



Thèse présentée pour obtenir le grade de Docteur
de l'Université Louis Pasteur, Strasbourg I



Discipline : Sciences du vivant

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée par :

Edith Hourcade

DÉGRADATION DU DICHLOROMÉTHANE ET ADAPTATION À LA PRODUCTION INTRACELLULAIRE D'ACIDE CHEZ *METHYLOBACTERIUM*

Soutenue publiquement le 18 juillet 2007

Membres du jury:

Directeur de thèse	M. Stéphane Vuilleumier	Professeur à l'Université Louis Pasteur, Strasbourg
Examineur	M. Serge Potier	Professeur à l'Université Louis Pasteur, Strasbourg
Rapporteur interne	M. Jean-Marc Jeltsch	Professeur à l'Université Louis Pasteur, Strasbourg
Rapporteur externe	Mme Julia Vorholt	Professeur, Institut für Mikrobiologie, ETH Zürich
Rapporteur externe	M. Thierry Maugard	Maitre de Conférences à l'Université de la Rochelle

Discipline : Sciences du vivant
Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée par :
Edith Hourcade

**DÉGRADATION DU DICHLOROMÉTHANE ET
ADAPTATION À LA PRODUCTION
INTRACELLULAIRE D'ACIDE CHEZ
*METHYLOBACTERIUM***

Soutenue publiquement le 18 juillet 2007

Membres du jury:

Directeur de thèse	M. Stéphane Vuilleumier	Professeur à l'Université Louis Pasteur, Strasbourg
Examineur	M. Serge Potier	Professeur à l'Université Louis Pasteur, Strasbourg
Rapporteur interne	M. Jean-Marc Jeltsch	Professeur à l'Université Louis Pasteur, Strasbourg
Rapporteur externe	Mme Julia Vorholt	Professeur, Institut für Mikrobiologie, ETH Zürich
Rapporteur externe	M. Thierry Maugard	Maître de Conférences à l'Université de la Rochelle

R REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire de " Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie " de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg (UMR 7156 / CNRS). Je tiens à remercier Serge Potier et Stéphane Vuilleumier de m'avoir accueilli et confié ce projet de thèse.

Je tiens à remercier Madame Julia Vorholt et Messieurs Jean-Marc Jeltsch et Thierry Maugard d'avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Je désire remercier tous les membres du laboratoire qui ont chacun contribué de près ou de loin au bon déroulement de cette thèse.

Merci à tous mes amis et pairs qui ont déjà entamé l'aventure que constitue la thèse. Merci d'avoir été à mes côtés et d'avoir partagé ces années de thèse. Et un énorme merci pour cette merveilleuse journée à la JAPANEXPO. (ㄨ^_^ㄨ) Bon courage et bonne chance à tous.

Je tiens à remercier tous les étudiants et tous les post-docs qui se sont succédés et qui m'ont aidé et soutenu au cours de ces 4 années.

Un grand merci à ma famille pour m'avoir soutenu moralement et financièrement et ainsi avoir pu permettre la réalisation de ce doctorat.

Je remercie N. Uzumaki et les habitants de Konoha, J.K.R., Mister Q, les résidents de la pension Hinata, les frères Elric et tous les autres qui m'ont accompagné pendant toute cette période (@^0^@)



TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION

1. Le dichlorométhane	14
2. Les bactéries méthylophiles	18
2.1. Définition générale	18
2.2. Les bactéries méthanotrophes	19
2.3. Les bactéries méthylophiles n'utilisant pas le méthane	20
2.4. Le genre <i>Methylobacterium</i>	20
2.5. Métabolisme des bactéries méthylophiles non-méthanotrophes	22
3. Dégradation microbienne du dichlorométhane	25
3.1. Micro-organismes dégradant le dichlorométhane	25
3.2. Voies métaboliques de transformation et de toxication du dichlorométhane	28
4. Réponse au stress acide chez les bactéries	30
4.1. Adaptation et acido-tolérance	30
4.2. Mécanismes de résistance	32
4.2.1. Modification de la membrane	33
4.2.2. Production de composés alcalins	35
4.2.3. Homéostasie du pH interne	36
4.2.3.1. Perturbation du pH _i	37
4.2.3.2. Régulation du pH _i	38
Système AR1	39
Système AR2	41

Régulation du système AR2	42
Système AR3	45
Rôle des canaux à chlorure dans AR2 et AR3	45
Capacité tampon du cytoplasme	47
4.2.4. Protection et réparation des protéines et de l'ADN	49
Protection et réparation des protéines	49
Système de réparation de l'ADN	50
4.2.5. Régulation	51
Systèmes à deux composants	51
Système de quorum sensing	52
4.2.6. Systèmes d'acido-tolérance en phase exponentielle	52
5. Sujet de thèse	54

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Souches bactériennes	56
2. Milieux et conditions de cultures	57
2.1. <i>Escherichia coli</i>	57
2.2. <i>Methylobacterium</i>	58
2.2.1. Milieux de culture	58
2.2.2. Conditions de cultures	60
2.3. Contrôle de pureté des souches et conservation	60
2.4. Antibiotiques	60
3. Suivi temporel de la croissance bactérienne	61
4. Suivi de la déchloration bactérienne	61
5. Traitement à l'acide	62
6. Mesure de la viabilité cellulaire	62

7. Mesure de la fluorescence de la GFP	62
8. Méthodes de biologie moléculaire	63
8.1. Extraction plasmidique	63
8.2. Extraction d'ADN génomique	63
8.2.1. Préparation rapide d'ADN génomique	63
8.2.2. Préparation d'ADN génomique	64
8.3. Electrophorèse	64
8.4. Précipitation alcoolique de l'ADN	65
8.5. Purification d'ADN par gel	65
8.6. Détermination de la concentration d'ADN	65
8.7. Digestion enzymatique	65
8.8. Déphosphorylation	66
8.9. Polymérisation	66
8.10. Ligation de molécules d'ADN	66
8.11. Transformation	66
8.12. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	67
8.13. Hybridation ADN/ADN	69
8.13.1. Préparation de l'ADN	70
8.13.2. Transfert	70
8.13.3. Préparation des sondes froides	70
8.13.4. Préhybridation et hybridation	71
8.13.5. Détection par colorimétrie	71
8.14. Détermination de la séquence d'un fragment d'ADN	72
9. Mutagenèse par transposition aléatoire	72
10. Criblage des mutants / détermination des phénotypes	74
11. Analyse du site d'insertion du mini-transposon	74
11.1. PCR inverse	74
11.2. Amplification des gènes comportant le	

mini-transposon (linker Y)	75
11.2.1. Préparation du linker Y et de l'ADN génomique	76
11.2.2. Amplification par PCR	76

CHAPITRE 1 : RÉSISTANCE À L'ACIDE CHEZ *METHYLOBACTERIUM*

Introduction	78
1. Tolérance de <i>M. dichloromethanicum</i> DM4 selon la nature de l'acide	80
2. Effet des ions chlorure sur l'acido-tolérance de la souche DM4	82
3. Effet du surnageant de culture sur la tolérance à l'acide	84
4. Effet de différentes fractions de surnageant sur la tolérance à l'acide	86
5. Acido-tolérance de la souche CM4 exprimant la dichlorométhane déshalogénase de la souche DM4	88
6. Tolérance de <i>Methylobacterium chloromethanicum</i> CM4 à l'acide	90
7. Mesure de l'intensité de fluorescence de la GFP	92

CHAPITRE 2 : CRIBLAGE DE MUTANTS ET TECHNIQUES DE CARACTÉRISATION

Introduction	95
1. Obtention des mutants	96
2. Criblage des mutants / détermination des phénotypes	98
3. Reconstruction <i>in silico</i> de la séquence du mini-transposon délivré par le plasmide pAG408	101
4. Analyse des sites d'insertion du mini-transposon	104

4.1. Méthode de clonage	104
4.2. Méthodes d'amplification par PCR	107

CHAPITRE 3 : EXPLORATION GÉNOMIQUE DU GENRE *METHYLOBACTERIUM*

Introduction	110
1. Séquençage et présentation de l'outil d'annotation de génomes : l'interface MaGe	112
1.1. Les outils bioinformatiques	113
1.2. Une base de données relationnelle	114
1.3. Fonctionnalités de l'interface graphique	114
2. Caractéristiques générales des génomes de <i>Methylobacterium</i>	115
3. Régions spécifiques	118
3.1. Région DCM126	118
3.2. Gènes communs aux souches DM4 et CM4	121
3.3. Régions de méthylotrophie	121
3.4. Région de DM4 homologue au chromosome META2	123
3.5. Gènes impliqués dans l'adaptation à l'acide	124

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

<i>Figure I.1</i>	Consommation de dichlorométhane en Europe entre 1985 et 2004	15
<i>Figure I.2</i>	Représentation par activité des établissements émettant du dichlorométhane vers l'eau et l'air en Europe en 2004	16
<i>Figure I.3</i>	Observation de la souche DM4 sous microscope à phase inverse et inclusions de poly- β -hydroxybutyrate chez DM4	21
<i>Figure I.4</i>	Métabolisme méthylo-trophe chez <i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	24
<i>Figure I.5</i>	Représentation schématique du mécanisme de la dichlorométhane déshalogénase	27
<i>Figure I.6</i>	Organisation génétique de la région comportant le gène <i>dcmA</i> chez les méthylo-trophes dégradant le dichlorométhane	28
<i>Figure I.7</i>	Mécanismes de résistance à l'acide	33
<i>Figure I.8</i>	Protection des chaperonines périplasmiques HdeAB chez <i>E. coli</i> et <i>Shigella</i>	41
<i>Figure I.9</i>	Activation des circuits contrôlant le système de résistance à l'acide dépendant du glutamate	49
<i>Figure I.10</i>	Modèle de canaux à chlorure Cl ⁻ impliqués dans la résistance à l'acide	47
<i>Figure I.11</i>	Réparation de l'ADN par excision de nucléotides	51

