J.* 10, 1216–1234. doi:10.1002/biot.201400541
- Cox, C.D., Rinehart, K.L., Moore, M.L., Cook, J.C., 1981. Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 4256–4260. doi:10.1073/pnas.78.7.4256
- D'aes, J., De Maeyer, K., Pauwelyn, E., Höfte, M., 2010. Biosurfactants in plant-*Pseudomonas* interactions and their importance to biocontrol. *Environ. Microbiol. Rep.* 2, 359–372. doi:10.1111/j.1758-2229.2009.00104.x
- D'aes, J., Hua, G.K.H., De Maeyer, K., Pannecouque, J., Forrez, I., Ongena, M., Dietrich, L.E.P., Thomashow, L.S., Mavrodi, D. V., Höfte, M., 2011. Biological Control of Rhizoctonia Root Rot on Bean by Phenazine- and Cyclic Lipopeptide-Producing *Pseudomonas* CMR12a. *Phytopathology* 101, 996–1004. doi:10.1094/PHYTO-11-10-0315
- Dalla Serra, M., Bernhart, I., Nordera, P., Di Giorgio, D., Ballio, a, Menestrina, G., 1999. Conductive properties and gating of channels formed by syringopeptin 25A, a bioactive lipodepsipeptide from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, in planar lipid membranes. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 12, 401–9. doi:10.1094/MPMI.1999.12.5.401
- Das, K., Mukherjee, A.K., 2007. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresour. Technol.* 98, 1339–1345. doi:10.1016/j.biortech.2006.05.032
- De Bruijn, I., De Kock, M.J.D., De Waard, P., Van Beek, T.A., Raaijmakers, J.M., 2008. Massetolide A biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 190, 2777–2789. doi:10.1128/JB.01563-07
- De Bruijn, I., De Kock, M.J.D., Yang, M., De Waard, P., Van Beek, T.A., Raaijmakers, J.M., 2007. Genome-based discovery, structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in *Pseudomonas* species. *Mol. Microbiol.* 63, 417–428. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05525.x
- de Sousa, T., Bhosle, S., 2012. Isolation and characterization of a lipopeptide bioemulsifier produced by *Pseudomonas nitroreducens* TSB.MJ10 isolated from a mangrove

- ecosystem. *Bioresour. Technol.* 123, 256–262. doi:10.1016/j.biortech.2012.07.056
- De Vleeschauwer, D., Höfte, M., 2009. Rhizobacteria-Induced Systemic Resistance, in: *Advances in Botanical Research*. pp. 223–281. doi:10.1016/S0065-2296(09)51006-3
- Denaro, R., Crisafi, F., Russo, D., Genovese, M., Messina, E., Genovese, L., Carbone, M., Ciavatta, M.L., Ferrer, M., Golyshin, P., Yakimov, M.M., 2014. *Alcanivorax borkumensis* produces an extracellular siderophore in iron-limitation condition maintaining the hydrocarbon-degradation efficiency. *Mar. Genomics* 17, 43–52. doi:10.1016/j.margen.2014.07.004
- Desai, J.D., Banat, I.M., 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 47–64. doi:10.1016/S0140-6701(97)84559-6
- Déziel, E., Lépine, F., Dennie, D., Boismenu, D., Mamer, O.A., Villemur, R., 1999. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1440, 244–252. doi:10.1016/S1388-1981(99)00129-8
- Dieckmann, R., Lee, Y.O., van Liempt, H., von Döhren, H., Kleinkauf, H., 1995. Expression of an active adenylate-forming domain of peptide synthetases corresponding to acyl-CoA-synthetases. *FEBS Lett.* 357, 212–216. doi:10.1016/0014-5793(94)01342-X
- Dubey, K. V., Juwarkar, A.A., Singh, S.K., 2005. Adsorption-desorption process using wood-based activated carbon for recovery of biosurfactant from fermented distillery wastewater. *Biotechnol. Prog.* 21, 860–867. doi:10.1021/bp040012e
- Duvnjak, Z., Cooper, D.G., Kosaric, N., 1982. Production of surfactant by *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558. *Biotechnol. Bioeng.* 24, 165–175. doi:10.1002/bit.260240114
- El, A., Rochex, A., Chataign, G., Max, B., 2015. The Tunisian oasis ecosystem is a source of antagonistic *Bacillus* spp . producing diverse antifungal lipopeptides 1–12. doi:10.1016/j.resmic.2015.09.003
- Eppelmann, K., Stachelhaus, T., Marahiel, M.A., 2002. Exploitation of the selectivity-conferring code of nonribosomal peptide synthetases for the rational design of novel peptide antibiotics. *Biochemistry* 41, 9718–9726. doi:10.1021/bi0259406
- Fechtner, J., Koza, A., Sterpaio, P. Dello, Hapca, S.M., Spiers, A.J., 2011. Surfactants expressed by soil pseudomonads alter local soil-water distribution, suggesting a hydrological role for these compounds. *FEMS Microbiol. Ecol.* 78, 50–58. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01141.x
- Fonseca, P., Moreno, R., Rojo, F., 2011. Growth of *Pseudomonas putida* at low temperature: Global transcriptomic and proteomic analyses. *Environ. Microbiol. Rep.* 3, 329–339. doi:10.1111/j.1758-2229.2010.00229.x
- Franzetti, A., Tamburini, E., Banat, I.M., 2010. Applications of biological surface active compounds in remediation technologies. *Adv. Exp. Med. Biol.* 672, 121–134. doi:10.1007/978-1-4419-5979-9_9
- Fujii, T., Yuasa, R., Kawase, T., 1999. Biodetergent: IV. Monolayers of corynomycolic acids

- at the air-water interface. *Colloid Polym. Sci.* 277, 334–339. doi:10.1007/s003960050389
- Fukuchi, N., Isogai, A., Nakayama, J., Takayama, S., Yamashita, S., Suyama, K., Takemoto, J.Y., Suzuki, A., 1992. Structure and stereochemistry of three phytotoxins, syringomycin, syringotoxin and syringostatin, produced by *Pseudomonas syringae* pv. *<i>syringae</i>*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1149–1157. doi:10.1039/P19920001149
- Gao, J., Xie, G., Peng, F., Xie, Z., 2015. *Pseudomonas donghuensis* sp. nov., exhibiting high-yields of siderophore. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 107, 83–94. doi:10.1007/s10482-014-0306-1
- Gauchi, J., 2005. Plans d'expériences optimaux : un exposé didactique. *Exp. Des.* 139–162.
- Gerard, J., Lloyd, R., Barsby, T., Haden, P., Kelly, M.T., Andersen, R.J., 1997. Massetolides A-H, antimycobacterial cyclic depsipeptides produced by two pseudomonads isolated from marine habitats. *J. Nat. Prod.* 60, 223–229. doi:10.1021/np9606456
- Gharaei-Fathabad, E., 2011. Biosurfactants in pharmaceutical industry: A mini-review. *Am. J. Drug Discov. Dev.* 1, 58–69. doi:10.3923/ajdd.2011.58.69
- Ghribi, D., Ellouze-Chaabouni, S., 2011. Enhancement of *Bacillus subtilis* Lipopeptide Biosurfactants Production through Optimization of Medium Composition and Adequate Control of Aeration. *Biotechnol. Res. Int.* 2011, 1–6. doi:10.4061/2011/653654
- Gomila, M., Pe??a, A., Mulet, M., Lalucat, J., Garc??a-Vald??s, E., 2015. Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Front. Microbiol.* 6. doi:10.3389/fmicb.2015.00214
- Gong, G., Zheng, Z., Chen, H., Yuan, C., Wang, P., Yao, L., Yu, Z., 2009. Enhanced production of surfactin by *Bacillus subtilis* E8 mutant obtained by ion beam implantation. *Food Technol. Biotechnol.* 47, 27–31.
- Goupy, J., 2006. Factorial experimental design: Detecting an outlier with the dynamic variable and the Daniel's diagram, in: *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. pp. 156–166. doi:10.1016/j.chemolab.2005.05.005
- Grgurina, I., Bensaci, M., Pocsfalvi, G., Mannina, L., Cruciani, O., Fiore, A., Fogliano, V., Sorensen, K.N., Takemoto, J.Y., 2005. Novel cyclic lipodepsipeptide from *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* strain 508 and syringopeptin antimicrobial activities. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 5037–5045. doi:10.1128/AAC.49.12.5037-5045.2005
- Grgurina, I., Mariotti, F., Fogliano, V., Gallo, M., Scaloni, A., Iacobellis, N.S., Lo Cantore, P., Mannina, L., Van Axel Castelli, V., Greco, M.L., Graniti, A., 2002. A new syringopeptin produced by bean strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1597, 81–89. doi:10.1016/S0167-4838(02)00283-2
- Groboillot, A., Portet-Koltalo, F., le Derf, F., Feuilloley, M.J.G., Orange, N., Poc, C.D., 2011. Novel application of cyclolipopeptide amphisin: Feasibility study as additive to remediate polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contaminated sediments. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 1787–1806. doi:10.3390/ijms12031787

- Gross, H., Loper, J.E., 2009. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Nat. Prod. Rep.* 26, 1408. doi:10.1039/b817075b
- Gross, H., Stockwell, V.O., Henkels, M.D., Nowak-Thompson, B., Loper, J.E., Gerwick, W.H., 2007. The Genom isotopic Approach: A Systematic Method to Isolate Products of Orphan Biosynthetic Gene Clusters. *Chem. Biol.* 14, 53–63. doi:10.1016/j.chembiol.2006.11.007
- Guenzi, E., Galli, G., Grgurina, I., Gross, D.C., Grandi, G., 1998. Characterization of the syringomycin synthetase gene cluster: A link between prokaryotic and eukaryotic peptide synthetases. *J. Biol. Chem.* 273, 32857–32863. doi:10.1074/jbc.273.49.32857
- Guerra-Santos, L., Kappeli, O., Fiechter, A., 1984. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 301–305.
- Guez, J.S., Müller, C.H., Danze, P.M., Buchs, J., Jacques, P., 2008. Respiration activity monitoring system (RAMOS), an efficient tool to study the influence of the oxygen transfer rate on the synthesis of lipopeptide by *Bacillus subtilis* ATCC6633. *J. Biotechnol.* 134, 121–126. doi:10.1016/j.jbiotec.2008.01.003
- Harshey, R.M., 2003. Bacterial Motility on a Surface: Many Ways to a Common Goal. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 249–273. doi:10.1146/annurev.micro.57.030502.091014
- Hashizume, H., Nishimura, Y., 2008. Cyclic lipopeptide antibiotics. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 35, 693–751. doi:10.1016/S1572-5995(08)80016-6
- Hildebrand, P.D., Braun, P.G., McRae, K.B., Lu, X., 1998. Role of the biosurfactant viscosin in broccoli head rot caused by a pectolytic strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Can. J. Plant Pathol.* 20, 296–303. doi:10.1080/07060669809500396
- Hu, Y., Ju, L.K., 2001. Purification of lactonic sophorolipids by crystallization. *J. Biotechnol.* 87, 263–272. doi:10.1016/S0168-1656(01)00248-6
- Hultberg, M., Bergstrand, K.J., Khalil, S., Alsanius, B., 2008. Characterization of biosurfactant-producing strains of fluorescent pseudomonads in a soilless cultivation system. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 94, 329–334. doi:10.1007/s10482-008-9250-2
- Isoda, H., Shinmoto, H., Kitamoto, D., Matsumura, M., Nakahara, T., 1997. Differentiation of human promyelocytic leukemia cell line HL60 by microbial extracellular glycolipids. *Lipids* 32, 263–271.
- Isogai, A., Iguchi, H., Nakayama, J., Kusai, A., Takemoto, J.Y., Suzuki, A., 1995. Structural analysis of new syringopeptins by tandem mass spectrometry. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59, 1374–1376.
- Jacques, G., 2000. Modélisation par les plans d'expériences. *Tech. l'ingénieur Capteurs méthodes Mes. base docum.* 275.
- Jacques, P., Hbid, C., Destain, J., Razafindralambo, H., Paquot, M., De Pauw, E., Thonart, P., 1999. Optimization of Biosurfactant Lipopeptide Production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman Design. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 77, 223–234.

doi:10.1385/ABAB:77:1-3:223

- Jain, D.K., Collins-Thompson, D.L., Lee, H., Trevors, J.T., 1991. A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *J. Microbiol. Methods* 13, 271–279. doi:10.1016/0167-7012(91)90064-W
- Janek, T., Łukaszewicz, M., Rezanka, T., Krasowska, A., 2010. Isolation and characterization of two new lipopeptide biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* BD5 isolated from water from the Arctic Archipelago of Svalbard. *Bioresour. Technol.* 101, 6118–6123. doi:10.1016/j.biortech.2010.02.109
- Jin, H., Zhang, X., Li, K., Niu, Y., Guo, M., Hu, C., Wan, X., Gong, Y., Huang, F., 2014. Direct bio-utilization of untreated rapeseed meal for effective iturin A production by *Bacillus subtilis* in submerged fermentation. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0111171
- Kanna, R., Gummadi, S.N., Kumar, G.S., 2014. Production and Characterization of Biosurfactant by *Pseudomonas putida* MTCC 2467. *J. Biol. Sci.* 14, 436–445. doi:10.3923/jbs.2014.436.445
- Karant, N.G.K., Deo, P.G., Veenanadig, N.K., 1999. Microbial production of biosurfactants and their importance. *Curr. Sci.* doi:10.1016/S0921-3449(96)01167-6
- Kasai, H., Takahashi, N., Tokumaru, H., 2012. Distinct Initial SNARE Configurations Underlying the Diversity of Exocytosis. *Physiol. Rev.* 92, 1915–1964. doi:10.1152/physrev.00007.2012
- Khopade, A., Biao, R., Liu, X., Mahadik, K., Zhang, L., Kokare, C., 2012a. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiopsis* sp. B4. *Desalination* 285, 198–204. doi:10.1016/j.desal.2011.10.002
- Khopade, A., Biao, R., Liu, X., Mahadik, K., Zhang, L., Kokare, C., 2012b. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiopsis* sp. B4. *Desalination* 285, 198–204. doi:10.1016/j.desal.2011.10.002
- Kuiper, I., Lagendijk, E.L., Pickford, R., Derrick, J.P., Lamers, G.E.M., Thomas-Oates, J.E., Lugtenberg, B.J.J., Bloemberg, G. V., 2004. Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. *Mol. Microbiol.* 51, 97–113. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03751.x
- Kulimushi, P.Z., Arias, A.A., Franzil, L., Steels, S., Ongena, M., 2017. Stimulation of fengycin-type antifungal lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* in the presence of the maize fungal pathogen *Rhizomucor variabilis*. *Front. Microbiol.* 8. doi:10.3389/fmicb.2017.00850
- Lang, S., 2002. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* doi:10.1016/S1359-0294(02)00007-9
- Lang, S., Philp, J.C., 1998. Surface-active lipids in rhodococci. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* doi:10.1023/A:1001799711799
- Larpernt, C., Chasseray, X., 1992. Optically active surfactants - I - the first synthesis and

- properties of sodium bis [(S)] ethyl-2-hexyl] sulfosuccinates (“aerosol ot”). *Tetrahedron* 48, 3903–3914. doi:10.1016/S0040-4020(01)88470-2
- Lindow, S.E., Brandl, M.T., 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* doi:10.1128/AEM.69.4.1875-1883.2003
- Liu, J., Liu, M., Wang, J., Yao, J.M., Pan, R.R., Yu, Z.L., 2005. Enhancement of the *Gibberella zeae* growth inhibitory lipopeptides from a *Bacillus subtilis* mutant by ion beam implantation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69, 223–228. doi:10.1007/s00253-005-1981-7
- Liu, J.F., Mbadanga, S.M., Yang, S.Z., Gu, J.D., Mu, B.Z., 2015. Chemical structure, property and potential applications of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* in petroleum recovery and spill mitigation. *Int. J. Mol. Sci.* doi:10.3390/ijms16034814
- Liu, X., Ren, B., Gao, H., Liu, M., Dai, H., Song, F., Yu, Z., Wang, S., Hu, J., Kokare, C.R., Zhang, L., 2012. Optimization for the production of surfactin with a new synergistic antifungal activity. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0034430
- Liu, X., Ye, Q., Yu, B., Liang, Y., Liu, W., Zhou, F., 2010. Switching water droplet adhesion using responsive polymer brushes. *Langmuir* 26, 12377–12382. doi:10.1021/la101909e
- M. I. Van Dyke, P. Couture, M. Brauer, H. Lee, J.T.T., 1993. *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. *Can. J. Microbiol.* 39, 1071–1078.
- Ma, Z., Geudens, N., Kieu, N.P., Sinnaeve, D., Ongena, M., Martins, J.C., Höfte, M., 2016. Biosynthesis, chemical structure, and structure-activity relationship of orfamide lipopeptides produced by *Pseudomonas protegens* and related species. *Front. Microbiol.* 7. doi:10.3389/fmicb.2016.00382
- Magdassi, S., Vinetsky, Y., Relkin, P., 1996. Formation and structural heat-stability of β -lactoglobulin/surfactant complexes. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 6, 353–362. doi:10.1016/0927-7765(96)01266-0
- Makkar, R.S., Cameotra, S.S., 2002. Effects of various nutritional supplements on biosurfactant production by a strain of *Bacillus subtilis* at 45°C. *J. Surfactants Deterg.* 5, 11–17. doi:10.1007/s11743-002-0199-8
- Marchant, R., Banat, I.M., 2012. Biosurfactants: A sustainable replacement for chemical surfactants? *Biotechnol. Lett.* doi:10.1007/s10529-012-0956-x
- Margaritis, A., Zajic, J.E., Gerson, D.F., 1979. Production and surface active properties of microbial surfactants. *Biotechnol. Bioeng.* 21, 1151–1162. doi:10.1002/bit.260210706
- Mata-Sandoval, J.C., Karns, J., Torrents, A., 1999. High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. *J. Chromatogr. A* 864, 211–220. doi:10.1016/S0021-9673(99)00979-6
- Matthijs, S., Tehrani, K.A., Laus, G., Jackson, R.W., Cooper, R.M., Cornelis, P., 2007. Thioquinolobactin, a *Pseudomonas* siderophore with antifungal and anti-*Pythium* activity. *Environ. Microbiol.* 9, 425–434. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01154.x

- May, J.J., Kessler, N., Marahiel, M.A., Stubbs, M.T., 2002. Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12120–5. doi:10.1073/pnas.182156699
- Md. Sakil Munna, Z.Z. and R.N., 2015. Influence of temperature on the growth of *Pseudomonas putida*. *Stanford J. Microbiol.* 5, 9–12.
- Mercade, M.E., Manresa, M.A., 1994. The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71, 61–64. doi:10.1007/BF02541473
- Minowa, Y., Araki, M., Kanehisa, M., 2007. Comprehensive Analysis of Distinctive Polyketide and Nonribosomal Peptide Structural Motifs Encoded in Microbial Genomes. *J. Mol. Biol.* 368, 1500–1517. doi:10.1016/j.jmb.2007.02.099
- Mnif, I., Sahnoun, R., Ellouz-Chaabouni, S., Ghribi, D., 2017. Application of bacterial biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of diesel oil in soil using a newly isolated consortium. *Process Saf. Environ. Prot.* 109, 72–81. doi:10.1016/j.psep.2017.02.002
- Mohammed, I.U., Deeni, Y., Hapca, S.M., Mclaughlin, K., Spiers, A.J., 2015. Predicting the minimum liquid surface tension activity of pseudomonads expressing biosurfactants. *Lett. Appl. Microbiol.* 60, 37–43. doi:10.1111/lam.12331
- Molin, G., Ternstrom, A., 1986. Phenotypically Based Taxonomy of Psychrotrophic *Pseudomonas* Isolated from Spoiled Meat, Water and Soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36, 257–274. doi:10.1099/00207713-36-2-257
- Mootz, H.D., Schwarzer, D., Marahiel, M.A., 2002. Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *ChemBioChem.* doi:10.1002/1439-7633(20020603)3:6<490::AID-CBIC490>3.0.CO;2-N
- Morikawa, M., Hirata, Y., Imanaka, T., 2000. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1488, 211–218. doi:10.1016/S1388-1981(00)00124-4
- Moro, P.A., 1997. A new syringopeptin produced by a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain isolated from diseased twigs of laurel. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 259–264. doi:10.1006/pmpp.1997.0124
- Motta Dos Santos, L.F., Coutte, F., Ravallec, R., Dhulster, P., Jacques, P., Motta Dos Santos, L.F., Tournier-Couturier, L., 2016. An improvement of surfactin production by *B. subtilis* BBG131 using design of experiments in microbioreactors and continuous process in bubbleless membrane bioreactor. *Bioresour. Technol.* 218, 944–952. doi:10.1016/j.biortech.2016.07.053
- Mukherjee, A.K., 2007. Potential application of cyclic lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains in laundry detergent formulations. *Lett. Appl. Microbiol.* 45, 330–335. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02197.x
- Mulet, M., Sánchez, D., Lalucat, J., Lee, K., García-Valdés, E., 2015. *Pseudomonas alkylphenolica* sp. Nov., A bacterial species able to form special aerial structures when grown on p-cresol. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 4013–4018. doi:10.1099/ijsem.0.000529

