Contribution à l'évaluation *a priori* des risques immuno-toxiques associés aux composés biosourcés d'origines microbiennes – Cas des rhamnolipides.

Hakim Chouki Samaï[1], Damien Rioult[2], Arnaud Haudrechy[3], Mª Pilar Mellado Garcia[1], Elodie Geba[1,2], Amandine Sommé[1,2], Marc Ongena[4], Sandrine Bouquillon[3], Stéphan Dorey[5] et Stéphane Betoulle[1,2]

[1]*Unité Stress Environnementaux et Biosurveillance des milieux aquatiques, UMR-I 02, Université de Reims Champagne-Ardenne, UFR des Sciences Exactes et Naturelles, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2*

[2]*Plateau technique mobile en cytométrie environnementale MOBICYTE, Université de Reims Champagne-Ardenne/INERIS, UFR des Sciences Exactes et Naturelles, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2*

[3]*Institut de Chimie Moléculaire de Reims UMR CNRS 7312, Université de Reims Champagne-Ardenne, UFR des Sciences Exactes et Naturelles, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2.*

[4]*Unité de Bio-Industries, Centre de Biophysique Moléculaire Numérique, Unité de Chimie Générale et Organique, Unité de Phytopathologie - Gembloux Agro-Bio Tech - Université de Liège.*

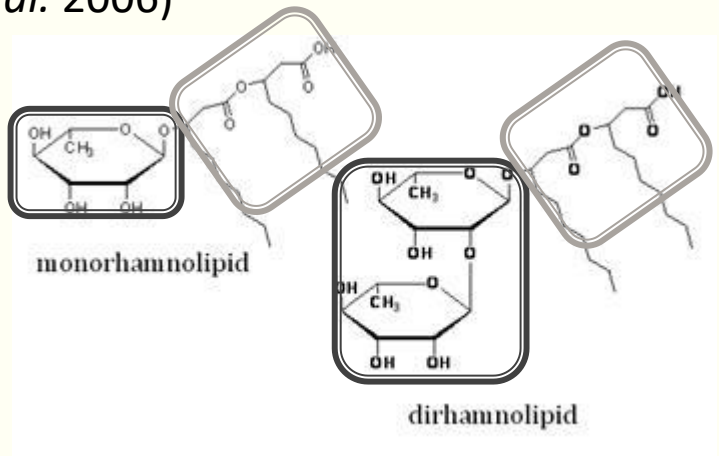
[5]*Unité de Recherche Vignes et Vins de Champagne EA 4770, Université de Reims Champagne-Ardenne, UFR des Sciences Exactes et Naturelles, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2.*

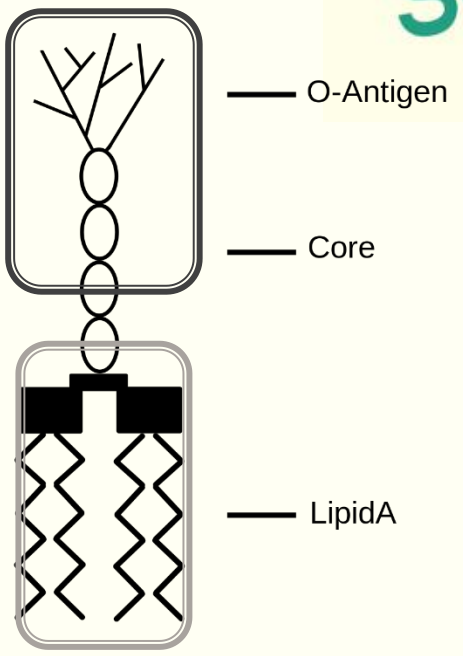
Bordeaux 2016

Rhamnolipides

- **Rhamnolipides : biosurfactants d'origine bactérienne (*Pseudomonas aeruginosa*)** (Vatsa *et al.* 2010)

- **Molécules considérées comme ayant une activité « Endotoxine-Like » : similitude avec les endotoxines bactériennes lipopolysaccharidiques ou LPS** (Andrä *et al.* 2006)





LIPOPOLYSACCHARIDE

Risque inflammatoire ?

Rhamnolipides

- **Application en agriculture comme biofongicide: Exemple du Zonix® aux Etats Unis**

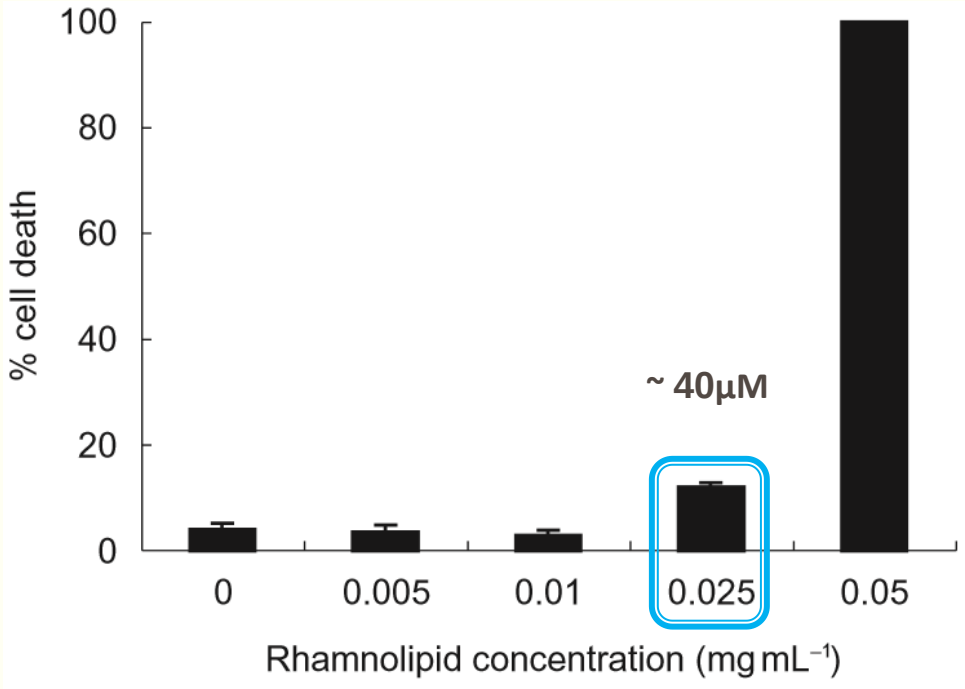
- **Application possible dans d'autres domaines : Bioremédiation, décontamination, biomédicale…**

(Vatsa *et al.* 2010, Cameotra *et al.* 2010, Cameorta & Makkar. 2004)