MATÉRIEL ET MÉTHODES

<i>Figure M.1</i>	Flasque et jarre de verre utilisées pour la culture des bactéries du genre <i>Methylobacterium</i> en milieu confiné	59
<i>Figure M.2</i>	Localisation des amorces spécifiques du mini-transposon Tn5	69
<i>Figure M.3</i>	Diagramme schématique du principe de la PCR inverse	75
<i>Figure M.4</i>	Diagramme schématique du linkerY et de la stratégie d'amplification des régions flanquant le mini-transposon	77

CHAPITRE 1

<i>Figure 1.1</i>	Acido-tolérance de la souche <i>M. dichloromethanicum</i> DM4 en fonction de la nature de l'acide, du temps d'exposition, du pH et des conditions de cultures	82
<i>Figure 1.2</i>	Effet de la source de carbone et des ions chlorure sur la viabilité de la souche <i>M. dichloromethanicum</i> DM4 soumise à un choc acide à pH 4 par ajout d'acide formique	83
<i>Figure 1.3</i>	Effet du surnageant de culture sur la tolérance à l'acide chez la souche DM4	85
<i>Figure 1.4</i>	Effet de différentes fractions de surnageant de culture sur la tolérance à l'acide	87
<i>Figure 1.5</i>	Viabilité des souches CM4(pME8221) et DM4-2cr(pME8221) après exposition à l'acide formique à pH 4	89
<i>Figure 1.6</i>	Tolérance à l'acide de <i>Methylobacterium chloromethanicum</i> CM4	91
<i>Figure 1.7</i>	Variation de l'intensité fluorescence de la GFP avec le pH	93

CHAPITRE 2

<i>Figure 2.1</i>	Observation de la fluorescence de transconjugants de la souche DM4 avec une lampe UV portable et sous microscope	97
<i>Figure 2.2</i>	Hybridation ADN/ADN de type Southern, avec une sonde spécifique de la région codant la protéine GFP	98
<i>Figure 2.3</i>	Observation typique de la croissance et de l'intensité de fluorescence de mutants sur le méthanol	99
<i>Figure 2.4</i>	Observation de la fluorescence d'un transconjugant avec une lampe UV portable et sous microscope à fluorescence	101
<i>Figure 2.5</i>	Représentation schématique du plasmide pAG408 après reconstruction	103
<i>Figure 2.6</i>	Exemple de gel électrophorétique du plasmide pAG408 digéré par les enzymes <i>NotI</i> , <i>AgeI</i> et <i>EcoRI</i>	104
<i>Figure 2.7</i>	Amplification du site d'insertion du mini-transposon d'un mutant et du pAG408	108

CHAPITRE 3

<i>Figure 3.1</i>	Synténie entre les génomes de DM4 et AM1	116
<i>Figure 3.2</i>	Représentation graphique des fonctions attribuées aux ORFs des chromosomes des souches AM1 et DM4 en fonction de leur COG	117
<i>Figure 3.3</i>	Aperçu de la région spécifique de DM4 de 126 kb contenant les gènes <i>dcmA</i> et <i>dcmR</i> à l'aide de l'interface MaGe	119
<i>Figure 3.4</i>	Contenu plasmidique des souches DM4, DM4-161 et DM4-2cr. Localisation de la région DCM126 sur une zone au contenu GC atypique	119

- Figure 3.5* Représentation des gènes impliqués dans la méthylotrophie sur le chromosome METDI de la souche DM4 et sur le chromosome META1 de la souche AM1 123
- Figure 3.6* Synténie entre le génome de DM4 et AM1 124
- Figure 3.7* Représentation des gènes impliqués dans l'adaptation à l'acide sur le chromosome METDI de la souche DM4 et sur le chromosome META1 de la souche AM1 126

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION

<i>Tableau I.1</i>	pKa de quelques acides organiques	38
<i>Tableau I.2</i>	Capacité tampon du cytoplasme	48

MATÉRIEL ET MÉTHODES

<i>Tableau M.1</i>	Compositions des différents milieux minéraux utilisés dans cette étude	58
<i>Tableau M.2</i>	Solutions d'antibiotiques utilisées au cours de cette étude	61
<i>Tableau M.3</i>	Caractéristiques des différentes séquences nucléotidiques des amorces spécifiques utilisées lors de cette étude	68
<i>Tableau M.4</i>	Conditions de PCR selon le couple d'amorces utilisé	69

CHAPITRE 2

<i>Tableau 2.1</i>	Résultats du criblage des mutants obtenus	100
<i>Tableau 2.2</i>	Liste des enzymes de restriction utilisables pour la caractérisation des mutants	106

CHAPITRE 3

<i>Tableau 3.1</i>	Banques génomiques utilisées pour le séquençage	112
<i>Tableau 3.2</i>	Caractéristiques générales des génomes des souches AM1 et DM4	115

ABRÉVIATIONS

ADI : **A**rginine **d**éiminase
ADN : **A**cide **d**ésoxyribonucléique
ADP : **A**dénosine **d**i-phosphate
AMP : **A**dénosine **m**ono-phosphate
AR : **A**cid **r**esistance
ARN : **A**cide **r**ibonucléique
ATP : **A**dénosine **t**ri-phosphate
ATR : **A**cid **t**olerance **r**esponse
BEt : **B**romure d'**é**thidium
CDS : **C**oding **s**equence
CFA : **C**yclopropane **f**atty **a**cid
COG : **C**luster of **o**rthologous **g**roups
DCM : **D**ichlorométhane
ddNTPs : **D**idésoxyribonucléotides **t**riphosphates
dNTPs : **D**ésoxyribonucléotides **t**riphosphates
DO : **D**ensité **o**ptique
ECs : **E**xtracellular **c**omponents
EDTA : **E**thylène **d**iamine **t**étra-**a**cétate
EIC : **E**xtracellular **i**nduction **c**omponents
ESC : **E**xtracellular **s**ensing **c**omponents
fpm : **F**orce **p**rotomotrice
GABA : **γ**-**a**mino **b**utyric **a**cid
GFP : **G**reen **f**luorescent **p**rotein
GAD : **G**lutamic **a**cid **d**ecarboxylase

GST : **g**lutathion **S**-transférases
H₄F : **T**étrahydrofolate
H₄MPT : **T**étrahydr**o**méthano**p**térine
kb : **k**ilobases
MaGe : **M**agnifying **G**enomes
MDH : **M**éthanol **d**éshydrogénase
MFO : **M**ixed **f**unction **o**xidase pathway
MMO : **M**éthane **m**ono-**o**xygénase
ORFs : **O**pen **r**eadin**g** **f**rames
pb : **p**aires de **b**ases
PCR : **P**olymérase **c**hain **r**eaction
pH_e : **pH** externe
pH_i : **pH** interne
PPFM : **P**ink-**p**igmented **f**acultatively **m**ethylotrophs
PQQ : **P**yrroloquinoline **q**uinone
CRP : **c**AMP receptor **p**rotein
TAE : **T**ris-**a**cétate-**E**DTA
UFC : **U**nité **f**ormant **c**olonie
UV : **U**ltra-**v**iolets

INTRODUCTION

1. LE DICHLOROMÉTHANE

Le dichlorométhane ou chlorure de méthylène (CH_2Cl_2 , DCM) est un liquide incolore, hautement volatil et ininflammable à température ambiante. Son origine est principalement anthropique (Keene *et al.*, 1999 ; INERIS, 2006). Le dichlorométhane est produit industriellement par des réactions de chloration thermiques, catalytiques ou photolytiques du chlore avec le méthane ou le chlorométhane. Les océans sont une source naturelle d'émissions atmosphériques de dichlorométhane dont les algues et les micro-organismes seraient probablement responsables (Blackman *et al.*, 1992). La production naturelle de dichlorométhane lors d'éruptions volcaniques et de la combustion de la biomasse n'est pas significative (Schwandner *et al.*, 2004 ; Keene *et al.*, 1999). Les sources naturelles d'émissions de dichlorométhane représenteraient jusqu'à 25% des rejets mondiaux atmosphériques du dichlorométhane (Keene *et al.*, 1999). Ceci est en contraste avec d'autres méthanes halogénés comme le chlorométhane et le bromométhane pour lesquelles l'apparition d'émissions atmosphériques est principalement d'origine naturelle (Khalil *et al.*, 1999 ; Harper, 2000). Le chlorométhane est produit naturellement en très grandes quantités et représente le carbone halogéné le plus abondant dans l'atmosphère (5 millions de tonnes par an ; Trotsenko *et al.*, 2003).

De fait, le dichlorométhane est le solvant chloré le plus utilisé dans l'industrie (www.eurochlor.org). En effet, ses propriétés physico-chimiques comme son point d'ébullition (40°C), sa haute solubilité dans l'eau pour un solvant chloré (autour de 20 g.L^{-1}), sa relative inertie et son point de congélation bas (-97°C) en font un composé d'intérêt pour de nombreuses applications industrielles.

Toutefois, la production et l'emploi du dichlorométhane en Europe sont en décroissance de longue date et cette tendance s'est poursuivie sur une période plus récente (Figure I.1, www.eurochlor.org). La diminution de la production et de la vente de dichlorométhane provient d'un usage plus efficace de ce solvant ainsi qu'à son remplacement dans certaines applications. Ceci résulte de l'inquiétude grandissante concernant la pollution environnementale et la toxicité de ce composé, qui depuis la fin des années 70, a été classé parmi les substances "probablement cancérigènes pour l'homme" (Agence de protection environnementale américaine, www.epa.gov). En Europe, le dichlorométhane est produit dans huit usines situées en Allemagne, en France, en Italie, en Espagne, aux Pays-Bas et en Grande-Bretagne (www.eurochlor.org).