- Mulligan, C.N., 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollut.* doi:10.1016/j.envpol.2004.06.009
- Nalini, S., Parthasathi, R., 2013. Characterisation and Optimisation of Biosurfactant Produced By 2, 168–174.
- Navon-Venezia, S., Zosim, Z., Gottlieb, A., Legmann, R., Carmeli, S., Ron, E.Z., Rosenberg, E., 1995. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3240–3244.
- Ndlovu, T., Rautenbach, M., Khan, S., Khan, W., 2017. Variants of lipopeptides and glycolipids produced by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* cultured in different carbon substrates. *AMB Express* 7, 109. doi:10.1186/s13568-017-0367-4
- Neilands, J.B., 1995. Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* doi:10.1074/JBC.270.45.26723
- Nguyen, T.T., Youssef, N.H., McInerney, M.J., Sabatini, D.A., 2008. Rhamnolipid biosurfactant mixtures for environmental remediation. *Water Res.* 42, 1735–1743. doi:10.1016/j.watres.2007.10.038
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., Heijne, G. Von, 1997. A Neural Network Method for Identification of Prokaryotic and Eukaryotic Signal Peptides and Prediction of their Cleavage Sites. *Int. J. Neural Syst.* 08, 581–599. doi:10.1142/S0129065797000537
- Nielsen, T.H., Christophersen, C., Anthoni, U., Sørensen, J., 1999. Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54. *J. Appl. Microbiol.* 87, 80–90. doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00798.x
- Nielsen, T.H., Sørensen, D., Tobiasen, C., Andersen, J.B., Christophersen, C., Givskov, M., Sørensen, J., 2002. Antibiotic and biosurfactant properties of cyclic lipopeptides produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. from the sugar beet rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3416–3423. doi:10.1128/AEM.68.7.3416-3423.2002
- Nielsen, T.H., Thrane, C., Christophersen, C., Anthoni, U., Sørensen, J., 2000. Structure, production characteristics and fungicidal antagonism of tensin - A new antifungal cyclic lipopeptide from *Pseudomonas fluorescens* strain 96.578. *J. Appl. Microbiol.* 89, 992–1001. doi:10.1046/j.1365-2672.2000.01201.x
- Nitschke, M., Costa, S.G.V.A.O., 2007. Biosurfactants in food industry. *Trends Food Sci. Technol.* doi:10.1016/j.tifs.2007.01.002
- Nutkins, J.C., Mortishire-Smith, R.J., Williams, D.H., Packman, L.C., Brodey, C.L., Rainey, P.B., Johnstone, K., 1991. Structure Determination of Tolaasin, an Extracellular Lipodepsipeptide Produced by the Mushroom Pathogen *Pseudomonas tolaasii* Paine. *J. Am. Chem. Soc.* 113, 2621–2627. doi:10.1021/ja00007a040
- Nybroe, O., Sørensen, J., 2004. Production of cyclic lipopeptides by fluorescent pseudomonads. *Pseudomonas* 147–172. doi:10.1007/978-1-4419-9088-4_5
- Ongena, M., Jacques, P., 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16, 115–125. doi:10.1016/j.tim.2007.12.009

- Pacwa-Plóciniczak, M., Płaza, G.A., Piotrowska-Seget, Z., Cameotra, S.S., 2011. Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 633–654. doi:10.3390/ijms12010633
- PALLERONI, N.J., KUNISAWA, R., CONTOPOULOU, R., DOUDOROFF, M., 1973. Nucleic Acid Homologies in the Genus *Pseudomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 23, 333–339. doi:10.1099/00207713-23-4-333
- Patil, S., Pendse, A., Aruna, K., 2014. International Journal of Current lated from oil contaminated soil sample 2, 20–30.
- Pauwelyn, E., Huang, C.-J., Ongena, M., Leclère, V., Jacques, P., Bleyaert, P., Budzikiewicz, H., Schäfer, M., Höfte, M., 2013. New linear lipopeptides produced by *Pseudomonas cichorii* SF1-54 are involved in virulence, swarming motility, and biofilm formation. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 26, 585–98. doi:10.1094/MPMI-11-12-0258-R
- Pearce, K.N., Kinsella, J.E., 1978. Emulsifying Properties of Proteins: Evaluation of a Turbidimetric Technique. *J. Agric. Food Chem.* 26, 716–723. doi:10.1021/jf60217a041
- Perfumo, A., Rancich, I., Banat, I.M., 2010. Possibilities and challenges for biosurfactants use in petroleum industry. *Adv. Exp. Med. Biol.* 672, 135–145. doi:10.1007/978-1-4419-5979-9_10
- Perneel, M., D'Hondt, L., De Maeyer, K., Adiobo, A., Rabaey, K., Höfte, M., 2008. Phenazines and biosurfactants interact in the biological control of soil-borne diseases caused by *Pythium* spp. *Environ. Microbiol.* 10, 778–788. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01501.x
- Peypoux, F., Bonmatin, J.M., Wallach, J., 1999. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 553–563. doi:10.1007/s002530051432
- Płaza, G.A., Zjawiony, I., Banat, I.M., 2006. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. *J. Pet. Sci. Eng.* 50, 71–77. doi:10.1016/j.petrol.2005.10.005
- Pruthi, V., Cameotra, S.S., 1997. Rapid identification of biosurfactant- producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique. *Biotechnology* 11, 671–674.
- Quadri, L.E.N., Weinreb, P.H., Lei, M., Nakano, M.M., Zuber, P., Walsh, C.T., 1998. Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carder protein domains in peptide synthetases. *Biochemistry* 37, 1585–1595. doi:10.1021/bi9719861
- Raaijmakers, J.M., de Bruijn, I., de Kock, M.J.D., 2006. Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 19, 699–710. doi:10.1094/MPMI-19-0699
- Raaijmakers, J.M., de Bruijn, I., Nybroe, O., Ongena, M., 2010. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: More than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 1037–1062. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x
- Rahman, K.S.M., Rahman, T.J., Banat, I.M., Lord, R., Street, G., 2007. Bioremediation of petroleum sludge using bacterial consortium with biosurfactant, in: *Environmental*

- Bioremediation Technologies. pp. 391–408. doi:10.1007/978-3-540-34793-4_17
- Rahman, K.S.M., Thahira-Rahman, J., Lakshmanaperumalsamy, P., Banat, I.M., 2002. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresour. Technol.* 85, 257–261. doi:10.1016/S0960-8524(02)00119-0
- Rauch, S.L., Wedig, M.M., Wright, C.I., Martis, B., McMullin, K.G., Shin, L.M., Cannistraro, P.A., Wilhelm, S., 2007. Functional Magnetic Resonance Imaging Study of Regional Brain Activation During Implicit Sequence Learning in Obsessive-Compulsive Disorder. *Biol. Psychiatry* 61, 330–336. doi:10.1016/j.biopsych.2005.12.012
- Rausch, C., Hoof, I., Weber, T., Wohlleben, W., Huson, D.H., 2007. Phylogenetic analysis of condensation domains in NRPS sheds light on their functional evolution. *BMC Evol. Biol.* 7, 78. doi:10.1186/1471-2148-7-78
- Reiling, H.E., Thanei-Wyss, U., Guerra-Santos, L.H., Hirt, R., Käppeli, O., Fiechter, A., 1986. Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 985–989.
- Remichkova, M., Galabova, D., Roeva, I., Karpenko, E., Shulga, A., Galabov, A.S., 2008. Anti-herpesvirus activities of *Pseudomonas* sp. S-17 rhamnolipid and its complex with alginate. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 63, 75–81.
- Rieger, M.M., Rhein, L.D., 1997. Surfactants in cosmetics, Surfactant science series.
- Rodrigues, L., Banat, I.M., Teixeira, J., Oliveira, R., 2006. Biosurfactants: Potential applications in medicine. *J. Antimicrob. Chemother.* doi:10.1093/jac/dkl024
- Ron, E.Z., Rosenberg, E., 2002. Biosurfactants and oil bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* doi:10.1016/S0958-1669(02)00316-6
- Ron, E.Z., Rosenberg, E., 2001. Natural roles of biosurfactants. *Environ. Microbiol.* doi:10.1046/j.1462-2920.2001.00190.x
- Roongsawang, N., Hase, K.I., Haruki, M., Imanaka, T., Morikawa, M., Kanaya, S., 2003. Cloning and characterization of the gene cluster encoding arthrofactin synthetase from *Pseudomonas* sp. MIS38. *Chem. Biol.* 10, 869–880. doi:10.1016/j.chembiol.2003.09.004
- Roongsawang, N., Washio, K., Morikawa, M., 2011. Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. *Int. J. Mol. Sci.* doi:10.3390/ijms12010141
- Rosenberg, M., Gutnick, D., Rosenberg, E., 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 9, 29–33. doi:10.1111/j.1574-6968.1980.tb05599.x
- Sørensen, D., Nielsen, T.H., Christophersen, C., Sørensen, J., Gajhede, M., 2001. Cyclic lipoundecapeptide amphisin from *Pseudomonas* sp. Strain DSS73. *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.* 57, 1123–1124. doi:10.1107/S0108270101010782
- Sachdev, D.P., Cameotra, S.S., 2013. Biosurfactants in agriculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 1005–1016. doi:10.1007/s00253-012-4641-8
- Sahoo, S., Datta, S., Biswas, D., 2011. *Journal of Advanced Scientific Research Optimization*

- of Culture Conditions for Biosurfactant Production from *Pseudomonas aeruginosa* OCD 1. *J Adv Sci Res J. Adv. Sci. Res.* 2, 32–36.
- Saikia, R.R., Deka, S., Deka, M., Banat, I.M., 2012. Isolation of biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* RS29 from oil-contaminated soil and evaluation of different nitrogen sources in biosurfactant production. *Ann. Microbiol.* 62, 753–763. doi:10.1007/s13213-011-0315-5
- Santos, D.K.F., Rufino, R.D., Luna, J.M., Santos, V.A., Sarubbo, L.A., 2016. Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century. *Int. J. Mol. Sci.* doi:10.3390/ijms17030401
- Satpute, S.K., Banpurkar, A.G., Dhakephalkar, P.K., Banat, I.M., Chopade, B. a, 2010. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 30, 127–144. doi:10.3109/07388550903427280
- Satpute, S.K., Bhawsar, B.D., Dhakephalkar, P.K., Chopade, B.A., 2008. Assessment of different screening methods for selecting biosurfactant producing marine bacteria. *Indian J. Mar. Sci.* 37, 243–250.
- Scaloni, A., Dalla Serra, M., Amodeo, P., Mannina, L., Vitale, R.M., Segre, A.L., Cruciani, O., Lodovichetti, F., Greco, M.L., Fiore, A., Gallo, M., D'Ambrosio, C., Coraiola, M., Menestrina, G., Graniti, A., Fogliano, V., 2004. Structure, conformation and biological activity of a novel lipodepsipeptide from *Pseudomonas corrugata*: cormycin A. *Biochem. J.* 384, 25–36. doi:10.1042/BJ20040422
- Segre, A., Bachmann, R.C., Ballio, A., Bossa, F., Grgurina, I., Iacobellis, N.S., Marino, G., Pucci, P., Simmaco, M., Takemoto, J.Y., 1989. The structure of syringomycins A1, E and G. *FEBS Lett.* 255, 27–31. doi:10.1016/0014-5793(89)81054-3
- Shaw, N., 1975. Bacterial Glycolipids and Glycophospholipids. *Adv. Microb. Physiol.* 12, 141–167. doi:10.1016/S0065-2911(08)60281-7
- Shoji, J., Hino, H., Katayama, T., Matsumoto, K., Tanimoto, T., Hattori, T., Higashiyama, I., Miwa, H., Motokawa, K., Yoshida, T., 1992. Isolation and characterization of new peptide antibiotics, plusbacins A1-A4 and B1-B4. *J. Antibiot. (Tokyo).* 45, 817–23. doi:10.7164/antibiotics.45.817
- Siddiqui, I.A., Shaikat, S.S., 2004. Liquid culture carbon, nitrogen and inorganic phosphate source regulate nematicidal activity by fluorescent pseudomonads in vitro. *Lett. Appl. Microbiol.* 38, 185–190. doi:10.1111/j.1472-765X.2003.01472.x
- Sieber, S.A., Marahiel, M.A., 2005. Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: Approaches to new antibiotics. *Chem. Rev.* doi:10.1021/cr0301191
- Sieber, S.A., Marahiel, M.A., 2003. Learning from Nature's Drug Factories: Nonribosomal Synthesis of Macrocyclic Peptides. *J. Bacteriol.* doi:10.1128/JB.185.24.7036-7043.2003
- Siegmund, I., Wagner, F., 1991. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotechnol. Tech.* 5, 265–268. doi:10.1007/BF02438660
- Silva, E.J., Rocha e Silva, N.M.P., Rufino, R.D., Luna, J.M., Silva, R.O., Sarubbo, L.A.,

2014. Characterization of a biosurfactant produced by *Pseudomonas cepacia* CCT6659 in the presence of industrial wastes and its application in the biodegradation of hydrophobic compounds in soil. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 117. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.02.012
- Singh, A.K., Rautela, R., Cameotra, S.S., 2014. Substrate dependent in vitro antifungal activity of *Bacillus* sp strain AR2. *Microb. Cell Fact.* 13, 67. doi:10.1186/1475-2859-13-67
- Singh, G.B., Gupta, S., Gupta, N., 2013. Carbazole degradation and biosurfactant production by newly isolated *Pseudomonas* sp. strain GBS.5. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 84, 35–43. doi:10.1016/j.ibiod.2013.05.022
- Sinnaeve, D., Hendrickx, P.M.S., Van Hemel, J., Peys, E., Kieffer, B., Martins, J.C., 2009a. The solution structure and self-association properties of the cyclic lipodepsipeptide pseudodesmin support its pore-forming potential. *Chem. - A Eur. J.* 15, 12653–12662. doi:10.1002/chem.200901885
- Sinnaeve, D., Michaux, C., Van hemel, J., Vandekerckhove, J., Peys, E., Borremans, F.A.M., Sas, B., Wouters, J., Martins, J.C., 2009b. Structure and X-ray conformation of pseudodesmins A and B, two new cyclic lipodepsipeptides from *Pseudomonas* bacteria. *Tetrahedron* 65, 4173–4181. doi:10.1016/j.tet.2009.03.045
- Sorensen, K.N., Kim, K.H., Takemoto, J.Y., 1996. In vitro antifungal and fungicidal activities and erythrocyte toxicities of cyclic lipodepsinonapeptides produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*? *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 2710–2713.
- Stachelhaus, T., Marahiel, M.A., 1995. Modular structure of peptide synthetases revealed by dissection of the multifunctional enzyme GrsA. *J. Biol. Chem.* 270, 6163–6169. doi:10.1074/jbc.270.11.6163
- Stein, D.B., Linne, U., Marahiel, M.A., 2005. Utility of epimerization domains for the redesign of nonribosomal peptide synthetases. *FEBS J.* 272, 4506–4520. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04871.x
- Stuible, H.P., Meier, S., Schweizer, E., 1997. Identification, isolation and biochemical characterization of a phosphopantetheine:protein transferase that activates the two type-I fatty acid synthases of *Brevibacterium ammoniagenes*. *Eur. J. Biochem.* 248, 481–487. doi:10.1111/j.1432-1033.1997.00481.x
- Sudo, T., Zhao, X., Wakamatsu, Y., Shibahara, M., Nomura, N., Nakahara, T., Suzuki, A., Kobayashi, Y., Jin, C., Murata, T., Yokoyama, K.K., 2000. Induction of the differentiation of human HL-60 promyelocytic leukemia cell line by succinoyl trehalose lipids. *Cytotechnology* 33, 259–264. doi:10.1023/A:1008137817944
- Suk, W.-S., Hong-Joo, S., Geon, L., Sang-Joon, L., 1999. Purification and Characterization of Biosurfactants Produced by *Pseudomonas* sp. SW1.
- Tayeb, L.A., Lefevre, M., Passet, V., Diancourt, L., Brisse, S., Grimont, P.A.D., 2008. Comparative phylogenies of Burkholderia, Ralstonia, Comamonas, Brevundimonas and related organisms derived from rpoB, gyrB and rrs gene sequences. *Res. Microbiol.* 159, 169–177. doi:10.1016/j.resmic.2007.12.005

- Tiehm, A., 1994. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 258–263.
- Tuleva, B., Christova, N., Jordanov, B., Nikolova-Damyanova, B., Petrov, P., 2005. Naphthalene degradation and biosurfactant activity by *Bacillus cereus* 28BN. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 60, 577–582.
- Ui, H., Miyake, T., Iinuma, H., Imoto, M., Naganawa, H., Hattori, S., Hamada, M., Takeuchi, T., Umezawa, S., Umezawa, K., 1997. Pholipeptin, a novel cyclic lipoundecapeptide from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Org. Chem.* 62, 103–108. doi:10.1021/jo9603993
- Urum, K., Pekdemir, T., 2004. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. *Chemosphere* 57, 1139–1150. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.07.048
- Uzoigwe, C., Burgess, J.G., Ennis, C.J., Rahman, P.K.S.M., 2015. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Front. Microbiol.* doi:10.3389/fmicb.2015.00245
- van Ginkel, C.G., 1996. Complete degradation of xenobiotic surfactants by consortia of aerobic microorganisms. *Biodegradation* 7, 151–164. doi:10.1007/BF00114627
- Van Hamme, J.D., Singh, A., Ward, O.P., 2006. Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnol. Adv.* doi:10.1016/j.biotechadv.2006.08.001
- Vater, J., Kablitz, B., Wilde, C., Franke, P., Mehta, N., Cameotra, S.S., 2002. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated. *Appl. Environ. Microbiol.* doi:10.1128/AEM.68.12.6210
- Vollenbroich, D., Pauli, G., Özel, M., Vater, J., 1997. Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 44–49.
- Walsh, C.T., Gehring, A.M., Weinreb, P.H., Quadri, L.E.N., Flugel, R.S., 1997. Post-translational modification of polyketide and nonribosomal peptide synthases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1, 309–315. doi:10.1016/S1367-5931(97)80067-1
- Walter, V., Syldatk, C., Hausmann, R., 2010. Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. *Adv. Exp. Med. Biol.* 672, 1–13. doi:10.1007/978-1-4419-5979-9_1
- Wang, S., Mulligan, C.N., 2004. An evaluation of surfactant foam technology in remediation of contaminated soil. *Chemosphere.* doi:10.1016/j.chemosphere.2004.08.019
- Weekers, F., Jacques, P., Springael, D., Mergeay, M., Diels, L., Thonart, P., 1999. Improving the catabolic functions of desiccation-tolerant soil bacteria. *Appl. Biochem. Biotechnol. - Part A Enzym. Eng. Biotechnol.* 77–79, 251–266.
- Wei, Y.H., Lai, C.C., Chang, J.S., 2007. Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Process Biochem.* 42, 40–45. doi:10.1016/j.procbio.2006.07.025
- Wei, Y.H., Lai, H.C., Chen, S.Y., Yeh, M.S., Chang, J.S., 2004. Biosurfactant production by

- Serratia marcescens SS-1 and its isogenic strain SM Δ R defective in SpnR, a quorum-sensing LuxR family protein. *Biotechnol. Lett.* 26, 799–802.
doi:10.1023/B:BILE.0000025881.95596.23
- Weng, W., Yang, F., Elsherbeni, A.Z., 2007. Taguchi ' s Method : A Novel Optimization Technique in Electromagnetics. *IEEE Trans. Antennas Propag.* 55, 723–730.
doi:10.1109/TAP.2007.891548
- Willumsen, P.A., Karlson, U., 1997. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation* 7, 415–423.
doi:10.1007/BF00056425
- Wilson Quail, J., Ismail, N., Soledade, M., Pedras, C., Boyetchko, S.M., 2002. Pseudophomins A and B, a class of cyclic lipodepsipeptides isolated from a *Pseudomonas* species. *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.* 58, o268–o271.
doi:10.1107/S0108270102004432
- Yakimov, M.M., Fredrickson, H.L., Timmis, K.N., 1996. Effect of heterogeneity of hydrophobic moieties on surface activity of lichenysin A, a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus licheniformis* BAS50. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 23 (Pt 1), 13–8.
doi:10.1111/j.1470-8744.1996.tb00358.x
- Yeh, M.S., Wei, Y.H., Chang, J.S., 2005. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by addition of solid carriers. *Biotechnol. Prog.* 21, 1329–1334.
doi:10.1021/bp050040c
- Youssef, N.H., Duncan, K.E., Nagle, D.P., Savage, K.N., Knapp, R.M., McInerney, M.J., 2004. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *J. Microbiol. Methods* 56, 339–347. doi:10.1016/j.mimet.2003.11.001
- Zachariah, P., Liston, J., 1973. Temperature adaptability of psychrotrophic *Pseudomonas*. *Appl. Microbiol.* 26, 437–8.
- Zhang, Y., Miller, R.M., 1994. Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2101–2106.
- Zhao, F., Shi, R., Zhao, J., Li, G., Bai, X., Han, S., Zhang, Y., 2015. Heterologous production of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid under anaerobic conditions for microbial enhanced oil recovery. *J. Appl. Microbiol.* 118, 379–389. doi:10.1111/jam.12698
- Zhao, P., Quan, C., Jin, L., Wang, L., Wang, J., Fan, S., 2013. Effects of critical medium components on the production of antifungal lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 exhibiting excellent biosurfactant properties. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 401–409. doi:10.1007/s11274-012-1180-5

