

Production de violacéine par *Janthinobacterium lividum*

Tests préliminaires sur cultures agitées de quelques mL

1. Préalable

Quelques souches d'espèces bactériennes phylogénétiquement très proches produisent le métabolite secondaire violacéine. La violacéine présente des activités biologiques antiparasitaires (trypanocide), antitumorales (certaines leucémies) et anti-ulcérations gastriques qui pourraient lui conférer un intérêt thérapeutique. Elle est engagée dans la protection de la peau chez certains amphibiens dans une symbiose bactérie/amphibien.

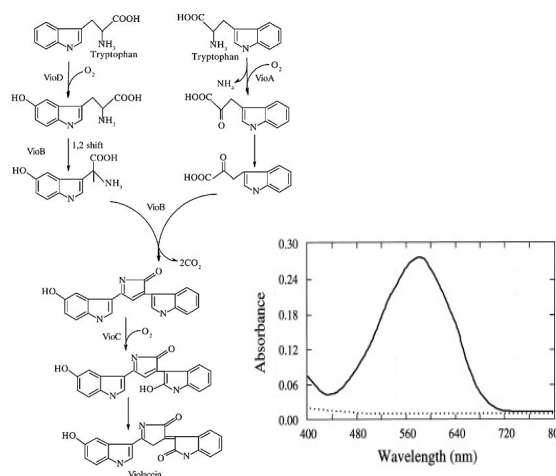
L'objectif est de réaliser une production de violacéine en milieu liquide en fermenteur de laboratoire. Il s'agit de réaliser dans un premier temps des essais en petits flacons dont les résultats seront utilisés pour le passage à l'échelle bioréacteur de laboratoire.

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. C'est d'ailleurs pourquoi on a préféré cette espèce à *Chromobacterium violaceum* pour le travail proposé. Car si *Chromob. violaceum* est plus célèbre que *Janth. Lividum* pour la production de violacéine, *Chromob. Viol.* est un pathogène opportuniste après infections cutanées ou ingestions qui peut être responsable de septicémies parfois graves ou mortelles en absence d'antibiothérapie adaptée débutée rapidement (depuis le premier cas publié, en Malaisie en 1927, une bonne centaine d'infections humaines à *Chromob. violaceum* ont été rapportées dans la littérature et l'espèce est classée dans le groupe de risque 2).

La production de violacéine est soumise à des régulations complexes (dont parfois le phénomène de quorum-sensing, voir cours et aussi et travaux pratiques « tp_quorumsensing.odt »). Les gènes impliqués dans la voie de synthèse de la violacéine sont connus et disponibles.

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.

Le tryptophane est le précurseur de la violacéine. La production de violacéine est régulée de façon complexe chez *Janthinobacterium lividum* : apparaît en phase stationnaire de culture, quasi nulle si milieu glucosé, importante sur substrat glycérol, favorisée par des concentrations sub-inhibitrices d'ampicilline (200µg/mL), des stress...

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 « Validation » d'un mode opératoire pour les mesures de violacéine et de biomasse

Une culture de 72 heures de *Janthinobacterium lividum*, souche type, CIP 103349 (=DSM 1522, appelée JIs dans la suite) est disponible (100 mL de milieu LB+glycérol 1 % en erlen de 500 mL, à 22°C, agitation douce). Du milieu LB+glycérol 1 % stérile est disponible.

- Réaliser le spectre d'absorbance du milieu LB-glycérol entre 500 et 740 nm (semi-microcuvettes, zéro = eau).
- Vortexer 30s un échantillon de la culture sur LB+glycérol (par exemple 0,5 mL en microtube) et diluer de façon adéquate la culture en milieu LB stérile de façon à pouvoir réaliser un spectre d'absorbance entre 500 et 740 nm conduisant à une DO entre 0,1 et 0,6 à 720 nm (semi-microcuvettes, zéro = eau). Repérer précisément le pic de DO vers 585 nm et la DO à 720 nm. (DO = densité optique : due à l'absorbance et au trouble).
- Extraire la violacéine de la culture selon le mode opératoire exposé dans le tableau 3 ou 4 ci-dessous. Réaliser un spectre « d'absorbance » entre 500 et 740 nm de la phase butanol ou éthanol (semi-microcuvettes, zéro = butanol ou éthanol). Dans le cas du mode opératoire du tableau 3, réaliser un spectre d'absorbance entre 500 et 740 nm de la phase aqueuse inférieure (semi-microcuvettes, zéro = eau, faire attention à ne pas remettre de culot en suspension)

Tableau 3.

