

Production de violacéine par *Chromobacterium violaceum*

Tests préliminaires sur cultures agitées de 30 mL

Travail en ateliers « tournants » de 3 étudiants. Les compte-rendu sont évidemment individuels.

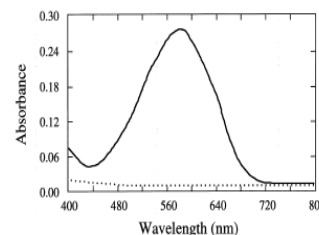
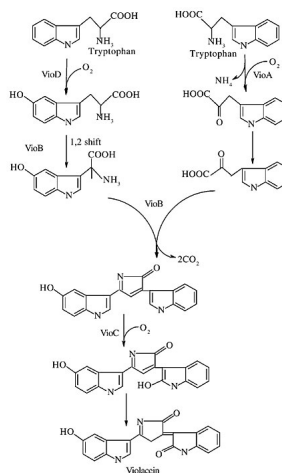
1. Préalable

Chromobacterium violaceum est une bactérie tellurique (bactérie du sol) productrice d'un métabolite secondaire caractéristique : la violacéine. Cette production est soumise à régulation par phénomène de quorum-sensing (voir travaux pratiques de première année, tp_quorumsensing.odt). La violacéine fait partie d'un ensemble de métabolites secondaires libérés par *C. violaceum*. La violacéine présente des activités biologiques antiparasitaire (trypanocide), antitumorale (certaines leucémies) et anti-ulcération gastrique qui pourraient leur conférer un intérêt thérapeutique. Les gènes impliqués dans la synthèse de ces composés sont disponibles, la séquence du génome de *C. violaceum* (souche ATCC 12472) est connue.

Tableau 1. Données concernant *Chromobacterium violaceum* :

Données concernant *Chromobacterium violaceum* : bacilles à Gram négatif, mobiles par flagelles, chimoorganotrophes aéro-anaérobies facultatifs. Bactérie du sol et de l'eau des régions humides tropicales et subtropicales. Bactérie saprophyte, considérée généralement comme non pathogène, mais à pouvoir pathogène opportuniste à l'occasion d'infections cutanées ou d'ingestions. Elle 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 *C. violaceum* ont été rapportées dans la littérature).

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 ou 575 nm.

La production de violacéine est régulée par quorum-sensing et favorisée par une très bonne oxygénation des milieux.

L'objectif est de réaliser des essais préliminaires en ErlenMeyer dont les résultats seront utilisés pour mettre en place une étude qui sera conduite à l'échelle du laboratoire et ayant pour objet la production de violacéine en fermenteur en milieu liquide.

2. Travail à réaliser

2.1 gestion de la sécurité et des déchets

Le travail à réaliser proposé dans ce paragraphe 2 n'exige pas de protéger la manipulation de contaminants. En revanche il demande des mesures de protection adaptées pour les manipulateurs, les futurs intervenants dans le laboratoire et une gestion des déchets conforme. La lecture du tableau 1 est, à ce titre, indispensable.

2.2 « Validation » du mode opératoire pour les mesures de violacéine et de biomasse

Une culture de 48 heures de *Chromobacterium violaceum*, souche sauvage CIP 103350 (= ATCC12472, appelée CV-S dans la suite) est disponible (25 mL de milieu TCS en erlen de 250 mL, forte aération par agitation orbitale, à 28°C).

Une culture de 48 heures de *Chromobacterium violaceum*, souche CV017 est disponible ((25 mL de milieu TCS en erlen de 250 mL, forte aération par agitation orbitale, à 28°C). On rappelle que CV017 est une souche « mutant spontané résistant à la streptomycine, producteur d'AHL mais déréprimé pour la production inductible de violacéine à 30°C (par mutagenèse mini-Tn5) ».

Du milieu TCS stérile est disponible.

- Réaliser le spectre d'absorbance du milieu TCS stérile entre 500 et 700 nm (semi-microcuvettes, zéro = eau).
- Diluer de façon adéquate les cultures de souches CV-S et CV017 en milieu TCS stérile de façon à obtenir une absorbance à 660 nm entre 0,3 et 0,5. Réaliser alors, sur ces 2 dilutions, le spectre d'absorbance entre 500 et 700 nm (semi-microcuvettes, zéro = eau).
- Extraire la violacéine de la culture de CV-S selon le mode opératoire exposé dans le tableau 3 ou 4 ci-dessous. Réaliser un spectre d'absorbance entre 500 et 700 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 700 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 celles 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 d'après Biotechnology letter volume 23, décembre 2001, 1963-1969

Collection of 1 mL of culture. Centrifugation at 10 000 g for 10 min. The supernatant is eliminated and 5 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 supernatent is 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 CV-S produisant de la violacéine par mesure d'absorbance (trouble) à 660 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 CV-S. 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 La violacéine, métabolite secondaire, induction de sa production

Chez les souches sauvages de *Chromobacterium violaceum*, la production de violacéine est induite par phénomène de « Quorum-sensing » mettant en action des médiateurs N-acyl-homosérine lactones (AHL). Revoir le travail de première année lors du TP correspondant au fichier tp_quorumsensing.odt.

Inoculer 3 Erlens de 250 mL contenant 30 mL de milieu TCS à 5%(V/V) : deux avec la culture de CV-S, un avec la culture de CV017. Cultiver sous agitation forte à 28°C. Suivre la biomasse par mesure d'absorbance à 660 nm. Une mesure chaque heure pendant 10 heures (prélèvements de 500 μ L). Au temps $t = 4$ heures, introduire 2 mL de surnageant filtré (centrifugation de la culture, puis filtration sur filtre de porosité 0,2 μ m) d'une culture de 18 heures d'*Aeromonas hydrophila* (contient des AHL reconnues par CV-S) dans un des Erlens de CV-S. Observer la production éventuelle de violacéine (visuelle ou quantitative pour les courageux par extraction et mesure d'absorbance à 585 nm).

Poursuivre chaque culture pendant 30 heures. Au bout des 30 heures : mesurer la biomasse par absorbance à 660 nm (on admettra une limite de linéarité à 0,6) . Extraire la violacéine et mesurer par absorptiométrie.

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

Bibliographie :

- Regina Vasconcellos Antônio and Tânia B. Creczynski-Pasa ; Genetic analysis of violacein biosynthesis by *Chromobacterium violaceum*, *Genet. Mol. Res.* 3 (1): 85-91 (2004).
- Renée S. Blosser, Kendall M. Gray ; 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.
- HAISHENG WANG ; PEIXIA JIANG ; YUAN LU ; ZHIYONG RUAN ; RUIBO JIANG ; XING Xin-Hui ; KAI LOU ; DONG WEI ; 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
- Armando S. Mendes, João E. de Carvalho, Marta C.T. Duarte, Nelson Durán and Roy E. Bruns ; Factorial design and response surface optimization of crude violacein for *Chromobacterium violaceum* production ; *Biotechnology letter* volume 23, décembre 2001, 1963-1969