Annexes

Annexe 1

N EXP	source Carbone	Acide Aminé	Extrait de levure	Cations	Azote
1	Glycérol	Leucine	sans	Mg ²⁺	Acide glutamique
2	Succinate	Leucine	sans	Mg ²⁺	Acide glutamique
3	Glucose	Valine	sans	Mg ²⁺	Acide glutamique
4	Glucose	Leucine	avec	Mg ²⁺	Acide glutamique
5	Succinate	Valine	avec	Mg ²⁺	Acide glutamique
6	Glucose	Leucine	sans	Zn ²⁺	Acide glutamique
7	Succinate	Valine	sans	Zn ²⁺	Acide glutamique
8	Succinate	Leucine	avec	Zn ²⁺	Acide glutamique
9	Glycérol	Valine	avec	Zn ²⁺	Acide glutamique
10	Glycérol	Leucine	sans	Mn ²⁺	Acide glutamique
11	Glycérol	Valine	sans	Mn ²⁺	Acide glutamique
12	Succinate	Valine	sans	Mn ²⁺	Acide glutamique
13	Glycérol	Leucine	avec	Mn ²⁺	Acide glutamique
14	Glucose	Valine	avec	Mn ²⁺	Acide glutamique
15	Glucose	Leucine	sans	Mg ²⁺	Tryptone
16	Succinate	Valine	sans	Mg ²⁺	Acide glutamique
17	Succinate	Leucine	avec	Mg ²⁺	Tryptone
18	Glycérol	Valine	avec	Mg ²⁺	Tryptone
19	Succinate	Leucine	sans	Zn ²⁺	Tryptone
20	Glycérol	Valine	sans	Zn ²⁺	Tryptone
21	Glycérol	Leucine	avec	Zn ²⁺	Tryptone
22	Glucose	Valine	avec	Zn ²⁺	Tryptone
23	Succinate	Valine	avec	Zn ²⁺	Tryptone
24	Glycérol	Leucine	sans	Mn ²⁺	Tryptone
25	Glucose	Valine	sans	Mn ²⁺	Tryptone
26	Glucose	Leucine	avec	Mn ²⁺	Tryptone
27	Succinate	Leucine	avec	Mn ²⁺	Tryptone
28	Glycérol	Valine	avec	Mn ²⁺	Tryptone
29	Glucose	Leucine	sans	Mg ²⁺	KNO ₃
30	Glycérol	Valine	sans	Mg ²⁺	KNO ₃
31	Succinate	Valine	sans	Mg ²⁺	KNO ₃
32	Glycérol	Leucine	avec	Mg ²⁺	KNO ₃
33	Glucose	Valine	avec	Mg ²⁺	KNO ₃
34	Glycérol	Leucine	sans	Zn ²⁺	KNO ₃
35	Glucose	Valine	sans	Zn ²⁺	KNO ₃
36	Glucose	Leucine	avec	Zn ²⁺	KNO ₃
37	Succinate	Leucine	avec	Zn ²⁺	KNO ₃
38	Glycérol	Valine	avec	Zn ²⁺	KNO ₃
39	Succinate	Leucine	sans	Mn ²⁺	KNO ₃
40	Glucose	Valine	sans	Mn ²⁺	KNO ₃
41	Glycérol	Leucine	avec	Mn ²⁺	KNO ₃
42	Succinate	Valine	avec	Mn ²⁺	KNO ₃
43	Glucose	Leucine	sans	Mn ²⁺	Acide glutamique
44	Glucose	Valine	avec	Mn ²⁺	Acide glutamique
45	Succinate	Valine	sans	Mg ²⁺	Tryptone
46	Glycérol	Valine	avec	Mg ²⁺	Tryptone

Annexe 2

Exp No	oligo1	oligo2	AA1	AA2	AA3
1	Co	Mo	Gln	His	Phe
2	Cu	Fe	Gln	His	Phe
3	Ca	Mo	Lys	His	Phe
4	Ca	I	Lys	His	Phe
5	Cu	Mo	Thr	His	Phe
6	Ca	Fe	Thr	His	Phe
7	Ca	Mo	Gln	Pro	Phe
8	Co	I	Gln	Pro	Phe
9	Co	Mo	Lys	Pro	Phe
10	Ca	Fe	Lys	Pro	Phe
11	Co	Fe	Thr	Pro	Phe
12	Cu	I	Thr	Pro	Phe
13	Cu	Mo	Gln	Ser	Phe
14	Ca	I	Gln	Ser	Phe
15	Co	Fe	Lys	Ser	Phe
16	Cu	I	Lys	Ser	Phe
17	Ca	Mo	Thr	Ser	Phe
18	Cu	Fe	Thr	Ser	Phe
19	Co	I	Thr	Ser	Phe
20	Ca	Mo	Gln	His	Try
21	Co	I	Gln	His	Try
22	Co	Mo	Lys	His	Try
23	Ca	Fe	Lys	His	Try
24	Cu	I	Lys	His	Try
25	Cu	Fe	Thr	His	Try
26	Co	Mo	Gln	Pro	Try
27	Ca	Fe	Gln	Pro	Try
28	Cu	Mo	Lys	Pro	Try
29	Co	Fe	Lys	Pro	Try
30	Ca	I	Lys	Pro	Try
31	Ca	Mo	Thr	Pro	Try
32	Co	I	Thr	Pro	Try
33	Co	Fe	Gln	Ser	Try
34	Cu	I	Gln	Ser	Try
35	Ca	Mo	Lys	Ser	Try
36	Cu	Fe	Lys	Ser	Try
37	Co	I	Lys	Ser	Try
38	Co	Mo	Thr	Ser	Try
39	Ca	I	Thr	Ser	Try
40	Cu	Mo	Gln	His	Arg
41	Ca	Fe	Gln	His	Arg
42	Cu	Fe	Lys	His	Arg
43	Co	I	Lys	His	Arg
44	Ca	Mo	Thr	His	Arg
45	Co	Fe	Thr	His	Arg

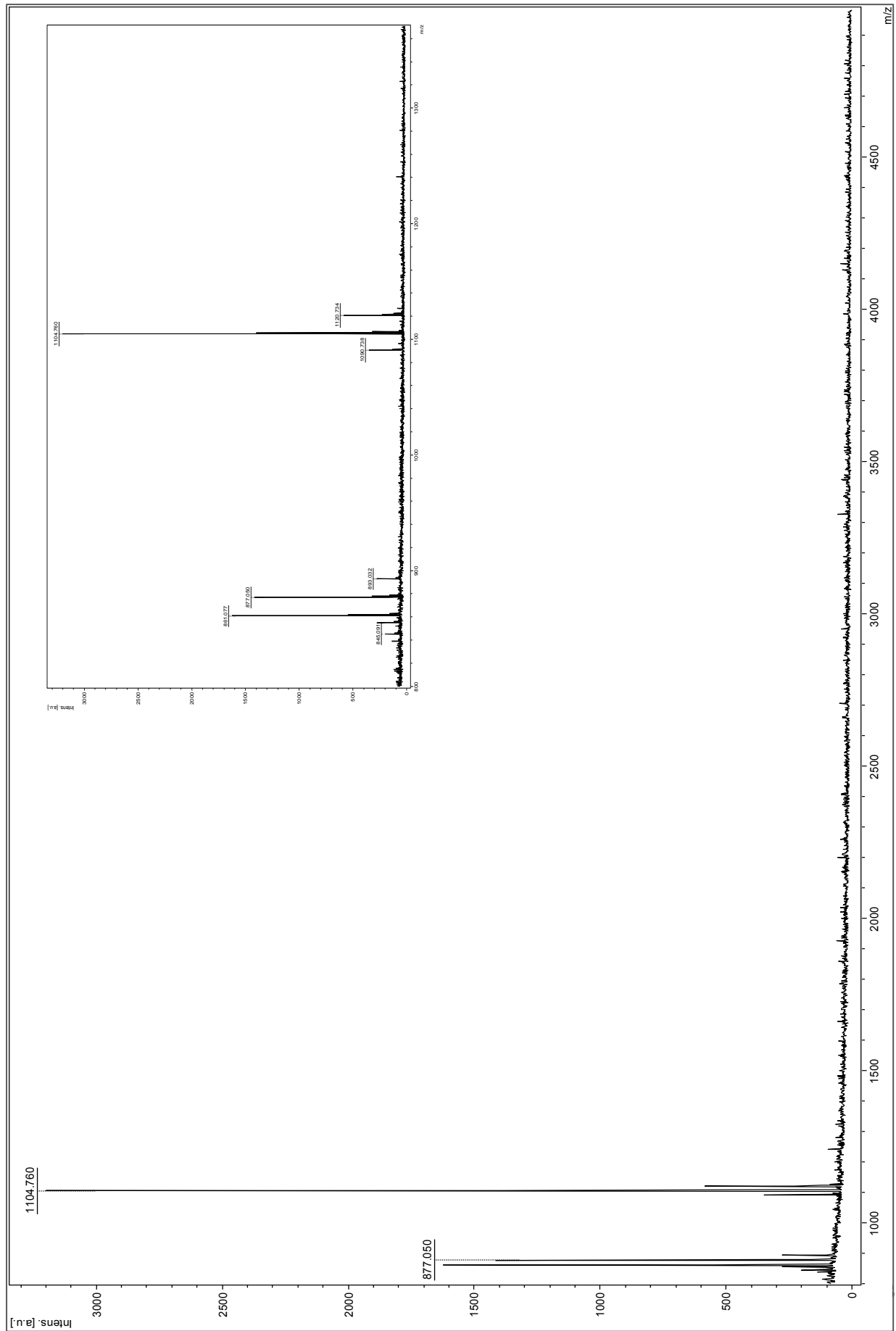
46	Cu	I	Thr	His	Arg
47	Co	Fe	Gln	Pro	Arg
48	Cu	I	Gln	Pro	Arg
49	Ca	Mo	Lys	Pro	Arg
50	Co	I	Lys	Pro	Arg
51	Co	Mo	Thr	Pro	Arg
52	Cu	Fe	Thr	Pro	Arg
53	Ca	I	Thr	Pro	Arg
54	Ca	Mo	Gln	Ser	Arg
55	Cu	Fe	Gln	Ser	Arg
56	Co	I	Gln	Ser	Arg
57	Co	Mo	Lys	Ser	Arg
58	Ca	I	Lys	Ser	Arg
59	Cu	Mo	Thr	Ser	Arg
60	Ca	Fe	Thr	Ser	Arg

Annexe 3

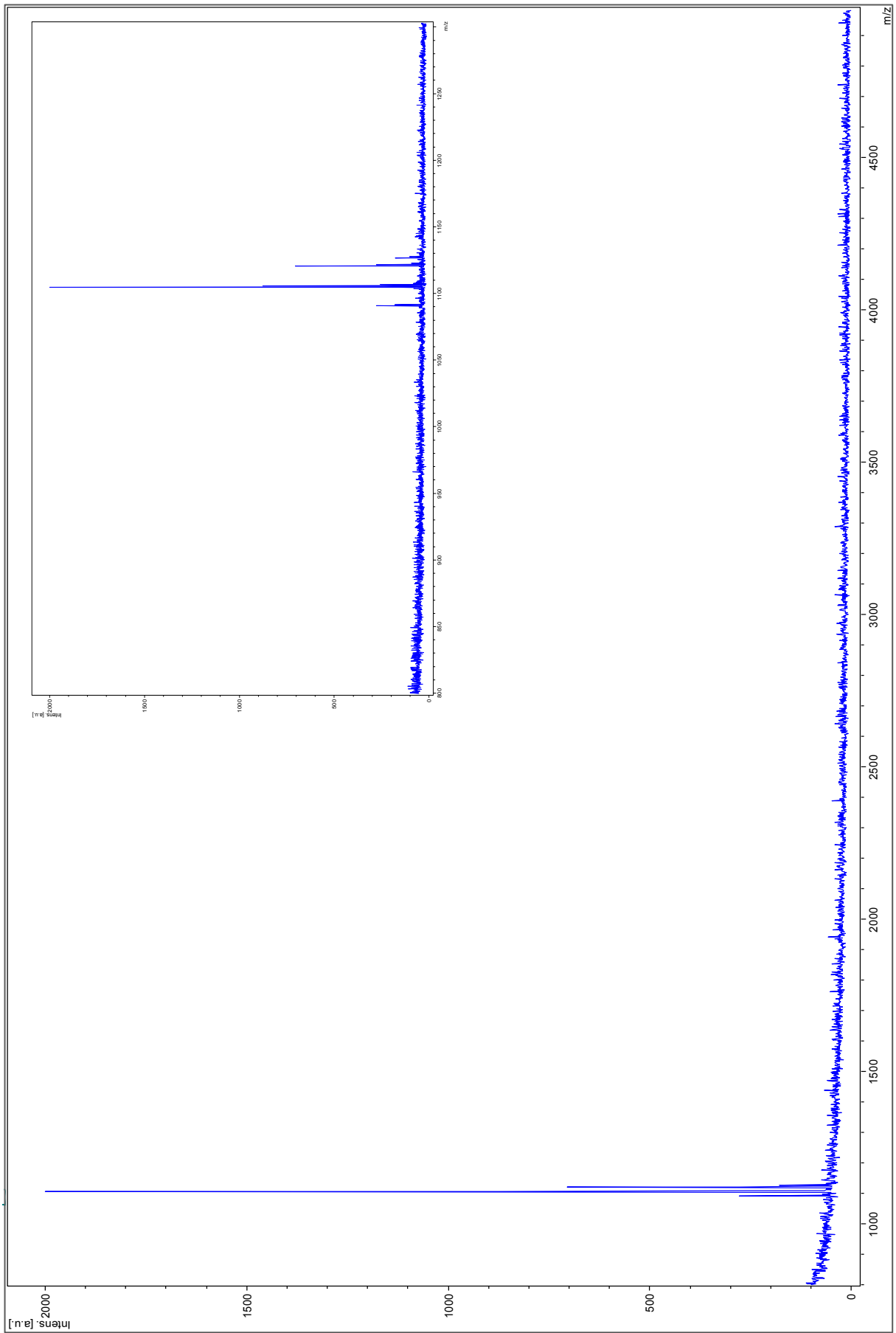
Exp	glucose	A.glutamique	Mg2+	valine	ca	sérine	DO	Aire
1	7	4	0,5	1,2	0,005	1,2	4,37	1125539
2	14	4	0,5	1,2	0,005	2	6,23	728414
3	7	7	0,5	1,2	0,005	2	4,25	383563
4	14	7	0,5	1,2	0,005	1,2	4,72	423694
5	7	4	1	1,2	0,005	2	2,14	2176930
6	14	4	1	1,2	0,005	1,2	2,27	2645853
7	7	7	1	1,2	0,005	1,2	1,29	2171320
8	14	7	1	1,2	0,005	2	3,33	2907081
9	7	4	0,5	2	0,005	2	4,01	1214645
10	14	4	0,5	2	0,005	1,2	3,87	978706
11	7	7	0,5	2	0,005	1,2	3,21	406047
12	14	7	0,5	2	0,005	2	3,78	652205
13	7	4	1	2	0,005	1,2	1,64	1899800
14	14	4	1	2	0,005	2	2,93	1236803
15	7	7	1	2	0,005	2	1,84	1176029
16	14	7	1	2	0,005	1,2	1,39	558013
17	7	4	0,5	1,2	0,015	2	1,61	851316
18	14	4	0,5	1,2	0,015	1,2	4,57	819323
19	7	7	0,5	1,2	0,015	1,2	2,93	664065
20	14	7	0,5	1,2	0,015	2	4,58	619146
21	7	4	1	1,2	0,015	1,2	2,46	2839507
22	14	4	1	1,2	0,015	2	1,76	2406000
23	7	7	1	1,2	0,015	2	1,83	986823
24	14	7	1	1,2	0,015	1,2	1,98	995025
25	7	4	0,5	2	0,015	1,2	4,68	903685
26	14	4	0,5	2	0,015	2	4,03	751395
27	7	7	0,5	2	0,015	2	2,04	828082
28	14	7	0,5	2	0,015	1,2	2,89	684219
29	7	4	1	2	0,015	2	3,71	1706032
30	14	4	1	2	0,015	1,2	1,89	1769553
31	7	7	1	2	0,015	1,2	2,54	843819
32	14	7	1	2	0,015	2	2,57	945577
33	2,177	5,5	0,75	1,6	0,01	1,6	2,44	702028
34	18,823	5,5	0,75	1,6	0,01	1,6	3,94	814253
35	10,5	1,933	0,75	1,6	0,01	1,6	3,48	796159
36	10,5	9,067	0,75	1,6	0,01	1,6	6,17	1470460
37	10,5	5,5	0,1555	1,6	0,01	1,6	5,4	1975957
38	10,5	5,5	1,3445	1,6	0,01	1,6	5,2	1290876
39	10,5	5,5	0,75	0,6488	0,01	1,6	5,21	819010
40	10,5	5,5	0,75	2,5512	0,01	1,6	7,29	1365185
41	10,5	5,5	0,75	1,6	0	1,6	5,59	1224665
42	10,5	5,5	0,75	1,6	0,02189	1,6	5,28	1114938
43	10,5	5,5	0,75	1,6	0,01	0,6488	3,64	1450119
44	10,5	5,5	0,75	1,6	0,01	2,5512	4,96	1601809
45	10,5	5,5	0,75	1,6	0,01	1,6	3,36	2269342
46	10,5	5,5	0,75	1,6	0,01	1,6	3	1327750
47	10,5	5,5	0,75	1,6	0,01	1,6	3,62	812526

Annexe 4:

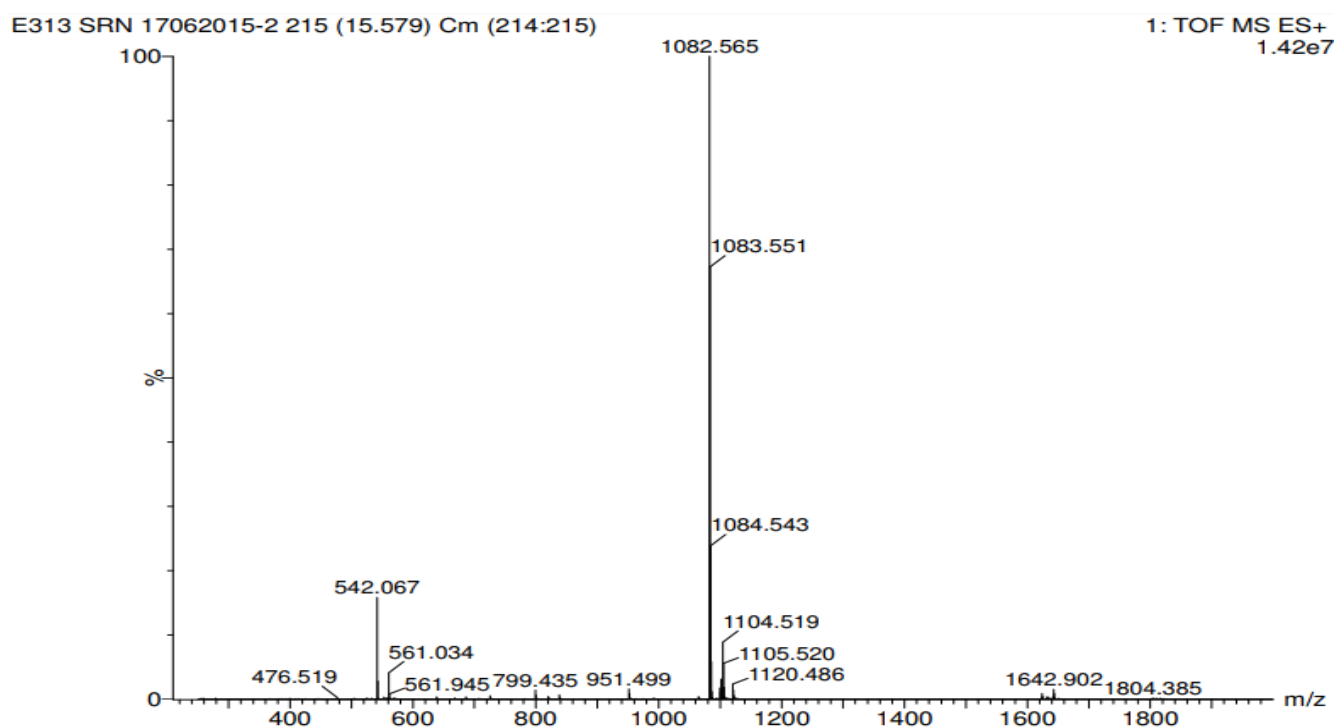
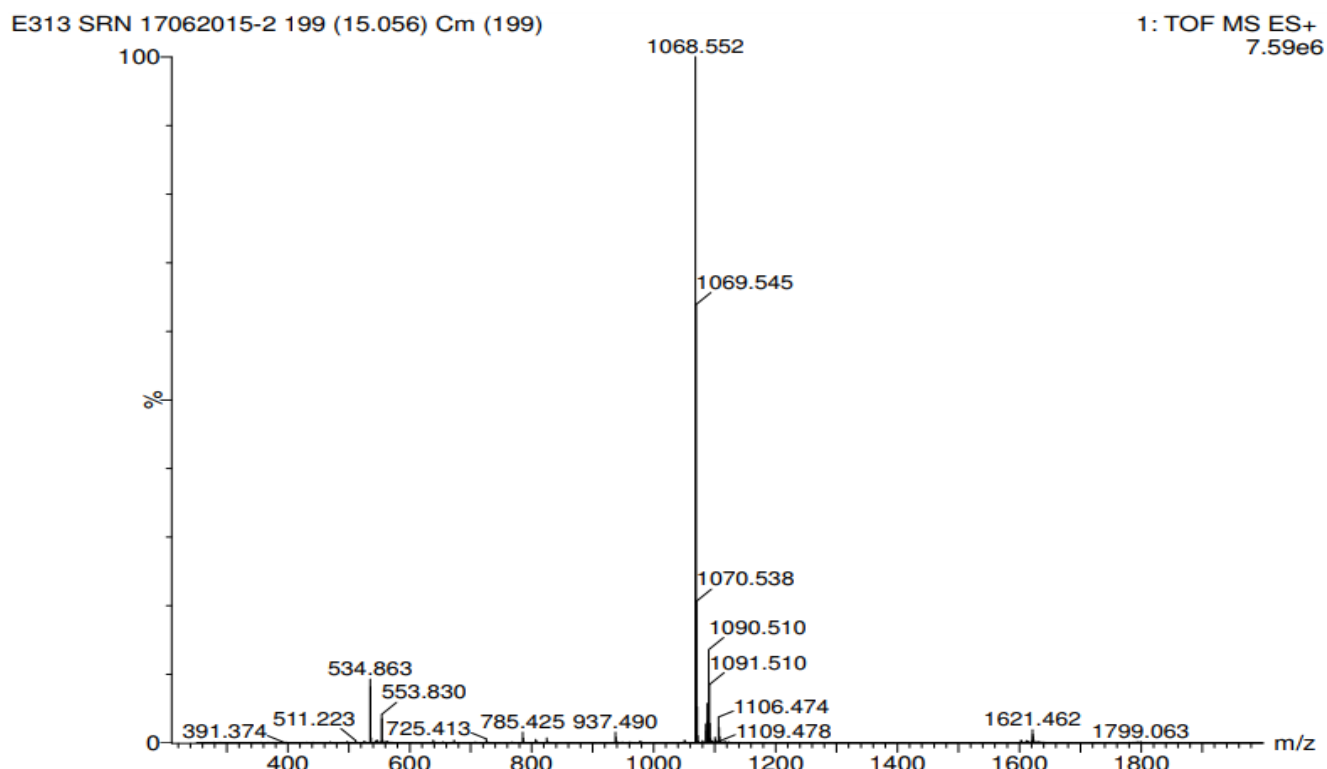
Filtrat 5 kDa