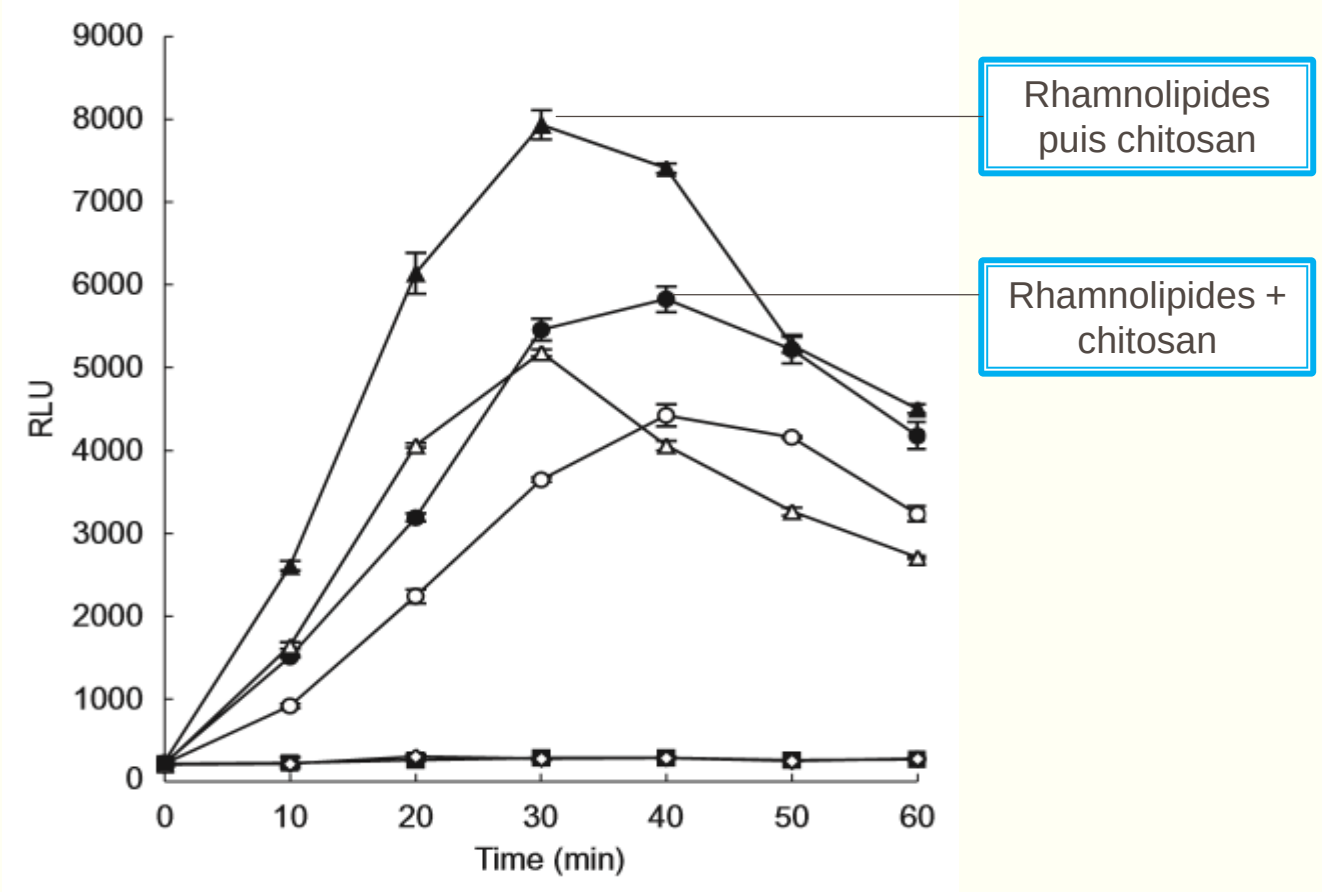
- Use of rhamnolipid to remove heavy metals from wastewater by micellar-enhanced ultrafiltration (MEUF) (El Zeftawy & Mulliguan, 2011)
- Production of rhamnolipids and diesel oil degradation by bacteria isolated from soil contaminated by petroleum (Leite *et al.* 2015)

Résultats rhamnolipides (URVVC – EA 4770) Varnier *et al.* 2009

- **Mort programmée (apoptose) des cellules chez les plantes avec fortes doses**



- **Potentiel éliciteur d'induction d'une activité oxydative chez les plantes**



Les rhamnolipides

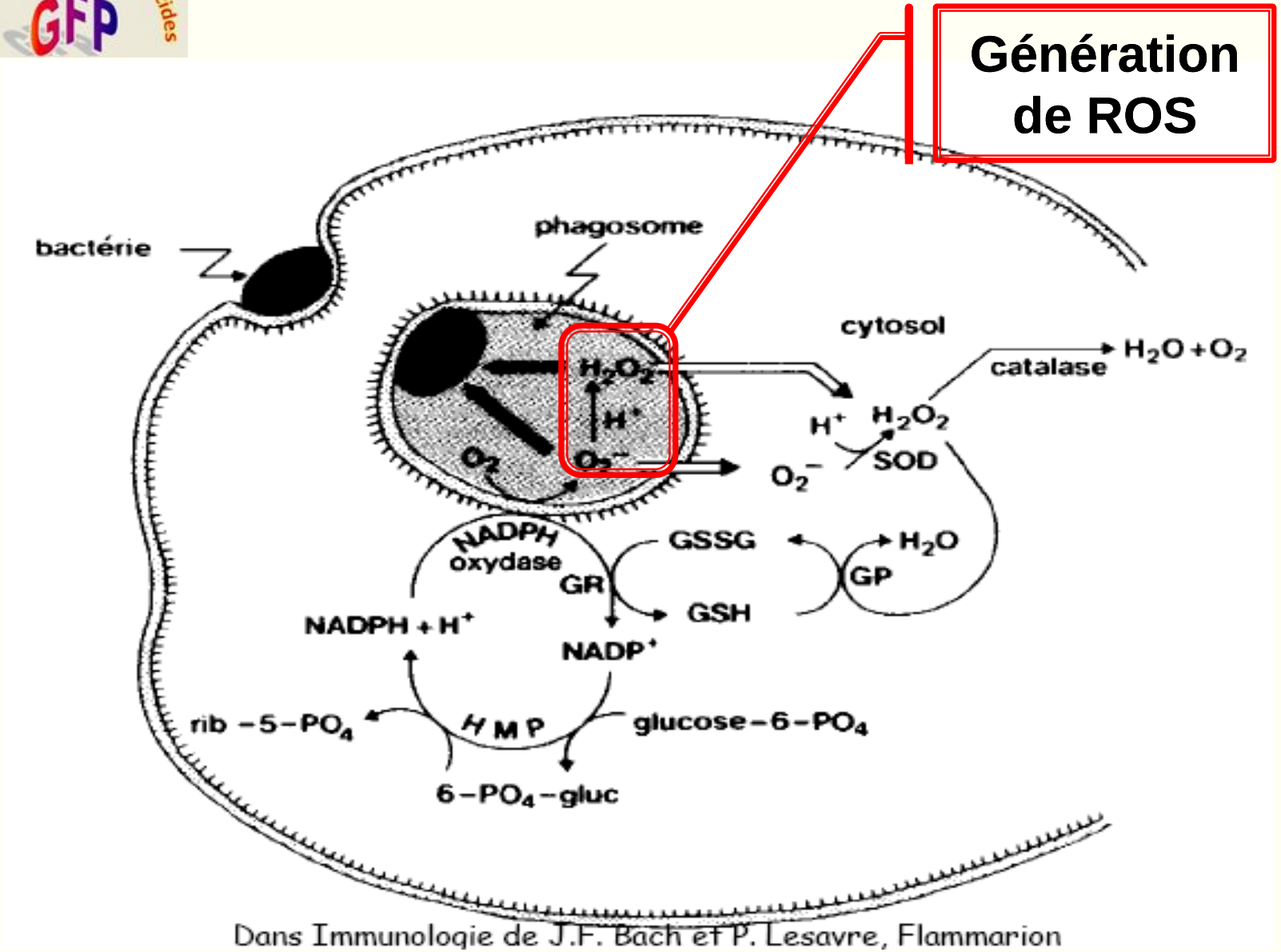
- **Alternative aux pesticides issus de la chimie de synthèse**
- **Biomolécules d'origines bactériennes : Elicitation de la défense immunitaire des plantes**
- **Si effets bénéfiques pour les plantes → Effets toxicologiques pour organismes non cibles?**
- **Littérature pauvre en données écotoxicologiques des rhamnolipides** (Johann *et al.* 2016)