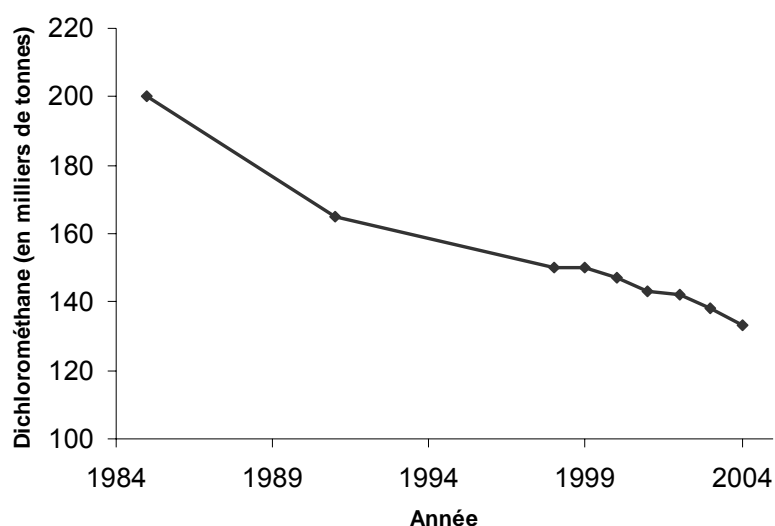


FIGURE I.1 - Consommation en dichlorométhane en Europe entre 1985 et 2004.

Les principales utilisations du dichlorométhane sont (INERIS, 2006) :

- l'industrie pharmaceutique (30%) où il est employé comme solvant de procédé ou d'extraction et comme agent d'enrobage
- le décapage de peinture (20%) dans la rénovation de meubles, le décapage de tôles peintes ou le ravalement de bâtiments
- comme propulseur dans les aérosols (10%) où il contribue à réduire l'inflammabilité de l'aérosol
- dans les colles et adhésifs (10%) de polymères comme le plexiglas ou les PVC

- pour le nettoyage/décapage/dégraissage de métaux et de plastiques, la fabrication de polymères ou encore dans l'agroalimentaire et les cosmétiques (extraction d'arômes naturels, d'huiles essentielles, décaféination du thé et du café)

Les rejets de dichlorométhane dans l'environnement vont principalement vers l'atmosphère, et dans une moindre mesure vers les milieux aquatiques. Les rejets de l'Europe en 2004 vers l'air et vers l'eau ont été estimés à 4000 tonnes et proviennent majoritairement de l'industrie pharmaceutique et de l'industrie chimique (Figure I.2, Agence européenne de l'environnement, EPER). En France, les quantités de dichlorométhane émises sont les plus importantes d'Europe tant dans l'atmosphère (43 % des émissions totales européennes, soit 1700 tonnes) que dans l'eau (58 %, soit 40 tonnes, Agence européenne de l'environnement, <http://eper.eea.eu.int/eper/>).

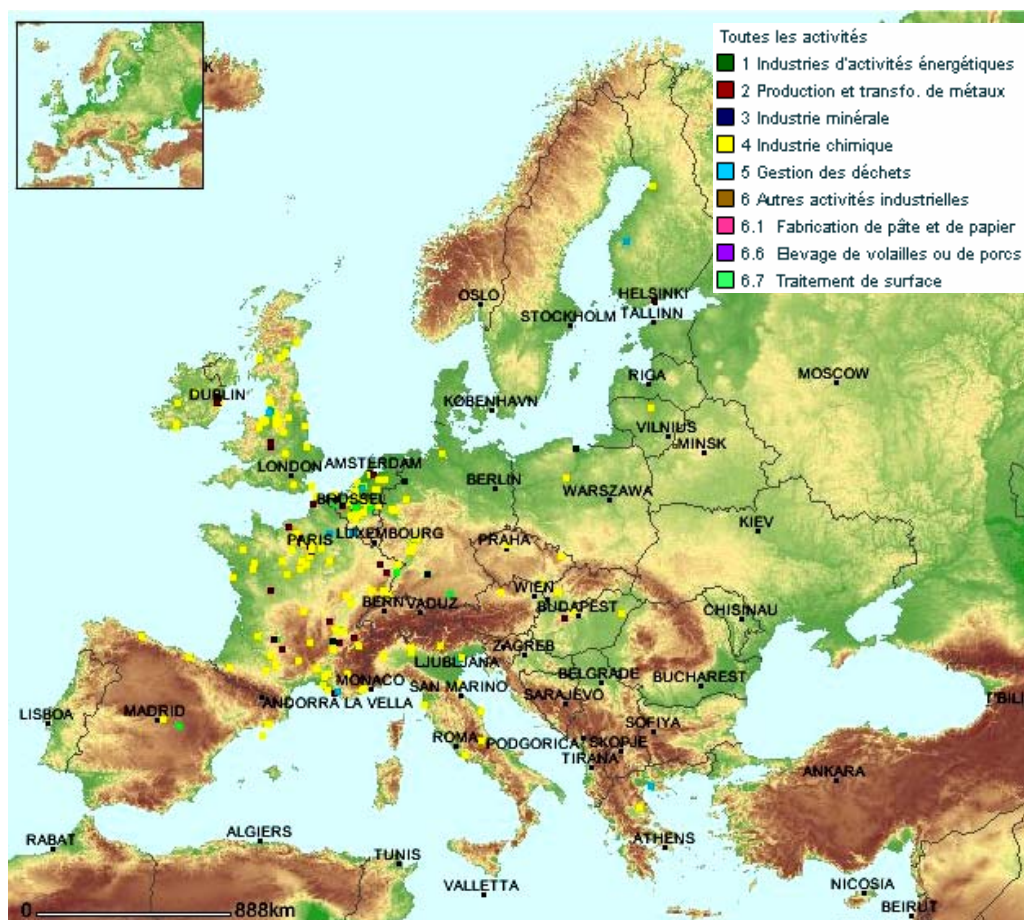


FIGURE I.2 - Représentation par activité des établissements émettant du dichlorométhane vers l'eau et l'air en Europe en 2004 (Agence européenne pour l'environnement, EPER).

Compte tenu de ses caractéristiques physico-chimiques, le dichlorométhane est essentiellement sous forme de gaz lorsqu'il est présent dans l'atmosphère. Dans ce compartiment, il est principalement dégradé en réagissant avec les radicaux hydroxyles formés naturellement par réactions photo-chimiques dans la partie inférieure de l'atmosphère (la troposphère). Le temps de demi-vie du dichlorométhane est estimé à 119 jours (INERIS, 2003). Son potentiel global concernant le réchauffement est négligeable du fait de sa faible absorption de rayonnement dans l'infrarouge. L'impact de ce composé sur la diminution de l'ozone et l'augmentation de l'effet de serre sont donc négligeables, ce qui contraste avec d'autres composés halogénés comme le chlorométhane et le bromométhane qui contribuent de manière significative à la diminution de l'ozone stratosphérique (Butler, 2000). Le dichlorométhane se volatilise rapidement à partir de l'eau de surface et n'est généralement pas persistant dans les eaux superficielles (INERIS, 2003). En revanche, sa stabilité dans le sol est plus élevée. Sa pression de vapeur et sa solubilité élevée dans l'eau font que le dichlorométhane est très mobile dans la plupart des sols (LCPE, 1993). Des processus comme la lixiviation peuvent entraîner la contamination des nappes phréatiques et de l'eau de consommation par le dichlorométhane.

En contraste avec son impact sur l'environnement, des effets toxiques sont associés au dichlorométhane, notamment chez les mammifères. L'inhalation est la principale voie d'exposition de l'homme au dichlorométhane. Le système nerveux central est la cible privilégiée du dichlorométhane inhalé. Chez l'homme, on observe des effets neurotoxiques (difficultés d'élocution, diminution des performances visuelles et psychomotrices, perte de conscience), mais encore une dépression respiratoire ou des anomalies du rythme cardiaque qui peuvent être fatales lors d'exposition aiguë (INERIS, 2003). L'exposition d'animaux de laboratoire à de fortes concentrations peut également être létal. Chez le rat ou la souris, des lésions au niveau du foie et des reins ont été observées ainsi que des effets sur le cœur, le système nerveux central et les poumons. Le dichlorométhane a aussi un effet génotoxique sur les poumons et le foie chez la souris, c'est pourquoi il est suspecté d'être cancérigène pour l'homme (LCPE, 1993). Cependant, il existe peu d'études suffisamment détaillées en ce qui concerne les effets carcinogènes du dichlorométhane chez l'homme (cf. Starr *et al.*, 2006 pour

une étude récente). Le faible nombre de personnes examinées, la gamme réduite de concentrations auxquelles elles ont été exposées, et la complexité des autres paramètres pouvant intervenir (entre autres, le polymorphisme génétique de l'enzyme impliqué dans la biotransformation du dichlorométhane, l'exposition à d'autres composés chimiques et le tabagisme) représentent des éléments limitant souvent la portée des données expérimentales qui ont pu être collectées jusqu'ici. On note néanmoins aujourd'hui qu'une implication du dichlorométhane dans certains cancers humains est possible. Par exemple, une prévalence de certains types de cancers (au niveau du cerveau et des poumons principalement) a été observée dans des groupes d'ouvriers exposés quotidiennement à ce composé. Des éléments épidémiologiques de ce type, ainsi que le caractère carcinogène avéré du dichlorométhane chez la souris, font que ce composé est considéré comme un « carcinogène possible » chez l'homme (Starr *et al.*, 2006). Toutefois, des études plus détaillées et de plus grande envergure seront encore nécessaires pour évaluer plus précisément les risques de cancer liés à une exposition chronique ou aiguë au dichlorométhane chez l'homme.