Filtrat 10 kDa



Annexe 5



Biosurfactant and bioemulsifying activities of syringafactin producing *Pseudomonas* spp. strains isolated from oil contaminated soils

Oumaima ZOUARI^(1,2), Didier LECOUTURIER^{(1)*}, Alice ROCHEX⁽¹⁾, Gabrielle CHATAIGNE⁽¹⁾, Pascal DHULSTER⁽¹⁾, Philippe JACQUES^(1,3), Dhouha GHRIBI⁽²⁾

(1) Univ. Lille, INRA, ISA, Univ. Artois, Univ. Littoral Côte d'Opale, EA 7394 - ICV - Institut Charles Viollette, F-59000 Lille, France

(2) Unit of Enzyme and bioconversion, National School of Engineers, Soukra road 3038. Sfax - Tunisia

(3) TERRA Teaching and Research Center, Microbial Processes and Interactions, Gembloux AgroBio Tech Liege University, B-5030 Gembloux, Belgium

*Corresponding Author: Mailing address: ProBioGEM, Polytech Lille, Université Lille 1 Sciences et Technologies, Avenue Paul Langevin, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

Phone : + 33 6 48 93 90 10 Fax : + 33 3 28 76 73 56.

E-mail : Didier.lecouturier@univ-lille1.fr

Abstract:

Pseudomonas strains isolated from oil contaminated soils were screened for potential biosurfactant production. Three out of eleven *Pseudomonas* isolates were selected for their ability to reduce pure water surface tension (from 72 mN.m⁻¹ to values ranging between 29.9 and 34 mN.m⁻¹) and for their high emulsifying activity (E24 value on n-hexadecane ~78%). These isolates (E39, E311 and E313) were identified as members of the *P. putida* group using phenotypical methods and a molecular approach by rRNA 16S sequencing. To identify the chemical nature of produced biosurfactants, thin layer chromatography (TLC) and MALDI-ToF mass spectrometry analysis were carried out. The obtained revealed the presence of lipopeptides belonging to the syringafactin family with eventually a new variant of these molecules. The applicability of biosurfactants was evaluated under extreme environmental conditions. Thus the activity of biosurfactants was stable over a pH range of 6-12, at high salinity (10 %) and after heating at 80°C. The potential of syringafactin producing strains to remove diesel was tested in contaminated soil micro-bioreactors. This experience revealed that the three biosurfactant producing strains were able to degrade diesel in a contaminated sand. These results suggest the prospective applicability of these biosurfactants in hydrocarbon bioremediation.

Key words: *Pseudomonas*, biosurfactant, bioemulsifier, lipopeptide, biodegradation

1 Introduction

Surfactants are amphiphilic chemical compounds, i. e. they contain both hydrophobic and hydrophilic groups, that accumulate preferentially at the interface between fluid phases with different degrees of polarity and hydrogen bonding such as oil/water or air/water interfaces. They are used industrially as emulsifiers, wetting, dispersing and foaming agents. Microbial

surfactants, known as biosurfactants, are produced by diverse microorganisms such as bacteria, fungi and yeasts, and are structurally diverse (Desai and Banat, 1997; Karanth et al., 1999; Lang, 2002; Mulligan, 2005). They are grouped into low molecular weight compounds including glycolipids, lipopeptides and phospholipids, and into high molecular weight polymers including proteins, lipoproteins, polysaccharides and lipopolysaccharides (Ron and Rosenberg, 2002).

In comparison to synthetic surfactants, biosurfactants offer several advantages mainly due to their high biodegradability, which makes them more eco-friendly. Furthermore, some of these molecules have a good stability on extreme conditions of pH, temperature and salinity (Marchant and Banat, 2012). These properties render them appropriate for many application fields such as polluted soils bioremediation (Cameotra and Makkar 2010; Pacwa-Płociniczak et al., 2011), agriculture (Sachdev and Cameotra, 2013), food industry (Campos et al., 2013), and animal and human health (Cameotra and Makkar, 2004; Rodrigues et al., 2006).

Pseudomonas spp. are well-known for their ability to produce biosurfactants mainly rhamnolipids and lipopeptides (Mulligan, 2005). Rhamnolipids, glycolipids which consist of one or two molecules of rhamnose linked to one, two or three molecules of β -hydroxyfatty acid (Abdel-Mawgoud et al., 2010), are some of the best studied biosurfactants. Lipopeptides are powerful biosurfactants that are composed of a lipid tail linked to a short linear or cyclic oligopeptide. They are structurally very diverse, depending on the configuration, type and number of the amino acids in the peptide the composition and on the length of the fatty acid. They are divided into several families: the majors are viscosin, amphisin, orfamide, putisolvin, tolaasin, entolysin, syringopeptin, syringomycin and syringafactin families (Raaijmakers et al., 2010; Roongsawang et al., 2011). Rhamnolipids and lipopeptides are implicated in many important bacterial functions, including antimicrobial activity, swarming motility, attachment and biofilm formation, and effect on bioavailability allowing the solubilisation of insoluble

compounds by increasing wettability and emulsification of water. Biosurfactants can also protect cells from toxic compounds and heavy metals by encapsulating them into micelles (D'aes et al., 2010; Ron and Rosenberg, 2001; Van Hamme et al., 2006). Biosurfactant producing *Pseudomonas* are commonly found in different environments including soil and the rhizosphere (Fechtner et al., 2011), particularly in hydrocarbon-contaminated soils where they facilitate hydrocarbon degradation (Bento et al., 2005; Bodour et al., 2003; D'aes et al., 2010; Mohammed et al., 2015; Saikia et al., 2012) and on plants where they can be beneficial or harmful for their host (D'aes et al., 2010). For these reasons, *Pseudomonas* are good candidates for discovering new biosurfactants. The present study aimed to screen *Pseudomonas* spp. strains isolated from hydrocarbon contaminated soil for their potential to produce biosurfactants/bioemulsifiers. The most potent isolates were tested for application in diesel biodegradation.

2 Materials and Methods

2.1 Isolation of *Pseudomonas* strains

Bacterial colonies were isolated from an oil-contaminated soil from an auto-mechanical workshop, in the area of Sfax, Tunisia. 500 g of soil samples were collected from the surface, at 5 cm and 10 cm of depth. 1 g of each sample was mixed with 10 ml physiological water by vortexing for 10 minutes; then several dilutions were prepared on physiological water, spread on an LB agar medium and incubated at 30°C for 24 h. Colonies were selected on the basis of colony morphology, transferred separately on cetrimid agar a selective medium for *Pseudomonas* isolation, and incubated at 30°C for 24 h. *Pseudomonas* bacteria were preserved on cryotubes containing 40% of glycerol solution and stored at -20°C for short preservation and -80°C for long preservation.

2.2 Bacterial growth conditions and cell-free supernatant preparation

Colony growth was performed on Tryptic Soy Agar plates streaked with frozen stocked cells at a temperature of 30°C for 24 h. Liquid culture was performed in Tryptic Soy Broth (pancreatic digest of casein 17 g.L⁻¹; peptic digest of soybean meal 3 g.L⁻¹; D-glucose 2.5 g.L⁻¹; sodium chloride 5 g.L⁻¹; di-potassium hydrogen phosphate 2.5 g.L⁻¹) at 30°C for 72 h with shaking on 160 rpm. A 10 mL pre-culture was inoculated with an isolated colony after 24 h of incubation. Then, 0.1 mL of the 24h pre-culture served to inoculate a 100 mL culture which was incubated in the same conditions for 48 hours. Broth culture was centrifuged for 10 min at 10,000 x g. The obtained supernatant was sterilized through a 0.22 µm Millipore PES filter membrane and stored at 4°C for biological tests.

2.3 Preparation of crude extract of biosurfactants

Biosurfactants were precipitated overnight at 4°C by adding HCl (6M) to the free cell supernatant to a pH of 2 (Cooper and Goldenberg, 1987; Peypoux et al., 1999). The mixture was centrifuged at 10,000 x g for 20 min and then the pellet was resuspended in ultrapure water. Finally, the pH was adjusted to 7 with NaOH (1M) and the crude extract was lyophilized using a Heto Power Dry PL 9000 freeze-dryer (Jouan Nordic, Allerød, Denmark), according to the following steps: 1 h at -30°C, 5 h at -10°C, 5 h at 0°C, 5 h at 20°C, 5 h at 35°C. Freeze-drying was carried out under a residual pressure of 15 mbar. For utilization, lyophilized crude extract was then solubilized in ultrapure water so that to obtain the adequate concentrations (1% or 0.1% w/v) and stored at 4°C.

2.4 Screening for biosurfactant production

2.4.1 Drop collapse test

To identify biosurfactant-producing strains, a drop collapsing test was carried out according to Bodour and Miller-Maier, 1998. 2 µl of paraffin oil was added to each well of a 96-well microliter plate and allowed to equilibrate for 1 h at room temperature. Then, 5 µl of cell-free supernatant of *Pseudomonas spp.* isolates were added on oil surface. The result was observed

after 1 min. The cultures which gave flat drops were scored as positive, while the cultures that gave rounded drops which pointed-out a deficiency of biosurfactant production were scored as negative.

2.4.2 *Surface tension and F_{CMC} measurement*

The surface tension was measured on cell-free supernatants and on the crude extracts of *Pseudomonas spp.* isolates using a tensiometer (TD1 LAUDA, Lauda-Königshofen, Germany) according to the Du Noüy ring method. Pure water was used as control, giving a surface tension value of 72 mN/m. Critical micelle concentration (CMC) is specified as the concentration at which the micelle formation is initiated in the solution containing the amphiphilic compound. CMC represents the intersection of linear component of the curve drawn between the surface tension and the biosurfactant concentration. In our case, surface tension measurements were performed on seven different dilutions of supernatants in ultrapure water: 1/20; 1/10; 1/5; 1/4; 1/2; 1 at room temperature which provides the dilution of the supernatant at which the CMC is reached (Chakraborty et al., 2011). The F_{CMC} value is determined as an indirect estimation of the CMC by the determination of dilution value where there was a sharp rise in the surface tension (Cooper and Zajic, 1980).

2.4.3 *Oil displacement test*

This assay was performed according to Morikawa et al. (2000). 40 ml of distilled water were placed on the surface of a large Petri dish with 150 mm in diameter, followed by adding 15 μ l of crude oil (diesel) on the water surface, and 20 μ l of the isolate culture supernatants on the centre of the oil film. Then, the diameter of the clear halo visualized under visible light was measured after 30 sec. If biosurfactants are present, the oil will be displaced resulting in an oil free clearing zone. A larger diameter of oil depicts a higher activity of biosurfactant.

2.4.4 *Emulsion index determination*

Emulsifying activity was measured according to the Cooper and Goldenberg (1987) method. 4 ml of biosurfactant crude extract were mixed with 4 ml of n-hexadecane and vortexed at high speed for 2

min. The mixture was allowed to stand for 24 h before measurement and the emulsion index was defined as follows:

$$E24(\%) = \frac{\text{height of emulsion layer}}{\text{total height}} \times 100$$

2.5 *Identification of bacterial strains*

To characterise the phenotypic properties of isolated strains, tests including morphological characterisation, Gram staining, oxidase activity and carbohydrate fermentation profile determined by API 20 NE tests (Biomérieux; Marcy l'Etoile, France) were performed. Each fermentation profile was processed by the APIWEB software database for identification. Genotypic characterisation was performed as follows. Genomic DNA was isolated from a one-night bacterial culture using the Wizard Genomic Purification DNA Kit (Promega Corp., Madison, WI, USA) following the prescribed standard protocol.). The whole 16S rRNA gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using primers S1 (5-AGAGTTTGATC(A,C)TGGCTCAG-3) and S2 (5-GG(A,C)TACCTTGTTACGA(T,C)TTC-3). The PCR reaction was performed with the following mixture: 5 µl of extracted genomic DNA (200 ng/µl), 2.5 µl of each primer (20 mM), 25 µl of PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific Fermentas, Vilnius, Lithuania) and ddH₂O were mixed up to a final volume of 50 µl. PCR thermal cycling was carried out using a thermal cycler as follows: a first denaturation of the DNA at 94°C for 3 min, than 30 cycles of denaturation at 94°C for 40 s, primer annealing at 55°C for 50 s, and primer synthesis step at 72°C for 12 min. The PCR products were subjected to agarose gel electrophoresis and purified using a QIA quick DNA gel purification kit (Qiagen, Hilden, Germany). Then, purified PCRs were introduced into *Escherichia coli* JM109 using the pGEMT Easy vector kit (Promega Corp). Transformed cells were selected on Luria Bertani (LB) solid medium supplemented with 100 µg⁻¹ of ampicillin. Plasmids were isolated from transformant colonies using QIAprep plasmid extraction kit protocol (Qiagen). Restriction endonuclease analysis of the plasmids was carried-out using EcoRI (Thermo Fisher Scientific

Fermentas). Cloned products were sequenced and analysed as above. The sequencing of resulting cloned product was performed by the Custom Sequencing Service of Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany) based on cycle sequencing technology on ABI PRISM 3730XL. Two sequencing reactions generating both forward and reverse sequences were required to cover the length of the 16S rRNA gene. Sequences were trimmed and assembled as previously described (El Arbi et al., 2016). The 16S rRNA gene sequences obtained from the isolate E39, E311 and E313 were compared with other bacterial sequences using NCBI mega BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) for their pairwise identities. Then, the phylogenetic tree was constructed by using MEGA 7.0 software using neighbour-joining method. All sequences were submitted to the GenBank database [accession numbers: MG183696 (E39), MG183695 (E311), and MG188738 (E313)].

2.6 *Thin Layer Chromatography*

The type of biosurfactant was preliminary determined by using a thin layer chromatography (TLC) analysis. A volume of 40 μ l of crude biosurfactant extracted from E39, E311 and E313 strains supernatant was spotted into three silica gel plates (F-254; Fisher) using CAMAG automatic TLC sampler. Samples were developed using CHCl_3 : CH_3OH : H_2O (65:15:2. v/v/v) as a mobile phase. Then the plates were air-dried, sprayed with standard reagents and heated at 105°C during 5 min. Ninhydrin reagent (0.5 g ninhydrin + 100 mL acetone) was used for peptide detection and anthrone reagent (1 g anthrone + 5 mL sulphuric acid + 95 mL ethanol) for sugar detection.

2.7 *Mass spectrometry analysis*

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-ToF-MS) was used to detect the production of lipopeptides on whole cells and in liquid cultures; i. e. in the cell-free supernatant and in the biosurfactant crude extract. For whole cell analyses, an isolated colony of bacteria grown on TSA solid medium was suspended in 10 μ l of matrix

solution containing 10 mg.ml⁻¹ of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid. For liquid culture analyses, 1 μ L of supernatant or crude extract and 1 μ L of matrix solution were mixed. Then, 1 μ L of the prepared samples were spotted in a MALDI-ToF MTP 384 target plate (Bruker Daltonik GmbH, Leipzig, Germany) following the dried-droplet preparation method. Molecular mass analyses were carried out with an Ultraflex MALDI-ToF/ToF mass spectrometer (Bruker, Bremen, Germany) equipped with a smartbeam laser. The masses were measured in reflector positive mode in m/z range between 800 – 2000 Da. Analyses were conducted with an accelerating voltage of 25 kV and a deflection mode of matrix suppression at m/z 750 Da. The laser power was adjusted to around 30% to above the threshold of ionization.

2.8 *Effect of pH, temperature and salinity on biosurfactant stability*

Biosurfactant stability was studied by testing the liquid surface tension reducing activity and the emulsifying activity of the biosurfactant crude extract solution (0.1 % w/v). To test their thermal stability, the biosurfactant solution was set at constant temperatures ranging from 4 to 100°C for 24 h, and then cooled at room temperature. The pH effect was tested by adjusting the pH of the crude biosurfactant solution into a range of 2 – 12 using HCL or NaOH solutions and different buffers: 50 mmol.L⁻¹; citrate buffer (pH 3.0 – 6.0), 50 mmol.L⁻¹ phosphate buffer (pH 6.0 – 8.0), and 50 mmol L⁻¹ glycine-NaOH buffer (pH 9.0 - 12.0). The effect of salinity on the biosurfactants stability was investigated by adjusting specific concentrations of NaCl (2 – 10%, w/v) of crude biosurfactant solution. The surface tension and E24 values for each treatment were performed as described above.

2.9 *Diesel biodegradation assays*

Plastic buckets (7 cm diameter, 15 cm height) were prepared as bioreactor systems for diesel biodegrading assays for each biosurfactant producing strains. Each bioreactor contains 200 ml of sand and is spoiled with 10% (v/v) of diesel oil sterilized by filtration through a 0.2 μ m membrane and inoculated with 20 ml of an overnight bacterial culture and then thoroughly

mixed together to achieve complete artificial contamination. A positive control was also performed using *Rhodococcus erythropolis* T902.1 as reference strain (Weekers et al., 1999) as inoculum and a bioreactor fed with free bacteria culture medium was used as negative control. Bioreactors were continuously flushed by 0.3 bar air and drawn towards a perforate pipe atop the systems. Buckets were daily percolated with M9 minimal medium lacked of carbon sources and having as basis the following composition: Na_2HPO_4 6 g.L⁻¹, KH_2PO_4 3 g.L⁻¹, NaCl 0.5 g.L⁻¹, NH_4Cl 1 g.L⁻¹ and MgSO_4 0.24 g.L⁻¹. All bioreactors were incubated at 30°C for 28 days. Bioreactor contents were aerated by sand turnover every 48 hours. Diesel degradation was followed every week by collecting 1 g of contaminated s and mixing it with 2 ml of toluene solvent to measure its optical density by spectrophotometer at 420 nm according to Rahman et al. (2002). Removal percentage of total petroleum hydrocarbon (%TPH) was determined as follows:

$$\%TPH = \left(\frac{ODi - ODx}{ODi} \right) * 100$$

These experiments were carried out in triplicate.

3 Results and discussion

3.1 Isolation and screening of biosurfactant producing Pseudomonas

Totally eleven *Pseudomonas* strains were isolated on cetrimide-agar plates from samples of oil contaminated soil collected in an auto-mechanical workshop. Morphological observation of these strains showed gram negative bacilli, motile bacteria. Strains were screened for biosurfactant activity by performing drop collapsing tests, surface tension measurements and oil displacement tests on their cell-free supernatant, and emulsion index tests on their biosurfactant crude extract (1 % w/v) as these methods are commonly used to detect biosurfactant production by microorganisms (Youssef et al., 2004). Drop collapse test was first

used as a simple and rapid method. Five isolates designated by E33b, E38b, E39, E311 and E313 were positive (table 1) which indicates their potential to produce biosurfactants. Drop collapse assay results did not always correlate with the liquid surface tension reducing activity (Mohammed et al., 2015). So, supernatants of all isolated strains were assessed for their capacity to reduce surface tension (table 1). The 5 drop-collapse-positive isolates (E33b, E38b, E39, E311 and E313) showed the culture supernatants having the highest liquid surface tension reducing activity in culture supernatants, the surface tension of water was lowered to less than 35 mN.m^{-1} which is a criterion of good surfactant (Mulligan, 2005). The values we obtained were comparable to those reported for biosurfactant producing Pseudomonads, the lowest liquid surface tensions are usually observed between 24 and 31 mN.m^{-1} (Fechtner et al., 2011; Mohammed et al., 2015; Zhao et al., 2015). The surface tension of the 5 strains free cell supernatants remains stable up to the $1/4^{\text{th}}$ dilution (Fig. 1). This indicated that the concentrations of biosurfactants in all the supernatants were above their F_{CMC} value (Fig. 1). Afterwards, oil displacement and emulsification tests were carried out with the five most surface-active strains. Isolates E39, E311 and E313 performed best in all assays. Their supernatant caused a higher oil displacement. The emulsion index with n-hexadecane were the highest with these strains, $79 \pm 2\%$ for E39 and E313, and $78 \pm 2\%$ for E311. These values are higher than the emulsion index (69 ± 3) found for *Pseudomonas spp.* 2B, a rhamnolipid producing bacterium (Aparna et al., 2012), for *Pseudomonas nitroreducens* TSB.MJ10 ($\sim 58\%$) (de Sousa and Bhosle, 2012) and for the carbazole degrading *Pseudomonas spp.* strain GBS.5 (53%) (Singh et al., 2013). It was also higher than a commercial surfactant such as SDS (65%) (de Sousa and Bhosle, 2012) and biosurfactants such as surfactins produced by *Bacillus subtilis* E8 (68%) (Gong et al., 2009). The emulsions resulting from E39, E311 and E313 biosurfactant addition were stable for more than one month; this emulsion stability suggests the application

of these molecules as good emulsifier agents in industrial domains. For further characterisation, we selected the isolates E39, E311 and E313 that displayed the best emulsion index.