Approche expérimentale

Etudes en ex vivo (approche cellulaire du risque toxicologique):

- **Participation à la vérification de l'innocuité environnementale de biomolécules utilisées dans l'élicitation des mécanismes de défense des plantes.**
- **Evaluation du risque immunotoxique: Activité oxydative (production d'espèces réactives d'oxygène) : condition normale de protection immunitaire ou phénomène d'inflammation?**

Génération de ROS

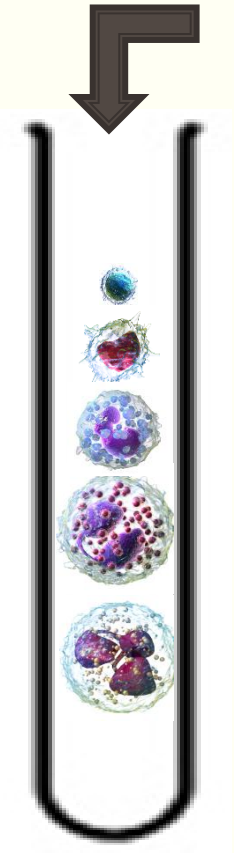


Dans Immunologie de J.F. Bach et P. Lesavre, Flammarion

Protocole expérimental

Modèle animal et culture cellulaire primaire pour *ex vivo* :

- Cellules immunitaires de gardon (*Rutilus rutilus*): splénocytes en culture primaire
- Suspension des cellules dans du PBS pour contamination et lecture

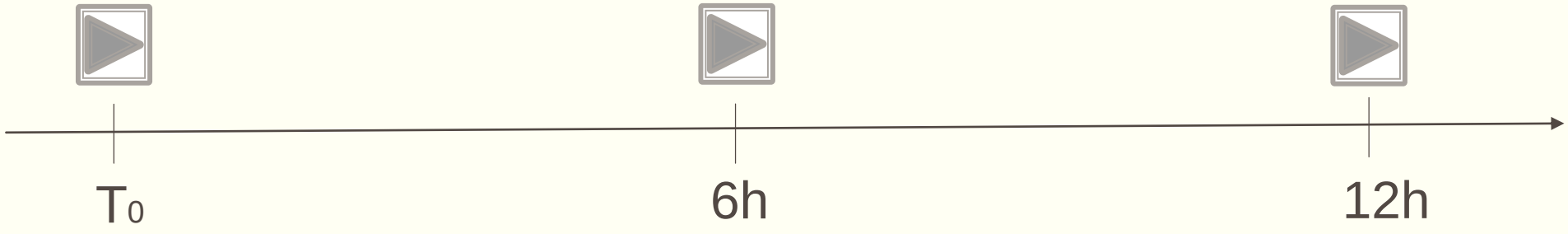


Mesure par cytométrie en flux de la mortalité cellulaire (Iodure de Propidium)

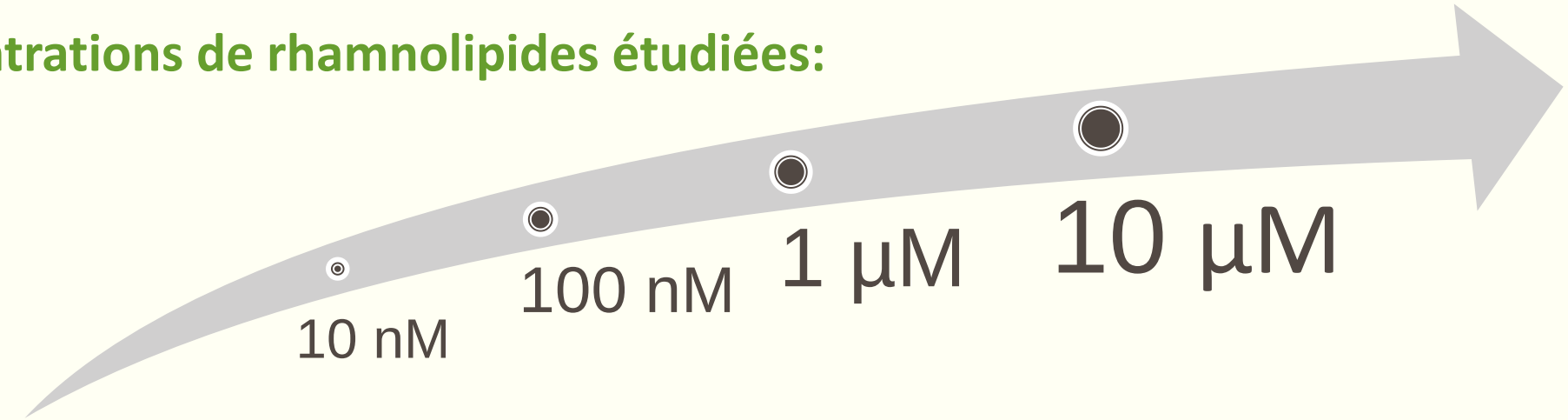
Mesure par chimioluminescence de la production de ROS (Luminol)

Protocole expérimental

Mesures de cytotoxicité:



Concentrations de rhamnolipides étudiées:



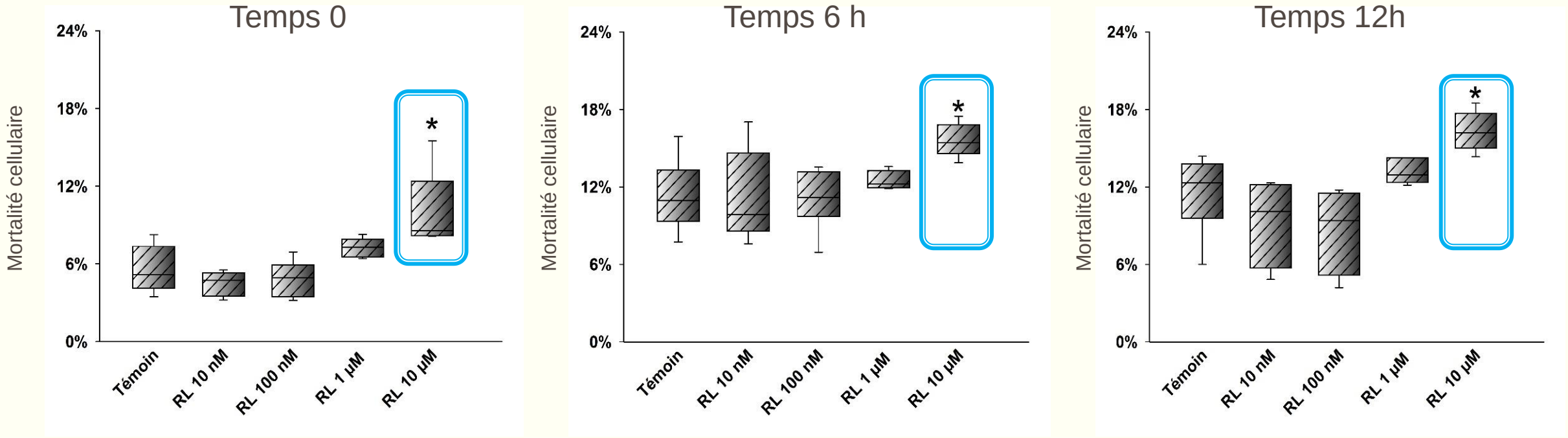
Protocole expérimental

Mesures de production de ROS:

Phase 1:	Phase 2:	Phase 3:
• Exposition des leucocytes au rhamnolipides	• Pré-incubation avec rhamnolipides mesure de l'effet du PMA	• Pré-incubation et réexposition aux mêmes molécules
T_0 ✓	6h 12h ✓	6h 12h ✓

Cytotoxicité des rhamnolipides

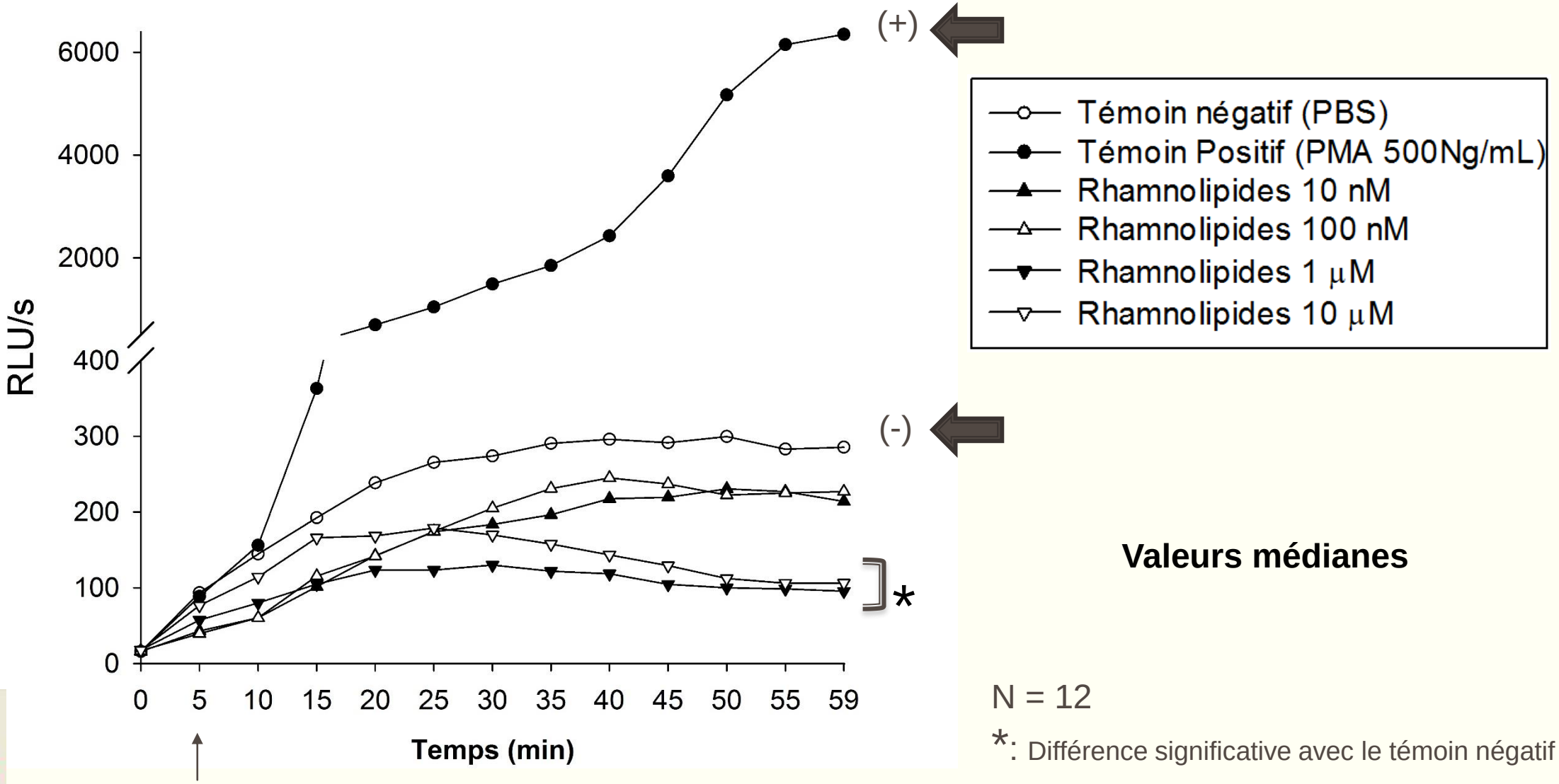
Valeurs médiane (min-max) N = 6, RL : Rhamnolipides)



