

Vie planctonique et vie en biofilm, un exemple avec une souche *Janthinobacterium lividum*

1. Préalable

Les bactéries *Janthinobacterium* peuvent vivre à l'état planctonique (cellules isolées libres) ou former des biofilms (les biofilms bactériens sont des amas structurés de cellules bactériennes enrobés d'une matrice polymérique et attachés à une surface). Des souches de *Janthinobacterium lividum* sont retrouvées en biofilm à la surface de la peau d'amphibiens où elles participent, par la sécrétion de métabolites secondaires, à la protection antifongique et antibactérienne des animaux et donnent une coloration violette.

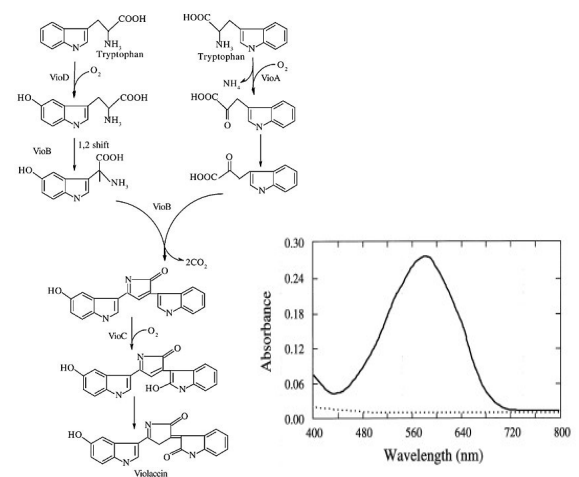
Tableau 1. Données concernant *Janthinobacterium lividum* :

Janthinobacterium lividum : bacilles à Gram négatif, mobiles par flagelles, espèce chimioorganotrophs aérobie stricte, optimum de température 25°C, maximum vers 30°C. Espèce très commune de l'environnement. Classée de classe de risque 1 selon le « Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA) » allemand.

Au sein des biofilms, les bactéries produisent notamment de la violacéine, un pigment violet à propriétés antifongiques et antibactériennes. La production de violacéine est soumise à des régulations complexes notamment par des systèmes auto-inducteurs sécrétés. Les gènes impliqués dans la voie de synthèse de la violacéine sont connus et disponibles.

D'après la littérature, en culture axénique en milieu liquide non agité (substrat glycérol, inhibition par le glucose), *Janth. Lividum* forme un biofilm de surface avec sécrétion de violacéine. Il y aurait favorisation par des concentrations sub-inhibitrices d'ampicilline (200µg/mL), des stress, du dioxyde de carbone ...

Tableau 2. Biosynthèse de la violacéine :



D'après J. of Biological Methods (40) 2000 47-55 et Biotechnology letter volume 23, décembre 2001, 1963-1969 la violacéine peut être aisément extraite à l'aide de butanol ou d'éthanol. Elle présente une large bande d'absorption dans le visible avec un maximum à 585 nm.

2. Travail à réaliser

2.1 gestion de la sécurité et des déchets

Si *Janth. Lividum* est classé dans le groupe de risque 1 par le BauA (Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, Federal Institute for Occupational Safety and Health), une série unique de 9 septicémies contractées dans un hôpital Thaïlandais via un bain de bouche très contaminé est répertorié. On travaillera donc comme pour un germe de classe 2 avec un risque de transmission aéroportée nulle.

2.2 Biofilm à violacéine, induction de production

Une culture de 72 heures de *Janthinobacterium lividum*, souche type, CIP 103349 (=DSMZ 1522) est disponible (100 mL de milieu LB+glycérol 1 % en Erlen de 500 mL, à 22°C, agitation douce). Un isolement sur milieu agarosé LB+glycérol 1 % est disponible.

- Observer l'allure des cultures fournies et renseigner le compte-rendu.
- Réaliser stérilement en NaCl 0,9 % une suspension trouble (type 1 Mc Farland). Cette suspension est appelée SI.
- Travailler alors selon le tableau ci-dessous, en petits pots plastiques de recueil stériles, diamètre 4cm.