3.2 Identification of biosurfactant producing strains

Biosurfactant producing bacteria were identified using biochemical characterisation tests and molecular identification based on whole 16S rRNA gene sequence BLAST analysis. All the three selected strains showed positive reactions to oxidase and arginine dihydrolase. According to the API 20 NE system, E39 was identified as *Pseudomonas* spp., E311 and E313 as *P. putida*. The phylogenetic relationships of E39, E311 and E313 strains with closely related type strains of the genus *Pseudomonas* (16S rRNA gene similarity value above 97.9%) are shown on the 16S rRNA gene tree (Fig. 2). The 16S rRNA sequence of these three strains were located in a separate branch in the *P. putida* group as defined by Gomila et al. (2015). The most closely related strains were *P. donghuensis* HYST (98.7 % identity) and *P. alklyphenolica* KL28T (98.6% identity) which were recently proposed as representatives of novel species of the *P. putida* group (Gao et al., 2015; Mulet et al., 2015). They are included in a cluster with *P. vranovensis* 2B2T (98.1 % identity) and *P. asplenii* ATCC 23835T (98.1 % identity). This suggest that the E39, E311 and E313 strains isolated from an oil-contaminated soil belong to the *Pseudomonas putida* group which is frequently represented in soils and in water.

3.3 Biosurfactant characterisation

To gain further perspicacity about the nature of the produced biosurfactant, TLC analysis was performed. For the crude extracts of isolates E39, E311 and E313, TLC revealed red spots showing a positive reaction when ninhydrin was used as visualization agent, which implies the presence of amino acid groups. No reaction occurred with anthrone reagent, which discards the hypothesis that the selected isolates produced glycolipids. They were then examined for their ability to produce lipopeptide biosurfactants by using MALDI-ToF mass spectrometry which

is an efficient device for their detection (Vater et al., 2002). Analyses were performed on whole cells grown on TSA solid medium (Fig. 3), on the supernatant of culture in TSB liquid medium and on crude extract (data not shown). In both solid and liquid media, mass spectra revealed series of prominent peaks ranging between 1090.7 and 1142.7. E39, E311 and E313 produced molecules with m/z corresponding to syringafactin A (m/z 1104.7 $[M+Na]^+$, 1120.7 $[M+K]^+$, 1126.7 $[(M-H)+2Na]^+$, 1142.7 $[(M-H)+Na+K]^+$). Syringafactins are octalipopeptides linked to C10 or C12 fatty acid produced by *Pseudomonas syringae* DC3000, they were detected in the mass range from m/z 1104.7 to 1146.7 for sodium adducts and from m/z 1120.7 to 1162.7 for potassium adducts (Berti et al., 2007). Mass peaks at m/z (1090.7 $[M+Na]^+$, 1106.7 $[M+K]^+$, 1112.7 $[(M-H)+2Na]^+$, 1128.7 $[(M-H)+Na+K]^+$) are separated by 14 Da from mass peaks at m/z (1104.7 $[M+Na]^+$, 1120.7 $[M+K]^+$, 1126.7 $[(M-H)+2Na]^+$, 1142.7 $[(M-H)+Na+K]^+$) respectively, which could be explained by the presence of another amino acid residue in the peptide moiety of syringafactin A or a C9 fatty acid chain respectively. Recently, Pauwelyn et al. (2013), identified lipopeptides produced by *Pseudomonas cichorii* SF1-54 as new members of the syringafactin family. The exact m/z of $[M+Na]^+$ of these lipopeptides, named cichofactins, is 1131.7 and 1159.7. Syringafactin family was shown to have biosurfactant properties and involve in the swarming properties of the producing strain (Berti et al., 2007, Pauwelyn et al., 2013). However this lipopeptide was poorly studied for its bioemulsifying properties and its role in the bioremediation.

3.4 Effect of pH, temperature and salinity on biosurfactant stability

The stability of biosurfactants in different environment conditions such as pH, temperature and salinity is an important factor to study, since it affects directly their applicability. The biosurfactants produced by *Pseudomonas* spp. E39, E311 and E313 were shown to be thermostable as they retained their activity after a 24 h treatment at a temperature range of 4 – 80°C (Fig. 4a, 4b). At 105 °C, the tension surface reducing activity decreased. The thermal

resistance of lipopeptidic biosurfactants produced by *Serratia marcescens* NSK-1 (Anyanwu et al., 2011), *Bacillus subtilis* (DM-03 and DM-04) (Mukherjee, 2007) and *P. nitroreducens* TSB.MJ10 (de Sousa and Bhosle, 2012) has been reported up to 80° or 100°C. The pH stability assays showed that the surface tension reducing and emulsifying activity of the tested biosurfactants remained stable over a pH range of 6 – 12 (Fig. 4c, 4d) but was affected by acidic conditions below pH 4. The alkaline pH stability of lipopeptidic biosurfactants has been showed by Anyanwu et al.,(2011); de Sousa and Bhosle (2012) and Mukherjee (2007). A decrease of emulsifying activity at acid pH was also observed by de Sousa and Bhosle (2012) and by Khopade et al.,(2012) for an undetermined bioemulsifier. It should also be noticed that the biosurfactant solution became turbid under pH 4 as observed by Khopade et al. (2012). The precipitation of biosurfactant could explain the partial loss of the activity. The addition of NaCl up to 10% only slightly decreased the activity of biosurfactants (Fig. 4e, 4f). The tolerance of lipopeptidic biosurfactants has been reported by Anyanwu et al. (2011) up to 20% NaCl and by de Sousa and Bhosle., (2012) up to 25% NaCl. The stability of the crude biosurfactants in a wide range of temperature, pH and salinity conditions confirmed their potential to be used in many fields and in particular in bioremediation application.

3.5 Diesel biodegradation

In this experiment, we were interested in finding out if the biosurfactant producing isolates might be able to degrade diesel oil since growth on crude oil is often associated with the production of surfactants. Sand bioreactors were contaminated by diesel oil and inoculated with isolates E39, E311, E313 and *Rhodococcus erythropolis* T902.1 as positive control. Biodegradation was monitored by measuring removal percentage of total petroleum hydrocarbon (% TPH). In this experiment, strains used diesel as sole carbon source. At 28 days of operation with diesel oil as the sole source of carbon, a removal of around 70 % was achieved

in bioreactors inoculated with E311 and *R. erythropolis* T902.1. However, *R. erythropolis* T902.1 reached this level of biodegradation sooner (14 days). The removal percentage was lower with E39 and E313 (around 55%) probably due to a lower removal rate (Fig. 5). According to mass analyses, strain E311 was the less lipopeptide productive strain whereas its potential for degradation of hydrocarbons was the most effective. There are several hypotheses to be mentioned: (i) the strain has a more efficient degradation enzymatic potential, (ii) the production of biosurfactants is different in the presence of hydrocarbons, (iii) a low production of biosurfactant is sufficient to be effective, (iv) too high production of surfactants could have an inhibitory effect on growth (high hydrocarbons solubility could be toxic for the cell). Furthermore, these results are comparable with those obtained in other studies (Das and Mukherjee, 2007; Mnif et al., 2017) which suggest that these *Pseudomonas* spp. strains could be useful in bioremediation application. The biosurfactants that they produce could enhance oil biodegradation in soils (Pacwa-Płociniczak et al., 2011).

4 Conclusion

The present study examined the biosurfactant properties of *Pseudomonas* strains isolated from oil contaminated soils. Three *Pseudomonas* spp. isolates E39, E311 and E313, closely related to members of the *Pseudomonas putida* group, were selected as efficient producers of biosurfactants as they have important surface tension reducing and emulsifying activities. The produced biosurfactants were identified as lipopeptides belonging to syringafactin family with the detection of a new variant to these molecules. The applicability of these biosurfactants was examined by evaluating their residual activities over extreme pH, temperature and salinity conditions which showed a high stability of these molecules in extreme environmental conditions. The capacity of syringafactin producing strains to degrade diesel in a contaminated sand was examined and showed a good potential of diesel removal in artificially contaminated

soils with considerable rates. These results suggest the potential of syringafactin for application in bioremediation processes.

Acknowledgements

This work was funded by the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Tunisia and a scholarship from the region Hauts-de-France. This work was supported by the European Union SMARTBIOCONTROLPORTFOLIO- Interreg BIOPROD program, the FEDER program ALIBIOTECH and the CPER project ALIBIOTECH from the region Hauts-de-France. The authors are grateful to the Advanced High Throughput Technologies Platform for Biorefineries Catalysts Design 'REALCAT' for allowing the implementation of MALDI-ToF mass spectrometry analysis. The authors are grateful to Kamel Maaloul, translator and English professor for having proofread the manuscript.

References

- Abdel-Mawgoud, A.M., Aboulwafa, M.M., Hassouna, N.A.H., 2008. Characterization of surfactin produced by bacillus subtilis isolate BS5. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 150, 289–303. doi:10.1007/s12010-008-8153-z
- Abdel-Mawgoud, A.M., Lépine, F., Déziel, E., 2010. Rhamnolipids: Diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* doi:10.1007/s00253-010-2498-2
- Adler, C., Corbalán, N.S., Seyedsayamdost, M.R., Pomares, M.F., de Cristóbal, R.E., Clardy, J., Kolter, R., Vincent, P.A., 2012. Catecholate Siderophores Protect Bacteria from Pyochelin Toxicity. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0046754
- Al-Ajlani, M., Sheikh, M., Ahmad, Z., Hasnain, S., 2007. Production of surfactin from *Bacillus subtilis* MZ-7 grown on pharmamedia commercial medium. *Microb. Cell Fact.* 6, 17. doi:10.1186/1475-2859-6-17
- Alsohim, A.S., Taylor, T.B., Barrett, G.A., Gallie, J., Zhang, X.X., Altamirano-Junqueira, A.E., Johnson, L.J., Rainey, P.B., Jackson, R.W., 2014. The biosurfactant viscosin produced by *Pseudomonas fluorescens* SBW25 aids spreading motility and plant growth promotion. *Environ. Microbiol.* 16, 2267–2281. doi:10.1111/1462-2920.12469
- Anthoni, U., Christophersen, C., Nielsen, P.H., Gram, L., Petersen, B.O., 1995.

- Pseudomonine, an isoxazolidone with siderophoric activity from *Pseudomonas fluorescens* ah2 isolated from lake victorian Nile perch. *J. Nat. Prod.* 58, 1786–1789. doi:10.1021/np50125a026
- Anyanwu, C.U., Obi, S.K.C., Okolo, B.N., 2011. Lipopeptide Biosurfactant Production by *Serratia marcescens* NSK-1 Strain Isolated from Petroleum-contaminated Soil. *J. Appl. Sci. Res.* 7, 79–87.
- Aparna, A., Srinikethan, G., Smitha, H., 2012. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 95, 23–29. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.01.043
- Asmer, H.J., Lang, S., Wagner, F., Wray, V., 1988. Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65, 1460–1466. doi:10.1007/BF02898308
- Bais, H.P., 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of Arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *PLANT Physiol.* 134, 307–319. doi:10.1104/pp.103.028712
- Bak, F., Bonnichsen, L., Jørgensen, N.O.G., Nicolaisen, M.H., Nybroe, O., 2014. The biosurfactant viscosin transiently stimulates n-hexadecane mineralization by a bacterial consortium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 1475–1483. doi:10.1007/s00253-014-6054-3
- Balibar, C.J., Vaillancourt, F.H., Walsh, C.T., 2005. Generation of D amino acid residues in assembly of arthrofactin by dual condensation/epimerization domains. *Chem. Biol.* 12, 1189–1200. doi:10.1016/j.chembiol.2005.08.010
- Ballio, A., Barra, D., Bossa, F., Collina, A., Grgurina, I., Marino, G., Moneti, G., Paci, M., Pucci, P., Segre, A., Simmaco, M., 1991. Syringopeptins, new phytotoxic lipodepsipeptides of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *FEBS Lett.* 291, 109–112. doi:10.1016/0014-5793(91)81115-O
- Ballio, A., Bossa, F., Collina, A., Gallo, M., Iacobellis, N.S., Paci, M., Pucci, P., Scaloni, A., Segre, A., Simmaco, M., 1990. Structure of syringotoxin, a bioactive metabolite of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *FEBS Lett.* 269, 377–380. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(90)81197-V

- Ballio, A., Bossa, F., Di Giorgio, D., Ferranti, P., Paci, M., Pucci, P., Scaloni, A., Segre, A., Strobel, G.A., 1994. Novel bioactive lipodepsipeptides from *Pseudomonas syringae*: The pseudomycins. *FEBS Lett.* 355, 96–100. doi:10.1016/0014-5793(94)01179-6
- Banat, I.M., 1997. 97/02677 Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Fuel Energy Abstr.* 38, 221. doi:10.1016/S0140-6701(97)84559-6
- Banat, I.M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M.G., Fracchia, L., Smyth, T.J., Marchant, R., 2010. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* doi:10.1007/s00253-010-2589-0
- Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S., 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 495–508. doi:10.1007/s002530051648
- Barros, F.F.C., De Quadros, C.P., Maróstica, M.R., Pastore, G.M., 2007. Surfactina: Propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Quim. Nova.* doi:10.1590/S0100-40422007000200031
- Bassarrello, C., Lazzaroni, S., Bifulco, G., Lo Cantore, P., Iacobellis, N.S., Riccio, R., Gomez-Paloma, L., Evidente, A., 2004. Tolaasins A-E, five new lipodepsipeptides produced by *Pseudomonas tolaasii*. *J. Nat. Prod.* 67, 811–816. doi:10.1021/np0303557
- Bento, F.M., De Oliveira Camargo, F.A., Okeke, B.C., Frankenberger, W.T., 2005. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. *Microbiol. Res.* 160, 249–255. doi:10.1016/j.micres.2004.08.005
- Berti, A.D., Greve, N.J., Christensen, Q.H., Thomas, M.G., 2007. Identification of a biosynthetic gene cluster and the six associated lipopeptides involved in swarming motility of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *J. Bacteriol.* 189, 6312–6323. doi:10.1128/JB.00725-07
- Bezza, F.A., Chirwa, E.M.N., 2017. Pyrene biodegradation enhancement potential of lipopeptide biosurfactant produced by *Paenibacillus dendritiformis* CN5 strain. *J. Hazard. Mater.* 321, 218–227. doi:10.1016/j.jhazmat.2016.08.035
- Bidwai, A.P., Zhang, L., Bachmann, R.C., Takemoto, J.Y., 1987. Mechanism of Action of *Pseudomonas syringae* Phytotoxin, Syringomycin 1. *Plant Physiol.* 83, 39–43.

- Bodour, A.A., Drees, K.P., Maier, R.M., 2003. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3280–3287. doi:10.1128/AEM.69.6.3280-3287.2003
- Bodour, A.A., Miller-Maier, R.M., 1998. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *J. Microbiol. Methods* 32, 273–280. doi:10.1016/S0167-7012(98)00031-1
- Brooks, T.M., Unterweger, D., Bachmann, V., Kostiuk, B., Pukatzki, S., 2013. Lytic activity of the *Vibrio cholerae* type VI secretion toxin VgrG-3 is inhibited by the antitoxin TsaB. *J. Biol. Chem.* 288, 7618–25. doi:10.1074/jbc.M112.436725
- Bunster, L., Fokkema, N.J., Schippers, B., 1989. Effect of surface-active *Pseudomonas* spp. on leaf wettability. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1340–5.
- Calcott, M.J., Owen, J.G., Lamont, I.L., Ackerley, D.F., 2014. Biosynthesis of novel pyoverdines by domain substitution in a nonribosomal peptide synthetase of *pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 5723–5731. doi:10.1128/AEM.01453-14
- Cameotra, S.S., Makkar, R.S., 2004. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Curr. Opin. Microbiol.* doi:10.1016/j.mib.2004.04.006
- Cameotra, S.S., Makkar, R.S., Kaur, J., Mehta, S.K., 2010. Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind. *Adv. Exp. Med. Biol.* 672, 261–280. doi:10.1007/978-1-4419-5979-9_20
- Campos, J.M., Montenegro Stamford, T.L., Sarubbo, L.A., de Luna, J.M., Rufino, R.D., Banat, I.M., 2013. Microbial biosurfactants as additives for food industries. *Biotechnol. Prog.* 29, 1097–1108. doi:10.1002/btpr.1796
- Chakraborty, T., Chakraborty, I., Ghosh, S., 2011. The methods of determination of critical micellar concentrations of the amphiphilic systems in aqueous medium. *Arab. J. Chem.* 4, 265–270. doi:10.1016/j.arabjc.2010.06.045
- Condurso, H.L., Bruner, S.D., 2012. Structure and noncanonical chemistry of nonribosomal peptide biosynthetic machinery. *Nat. Prod. Rep.* 29, 1099. doi:10.1039/c2np20023f
- Cooper, D.G., Goldenberg, B.G., 1987. Surface-Active Agents from Two *Bacillus* Species.