* : Test statistique Mann-Whitney, différence significative avec le témoin

Rhamnolipides et activité oxydative – sans incubation

PHASE 1



Ajout de PMA (+) / PBS (-) / Rhamnolipides

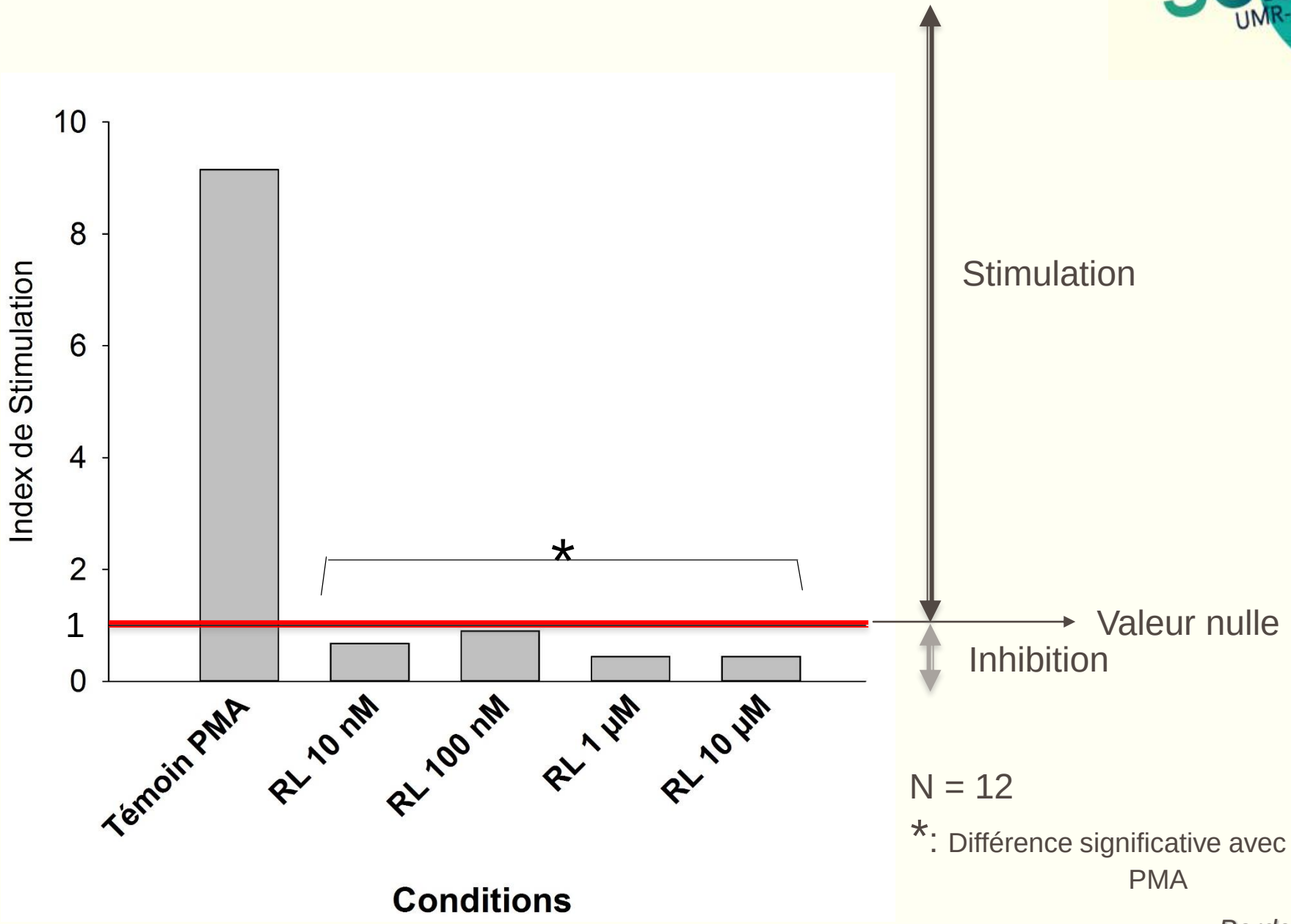
Valeurs médianes

N = 12

*: Différence significative avec le témoin négatif

Rhamnolipides et activité oxydative – sans incubation

PHASE 1



N = 12

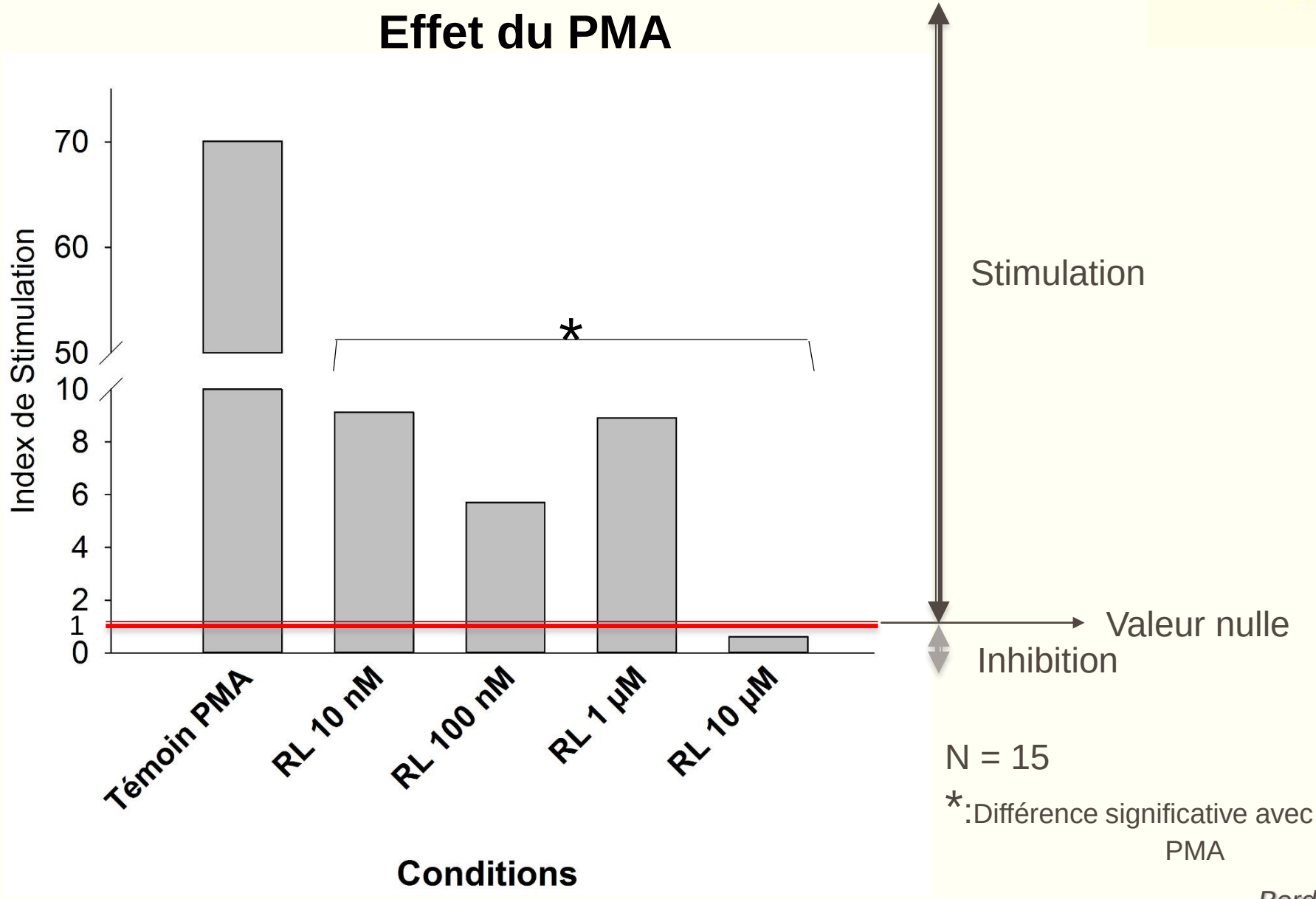
*: Différence significative avec le témoin PMA