2. LES BACTÉRIES MÉTHYLOTROPES

2.1. Définition générale

Les bactéries méthylothropes ont été définies comme étant des organismes qui peuvent utiliser des substances carbonées réduites ne possédant aucune liaison carbone-carbone comme seule source de carbone et d'énergie (Anthony, 1982). Cette définition regroupe toutes les bactéries se développant sur le méthane, le méthanol, les amines méthylées, les méthanes halogénés et les composés méthylés soufrés. Le métabolisme méthylotrrophe est retrouvé dans les trois grands domaines de la vie : les *Bacteria*, les *Eukarya* et les *Archaea*, et n'est donc pas représentatif d'un groupe taxonomique distinct (Anthony, 1982). Les procaryotes méthylothropes sont divisés en deux groupes. Les organismes qui utilisent le méthane sont appelés méthanotrophes et ceux capables de pousser sur le méthanol et/ou d'autres composés méthylés mais pas sur le méthane sont habituellement appelés sous le terme "non-methane utilizing methylothropes", sans équivalent français (Green, 1992). Les bactéries méthylothropes sont des organismes ubiquistes présents dans le sol, l'eau douce, les sédiments des lacs, les océans, les surfaces des feuilles et les nodules de plantes, les graines

de riz, l'air, l'environnement hospitalier (Omer *et al.*, 2004). Ils font également partie de la microflore de la peau humaine, et peuvent être associés à de nombreuses infections opportunistes (Wallace *et al.*, 1990).

Les bactéries méthylophiles comprennent des organismes aérobies stricts et aéro-anaérobies facultatifs. Les espèces ont été classées selon les sous-classes alpha-, bêta- et gamma des protéobactéries, ou encore les Gram-positif à faible ou haut GC (Lidstrom, 1999). La plupart sont des méthylophiles obligatoires, comme *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylosinus* et *Methylocystis*, cependant une variété de genres comme *Methylobacterium* ou *Rhodopseudomonas* sont des méthylophiles facultatifs qui ont la capacité de se développer avec des composés multicarbonés.

Quelques espèces de bactéries méthylophiles métabolisent différents composés chimiques toxiques comme les composés méthylés halogénés ou les amines méthylées (Hanson *et al.*, 1990 ; Wood *et al.*, 2002). D'autres possèdent une nitrogénase et jouent un rôle dans le cycle de l'azote (Anthony, 1982 ; Lidstrom, 1999).

2.2. Les bactéries méthanotrophes

Le terme "bactéries méthanotrophes" s'applique aux bactéries qui utilisent le méthane comme seule source de carbone. La plupart des bactéries méthanotrophes sont des méthanotrophes stricts. La présence d'un système membranaire interne est une particularité typique des bactéries méthanotrophes (Hanson et Hanson, 1996). L'oxydation du méthane en méthanol fait appel à une enzyme, la méthane mono-oxygénase (MMO), qui est caractéristique des méthanotrophes (Anthony, 1982 ; Lidstrom, 1999). Les bactéries méthanotrophes sont classées en deux ensembles d'après l'analyse de leur séquence d'ADNr 16S, de leur voie d'assimilation du carbone ou bien encore de leur arrangement de la membrane interne. Les organismes de type I (*Methylomonas*, *Methylobacter*) utilisent la voie du ribulose monophosphate pour l'assimilation du carbone et font partie de la sous-division des Gamma-protéobactéries. Les méthylophiles de type II assimilent le carbone à travers la

voie de la sérine et forment un groupe distinct parmi les protéobactéries de la sous-division alpha (Hanson et Hanson, 1996).

2.3. Les bactéries méthylophiles n'utilisant pas le méthane

Les méthylophiles qui ne possèdent pas la capacité d'oxyder le méthane sont appelées "non-methane utilizing methylotrophs". Les bactéries de ce groupe sont capables de pousser sur le méthanol ou d'autres substrats mono-carbonés. En contraste avec les méthanotrophes dont la plupart sont des méthanotrophes stricts, les bactéries méthylophiles qui ne poussent pas sur le méthane sont habituellement des méthylophiles facultatifs, qui sont capables de pousser sur des composés multi-carbonés. Ces deux groupes présentent d'autres différences. Chez les bactéries qui n'oxydent pas le méthane, le système membranaire interne caractéristique est absent, avec une exception pour les membranes photosynthétiques des bactéries phototrophes. Phylogénétiquement, ce groupe est composé de bactéries à Gram-positif (faible et haut niveau de GC) et des bactéries à Gram-négatif (sous-division alpha, bêta et gamma des protéobactéries, Lidstrom, 1999).

2.4. Le genre *Methylobacterium*

Le genre *Methylobacterium* définit un groupe de 20 espèces appartenant à la sous-classe $\alpha 2$ des protéobactéries, incluant *M. extorquens*, *M. mesophilicum*, *M. chloromethanicum* et *M. dichloromethanicum* (Kato *et al.*, 2005). Les bactéries du genre *Methylobacterium* possèdent la capacité de pousser sur des composés en C₁ tel que le formate, le formaldéhyde, la méthylamine et le méthanol comme seules sources de carbone et d'énergie. Ce sont des chimio-organotrophes et méthylophiles facultatifs, ils sont donc aussi capables d'utiliser des composés multi-carbonés pour leur croissance. Les cellules de ce genre se présentent sous la forme de bâtonnets (bacilles, 0,8 – 1,0 x 1,0 – 3,0 μm), le plus souvent isolés et occasionnellement en rosette (Figure I.3 A). Elles sont souvent ramifiées ou pléomorphiques, spécialement chez les cultures en phase stationnaire tardive. Ce sont des bactéries aérobies strictes, à Gram-négatif, oxydase et catalase positives, et possèdent une pigmentation rose typique due à la présence de caroténoïdes (Van Dien *et al.*, 2003). Les souches *Methylobacterium* sont communément appelées "pink-pigmented facultatively

methylotrophs" (PPFM). Cependant, au moins une espèce, *M. nodulans*, n'est pas pigmentée (Jourand *et al.*, 2004). Elles sont mésophiles et leur optimum de température est compris entre 25 et 30°C. Toutes ces souches sont mobiles grâce à un flagelle polaire unique. Souvent, les cellules contiennent des inclusions de poly- β -hydroxybutyrate (Figure I.3 B) et quelque fois des granules de polyphosphates (Green, 1992).

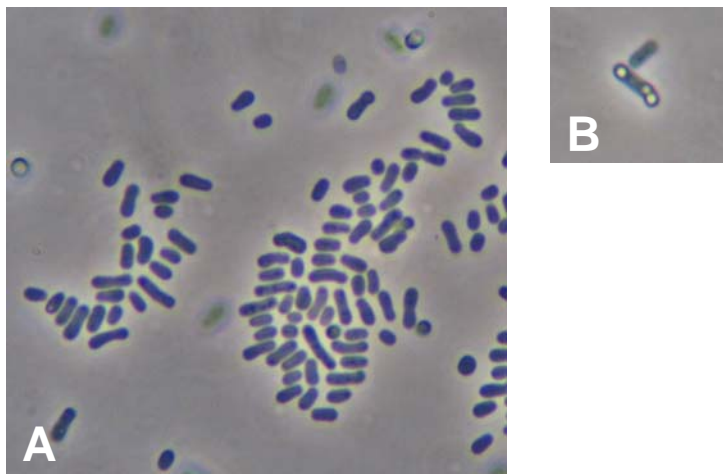


FIGURE I.3 – (A) Observation de la souche DM4 sous microscope à phase inverse (Leica DM4000B) ; (B) inclusions de poly- β -hydroxybutyrate chez DM4.

Les espèces de *Methylobacterium* sont ubiquistes et peuvent être retrouvées dans une grande variété d'habitats naturels comme le sol, les eaux douces, les sédiments des lacs, les surfaces des feuilles et les nodules de plantes ou l'environnement hospitalier (Omer *et al.*, 2004). Les PPFMs possèdent des rôles écologiques importants, car ils peuvent métaboliser plusieurs produits libérés par les plantes comme le méthanol, le méthylamine et d'autres composés méthylés variés.

Les *Methylobacterium* spp. sont incapables d'oxyder le méthane et ne possèdent pas de méthane mono-oxygénase, hormis deux exceptions. *Methylobacterium organophilum* XX a été initialement décrite comme une méthanotrophe facultative, cependant cette caractéristique semble avoir été perdue depuis. Il a été suggéré que cette caractéristique était codée par un plasmide qui a été perdu parce que la souche n'a pas été maintenue dans des conditions de

pression sélective avec le méthane comme source de carbone (Green, 1992). Récemment, *M. populi*, une nouvelle bactérie méthylo tro phe qui utilise le méthane a été isolée. Même si une croissance sur le méthane a été observée, la présence de l'enzyme MMO ou du gène correspondant n'a pas encore été démontrée pour cette souche (Van Aken *et al.*, 2004).

2.5. Métabolisme des bactéries méthylo tro phes non-méthanotrophes

Le métabolisme méthylo tro phe a largement été étudié au cours des trente dernières années chez les bactéries méthylo tro phes utilisant ou non le méthane. La séquence complète des génomes de *Methylococcus capsulatus* (Ward *et al.*, 2004) et de *Methylobacillus flagellatus* (Chistoserdova *et al.*, 2007) ainsi que l'ébauche de celui de *Methylobacterium extorquens* AM1 (Chistoserdova *et al.*, 2003), trois organismes modèles, sont maintenant disponibles. Les approches génétiques de *M. extorquens* AM1 ont permis de caractériser plus de 100 gènes liés au métabolisme méthylo tro phe. Le protéome de *M. extorquens* AM1 a également été analysé en conditions méthylo tro phes et non méthylo tro phes, et a permis d'identifier de nombreuses enzymes impliquées dans les voies de la méthylo tro phie (Laukel *et al.*, 2004). On peut considérer que la méthylo tro phie est constituée de trois étapes : l'oxydation primaire des composés carbonés en formaldéhyde, l'assimilation du formaldéhyde dans le matériel cellulaire, et l'oxydation du formaldéhyde en formate et en CO₂ (Figure I.4).