- Appl. Environ. Microbiol. 53, 224–229. doi:0099-2240/87/020224
- Cooper, D.G., Goldenberg, B.G., 1987. Surface-active agents from two *Bacillus* species. Appl. Environ. Microbiol. doi:0099-2240/87/020224
- Cooper, D.G., Zajic, J.E., 1980. Surface-Active Compounds from Microorganisms. Adv. Appl. Microbiol. 26, 229–253. doi:10.1016/S0065-2164(08)70335-6
- Coraiola, M., Lo Cantore, P., Lazzaroni, S., Evidente, A., Iacobellis, N.S., Dalla Serra, M., 2006. WLIP and tolaasin I, lipodepsipeptides from *Pseudomonas reactans* and *Pseudomonas tolaasii*, permeabilise model membranes. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 1758, 1713–1722. doi:10.1016/j.bbamem.2006.06.023
- Cornelis, P., Dingemans, J., 2013. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. Front. Cell. Infect. Microbiol. 3. doi:10.3389/fcimb.2013.00075
- Cosby, W.M., Vollenbroich, D., Lee, O.H., Zuber, P., 1998. Altered *srf* expression in *Bacillus subtilis* resulting from changes culture pH is dependent on the SpoOK oligopeptide permease and the ComQX system of extracellular control. J. Bacteriol. 180, 1438–1445.
- Coutte, F., 2009. Production Selective De Lipopeptides Par *Bacillus Subtilis* En Bioreacteur a Membrane Du Genie Moleculaire Au Genie Des Procedes 243.
- Coutte, F., Leclère, V., Béchet, M., Guez, J.S., Lecouturier, D., Chollet-Imbert, M., Dhulster, P., Jacques, P., 2010. Effect of *pps* disruption and constitutive expression of *srfA* on surfactin productivity, spreading and antagonistic properties of *Bacillus subtilis* 168 derivatives. J. Appl. Microbiol. 109, 480–491. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04683.x
- Coutte, F., Lecouturier, D., Leclère, V., Béchet, M., Jacques, P., Dhulster, P., 2013. New integrated bioprocess for the continuous production, extraction and purification of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* in membrane bioreactor. Process Biochem. 48, 25–32. doi:10.1016/j.procbio.2012.10.005
- Coutte, F., Niehren, J., Dhali, D., John, M., Versari, C., Jacques, P., 2015. Modeling leucine's metabolic pathway and knockout prediction improving the production of surfactin, a biosurfactant from *Bacillus subtilis*. Biotechnol. J. 10, 1216–1234. doi:10.1002/biot.201400541

- Cox, C.D., Rinehart, K.L., Moore, M.L., Cook, J.C., 1981. Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 4256–4260. doi:10.1073/pnas.78.7.4256
- D'aes, J., De Maeyer, K., Pauwelyn, E., Höfte, M., 2010. Biosurfactants in plant-*Pseudomonas* interactions and their importance to biocontrol. *Environ. Microbiol. Rep.* 2, 359–372. doi:10.1111/j.1758-2229.2009.00104.x
- D'aes, J., Hua, G.K.H., De Maeyer, K., Pannecouque, J., Forrez, I., Ongena, M., Dietrich, L.E.P., Thomashow, L.S., Mavrodi, D. V., Höfte, M., 2011. Biological Control of *Rhizoctonia* Root Rot on Bean by Phenazine- and Cyclic Lipopeptide-Producing *Pseudomonas* CMR12a. *Phytopathology* 101, 996–1004. doi:10.1094/PHYTO-11-10-0315
- Dalla Serra, M., Bernhart, I., Nordera, P., Di Giorgio, D., Ballio, a, Menestrina, G., 1999. Conductive properties and gating of channels formed by syringopeptin 25A, a bioactive lipodepsipeptide from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, in planar lipid membranes. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 12, 401–9. doi:10.1094/MPMI.1999.12.5.401
- Das, K., Mukherjee, A.K., 2007. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresour. Technol.* 98, 1339–1345. doi:10.1016/j.biortech.2006.05.032
- De Bruijn, I., De Kock, M.J.D., De Waard, P., Van Beek, T.A., Raaijmakers, J.M., 2008. Massetolide A biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 190, 2777–2789. doi:10.1128/JB.01563-07
- De Bruijn, I., De Kock, M.J.D., Yang, M., De Waard, P., Van Beek, T.A., Raaijmakers, J.M., 2007. Genome-based discovery, structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in *Pseudomonas* species. *Mol. Microbiol.* 63, 417–428. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05525.x
- de Sousa, T., Bhosle, S., 2012. Isolation and characterization of a lipopeptide bioemulsifier produced by *Pseudomonas nitroreducens* TSB.MJ10 isolated from a mangrove ecosystem. *Bioresour. Technol.* 123, 256–262. doi:10.1016/j.biortech.2012.07.056
- De Vleeschauwer, D., Höfte, M., 2009. Rhizobacteria-Induced Systemic Resistance, in:

- Advances in Botanical Research. pp. 223–281. doi:10.1016/S0065-2296(09)51006-3
- Denaro, R., Crisafi, F., Russo, D., Genovese, M., Messina, E., Genovese, L., Carbone, M., Ciavatta, M.L., Ferrer, M., Golyshin, P., Yakimov, M.M., 2014. *Alcanivorax borkumensis* produces an extracellular siderophore in iron-limitation condition maintaining the hydrocarbon-degradation efficiency. *Mar. Genomics* 17, 43–52. doi:10.1016/j.margen.2014.07.004
- Desai, J.D., Banat, I.M., 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 47–64. doi:10.1016/S0140-6701(97)84559-6
- Déziel, E., Lépine, F., Dennie, D., Boismenu, D., Mamer, O.A., Villemur, R., 1999. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1440, 244–252. doi:10.1016/S1388-1981(99)00129-8
- Dieckmann, R., Lee, Y.O., van Liempt, H., von Döhren, H., Kleinkauf, H., 1995. Expression of an active adenylate-forming domain of peptide synthetases corresponding to acyl-CoA-synthetases. *FEBS Lett.* 357, 212–216. doi:10.1016/0014-5793(94)01342-X
- Dubey, K. V., Juwarkar, A.A., Singh, S.K., 2005. Adsorption-desorption process using wood-based activated carbon for recovery of biosurfactant from fermented distillery wastewater. *Biotechnol. Prog.* 21, 860–867. doi:10.1021/bp040012e
- Duvnjak, Z., Cooper, D.G., Kosaric, N., 1982. Production of surfactant by *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558. *Biotechnol. Bioeng.* 24, 165–175. doi:10.1002/bit.260240114
- El, A., Rochex, A., Chataign, G., Max, B., 2015. The Tunisian oasis ecosystem is a source of antagonistic *Bacillus* spp . producing diverse antifungal lipopeptides 1–12. doi:10.1016/j.resmic.2015.09.003
- Eppelmann, K., Stachelhaus, T., Marahiel, M.A., 2002. Exploitation of the selectivity-conferring code of nonribosomal peptide synthetases for the rational design of novel peptide antibiotics. *Biochemistry* 41, 9718–9726. doi:10.1021/bi0259406
- Fechtner, J., Koza, A., Sterpaio, P. Dello, Hapca, S.M., Spiers, A.J., 2011. Surfactants expressed by soil pseudomonads alter local soil-water distribution, suggesting a

- hydrological role for these compounds. *FEMS Microbiol. Ecol.* 78, 50–58.
doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01141.x
- Fonseca, P., Moreno, R., Rojo, F., 2011. Growth of *Pseudomonas putida* at low temperature: Global transcriptomic and proteomic analyses. *Environ. Microbiol. Rep.* 3, 329–339.
doi:10.1111/j.1758-2229.2010.00229.x
- Franzetti, A., Tamburini, E., Banat, I.M., 2010. Applications of biological surface active compounds in remediation technologies. *Adv. Exp. Med. Biol.* 672, 121–134.
doi:10.1007/978-1-4419-5979-9_9
- Fujii, T., Yuasa, R., Kawase, T., 1999. Biodetergent: IV. Monolayers of corynomycolic acids at the air-water interface. *Colloid Polym. Sci.* 277, 334–339.
doi:10.1007/s003960050389
- Fukuchi, N., Isogai, A., Nakayama, J., Takayama, S., Yamashita, S., Suyama, K., Takemoto, J.Y., Suzuki, A., 1992. Structure and stereochemistry of three phytotoxins, syringomycin, syringotoxin and syringostatin, produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1149–1157. doi:10.1039/P19920001149
- Gao, J., Xie, G., Peng, F., Xie, Z., 2015. *Pseudomonas donghuensis* sp. nov., exhibiting high-yields of siderophore. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 107, 83–94. doi:10.1007/s10482-014-0306-1
- Gauchi, J., 2005. Plans d'expériences optimaux : un exposé didactique. *Exp. Des.* 139–162.
- Gerard, J., Lloyd, R., Barsby, T., Haden, P., Kelly, M.T., Andersen, R.J., 1997. Massetolides A-H, antimycobacterial cyclic depsipeptides produced by two pseudomonads isolated from marine habitats. *J. Nat. Prod.* 60, 223–229. doi:10.1021/np9606456
- Gharaei-Fathabad, E., 2011. Biosurfactants in pharmaceutical industry: A mini-review. *Am. J. Drug Discov. Dev.* 1, 58–69. doi:10.3923/ajdd.2011.58.69
- Ghribi, D., Ellouze-Chaabouni, S., 2011. Enhancement of *Bacillus subtilis* Lipopeptide Biosurfactants Production through Optimization of Medium Composition and Adequate Control of Aeration. *Biotechnol. Res. Int.* 2011, 1–6. doi:10.4061/2011/653654
- Gomila, M., Pe??a, A., Mulet, M., Lalucat, J., Garc??a-Vald??s, E., 2015. Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Front. Microbiol.* 6. doi:10.3389/fmicb.2015.00214

- Gong, G., Zheng, Z., Chen, H., Yuan, C., Wang, P., Yao, L., Yu, Z., 2009. Enhanced production of surfactin by *Bacillus subtilis* E8 mutant obtained by ion beam implantation. *Food Technol. Biotechnol.* 47, 27–31.
- Goupy, J., 2006. Factorial experimental design: Detecting an outlier with the dynamic variable and the Daniel's diagram, in: *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. pp. 156–166. doi:10.1016/j.chemolab.2005.05.005
- Grgurina, I., Bensaci, M., Pocsfalvi, G., Mannina, L., Cruciani, O., Fiore, A., Fogliano, V., Sorensen, K.N., Takemoto, J.Y., 2005. Novel cyclic lipodepsipeptide from *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* strain 508 and syringopeptin antimicrobial activities. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 5037–5045. doi:10.1128/AAC.49.12.5037-5045.2005
- Grgurina, I., Mariotti, F., Fogliano, V., Gallo, M., Scaloni, A., Iacobellis, N.S., Lo Cantore, P., Mannina, L., Van Axel Castelli, V., Greco, M.L., Graniti, A., 2002. A new syringopeptin produced by bean strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1597, 81–89. doi:10.1016/S0167-4838(02)00283-2
- Groboillot, A., Portet-Koltalo, F., le Derf, F., Feuilloley, M.J.G., Orange, N., Poc, C.D., 2011. Novel application of cyclolipopeptide amphisin: Feasibility study as additive to remediate polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contaminated sediments. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 1787–1806. doi:10.3390/ijms12031787
- Gross, H., Loper, J.E., 2009. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Nat. Prod. Rep.* 26, 1408. doi:10.1039/b817075b
- Gross, H., Stockwell, V.O., Henkels, M.D., Nowak-Thompson, B., Loper, J.E., Gerwick, W.H., 2007. The Genom isotopic Approach: A Systematic Method to Isolate Products of Orphan Biosynthetic Gene Clusters. *Chem. Biol.* 14, 53–63. doi:10.1016/j.chembiol.2006.11.007
- Guenzi, E., Galli, G., Grgurina, I., Gross, D.C., Grandi, G., 1998. Characterization of the syringomycin synthetase gene cluster: A link between prokaryotic and eukaryotic peptide synthetases. *J. Biol. Chem.* 273, 32857–32863. doi:10.1074/jbc.273.49.32857
- Guerra-Santos, L., Kappeli, O., Fiechter, A., 1984. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant

- production in continuous culture with glucose as carbon source. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 301–305.
- Guez, J.S., M??ller, C.H., Danze, P.M., B??chs, J., Jacques, P., 2008. Respiration activity monitoring system (RAMOS), an efficient tool to study the influence of the oxygen transfer rate on the synthesis of lipopeptide by *Bacillus subtilis* ATCC6633. *J. Biotechnol.* 134, 121–126. doi:10.1016/j.jbiotec.2008.01.003
- Harshey, R.M., 2003. Bacterial Motility on a Surface: Many Ways to a Common Goal. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 249–273. doi:10.1146/annurev.micro.57.030502.091014
- Hashizume, H., Nishimura, Y., 2008. Cyclic lipopeptide antibiotics. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 35, 693–751. doi:10.1016/S1572-5995(08)80016-6
- Hildebrand, P.D., Braun, P.G., McRae, K.B., Lu, X., 1998. Role of the biosurfactant viscosin in broccoli head rot caused by a pectolytic strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Can. J. Plant Pathol.* 20, 296–303. doi:10.1080/07060669809500396
- Hu, Y., Ju, L.K., 2001. Purification of lactonic sophorolipids by crystallization. *J. Biotechnol.* 87, 263–272. doi:10.1016/S0168-1656(01)00248-6
- Hultberg, M., Bergstrand, K.J., Khalil, S., Alsanius, B., 2008. Characterization of biosurfactant-producing strains of fluorescent pseudomonads in a soilless cultivation system. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 94, 329–334. doi:10.1007/s10482-008-9250-2
- Isoda, H., Shinmoto, H., Kitamoto, D., Matsumura, M., Nakahara, T., 1997. Differentiation of human promyelocytic leukemia cell line HL60 by microbial extracellular glycolipids. *Lipids* 32, 263–271.
- Isogai, A., Iguchi, H., Nakayama, J., Kusai, A., Takemoto, J.Y., Suzuki, A., 1995. Structural analysis of new syringopeptins by tandem mass spectrometry. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59, 1374–1376.
- Jacques, G., 2000. Modélisation par les plans d'expériences. *Tech. l'ingénieur Capteurs méthodes Mes. base docum*, 275.
- Jacques, P., Hbid, C., Destain, J., Razafindralambo, H., Paquot, M., De Pauw, E., Thonart, P., 1999. Optimization of Biosurfactant Lipopeptide Production from *Bacillus subtilis* S499

- by Plackett-Burman Design. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 77, 223–234.
doi:10.1385/ABAB:77:1-3:223
- Jain, D.K., Collins-Thompson, D.L., Lee, H., Trevors, J.T., 1991. A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *J. Microbiol. Methods* 13, 271–279.
doi:10.1016/0167-7012(91)90064-W
- Janek, T., Łukaszewicz, M., Rezanka, T., Krasowska, A., 2010. Isolation and characterization of two new lipopeptide biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* BD5 isolated from water from the Arctic Archipelago of Svalbard. *Bioresour. Technol.* 101, 6118–6123. doi:10.1016/j.biortech.2010.02.109
- Jin, H., Zhang, X., Li, K., Niu, Y., Guo, M., Hu, C., Wan, X., Gong, Y., Huang, F., 2014. Direct bio-utilization of untreated rapeseed meal for effective iturin A production by *Bacillus subtilis* in submerged fermentation. *PLoS One* 9.
doi:10.1371/journal.pone.0111171
- Kanna, R., Gummadi, S.N., Kumar, G.S., 2014. Production and Characterization of Biosurfactant by *Pseudomonas putida* MTCC 2467. *J. Biol. Sci.* 14, 436–445.
doi:10.3923/jbs.2014.436.445
- Karant, N.G.K., Deo, P.G., Veenanadig, N.K., 1999. Microbial production of biosurfactants and their importance. *Curr. Sci.* doi:10.1016/S0921-3449(96)01167-6
- Kasai, H., Takahashi, N., Tokumaru, H., 2012. Distinct Initial SNARE Configurations Underlying the Diversity of Exocytosis. *Physiol. Rev.* 92, 1915–1964.
doi:10.1152/physrev.00007.2012
- Khopade, A., Biao, R., Liu, X., Mahadik, K., Zhang, L., Kokare, C., 2012a. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiopsis* sp. B4. *Desalination* 285, 198–204. doi:10.1016/j.desal.2011.10.002
- Khopade, A., Biao, R., Liu, X., Mahadik, K., Zhang, L., Kokare, C., 2012b. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiopsis* sp. B4. *Desalination* 285, 198–204. doi:10.1016/j.desal.2011.10.002
- Kuiper, I., Legendijk, E.L., Pickford, R., Derrick, J.P., Lamers, G.E.M., Thomas-Oates, J.E., Lugtenberg, B.J.J., Bloemberg, G. V., 2004. Characterization of two *Pseudomonas*

- putida lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. *Mol. Microbiol.* 51, 97–113. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03751.x
- Kulimushi, P.Z., Arias, A.A., Franzil, L., Steels, S., Ongena, M., 2017. Stimulation of fengycin-type antifungal lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* in the presence of the maize fungal pathogen *Rhizomucor variabilis*. *Front. Microbiol.* 8. doi:10.3389/fmicb.2017.00850
- Lang, S., 2002. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* doi:10.1016/S1359-0294(02)00007-9
- Lang, S., Philp, J.C., 1998. Surface-active lipids in rhodococci. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* doi:10.1023/A:1001799711799
- Larpent, C., Chasseray, X., 1992. Optically active surfactants - I - the first synthesis and properties of sodium bis [(S)] ethyl-2-hexyl] sulfosuccinates (“aerosol ot”). *Tetrahedron* 48, 3903–3914. doi:10.1016/S0040-4020(01)88470-2
- Lindow, S.E., Brandl, M.T., 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* doi:10.1128/AEM.69.4.1875-1883.2003
- Liu, J., Liu, M., Wang, J., Yao, J.M., Pan, R.R., Yu, Z.L., 2005. Enhancement of the *Gibberella zeae* growth inhibitory lipopeptides from a *Bacillus subtilis* mutant by ion beam implantation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69, 223–228. doi:10.1007/s00253-005-1981-7
- Liu, J.F., Mbadinga, S.M., Yang, S.Z., Gu, J.D., Mu, B.Z., 2015. Chemical structure, property and potential applications of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* in petroleum recovery and spill mitigation. *Int. J. Mol. Sci.* doi:10.3390/ijms16034814
- Liu, X., Ren, B., Gao, H., Liu, M., Dai, H., Song, F., Yu, Z., Wang, S., Hu, J., Kokare, C.R., Zhang, L., 2012. Optimization for the production of surfactin with a new synergistic antifungal activity. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0034430
- Liu, X., Ye, Q., Yu, B., Liang, Y., Liu, W., Zhou, F., 2010. Switching water droplet adhesion using responsive polymer brushes. *Langmuir* 26, 12377–12382. doi:10.1021/la101909e
- M. I. Van Dyke, P. Couture, M. Brauer, H. Lee, J.T.T., 1993. *Pseudomonas aeruginosa* UG2

- rhamnolipid biosurfactans: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. *Can. J. Microbiol.* 39, 1071–1078.
- Ma, Z., Geudens, N., Kieu, N.P., Sinnaeve, D., Ongena, M., Martins, J.C., Höfte, M., 2016. Biosynthesis, chemical structure, and structure-activity relationship of orfamide lipopeptides produced by *Pseudomonas protegens* and related species. *Front. Microbiol.* 7. doi:10.3389/fmicb.2016.00382
- Magdassi, S., Vinetsky, Y., Relkin, P., 1996. Formation and structural heat-stability of β -lactoglobulin/surfactant complexes. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 6, 353–362. doi:10.1016/0927-7765(96)01266-0
- Makkar, R.S., Cameotra, S.S., 2002. Effects of various nutritional supplements on biosurfactant production by a strain of *Bacillus subtilis* at 45°C. *J. Surfactants Deterg.* 5, 11–17. doi:10.1007/s11743-002-0199-8
- Marchant, R., Banat, I.M., 2012. Biosurfactants: A sustainable replacement for chemical surfactants? *Biotechnol. Lett.* doi:10.1007/s10529-012-0956-x
- Margaritis, A., Zajic, J.E., Gerson, D.F., 1979. Production and surface-active properties of microbial surfactants. *Biotechnol. Bioeng.* 21, 1151–1162. doi:10.1002/bit.260210706
- Mata-Sandoval, J.C., Karns, J., Torrents, A., 1999. High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. *J. Chromatogr. A* 864, 211–220. doi:10.1016/S0021-9673(99)00979-6
- Matthijs, S., Tehrani, K.A., Laus, G., Jackson, R.W., Cooper, R.M., Cornelis, P., 2007. Thioquinolobactin, a *Pseudomonas* siderophore with antifungal and anti-*Pythium* activity. *Environ. Microbiol.* 9, 425–434. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01154.x
- May, J.J., Kessler, N., Marahiel, M.A., Stubbs, M.T., 2002. Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12120–5. doi:10.1073/pnas.182156699
- Md. Sakil Munna, Z.Z. and R.N., 2015. Influence of temperature on the growth of *Pseudomonas putida*. *Stanford J. Microbiol.* 5, 9–12.
- Mercade, M.E., Manresa, M.A., 1994. The use of agroindustrial by-products for biosurfactant

- production. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71, 61–64. doi:10.1007/BF02541473
- Minowa, Y., Araki, M., Kanehisa, M., 2007. Comprehensive Analysis of Distinctive Polyketide and Nonribosomal Peptide Structural Motifs Encoded in Microbial Genomes. *J. Mol. Biol.* 368, 1500–1517. doi:10.1016/j.jmb.2007.02.099
- Mnif, I., Sahnoun, R., Ellouz-Chaabouni, S., Ghribi, D., 2017. Application of bacterial biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of diesel oil in soil using a newly isolated consortium. *Process Saf. Environ. Prot.* 109, 72–81. doi:10.1016/j.psep.2017.02.002
- Mohammed, I.U., Deeni, Y., Hapca, S.M., McLaughlin, K., Spiers, A.J., 2015. Predicting the minimum liquid surface tension activity of pseudomonads expressing biosurfactants. *Let. Appl. Microbiol.* 60, 37–43. doi:10.1111/lam.12331
- Molin, G., Ternstrom, A., 1986. Phenotypically Based Taxonomy of Psychrotrophic *Pseudomonas* Isolated from Spoiled Meat, Water and Soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36, 257–274. doi:10.1099/00207713-36-2-257
- Mootz, H.D., Schwarzer, D., Marahiel, M.A., 2002. Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *ChemBioChem.* doi:10.1002/1439-7633(20020603)3:6<490::AID-CBIC490>3.0.CO;2-N
- Morikawa, M., Hirata, Y., Imanaka, T., 2000. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1488, 211–218. doi:10.1016/S1388-1981(00)00124-4
- Moro, P.A., 1997. A new syringopeptin produced by a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain isolated from diseased twigs of laurel. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 259–264. doi:10.1006/pmpp.1997.0124
- Motta Dos Santos, L.F., Coutte, F., Ravallec, R., Dhulster, P., Jacques, P., Motta Dos Santos, L.F., Tournier-Couturier, L., 2016. An improvement of surfactin production by *B. subtilis* BBG131 using design of experiments in microbioreactors and continuous process in bubbleless membrane bioreactor. *Bioresour. Technol.* 218, 944–952. doi:10.1016/j.biortech.2016.07.053
- Mukherjee, A.K., 2007. Potential application of cyclic lipopeptide biosurfactants produced by

- Bacillus subtilis* strains in laundry detergent formulations. *Lett. Appl. Microbiol.* 45, 330–335. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02197.x
- Mulet, M., Sánchez, D., Lalucat, J., Lee, K., García-Valdés, E., 2015. *Pseudomonas alkylphenolica* sp. Nov., A bacterial species able to form special aerial structures when grown on p-cresol. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 4013–4018. doi:10.1099/ijsem.0.000529
- Mulligan, C.N., 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollut.* doi:10.1016/j.envpol.2004.06.009
- Nalini, S., Parthasathi, R., 2013. Characterisation and Optimisation of Biosurfactant Produced By 2, 168–174.
- Navon-Venezia, S., Zosim, Z., Gottlieb, A., Legmann, R., Carmeli, S., Ron, E.Z., Rosenberg, E., 1995. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3240–3244.
- Ndlovu, T., Rautenbach, M., Khan, S., Khan, W., 2017. Variants of lipopeptides and glycolipids produced by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* cultured in different carbon substrates. *AMB Express* 7, 109. doi:10.1186/s13568-017-0367-4
- Neilands, J.B., 1995. Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* doi:10.1074/JBC.270.45.26723
- Nguyen, T.T., Youssef, N.H., McInerney, M.J., Sabatini, D.A., 2008. Rhamnolipid biosurfactant mixtures for environmental remediation. *Water Res.* 42, 1735–1743. doi:10.1016/j.watres.2007.10.038
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., Heijne, G. Von, 1997. A Neural Network Method for Identification of Prokaryotic and Eukaryotic Signal Peptides and Prediction of their Cleavage Sites. *Int. J. Neural Syst.* 08, 581–599. doi:10.1142/S0129065797000537
- Nielsen, T.H., Christophersen, C., Anthoni, U., Sørensen, J., 1999. Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54. *J. Appl. Microbiol.* 87, 80–90. doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00798.x
- Nielsen, T.H., Sørensen, D., Tobiasen, C., Andersen, J.B., Christophersen, C., Givskov, M.,