Bordeaux 2016

Rhamnolipides et activité oxydative – pré-incubation de 12h

PHASE 2

Effet du PMA



N = 15

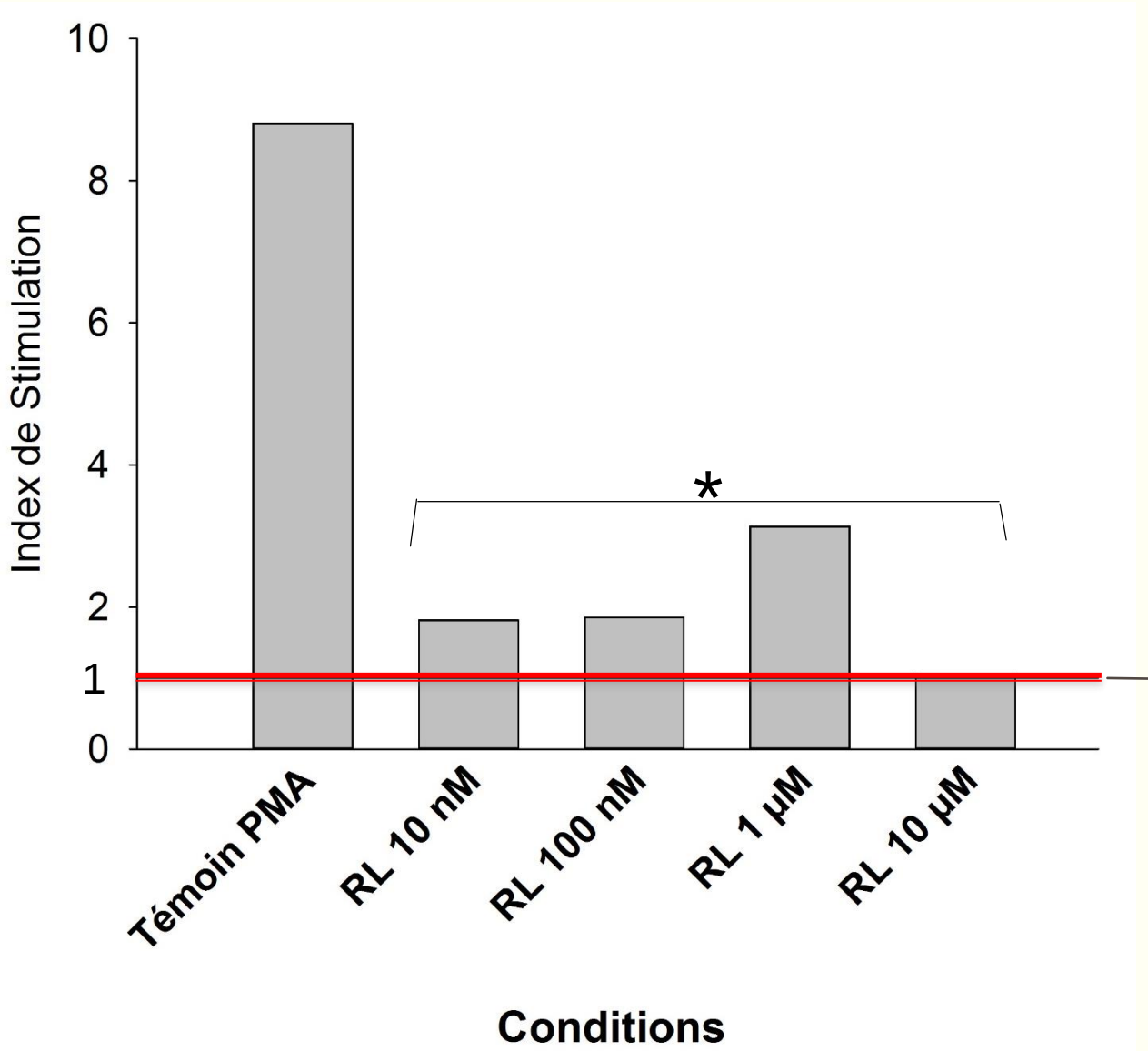
*:Différence significative avec le témoin PMA