Chez *M. extorquens* AM1, la première étape du métabolisme méthylo tro phe est l'oxydation des composés en C1 en un métabolite clé intermédiaire, le formaldéhyde, une étape commune à la majorité des organismes méthylo tro phes. L'oxydation périplasmique du méthanol implique une enzyme complexe, la méthanol déshydrogénase (MDH), qui contient une pyrroloquinoline quinone (PQQ), générant du formaldéhyde, qui est métabolisé dans le cytoplasme (Anthony, 1982 ; Lidstrom, 1999). Des enzymes spécifiques transforment les halométhanes, les composés méthylés soufrés et les méthylamines en formaldéhyde. Cependant, le formaldéhyde est toxique et doit être rapidement éliminé. Une partie du formaldéhyde est converti en CO₂ pour produire de l'énergie, et une autre partie est assimilée en carbone cellulaire via le cycle de la sérine (Anthony, 1982). Deux voies sont connues chez *M. extorquens* AM1 pour oxyder le formaldéhyde en formate. La première est dépendante du

tétrahydrofolate (H₄F) et implique une inter-conversion en méthylène-H₄folate, méthényl-H₄folate, formyl-H₄folate et formate. Ces étapes d'oxydation sont similaires à la conversion des composés en C1 trouvée chez la plupart des organismes. Il a été suggéré que le rôle de cette voie chez *M. extorquens* AM1 est de maintenir de fortes concentrations de composés intermédiaires liés au méthylène-H₄folate pour l'assimilation du carbone à travers le cycle de la sérine (Vorholt, 2002 ; Marx *et al.*, 2005).

La seconde voie, découverte plus récemment (Chistoserdova *et al.*, 1998), implique le co-facteur tétrahydrométhanoptérine (H₄MPT). Par une suite de réactions enzymatiques, le formaldéhyde est converti tour à tour en méthylène-H₄MPT, en méthényl-H₄MPT, puis en Formyl-H₄MPT, qui est oxydé en formate et en CO₂. Cette voie semble être la plus efficace pour l'oxydation du formaldéhyde en CO₂, grâce à la catalyse de la première étape par l'enzyme Fae (Formaldéhyde activating enzyme) et la grande activité des autres enzymes de cette voie : deux méthylène-H₄MPT déshydrogénases (MtdA/B) et un complexe formyl-transférase/hydrolase (Pomper *et al.*, 1999 ; Vorholt *et al.*, 1998 ; Vorholt *et al.*, 2000). A noter que cette voie qui était initialement considérée comme étant exclusive aux Archaea, a été retrouvée chez toutes les souches testées appartenant aux protéobactéries méthylophiles utilisant la voie d'assimilation de la sérine ou la voie du ribulose monophosphate (Chistoserdova *et al.*, 1998 ; Vorholt *et al.*, 1999).

Chez *M. extorquens* AM1, l'assimilation du carbone est opérée par le cycle de la sérine (Anthony, 1982 ; Marx *et al.*, 2005). La glycine est condensée avec le méthylène-H₄F pour produire de la sérine dans la réaction catalysée par l'enzyme sérine hydroxyméthyltransférase. La régénération du glyoxylate, précurseur de la glycine, à travers le cycle classique du glyoxylate n'est pas possible chez la souche AM1, puisque l'enzyme clé de ce cycle, la isocitrate lyase, est absente (Chistoserdova et Lidstrom, 1996). L'alternative au cycle de régénération du glyoxylate, impliquant les enzymes du cycle des poly-β-hydroxybutyrate, est proposée pour répondre à cette fonction (Korotkova *et al.*, 2002a ; Korotkova *et al.*, 2002b). Par la voie de la sérine, une molécule en C3 (phosphoglycérate) est produite à partir de deux molécules de formaldéhyde et d'une molécule de CO₂ (Ensign, 2006).

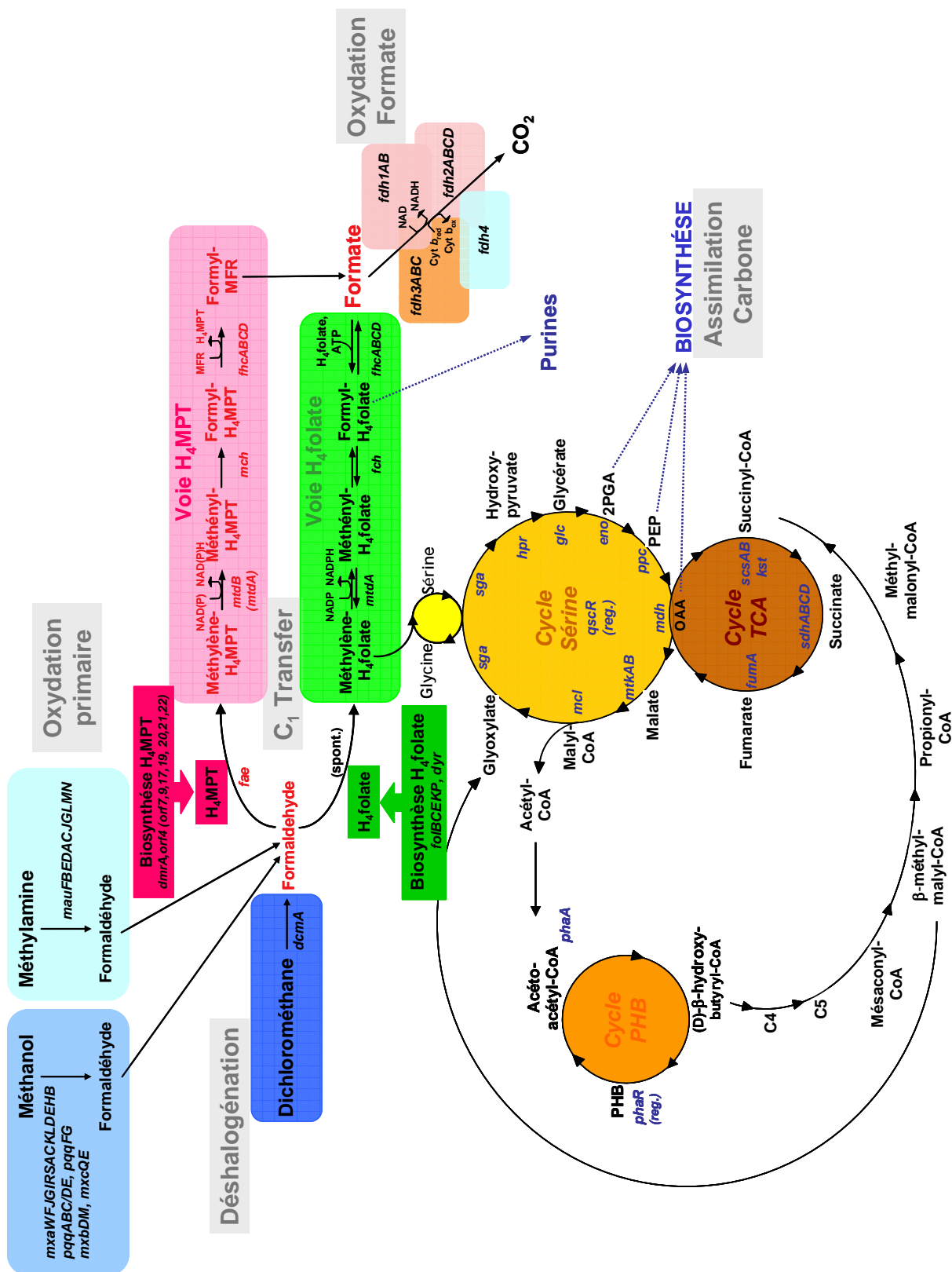


FIGURE I.4 - Métabolisme méthylotrophe chez *Methylobacterium extorquens* AM1 (adaptée de Kalyuzhnaya, 2005 ; Ensign, 2006).

La souche *M. dichloromethanicum* DM4, qui est capable de pousser avec le dichlorométhane comme seule source de carbone, utilise vraisemblablement la même voie du formaldéhyde que la souche AM1. Le dichlorométhane, un composé halogéné toxique, est converti en formaldéhyde au niveau du cytoplasme grâce à la dichlorométhane déshalogénase.

Le cas de l'utilisation du chlorométhane par *Methylobacterium chloromethanicum* CM4 (Vannelli *et al.*, 1999 ; Studer *et al.*, 2001, 2002) est une exception notable à la voie de l'oxydation primaire qui conduit au formaldéhyde et illustre bien la complexité du métabolisme en C₁ des espèces *Methylobacterium*. Cet organisme convertit le chlorométhane via une voie oxydative qui dépend d'une protéine corrinoïde, sans formation de formaldéhyde. Le chlorométhane est d'abord déchloré et son carbone lié au H₄F sous forme de méthyl-H₄F, puis oxydé en méthylène-H₄F. Les autres composés en C₁ utilisés par cette souche suivent les voies impliquant le H₄F ou la H₄MPT comme cofacteurs.

3. TRANSFORMATION DU DICHLOROMÉTHANE

3.1. Micro-organismes dégradant le dichlorométhane

Jusqu'ici, les bactéries capables de minéraliser le dichlorométhane ont été des organismes méthylotrophes isolés de boues d'épuration, de sols et de nappes phréatiques exposés à ce composé (Vuilleumier, 2002).