- Sørensen, J., 2002. Antibiotic and biosurfactant properties of cyclic lipopeptides produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. from the sugar beet rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3416–3423. doi:10.1128/AEM.68.7.3416-3423.2002
- Nielsen, T.H., Thrane, C., Christophersen, C., Anthoni, U., Sørensen, J., 2000. Structure, production characteristics and fungicidal antagonism of tensin - A new antifungal cyclic lipopeptide from *Pseudomonas fluorescens* strain 96.578. *J. Appl. Microbiol.* 89, 992–1001. doi:10.1046/j.1365-2672.2000.01201.x
- Nitschke, M., Costa, S.G.V.A.O., 2007. Biosurfactants in food industry. *Trends Food Sci. Technol.* doi:10.1016/j.tifs.2007.01.002
- Nutkins, J.C., Mortishire-Smith, R.J., Williams, D.H., Packman, L.C., Brodey, C.L., Rainey, P.B., Johnstone, K., 1991. Structure Determination of Tolaasin, an Extracellular Lipopeptide Produced by the Mushroom Pathogen *Pseudomonas tolaasii* Paine. *J. Am. Chem. Soc.* 113, 2621–2627. doi:10.1021/ja00007a040
- Nybroe, O., Sørensen, J., 2004. Production of cyclic lipopeptides by fluorescent pseudomonads. *Pseudomonas* 147–172. doi:10.1007/978-1-4419-9088-4_5
- Ongena, M., Jacques, P., 2008. Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16, 115–125. doi:10.1016/j.tim.2007.12.009
- Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G.A., Piotrowska-Seget, Z., Cameotra, S.S., 2011. Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 633–654. doi:10.3390/ijms12010633
- PALLERONI, N.J., KUNISAWA, R., CONTOPOULOU, R., DOUDOROFF, M., 1973. Nucleic Acid Homologies in the Genus *Pseudomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 23, 333–339. doi:10.1099/00207713-23-4-333
- Patil, S., Pendse, A., Aruna, K., 2014. International Journal of Current lated from oil contaminated soil sample 2, 20–30.
- Pauwelyn, E., Huang, C.-J., Ongena, M., Leclère, V., Jacques, P., Bleyaert, P., Budzikiewicz, H., Schäfer, M., Höfte, M., 2013. New linear lipopeptides produced by *Pseudomonas cichorii* SF1-54 are involved in virulence, swarming motility, and biofilm formation. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 26, 585–98. doi:10.1094/MPMI-11-12-0258-R

- Pearce, K.N., Kinsella, J.E., 1978. Emulsifying Properties of Proteins: Evaluation of a Turbidimetric Technique. *J. Agric. Food Chem.* 26, 716–723. doi:10.1021/jf60217a041
- Perfumo, A., Rancich, I., Banat, I.M., 2010. Possibilities and challenges for biosurfactants use in petroleum industry. *Adv. Exp. Med. Biol.* 672, 135–145. doi:10.1007/978-1-4419-5979-9_10
- Perneel, M., D'Hondt, L., De Maeyer, K., Adiobo, A., Rabaey, K., Höfte, M., 2008. Phenazines and biosurfactants interact in the biological control of soil-borne diseases caused by *Pythium* spp. *Environ. Microbiol.* 10, 778–788. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01501.x
- Peypoux, F., Bonmatin, J.M., Wallach, J., 1999. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 553–563. doi:10.1007/s002530051432
- Plaza, G.A., Zjawiony, I., Banat, I.M., 2006. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. *J. Pet. Sci. Eng.* 50, 71–77. doi:10.1016/j.petrol.2005.10.005
- Pruthi, V., Cameotra, S.S., 1997. Rapid identification of biosurfactant-producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique. *Biotechnology* 11, 671–674.
- Quadri, L.E.N., Weinreb, P.H., Lei, M., Nakano, M.M., Zuber, P., Walsh, C.T., 1998. Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carboxylase protein domains in peptide synthetases. *Biochemistry* 37, 1585–1595. doi:10.1021/bi9719861
- Raaijmakers, J.M., de Bruijn, I., de Kock, M.J.D., 2006. Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 19, 699–710. doi:10.1094/MPMI-19-0699
- Raaijmakers, J.M., de Bruijn, I., Nybroe, O., Ongena, M., 2010. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: More than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 1037–1062. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x
- Rahman, K.S.M., Rahman, T.J., Banat, I.M., Lord, R., Street, G., 2007. Bioremediation of petroleum sludge using bacterial consortium with biosurfactant, in: *Environmental Bioremediation Technologies*. pp. 391–408. doi:10.1007/978-3-540-34793-4_17

- Rahman, K.S.M., Thahira-Rahman, J., Lakshmanaperumalsamy, P., Banat, I.M., 2002. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresour. Technol.* 85, 257–261. doi:10.1016/S0960-8524(02)00119-0
- Rauch, S.L., Wedig, M.M., Wright, C.I., Martis, B., McMullin, K.G., Shin, L.M., Cannistraro, P.A., Wilhelm, S., 2007. Functional Magnetic Resonance Imaging Study of Regional Brain Activation During Implicit Sequence Learning in Obsessive-Compulsive Disorder. *Biol. Psychiatry* 61, 330–336. doi:10.1016/j.biopsych.2005.12.012
- Rausch, C., Hoof, I., Weber, T., Wohlleben, W., Huson, D.H., 2007. Phylogenetic analysis of condensation domains in NRPS sheds light on their functional evolution. *BMC Evol. Biol.* 7, 78. doi:10.1186/1471-2148-7-78
- Reiling, H.E., Thanei-Wyss, U., Guerra-Santos, L.H., Hirt, R., Käppeli, O., Fiechter, A., 1986. Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 985–989.
- Remichkova, M., Galabova, D., Roeva, I., Karpenko, E., Shulga, A., Galabov, A.S., 2008. Anti-herpesvirus activities of *Pseudomonas* sp. S-17 rhamnolipid and its complex with alginate. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 63, 75–81.
- Rieger, M.M., Rhein, L.D., 1997. Surfactants in cosmetics, Surfactant science series.
- Rodrigues, L., Banat, I.M., Teixeira, J., Oliveira, R., 2006. Biosurfactants: Potential applications in medicine. *J. Antimicrob. Chemother.* doi:10.1093/jac/dkl024
- Ron, E.Z., Rosenberg, E., 2002. Biosurfactants and oil bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* doi:10.1016/S0958-1669(02)00316-6
- Ron, E.Z., Rosenberg, E., 2001. Natural roles of biosurfactants. *Environ. Microbiol.* doi:10.1046/j.1462-2920.2001.00190.x
- Roongsawang, N., Hase, K.I., Haruki, M., Imanaka, T., Morikawa, M., Kanaya, S., 2003. Cloning and characterization of the gene cluster encoding arthrofactin synthetase from *Pseudomonas* sp. MIS38. *Chem. Biol.* 10, 869–880. doi:10.1016/j.chembiol.2003.09.004
- Roongsawang, N., Washio, K., Morikawa, M., 2011. Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. *Int. J. Mol. Sci.* doi:10.3390/ijms12010141

- Rosenberg, M., Gutnick, D., Rosenberg, E., 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 9, 29–33. doi:10.1111/j.1574-6968.1980.tb05599.x
- Sørensen, D., Nielsen, T.H., Christophersen, C., Sørensen, J., Gajhede, M., 2001. Cyclic lipoundecapeptide amphiphile from *Pseudomonas* sp. Strain DSS73. *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.* 57, 1123–1124. doi:10.1107/S0108270101010782
- Sachdev, D.P., Cameotra, S.S., 2013. Biosurfactants in agriculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 1005–1016. doi:10.1007/s00253-012-4641-8
- Sahoo, S., Datta, S., Biswas, D., 2011. Journal of Advanced Scientific Research Optimization of Culture Conditions for Biosurfactant Production from *Pseudomonas aeruginosa* OCD 1. *J Adv Sci Res J. Adv. Sci. Res.* 2, 32–36.
- Saikia, R.R., Deka, S., Deka, M., Banat, I.M., 2012. Isolation of biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* RS29 from oil-contaminated soil and evaluation of different nitrogen sources in biosurfactant production. *Ann. Microbiol.* 62, 753–763. doi:10.1007/s13213-011-0315-5
- Santos, D.K.F., Rufino, R.D., Luna, J.M., Santos, V.A., Sarubbo, L.A., 2016. Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century. *Int. J. Mol. Sci.* doi:10.3390/ijms17030401
- Satpute, S.K., Banpurkar, A.G., Dhakephalkar, P.K., Banat, I.M., Chopade, B. a, 2010. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 30, 127–144. doi:10.3109/07388550903427280
- Satpute, S.K., Bhawsar, B.D., Dhakephalkar, P.K., Chopade, B.A., 2008. Assessment of different screening methods for selecting biosurfactant producing marine bacteria. *Indian J. Mar. Sci.* 37, 243–250.
- Scaloni, A., Dalla Serra, M., Amodeo, P., Mannina, L., Vitale, R.M., Segre, A.L., Cruciani, O., Lodovichetti, F., Greco, M.L., Fiore, A., Gallo, M., D'Ambrosio, C., Coraiola, M., Menestrina, G., Graniti, A., Fogliano, V., 2004. Structure, conformation and biological activity of a novel lipodepsipeptide from *Pseudomonas corrugata*: cormycin A. *Biochem. J.* 384, 25–36. doi:10.1042/BJ20040422

- Segre, A., Bachmann, R.C., Ballio, A., Bossa, F., Grgurina, I., Iacobellis, N.S., Marino, G., Pucci, P., Simmaco, M., Takemoto, J.Y., 1989. The structure of syringomycins A1, E and G. *FEBS Lett.* 255, 27–31. doi:10.1016/0014-5793(89)81054-3
- Shaw, N., 1975. Bacterial Glycolipids and Glycophospholipids. *Adv. Microb. Physiol.* 12, 141–167. doi:10.1016/S0065-2911(08)60281-7
- Shoji, J., Hino, H., Katayama, T., Matsumoto, K., Tanimoto, T., Hattori, T., Higashiyama, I., Miwa, H., Motokawa, K., Yoshida, T., 1992. Isolation and characterization of new peptide antibiotics, plusbacins A1-A4 and B1-B4. *J. Antibiot. (Tokyo).* 45, 817–23. doi:10.7164/antibiotics.45.817
- Siddiqui, I.A., Shaikat, S.S., 2004. Liquid culture carbon, nitrogen and inorganic phosphate source regulate nematicidal activity by fluorescent pseudomonads in vitro. *Lett. Appl. Microbiol.* 38, 185–190. doi:10.1111/j.1472-765X.2003.01472.x
- Sieber, S.A., Marahiel, M.A., 2005. Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: Approaches to new antibiotics. *Chem. Rev.* doi:10.1021/cr0301191
- Sieber, S.A., Marahiel, M.A., 2003. Learning from Nature's Drug Factories: Nonribosomal Synthesis of Macrocyclic Peptides. *J. Bacteriol.* doi:10.1128/JB.185.24.7036-7043.2003
- Siegmund, I., Wagner, F., 1991. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotechnol. Tech.* 5, 265–268. doi:10.1007/BF02438660
- Silva, E.J., Rocha e Silva, N.M.P., Rufino, R.D., Luna, J.M., Silva, R.O., Sarubbo, L.A., 2014. Characterization of a biosurfactant produced by *Pseudomonas cepacia* CCT6659 in the presence of industrial wastes and its application in the biodegradation of hydrophobic compounds in soil. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 117. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.02.012
- Singh, A.K., Rautela, R., Cameotra, S.S., 2014. Substrate dependent in vitro antifungal activity of *Bacillus* sp strain AR2. *Microb. Cell Fact.* 13, 67. doi:10.1186/1475-2859-13-67
- Singh, G.B., Gupta, S., Gupta, N., 2013. Carbazole degradation and biosurfactant production by newly isolated *Pseudomonas* sp. strain GBS.5. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 84, 35–43.

doi:10.1016/j.ibiod.2013.05.022

- Sinnaeve, D., Hendrickx, P.M.S., Van Hemel, J., Peys, E., Kieffer, B., Martins, J.C., 2009a. The solution structure and self-association properties of the cyclic lipodepsipeptide pseudodesmin a support its pore-forming potential. *Chem. - A Eur. J.* 15, 12653–12662. doi:10.1002/chem.200901885
- Sinnaeve, D., Michaux, C., Van hemel, J., Vandenkerckhove, J., Peys, E., Borremans, F.A.M., Sas, B., Wouters, J., Martins, J.C., 2009b. Structure and X-ray conformation of pseudodesmins A and B, two new cyclic lipodepsipeptides from *Pseudomonas* bacteria. *Tetrahedron* 65, 4173–4181. doi:10.1016/j.tet.2009.03.045
- Sorensen, K.N., Kim, K.H., Takemoto, J.Y., 1996. In vitro antifungal and fungicidal activities and erythrocyte toxicities of cyclic lipodepsinonapeptides produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*? *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 2710–2713.
- Stachelhaus, T., Marahiel, M.A., 1995. Modular structure of peptide synthetases revealed by dissection of the multifunctional enzyme GrsA. *J. Biol. Chem.* 270, 6163–6169. doi:10.1074/jbc.270.11.6163
- Stein, D.B., Linne, U., Marahiel, M.A., 2005. Utility of epimerization domains for the redesign of nonribosomal peptide synthetases. *FEBS J.* 272, 4506–4520. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04871.x
- Stuible, H.P., Meier, S., Schweizer, E., 1997. Identification, isolation and biochemical characterization of a phosphopantetheine:protein transferase that activates the two type-I fatty acid synthases of *Brevibacterium ammoniagenes*. *Eur. J. Biochem.* 248, 481–487. doi:10.1111/j.1432-1033.1997.00481.x
- Sudo, T., Zhao, X., Wakamatsu, Y., Shibahara, M., Nomura, N., Nakahara, T., Suzuki, A., Kobayashi, Y., Jin, C., Murata, T., Yokoyama, K.K., 2000. Induction of the differentiation of human HL-60 promyelocytic leukemia cell line by succinoyl trehalose lipids. *Cytotechnology* 33, 259–264. doi:10.1023/A:1008137817944
- Suk, W.-S., Hong-Joo, S., Geon, L., Sang-Joon, L., 1999. Purification and Characterization of Biosurfactants Produced by *Pseudomonas* sp. SW1.
- Tayeb, L.A., Lefevre, M., Passet, V., Diancourt, L., Brisse, S., Grimont, P.A.D., 2008.

- Comparative phylogenies of Burkholderia, Ralstonia, Comamonas, Brevundimonas and related organisms derived from rpoB, gyrB and rrs gene sequences. *Res. Microbiol.* 159, 169–177. doi:10.1016/j.resmic.2007.12.005
- Tiehm, A., 1994. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 258–263.
- Tuleva, B., Christova, N., Jordanov, B., Nikolova-Damyanova, B., Petrov, P., 2005. Naphthalene degradation and biosurfactant activity by *Bacillus cereus* 28BN. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 60, 577–582.
- Ui, H., Miyake, T., Iinuma, H., Imoto, M., Naganawa, H., Hattori, S., Hamada, M., Takeuchi, T., Umezawa, S., Umezawa, K., 1997. Pholipeptin, a novel cyclic lipoundecapeptide from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Org. Chem.* 62, 103–108. doi:10.1021/jo9603993
- Urum, K., Pekdemir, T., 2004. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. *Chemosphere* 57, 1139–1150. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.07.048
- Uzoigwe, C., Burgess, J.G., Ennis, C.J., Rahman, P.K.S.M., 2015. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Front. Microbiol.* doi:10.3389/fmicb.2015.00245
- van Ginkel, C.G., 1996. Complete degradation of xenobiotic surfactants by consortia of aerobic microorganisms. *Biodegradation* 7, 151–164. doi:10.1007/BF00114627
- Van Hamme, J.D., Singh, A., Ward, O.P., 2006. Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnol. Adv.* doi:10.1016/j.biotechadv.2006.08.001
- Vater, J., Kablitz, B., Wilde, C., Franke, P., Mehta, N., Cameotra, S.S., 2002. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated. *Appl. Environ. Microbiol.* doi:10.1128/AEM.68.12.6210
- Vollenbroich, D., Pauli, G., Özel, M., Vater, J., 1997. Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 44–49.
- Walsh, C.T., Gehring, A.M., Weinreb, P.H., Quadri, L.E.N., Flugel, R.S., 1997. Post-

- translational modification of polyketide and nonribosomal peptide synthases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1, 309–315. doi:10.1016/S1367-5931(97)80067-1
- Walter, V., Sylđatk, C., Hausmann, R., 2010. Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. *Adv. Exp. Med. Biol.* 672, 1–13. doi:10.1007/978-1-4419-5979-9_1
- Wang, S., Mulligan, C.N., 2004. An evaluation of surfactant foam technology in remediation of contaminated soil. *Chemosphere*. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.08.019
- Weekers, F., Jacques, P., Springael, D., Mergeay, M., Diels, L., Thonart, P., 1999. Improving the catabolic functions of desiccation-tolerant soil bacteria. *Appl. Biochem. Biotechnol. - Part A Enzym. Eng. Biotechnol.* 77–79, 251–266.
- Wei, Y.H., Lai, C.C., Chang, J.S., 2007. Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Process Biochem.* 42, 40–45. doi:10.1016/j.procbio.2006.07.025
- Wei, Y.H., Lai, H.C., Chen, S.Y., Yeh, M.S., Chang, J.S., 2004. Biosurfactant production by *Serratia marcescens* SS-1 and its isogenic strain SMΔR defective in SpnR, a quorum-sensing LuxR family protein. *Biotechnol. Lett.* 26, 799–802. doi:10.1023/B:BILE.0000025881.95596.23
- Weng, W., Yang, F., Elsherbeni, A.Z., 2007. Taguchi ' s Method : A Novel Optimization Technique in Electromagnetics. *IEEE Trans. Antennas Propag.* 55, 723–730. doi:10.1109/TAP.2007.891548
- Willumsen, P.A., Karlson, U., 1997. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation* 7, 415–423. doi:10.1007/BF00056425
- Wilson Quail, J., Ismail, N., Soledade, M., Pedras, C., Boyetchko, S.M., 2002. Pseudophomins A and B, a class of cyclic lipodepsipeptides isolated from a *Pseudomonas* species. *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.* 58, o268–o271. doi:10.1107/S0108270102004432
- Yakimov, M.M., Fredrickson, H.L., Timmis, K.N., 1996. Effect of heterogeneity of hydrophobic moieties on surface activity of lichenysin A, a lipopeptide biosurfactant

- from *Bacillus licheniformis* BAS50. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 23 (Pt 1), 13–8.
doi:10.1111/j.1470-8744.1996.tb00358.x
- Yeh, M.S., Wei, Y.H., Chang, J.S., 2005. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by addition of solid carriers. *Biotechnol. Prog.* 21, 1329–1334.
doi:10.1021/bp050040c
- Youssef, N.H., Duncan, K.E., Nagle, D.P., Savage, K.N., Knapp, R.M., McInerney, M.J., 2004. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *J. Microbiol. Methods* 56, 339–347. doi:10.1016/j.mimet.2003.11.001
- Zachariah, P., Liston, J., 1973. Temperature adaptability of psychrotrophic *Pseudomonas*. *Appl. Microbiol.* 26, 437–8.
- Zhang, Y., Miller, R.M., 1994. Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2101–2106.
- Zhao, F., Shi, R., Zhao, J., Li, G., Bai, X., Han, S., Zhang, Y., 2015. Heterologous production of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid under anaerobic conditions for microbial enhanced oil recovery. *J. Appl. Microbiol.* 118, 379–389. doi:10.1111/jam.12698
- Zhao, P., Quan, C., Jin, L., Wang, L., Wang, J., Fan, S., 2013. Effects of critical medium components on the production of antifungal lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 exhibiting excellent biosurfactant properties. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 401–409. doi:10.1007/s11274-012-1180-5

Figure captions

Fig. 1 Plot of surface tension versus serial cell-free supernatant dilutions of *Pseudomonas* isolates E33b (▲), E38b (◆), E39 (×), E311 (■) and E313 (●) solutions and F_{CMC} determination

Fig. 2 Neighbour-joining phylogenetic tree based on partial 16S rRNA gene sequence analysis showing the relationship of biosurfactant producing isolates with phylogenetically

close members of the genus *Pseudomonas*. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145T was used as an outgroup. Percentage of bootstrap values are given at branching points (1000 replications)

Fig. 3 Whole-cells MALDI-ToF mass spectra of the three selected biosurfactant isolates, (A): *Pseudomonas* spp. E39, (B): *Pseudomonas* spp. E311. (C): *Pseudomonas* spp. E313