Bordeaux 2016

Rhamnolipides et activité oxydative – pré-incubation de 12h

Effet des rhamnolipides

PHASE 3



Stimulation

Valeur nulle

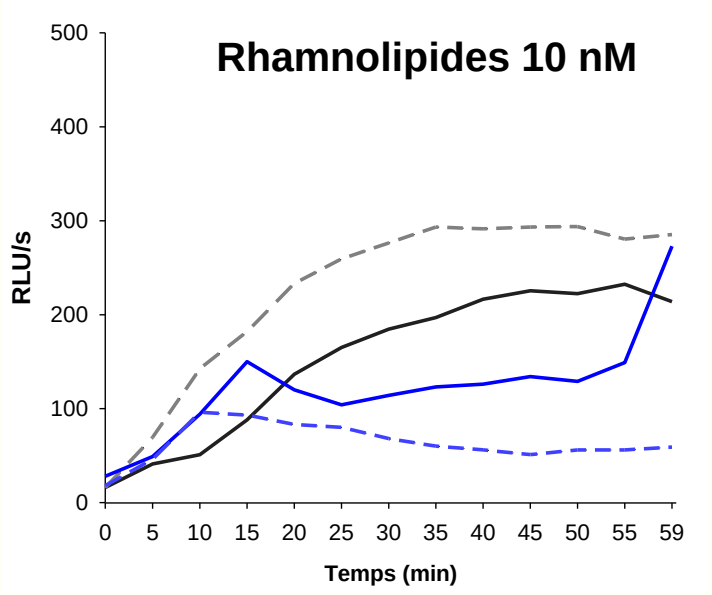
Inhibition

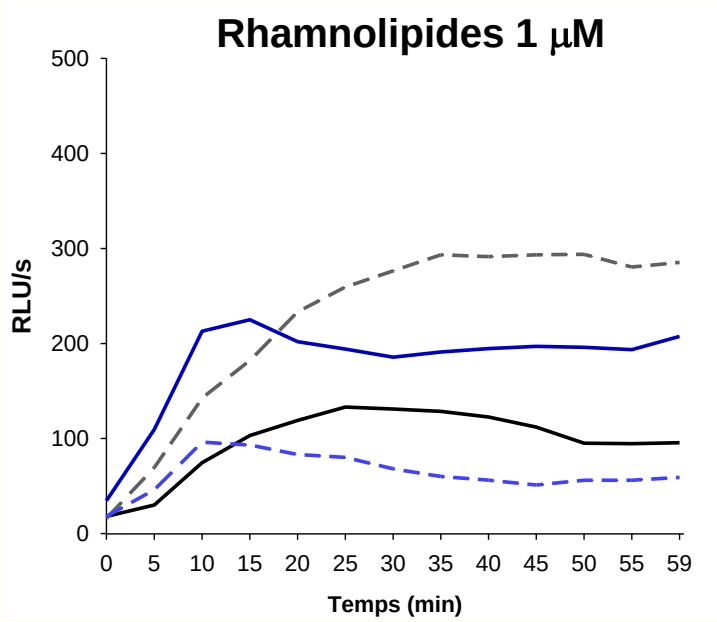
N = 12

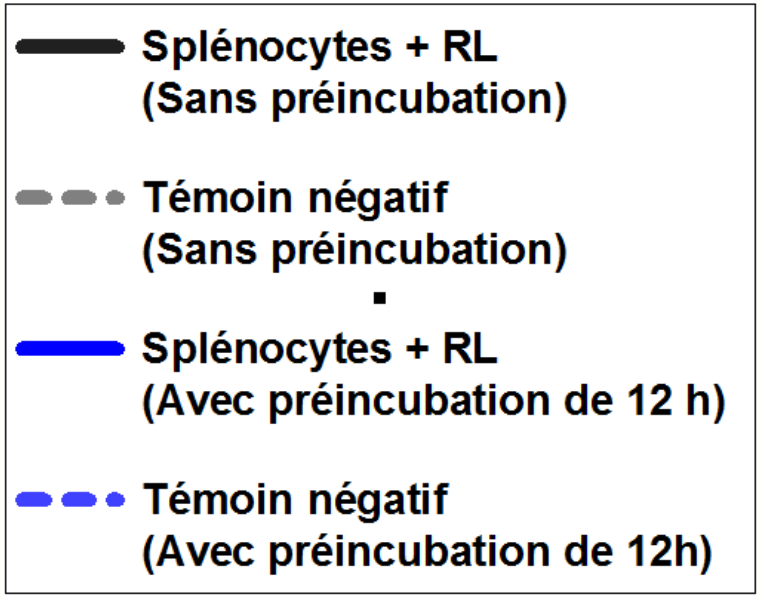
*: Différence significative avec le témoin PMA

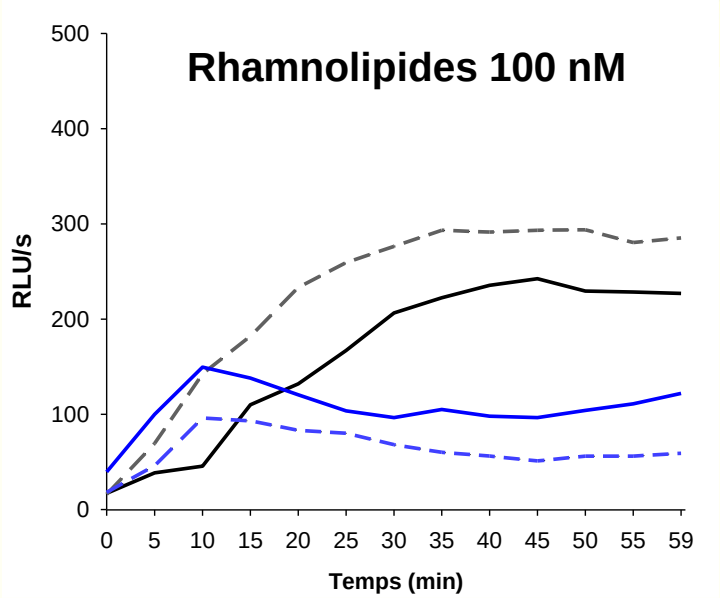
Bordeaux 2016

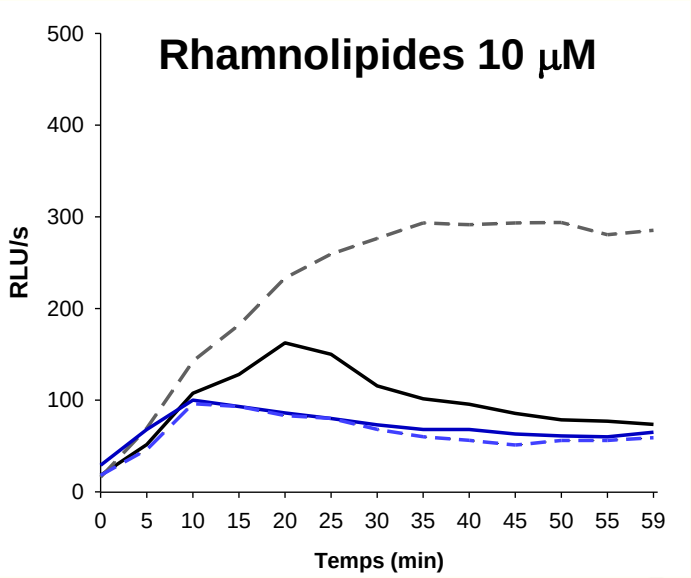
Activité oxydative des splénocytes avec et sans préincubation: Effet des Rhamnolipides