Le fait qu'un grand nombre de souches méthylotrophes de collection ne soient pas capables de pousser sur le dichlorométhane indique que l'acquisition et également le maintien présumé de cette propriété requièrent une pression sélective (Tourova *et al.*, 2001). Cependant, un certain nombre de bactéries méthylotrophes aérobies et anaérobies qui ont été caractérisées sont capables de dégrader ou de minéraliser le dichlorométhane. La voie anaérobie de la dégradation du dichlorométhane chez la bactérie à Gram-positif *Dehalobacterium formicoaceticum* apparaît comme étant une voie à multi-enzymes impliquant des protéines corrinoïdes, des méthyltransférases et des enzymes qui interconvertissent les composés en C₁ par un métabolisme dépendant du tétrahydrofolate (Mägli *et al.*, 1998). Il est intéressant de noter que des combinaisons similaires d'enzymes

sont connues pour la minéralisation du chlorométhane chez les bactéries anaérobies comme *Acetobacterium dehalogenans* (Messmer et al., 1996 ; Wohlfarth et Diekert, 1997) et les bactéries aérobies comme *Methylobacterium chloromethanicum* CM4 (Vannelli et al., 1998 ; Studer et al., 2001).

La dégradation du dichlorométhane par les bactéries aérobies observée de manière prédominante chez des méthylotrophes à Gram-négatif appartenant aux alpha et bêta-protéobactéries, implique différents mécanismes enzymatiques. Le dichlorométhane est soit minéralisé cométaboliquement, soit utilisé comme seule source de carbone et d'énergie pour la croissance. La méthanotrophe stricte *Methylosinus trichosporium* OB3b cométabolise le dichlorométhane en monoxyde de carbone par une réaction catalysée par une méthane mono-oxygénase. Cette souche est incapable d'utiliser le dichlorométhane pour sa croissance, probablement à cause des produits toxiques générés dans cette conversion (Byers et Sly, 1993 ; Nicolaidis et Sargent, 1987), notamment le phosgène.

Parmi les souches utilisant le dichlorométhane comme seule source de carbone et d'énergie, plusieurs souches bactériennes non pigmentées utilisant le dichlorométhane possèdent des similarités au niveau de leurs caractéristiques phénotypiques, de leurs profils d'acides gras cellulaires, de leurs compositions de bases d'ADN et montrent une haute identité dans leurs gènes d'ADN 16S. Ce groupe a été récemment attribué à un nouveau genre nommé *Methylopila* (Doronina et al., 2000). La bactérie la plus étudiée en ce qui concerne la dégradation du dichlorométhane au niveau moléculaire est une souche pigmentée de rose, *M. dichloromethanicum* DM4 (Gälli et Leisinger, 1985). Cette souche présente les propriétés typiques du genre *Methylobacterium* aussi bien par ses caractéristiques morphologiques, chimio-taxonomiques et biochimiques, que dans son contenu en GC et sa séquence d'ADN 16S. Néanmoins, cette capacité de croître sur le dichlorométhane sépare la souche *Methylobacterium dichloromethanicum* DM4 en tant que géno-espèce distincte de la souche type *Methylobacterium extorquens* AM1 (Green et Bousfield, 1982) et des autres membres du genre *Methylobacterium* (Doronina et al., 2000). Tous les méthylotrophes aérobies facultatifs utilisant le dichlorométhane étudiés jusqu'ici possèdent la même enzyme, la dichlorométhane

déshalogénase, qui leur permet d'utiliser ce composé halogéné comme seule source de carbone et d'énergie (Vuilleumier *et al.*, 2001).

La dichlorométhane déshalogénase est une protéine cytoplasmique de 34 kDa codée par le gène *dcmA* dont l'expression est inductible (La Roche et Leisinger, 1990, 1991). Elle peut représenter jusqu'à 20% des protéines solubles totales au cours de la croissance sur le dichlorométhane (Kohler-Staub et Leisinger, 1985). Cette enzyme transforme le dichlorométhane en formaldéhyde et deux molécules d'acide chlorhydrique (Figure I.5). La dichlorométhane déshalogénase est un équivalent bactérien des enzymes de la famille des glutathion S-transférases (GST, La Roche et Leisinger, 1990 ; Vuilleumier, 1997 ; Vuilleumier et Pagni, 2002). La principale fonction de cette famille enzymatique est la fixation, la transformation et la détoxification de composés naturels ou anthropiques par conjugaison avec le glutathion. Certaines GSTs des mammifères de la classe Theta (GSTT1-1) sont proches de la dichlorométhane déshalogénase bactérienne (25% d'identité environ) et la plupart d'entre elles montrent également une activité importante avec le dichlorométhane (Whittington *et al.*, 1999 ; Jemth et Mannervik, 1997 ; Gisi *et al.*, 2001 ; Stourman *et al.*, 2003).

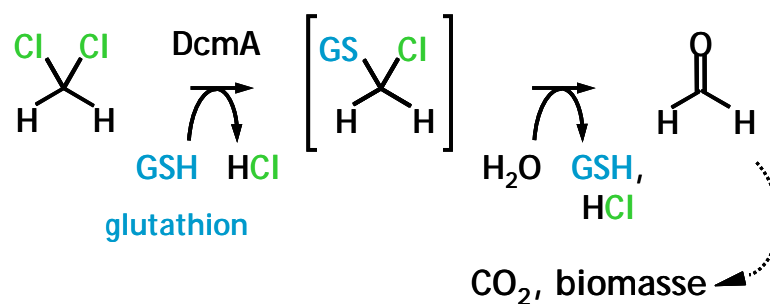


FIGURE I.5 - Représentation schématique du mécanisme de la dichlorométhane déshalogénase.

A l'exception de la souche DM11, toutes les souches méthylo trophes dégradant le dichlorométhane possèdent une dichlorométhane déshalogénase similaire voire identique à celle de la souche DM4 (Figure I.6, Kohler-Staub et Leisinger, 1985 ; Scholtz *et al.*, 1988 ;

Vuilleumier *et al.*, 2001). Cette enzyme est localisée dans le cytoplasme, contrairement à la méthylamine ou la méthanol déshydrogénase qui sont des enzymes périplasmiques (Leisinger *et al.*, 1994). Le gène *dcmR* est un régulateur négatif du gène *dcmA* au niveau transcriptionnel. Il est situé en amont du gène *dcmA* en orientation inverse (La Roche et Leisinger, 1991). En absence de dichlorométhane, le produit codé par *dcmR* se lierait à une région spécifique en amont du gène *dcmA*.

Ces deux gènes sont flanqués par trois éléments d'insertion *IS1354*, *IS1355* et *IS1357*, et par deux gènes *orf353* et *orf192* de fonction inconnue. Cette région est hautement conservée chez de nombreux méthylophes dégradant le dichlorométhane ce qui suggère que cette région provient d'un transfert horizontal (Leisinger, 1996 ; Schmid-Appert *et al.*, 1997).

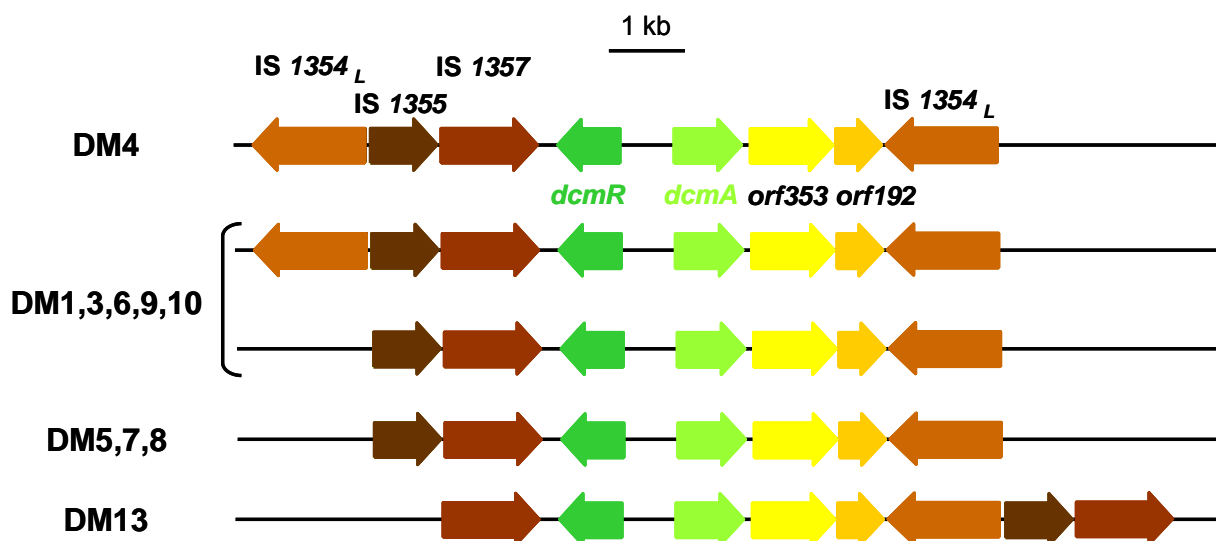


FIGURE I.6 - Organisation génétique de la région comportant le gène *dcmA* chez les méthylophes dégradant le dichlorométhane.

3.2. Voies métaboliques de transformation du dichlorométhane

Chez l'homme, la voie d'exposition principale au dichlorométhane est par inhalation. Les données disponibles sur le métabolisme du dichlorométhane montrent que ce composé est dégradé *via* deux voies principales chez les mammifères. La première voie (MFO : Mixed

Function Oxidase Pathway) implique les cytochromes P450 (et en particulier le CYP2E1) par laquelle le dichlorométhane est transformé en monoxyde de carbone. La seconde voie fait intervenir une glutathion S-transférase (GST) à faible affinité pour le dichlorométhane, la GSTT1-1, qui conduit à la transformation du dichlorométhane en formaldéhyde (Stourman *et al.*, 2003). La voie impliquant les cytochromes P450 étant déjà saturée à des concentrations en dichlorométhane relativement faibles, c'est la voie mettant en jeu la GSTT1-1 qui prédomine lors d'expositions chroniques à des vapeurs hautement concentrées en dichlorométhane (Starr *et al.*, 2006). Dans de telles conditions, un effet carcinogène significatif a été observé au niveau du foie et des poumons chez la souris où l'activité GSTT1-1 est importante. Une corrélation de l'activité dose-dépendante de transformation du dichlorométhane par la GSTT1-1 avec la mutagénicité du dichlorométhane a également été démontrée chez la souris, indiquant que le dichlorométhane est bioactivé en un intermédiaire carcinogène par cette voie (Hashmi *et al.*, 1994 ; Vuilleumier, 2002).