Fig. 4 Study of environmental conditions on biosurfactant crude extracts (0.1% w/v) stability: temperature effect on tensioactive residual activity (a) and emulsifying residual activity (b), pH effect on tensioactive residual activity (c) and emulsifying residual activity (d), salinity effect on tensioactive residual activity (e) and emulsifying residual activity (f) of biosurfactants produced by E39, E311 and E313 strain

Fig. 5 Study of Total petroleum hydrocarbon (TPH) biodegradation by E39 (■), E311 (◆) and E313 (▲) strains in diesel contaminated sand comparing with *Rhodococcus erythropolis* T902.1 used as positive control (●) and a non-inoculated bucket as a negative control (—)

Table 1 Assessment of biosurfactant and emulsifying activities of *Pseudomonas* isolates obtained from oil contaminated soil

Fig 1 :

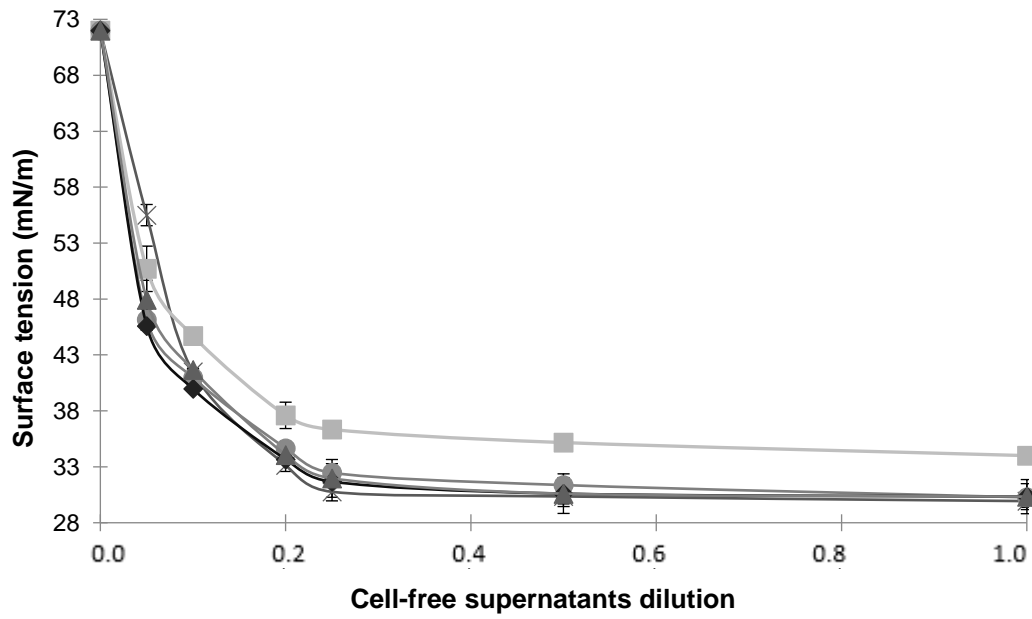


Fig 2 :

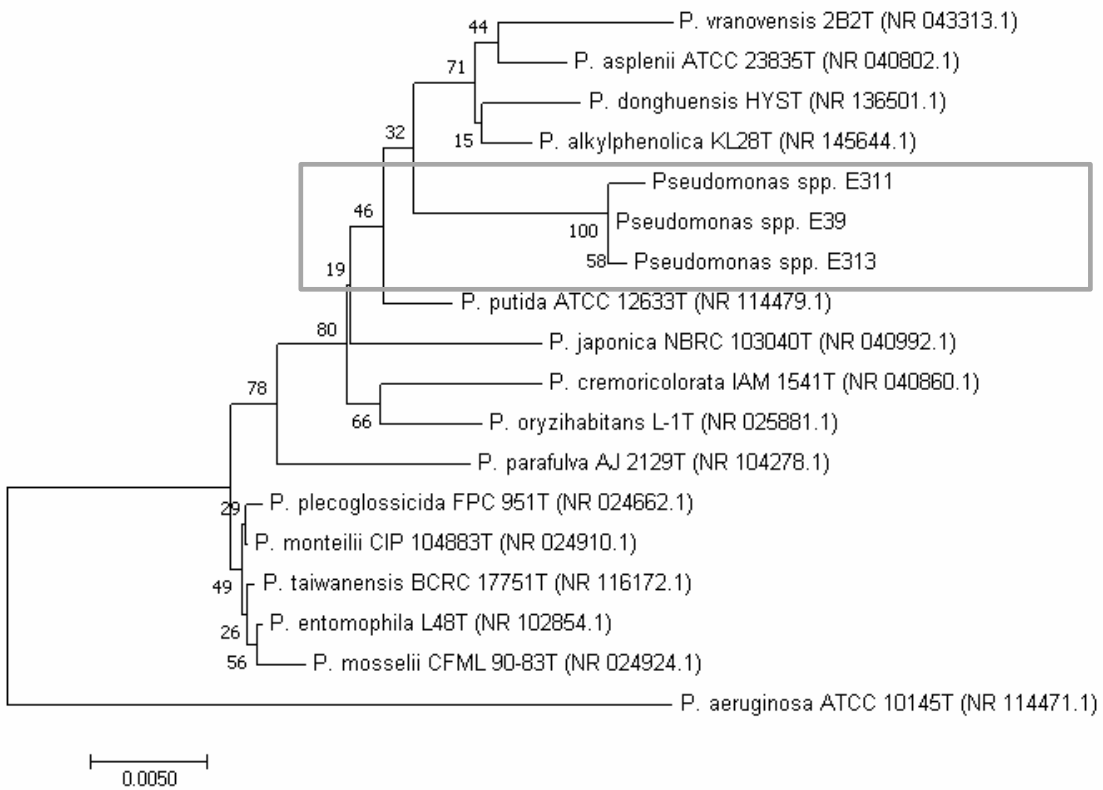


Fig 3 :

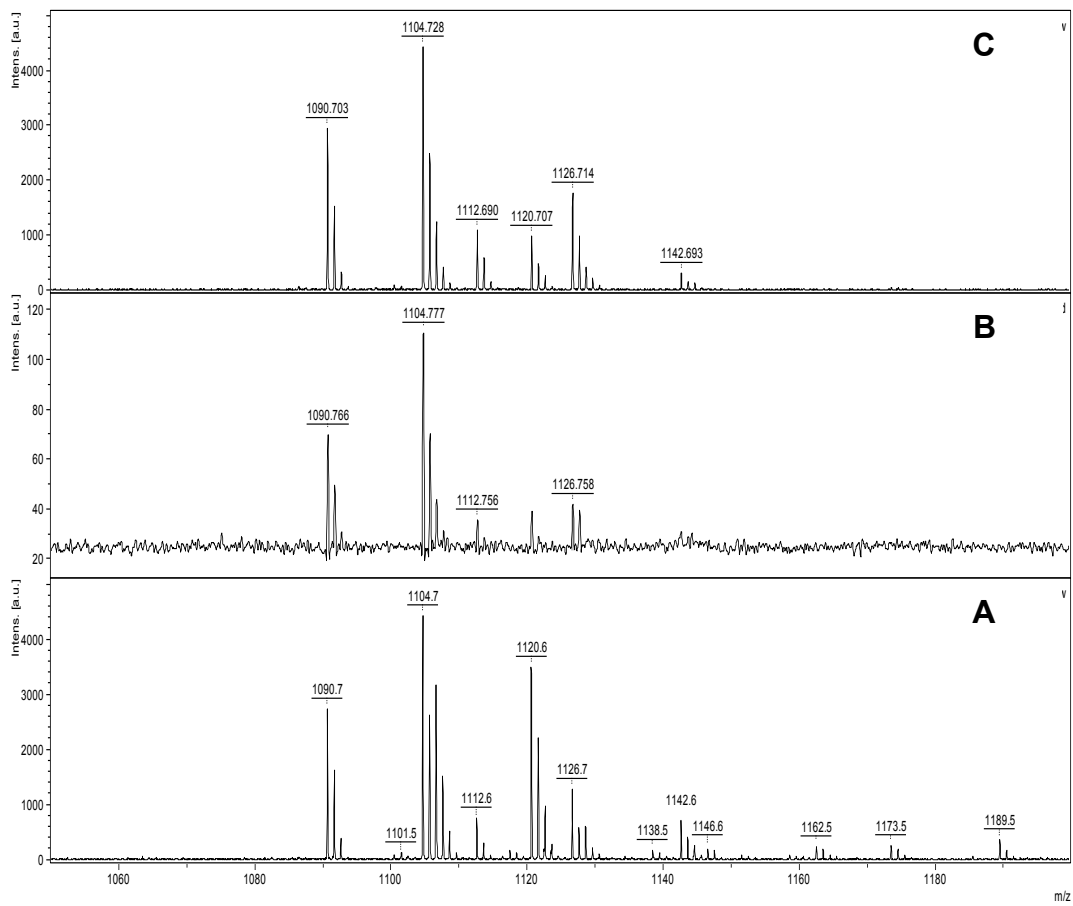
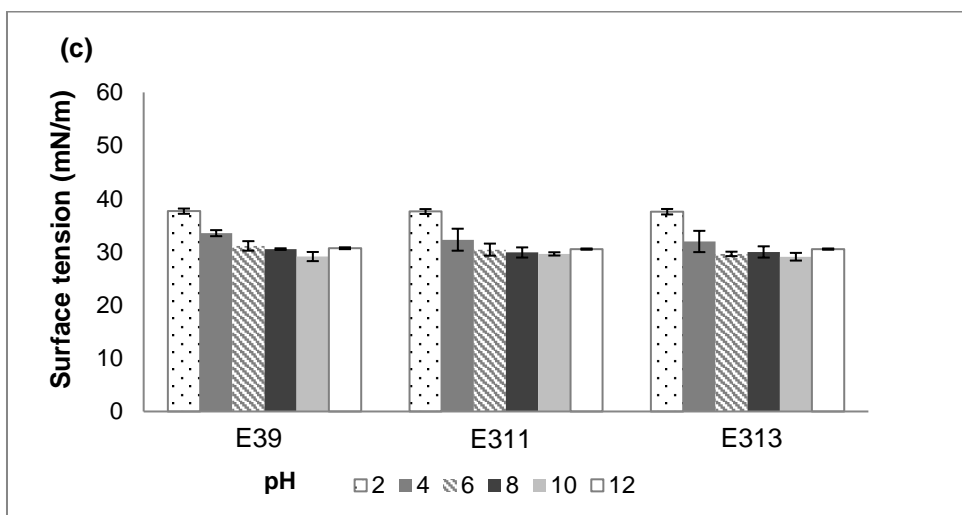
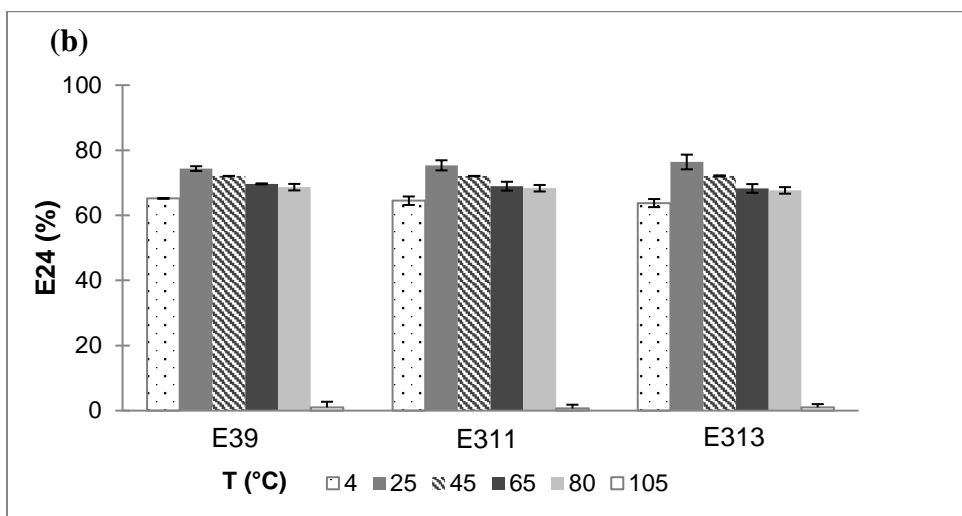
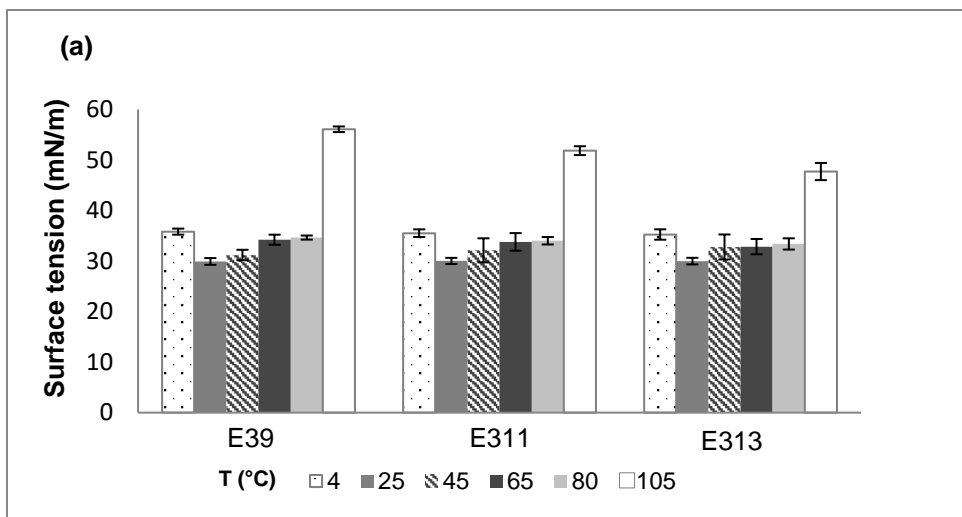


Fig 4 :



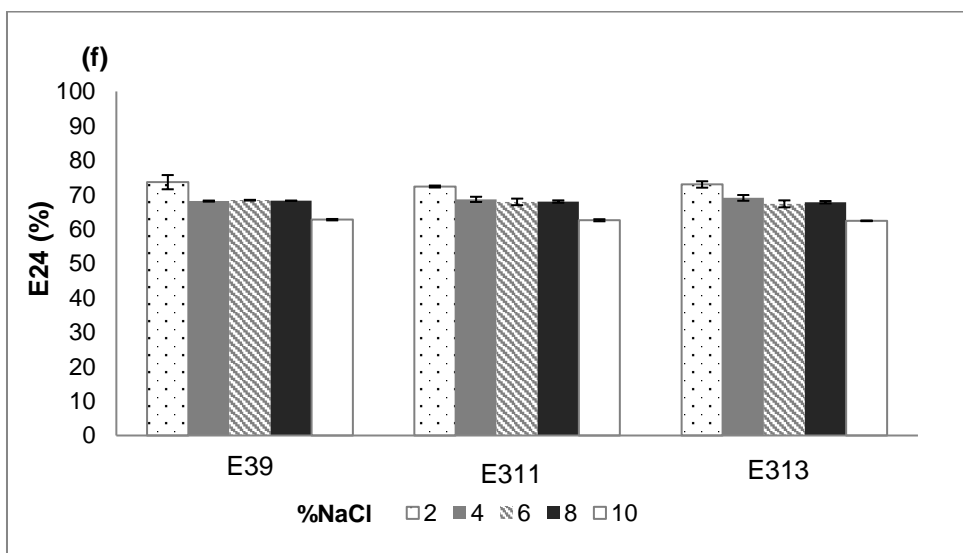
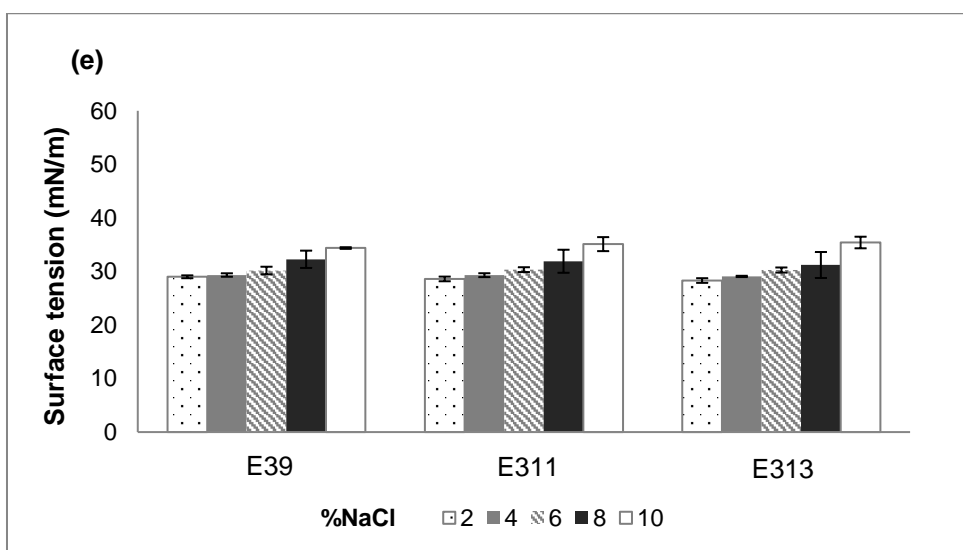
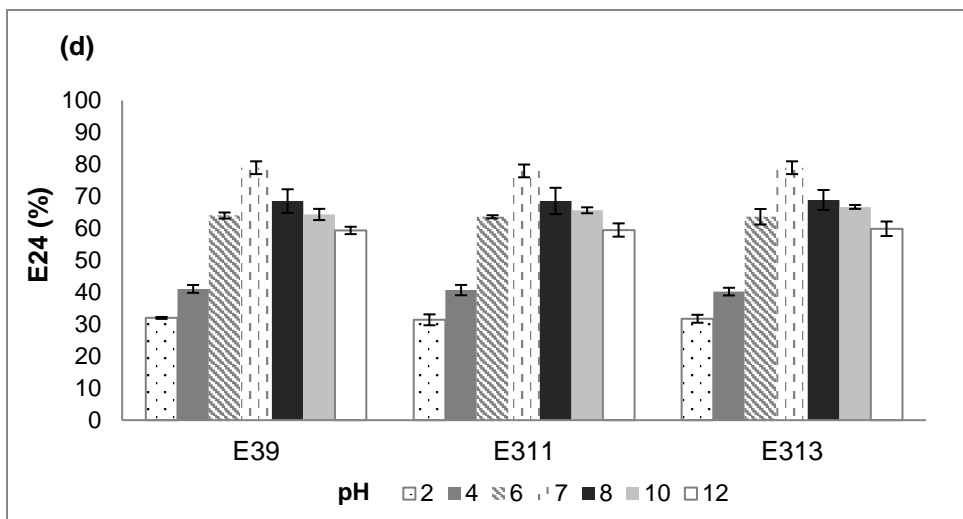


Fig 5 :

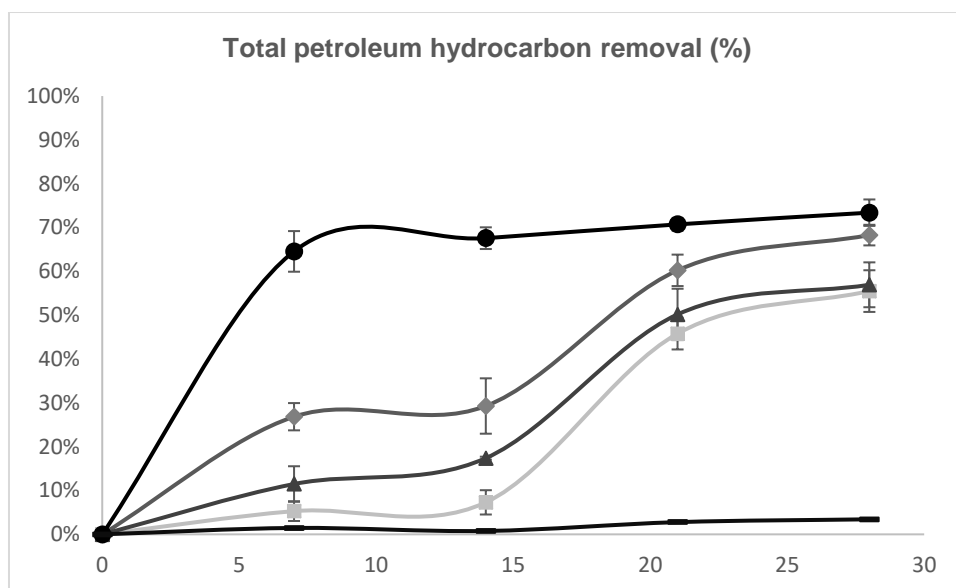


Table 1 :

Isolate	Drop collapse test	Surface tension (mN/m)	Oil displacement (mm)	Emulsion index (E24)
E33a	-	55.9±0.2	nd	nd
E33b	+	30.3±1.2	16.2±1.1	53±0.5%
E36	-	47.4±0.8	nd	nd
E37	-	50.3±0.8	nd	nd
E38a	-	49.13±0.2	nd	nd
E38b	+	30.3±1.6	17±1.1	62.7±1.1%
E39	+	29.9±0.7	19.3±0.6	79±2%
E310	-	52.9±0.5	nd	nd
E311	+	34±0.6	19±2.7	78±0.2%
E312	-	39.6±0.6	nd	nd
E313	+	30.3±0.6	19.3±0.6	79±0.4%

nd : not determined