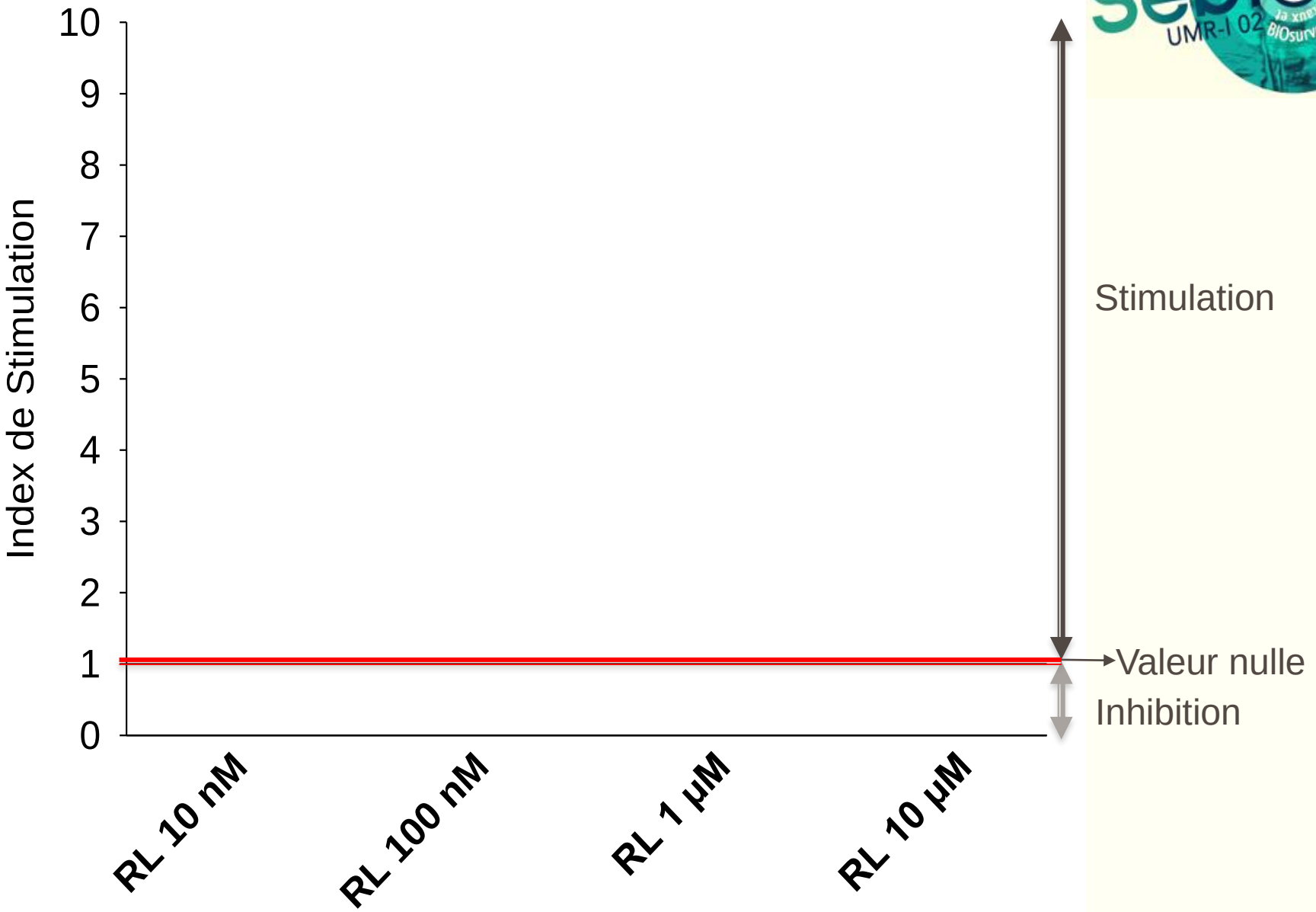


Comparatif des index de stimulation

Splénocytes préincubés 12h
Effet du PMA

Splénocytes préincubés 12h
Effet des rhamnolipides

Splénocytes non préincubés



Conditions

Comparatif des stimulations oxydatives sur des splenocytes de poissons d'eaux douces par autres pesticides

Agent	Concentration	Effet	référence
Diazinon	6,44 µM	Stress oxydant	Diaz-Resendiz et *al.* 2015
Endosulfan	2 nM	Stress oxydant	Tellez-Banuelos et *al.* 2009
Rhamnolipides (mono+di) C10-C10	1 µM	Stimulation de splénocytes	Projet actuel

Conclusions

- **Cytotoxicité des rhamnolipides vis-à-vis des splénocytes de gardon à relativiser en regard de l'approche expérimentale ex vivo mise en jeu => poursuite de travaux sur des lignées cellulaires**
- **Stimulation de l'activité oxydative chez des cellules animales** (Dwivedi *et al.* 2015)
- **Stimulation de l'activité oxydative par les doses non cytotoxiques après incubation des cellules : Confirmation de l'action observée chez les plantes.** (Varnier *et al.* 2009)

Stimulation de l'activité oxydative cellulaire

Favorable:

Amélioration de la défense de l'organisme

Défavorable:

Mise en place de phénomène pro-inflammatoire

Je vous remercie pour votre attention ;)

Bibliographie:

- J ANDRÄ, J RADEMANN, J HOWE, M H.J. KOCH, H HEINE, U ZÄHRINGER & K BRADENBURG. **2006**. Endotoxin-like properties of a rhamnolipid exotoxin from *Burkholderia (Pseudomonas) plantarii*: immune cell stimulation and biophysical characterization. *Biological Chemistry* . **387:** 301–310
- S S CAMEOTRA, R S. MAKKAR, J KAUR & S.K. MEHTA. Synthesis of Biosurfactants and Their Advantages to Microorganisms and Mankind, ***In***: Biosurfactants, Ramkrishna Sen. **2010**. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media. **Chapter 20**: 261-280
- S S. CAMEOTRA & R S. MAKKAR. **2004**. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Current Opinion in Microbiology*. **7:** 262-266
- S DWIVEDI, Q SAQUIB, AA AL-KHEDHAIRY, J AHMAD, MA SIDDIQUI & J MUSARRAT. **2015**. Rhamnolipids functionalized AgNPs-induced oxidative stress and modulation of toxicity pathway genes in cultured MCF-7 cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **132:** 290-298
- M.A. M EL ZEFTAWY & C N. MULLIUAN. **2011**. Use of rhamnolipid to remove heavy metals from wastewater by micellar-enhanced ultrafiltration (MEUF). *Separation and purification Technology*. **77:** 120-127
- S JOHANN, T-B SEILER, T TISO, K BLUHMA, L M. BLANK & H HOLLERT. **2016**. Mechanism-specific and whole-organism ecotoxicity of mono-rhamnolipids. *Science of the Total Environment*. **548-549:** 155-163
- G G. F. LEITE, J V. FIGUEIROA, T C. M. ALMEIDA, J L. VALOES, W F. MARQUES, M D. D. C. DUARTE & K GORLACH-LIRA. **2015**. Production of rhamnolipids and diesel oil degradation by bacteria isolated from soil contaminated by petroleum. *Biotechnology Progress*. **32(2):** 262-27
- P VATSA, L SANCHEZ, C CLEMENT, F BAILLIEUL & S DOREY. **2010**. Rhamnolipid Biosurfactants as New Players in Animal and Plant Defense against Microbes. *International Journal of Molecular Sciences*. **11:** 5095-5108
- A-L VARNIER, L SANCHEZ, P VATSA, L BOUDESOCQUE, A GARCIA-BRUGGER, F RABENOELINA, A SOROKIN, J-H RENAULT, S KAUFFMANN, A PUGIN, C CLEMENT, F BAILLIEUL & S DOREY. **2009**. Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. *Plant, Cell and Environment* **32**: 178–193