Le mécanisme précis selon lequel la toxicité du dichlorométhane résulte de la transformation enzymatique du dichlorométhane par les GSTs a été étudié en détail précédemment par notre équipe de recherche (Gisi *et al.*, 1999 ; Kayser et Vuilleumier, 2001). Il a d'abord été observé que le dichlorométhane est mutagène chez la souche *Salmonella thyphimurium* lorsqu'elle exprime la GSTT1-1 du rat. Un effet similaire mais de moindre intensité est également observé avec une dichlorométhane déshalogénase / glutathion S-transférase homologue provenant de bactéries méthylophiles capables de se développer sur le dichlorométhane comme seule source de carbone (Gisi *et al.*, 1999), et ce malgré que les dichlorométhane déshalogénases des bactéries méthylophiles présentent une affinité beaucoup plus importante que les enzymes homologues humaine, du rat et de la souris (Gisi *et al.*, 1999; Wheeler *et al.*, 2001; Stourman *et al.*, 2003). Le consensus aujourd'hui est que la réaction de GSTs/DCM déshalogénases humaines et microbiennes avec le dichlorométhane implique un intermédiaire très réactif, le S-chlorométhylglutathion, dont le fort pouvoir alkylant peut conduire à des lésions de l'ADN. Si le S-chlorométhylglutathion ou le produit de sa réaction à l'ADN n'a pas été à ce jour directement identifié chez les mammifères exposés au dichlorométhane, des produits de conjugaison d'ADN et de glutathion contenant l'atome de

carbone du dichlorométhane et l'atome de soufre du glutathion ont été identifiés lors d'expériences *in vitro* dans lesquelles le dichlorométhane a été incubé avec une glutathion S-transférase / dichlorométhane déshalogénase microbienne en présence d'oligonucléotides (Kayser et Vuilleumier, 2001).

4. RÉPONSE PROCARYOTE À L'ACIDE

4.1. Adaptation et acido-tolérance

De nombreuses bactéries rencontrent un environnement acide. L'acidité peut nuire à la cellule en diminuant le pH interne, un paramètre déterminant pour le métabolisme cellulaire, qui affecte la croissance de la cellule. Lors du passage dans le tractus gastro-intestinal, les bactéries pathogènes dentaires et gastriques ainsi que les bactéries probiotiques doivent faire face aux fluides gastriques très acides de l'estomac (Van de Guchte *et al.*, 2002). Un pH de 1,5 est atteint à jeun et augmente entre 3 et 5 au cours de l'alimentation (Cotter et Hill, 2003). Les bactéries fermentaires dont la fermentation est utilisée pour l'amélioration et / ou la conservation des aliments sont également soumises à un tel environnement. De plus, au cours de leur métabolisme, elles produisent des acides organiques créant ainsi un environnement acide (Van de Guchte *et al.*, 2002). Des *Archaea* poussant à un pH proche de 0 ont également été retrouvées à proximité de volcans (Fütterer *et al.*, 2004). De fait, les bactéries soumises à un potentiel stress acide dans la nature ou lors de processus industriels doivent être capables de répondre rapidement à ce stress pour survivre (Stortz *et al.*, 2000).

De très nombreuses études ont été effectuées sur la résistance des bactéries à l'acide. Il a été montré que la résistance à l'acidité chez les procaryotes dépend de différents paramètres comme la phase de croissance, le milieu de culture, le pH de culture ou encore l'état planctonique, sporulé ou adhérent des cellules.

La survie au stress acide a été étudiée en détail sur des bactéries prélevées à différents stades de la croissance. Chez *E. coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis* et *Listeria monocytogenes*, les cellules prélevées en phase stationnaire sont plus résistantes au stress acide que les cellules prélevées à d'autres stades de la croissance cellulaire (Richard et Foster,

2003 ; Davis *et al.*, 1996 ; Alemayehu *et al.*, 2000 ; Lorca et Valdez, 2001). L'entrée en phase stationnaire peut induire des mécanismes qui permettent la résistance au stress acide. Cette résistance est appelée "Acid Tolerance Response" (ATR) naturelle, et son induction varie selon les organismes.

Une exposition préalable à un pH acide ou une culture à bas pH peut influencer sur la résistance au stress acide. En effet, il a été montré chez *L. monocytogenes* que des cellules cultivées à pH 7,0 et pré-adaptées à un pH acide 5,5 sont plus résistantes à une exposition à pH 3,5 que des cellules non pré-adaptées (O'Driscoll *et al.*, 1996). Chez *Streptococcus mutans* et *Enterococcus hirae*, des cellules en culture continue à un pH acide de 5 résistent mieux à un stress acide à pH 2,5 que des cellules cultivées à pH 7 (Belli et Marquis, 1991 ; O'Driscoll *et al.*, 1996). Ce phénomène d'adaptation de la cellule pré-exposée ou cultivée à un pH acide non léthal puis soumise à un choc acide, est appelé ATR dépendante du pH.

En plus d'une meilleure résistance à l'acidité, la pré-exposition à un pH acide non léthal confère aussi aux cellules une capacité à survivre à d'autres types de stress (protection croisée). En effet, des cultures de *Listeria monocytogenes* et de *Lactobacillus delbrueckii* dans lesquelles l'ATR a été induite ont montré une meilleure résistance à un stress thermique ou à l'éthanol par rapport à des cultures non adaptées (O'Driscoll *et al.*, 1996, Casadei *et al.*, 2001). Chez *Salmonella typhimurium*, l'ATR peut également protéger les cellules contre l'exposition à la chaleur et aux sels NaCl et KCl (Greenacre et Brocklehurst, 2006).

L'acido-tolérance peut entre autres être affectée par différents facteurs. Ainsi, l'ATR de cellules de *L. monocytogenes* est dépendante de la température de pré-adaptation à pH 5,5 (Koutsoumanis *et al.*, 2003). Dans cette étude, la résistance au choc acide à pH 3,5 est 2 fois plus importante pour les cellules pré-incubées à pH 5,5 et 30°C que les cellules pré-incubées à pH 5,5 et 4°C. De même, l'ajout de 10,5 % de NaCl dans le milieu de pré-adaptation des cellules à pH 5,5 augmente la résistance des cellules soumises à pH 3,5 par rapport aux cellules pré-adaptées en absence de NaCl.

L'état des cellules planctoniques ou adhérentes influence aussi la résistance face à un stress acide. Par exemple, des cellules de *L. monocytogenes* adhérentes à l'inox survivent mieux à l'acide acétique ajouté dans le milieu que les cellules planctoniques (Oh et Marshall, 1996). De plus, les cellules survivent d'autant mieux que la culture vieillit. Chez *Streptococcus mutans*, il a été montré que la formation de biofilms semblait protéger les cellules vivantes qui se trouvent dans les couches profondes du biofilm de l'acidité exogène, car l'accès des protons à ces cellules serait limité par l'amas de cellules qui les recouvre (Svensater *et al.*, 2001). Chez cette bactérie, il a aussi été mis en évidence que la densité cellulaire peut affecter la résistance des cellules à l'acidité. En effet, des cellules planctoniques à forte densité résistent significativement mieux à un stress acide que des cellules à faible concentration (Li *et al.*, 2001). Ceci suggère que les systèmes de communication de cellule à cellule, regroupés sous l'appellation générique "Quorum sensing", pourraient être impliqués (Wen et Burne, 2004).

4.2. Mécanismes de résistance

L'acidité provoque de nombreux dommages à la cellule tant au niveau physiologique que moléculaire (dénaturation de protéines, de l'ADN). Un stress acide altère la membrane, cette dernière devenant plus perméable aux protons. L'entrée de protons dans la cellule diminue alors le pH interne (pH_i). Cette diminution du pH_i affectera le métabolisme en inactivant ou en dénaturant des protéines, et l'ADN par perte de purines et de pyrimidines (Cotter et Hill, 2003). Les microorganismes emploient divers mécanismes et stratégies pour se protéger de l'hostilité qu'impose un environnement à bas pH : modification de l'architecture et de la composition de la membrane, changement de métabolisme et production de molécules alcalines, homéostasie du pH interne et production de protéines chaperonnes par exemple (Figure I.7).