Référence	A	B	C	D	E	F	G
Milieu de culture	5 mL de LB						
	+ glycérol 1 % final	+ glycérol 1 % final	+ glucose 1 % final	+ glycérol 1 % final		+ glycérol 1 % final	+ glycérol 1 % final
Suspension SI	0,250 mL						
Ampicilline 100 g/L	0	0	0	Volume nécessaire pour amener à 200 µg/mL, ajouté au temps 24h		0	0
Conditions de culture à 24 °C	Fermeture desserrée, agitation*.	Fermeture desserrée, pas d'agitation.	Fermeture desserrée, pas d'agitation.	Fermeture desserrée, pas d'agitation.	Fermeture desserrée, agitation.	Fermeture desserrée, non agité, en atmosphère enrichie en CO ₂ **.	

* : agitation sur plateau à 180 rpm ; ** : grâce au placement en jarre de 3L + réactif sachet enrichissant en CO₂ de type Oxoid CO₂GEN.

Isoler finalement sur milieu LB la suspension SI.

Observer les cultures chaque 24h pendant 5 jour.

Compte-rendu

- Travail réalisé, résultats obtenus et conclusions.
- Ne pas oublier de justifier le calcul des volumes de solution de glucose et glycérol 30 % et du volume de solution antibiotique utilisés.

2.2 Violacéine intra ou extracellulaire ou les 2 ?

Proposer un mode opératoire pour répondre à cette question. On pourra utiliser les données des tableaux 1 et 2 ci-dessous.

Tableau 1.

Extraction de la violacéine d'après J. of Biological Methods (40), 2000, 47-55

200 µL of culture is placed in a 1.5 mL Eppendorf tube. Then celles are lysed by adding 200 µL of 10% sodium dodecyl sulfate, mixing for 5 s with a vortex mixer, and incubating at room temperature for 5 min. Violacein is quantitatively extracted from this cell lysate by adding 900 µL of water-saturated butanol, vortexing for 5 s, and centrifuging at 13 000 g for 5 min in a microfuge. The butanol (upper) phase containing the violacein was collected and its absorbance measured at a wavelength of 585 nm.

Tableau 2.

Extraction de la violacéine adaptée de Biotechnology letter volume 23, décembre 2001, 1963-1969

Collection of 0.2 mL of culture. Centrifugation at 10 000 g for 10 min. The supernatant is eliminated and 1 mL absolute ethanol is added to the pellets of the cells to extract the pigment. Vortexing. Centrifugation at 10 000 g for 10 min. The supernatant is possibly diluted in absolute ethanol for violacein (violacein+deoxyviolacein) by absorbance measurement at 575 nm (molar extinction coefficient of pure violacein = 0,05601 ml.µg⁻¹ cm₋₁ in ethanol at 575 nm).

Bibliographie

- Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for N-acyl homoserine lactone autoinducers ; J. of Biological Methods (40) 2000 47-55.
- Optimization of culture conditions for violacein production by a new strain of *Duganella* sp. B2 ; Biochemical engineering journal ; 2009, vol. 44, no2-3, pp. 119-124
- Factorial design and response surface optimization of crude violacein for *Chromobacterium violaceum* production ; Biotechnology letter volume 23, décembre 2001, 1963-1969
- <http://web2.uwindsor.ca/courses/biology/fackrell/Microbes/4360.htm>
- Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum* ; Journal of Applied Microbiology ; 102 (2007) 992-999
- <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2006.03155.x/pdf>
- Technical Rule for Biological Agents 466 <http://www.baua.de/en/Topics-from-A-to-Z/Biological-Agents/TRBA/TRBA-466.html> et J Med Assoc Thai. 1992 Mar;75 Suppl 2:6-10 ; Hospital acquired *Janthinobacterium lividum* septicemia in Srinagarind Hospital.
- Claudia Hornung et al ; The *Janthinobacterium* sp. HH01 Genome Encodes a Homologue of the *V. cholerae* CqsA and *L. pneumophila* LqsA Autoinducer Synthases ; Plos one ; Published: February 6, 2013 ; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0055045>
- Natalia Valdes et al ; Draft genome sequence of *Janthinobacterium lividum* strain MTR reveals its mechanism of capnophilic behavior; Standards in Genomic Sciences 2015 10:110 ; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26605004>