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

200 μ L of culture is placed in a 1.5 mL Eppendorf tube. Then cells are lysed by adding 200 μ L 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 μ L 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 4.

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. μ g⁻¹ cm⁻¹ in ethanol at 575 nm).

Compte-rendu : Spectres annotés (il y aura certainement intérêt à en superposer certains pour faciliter l'interprétation). Les résultats obtenus permettent-ils d'envisager le suivi d'une culture en milieu liquide de *Janthinobacterium lividum* produisant de la violacéine par mesure d'absorbance (trouble) à 720 nm ? Le mode opératoire d'extraction de la violacéine paraît-il valide ?

2.3 Violacéine intra ou extracellulaire ou les 2 ?

- Prélever 1 mL de culture. Centrifuger 5 minutes à 13 000 g (= étape 1)
- Récupérer 200 μ L de surnageant de l'étape 1. Extraire la violacéine de ce surnageant selon le mode opératoire du tableau 3. Mesurer l'absorbance à 585 nm contre du butanol.
- Laver 2 fois le culot obtenu à l'étape 1 en eau+NaCl 9 g/L. Reprendre finalement le culot par 1 mL d' eau+NaCl 9 g/L. Extraire la violacéine selon le mode opératoire du tableau 3 sur une prise d'essai de 200 μ L. Mesurer l'absorbance à 585 nm contre du butanol.

Compte-rendu :

Résultats obtenus. Que peut-on dire de la localisation de la violacéine ?

2.4 Relation DO-720nm/UFC/biomasse sèche

Utiliser la culture de 72h en milieu LB+glycérol. Réaliser une observation microscopique après coloration de Gram. Vérifier qu'après agitation au vortex 30s, les bactéries sont isolées.

Compte-rendu : travail réalisé. Résultats.

2.4.1 Relation DO-720nm/UFC

A l'aide du résultat de DO à 720 nm sur la culture diluée obtenu au paragraphe 2.2, calculer la DO de la culture non diluée à 720 nm. En supposant que 1 de DO correspond à 10^9 bactéries, en déduire la concentration supposée en bactéries de cette culture.

Dénombrer alors la culture par comptage d'UFC sur boîtes de milieu LB. On réalisera une série de dilutions de raison géométrique 1/10 (homogénéisation au vortex). On inoculera sous volume de 0,1 mL, étalement en surface, 3 dilutions judicieuses pour lesquelles on espère compter 30 à 300 colonies par boîte. Incuber à 25°C.

Compte-rendu : travail réalisé, résultats bruts obtenus. Relation DO-720nm/UFC

2.4.2 Relation DO-720nm/UFC/biomasse sèche

Prélever 50 mL de culture de 48 heures de *Janthinobacterium lividum* en LB+glycérol. Centrifuger, laver le culot bactérien et transférer quantitativement dans un petit bécher préalablement taré. Sécher à 105°C. Peser. En déduire la biomasse sèche présente dans les 50 mL.

Compte-rendu : résultats bruts. Relation DO-720nm/UFC/biomasse sèche. Masse moyenne d'une bactérie.

2.4 La violacéine, métabolite secondaire, induction de sa production

D'après la littérature, la production de violacéine par *Janthinobacterium lividum* ne commence qu'en phase stationnaire de culture et est associée à la formation d'un biofilm. Elle est inhibée si la culture a été réalisée en milieu LB-glucosé (1%) et amplifiée si du glycérol (1%) a été préféré. Certains stress amplifient la production comme les concentrations sub-inhibitrices en antibiotiques (100 à 2000 µg/mL d'ampicilline). Les effets de la température sont mal décrits, 25°C, serait optimum, 30°C serait un maximum ? Pour le $\frac{1}{2}$ groupe, proposer 2 conditions de production qui seront réalisées dupliquées. A disposition : milieu LB, ampicilline 1 g/L, glycérol stérile, tryptophane 10g/L, incubateurs à température réglable ... Proposer l'organigramme de suivi des manipulations. Chaque étudiant participe alors à la mise en place et au suivi des cultures.

Compte-rendu : Résultats obtenus et conclusions (comment envisager une production de violacéine en fermenteur 1,5 L ?).

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