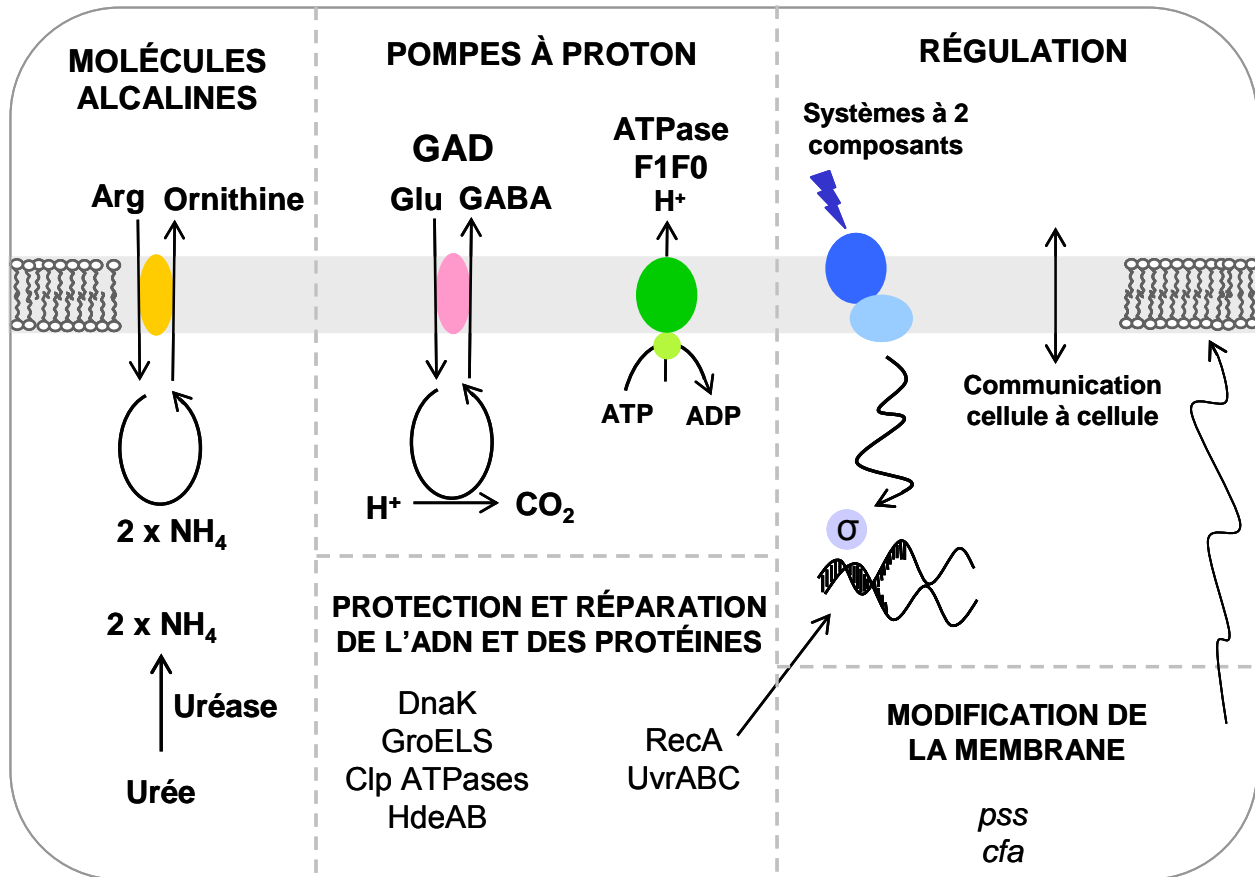


FIGURE I.7 - Mécanismes de résistance à l'acide d'après Cotter et Hill, 2003.

(i) Production de composés alcalins comme les systèmes de l'uréase et de l'arginine déiminase qui augmentent le pH interne. (ii) Pompe à proton comme la F_0F_1 ATPase ou système de décarboxylation d'acide aminé pour augmenter le pH interne. (iii) Réparation des protéines impliquant des chaperonnes, protéases et protéines de choc thermique qui protègent les protéines ou les dégradent si endommagées. (iv) Réparation des dommages de l'ADN causés par un pH interne faible. (v) Enveloppe cellulaire qui peut protéger les cellules par modification de son architecture et de sa composition. (vi) Participation de régulateurs comme les systèmes à 2 composants, les facteurs sigma qui peuvent induire une réponse mineure ou global ou la densité cellulaire qui peut affecter la communication cellule à cellule.

4.2.1. Modification de la membrane

La membrane cellulaire des bactéries est la première structure cellulaire en contact avec l'extérieur. Elle est donc la première à être affectée par les conditions environnementales néfastes pouvant impliquer l'acidité du milieu. La fluidité de la membrane est importante pour

les cellules car elle peut affecter les fonctions membranaires comme les réactions biochimiques, les systèmes de transport et la sécrétion de protéines. Les bactéries ont développé des stratégies d'adaptation leur permettant de prévenir ces problèmes. Elles modifient la composition de leur membrane afin de diminuer sa fluidité et sa perméabilité aux protons. Ces modifications se font principalement au niveau des acides gras. Généralement, la quantité en acides gras saturés augmente et la longueur des chaînes diminue, ce qui réduit la fluidité membranaire comme c'est le cas chez *E. coli* ou *Salmonella typhimurium* (Yuk et Marshall, 2004 ; Kwon *et al.*, 2000). Cependant, chez certaines bactéries orales telles que *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii*, *Lactobacillus casei* et *Streptococcus macedonicus*, la membrane des cellules adaptées est enrichie en acides gras mono-insaturés et la longueur de leur chaîne est augmentée par rapport à celles des cellules non adaptées (Papadimitriou *et al.*, 2007 ; Fozo *et al.*, 2004 ; Fozo et Quivey, 2004), suggérant une fluidification de la membrane. Actuellement, la manière dont cette stratégie d'adaptation de la membrane aux bas pH permet aux cellules de mieux résister au stress acide n'est pas bien connue (Fozo et Quivey, 2004).

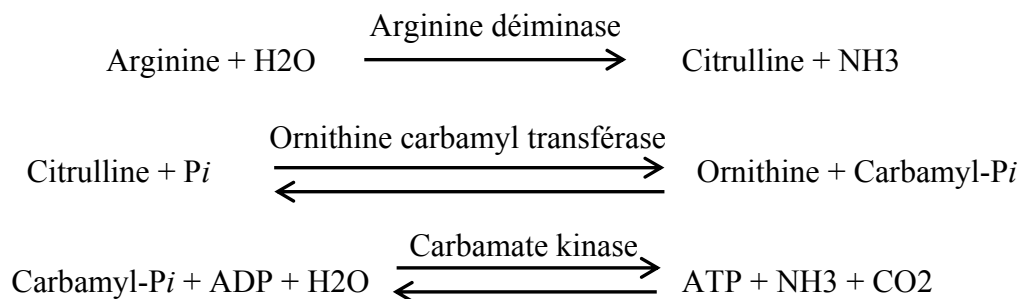
Toujours chez *E. coli*, le contenu de la membrane en acides gras à cyclopropane (CFA, "cyclopropane fatty acid") joue également un rôle important dans la diminution de la perméabilité aux protons au cours d'un stress acide. La formation de CFA est une modification post-synthétique des membranes lipidiques qui a lieu au cours de la transition de la phase exponentielle à la phase stationnaire (Merrell et Camilli, 2002). Les CFA sont formés par la CFA synthase, codée par le gène *cfa* lui-même régulé par le facteur sigma RpoS. Différentes études montrent qu'en absence du gène *cfa*, les cellules sont plus sensibles à pH 3 (Booth *et al.*, 2002). La conversion d'acides gras insaturés en CFA diminue la perméabilité aux protons et contribue ainsi à augmenter la résistance à l'acide (Richard et Foster, 2003). Ce mécanisme intervient dans les trois systèmes de résistance à l'acide mis en place en phase stationnaire qui sont décrits plus loin (AR1, AR2 et AR3). La composition en phospholipides est également importante chez *E. coli*. Les cultures en phase stationnaire de *E. coli* sont beaucoup plus sensibles à un choc acide à pH 3 en absence du phospholipide majoritaire, la phosphatidyléthanolamine (Canet *et al.*, 2003).

4.2.2. Production de composés alcalins

Certaines bactéries produisent des molécules acides en conditions de croissance alcaline ou des molécules alcalines en conditions de croissance acide. Dans cette dernière situation, de nombreuses bactéries produisent des molécules alcalines et plus spécifiquement de l'ammoniaque. L'ammoniaque est générée par 2 voies, la voie de l'uréase et la voie de l'arginine déiminase (Cotter et Hill, 2003 ; Van de Guchte *et al.*, 2002). Ces deux systèmes protègent les cellules contre l'acidité de l'environnement par l'augmentation du pH externe (pHe) grâce à la production d'ammoniaque.

La voie de l'uréase résulte de l'hydrolyse de l'urée en deux molécules d'ammoniaque et une molécule de dioxyde de carbone. Elle participe ainsi au maintien de la force protomotrice à travers la membrane interne de la bactérie. Chez *S. salivarius*, la production d'uréase augmente au cours de la croissance alors que le pH de la culture diminue (Cotter et Hill, 2003). Cette enzyme a une activité maximale pour un pH de l'ordre de 5,8. Par contre, elle diminue lorsque le pH augmente, mais aussi lorsque le pH est extrêmement acide et est inactivée à pH 4,3. Son expression réprimée à pH 7,0 est induite à pH 5,5. Chez cette bactérie, l'uréase est codée par l'opéron *ureIABCEFGD* (Chen *et al.*, 1998) avec *ureC*, *ureB* et *ureA* qui codent pour les sous-unités α , β et γ qui constituent l'enzyme, et les sous-unités codées par *ureDEFG* qui fonctionnent comme des protéines accessoires qui participent à l'incorporation d'ions nickel dans l'enzyme. Deux promoteurs, *PureI* et *PureA*, ont été identifiés chez *S. salivarius* et semblent être régulés par le pH acide et le niveau de composés carbonés. Il a été mis en évidence que la haute résistance à l'acide de *Helicobacter pylori* était liée à sa capacité à produire une uréase (Booth *et al.*, 2002). Cette enzyme est constituée de sous-unités UreA et UreB et est activée par les protéines accessoires UreE, UreF, UreG et UreH (Arnoud *et al.*, 2004). Un transporteur spécifique de l'urée, UreI, a été localisé sur la membrane interne. Les pores de UreI s'ouvrent quand le pH du milieu avoisine 6,5 et permet ainsi l'accès de l'urée à l'uréase cytoplasmique. Six résidus d'acides aminés périplasmiques seraient liés à l'activité de ce transporteur. La protonation de ces résidus aminés, comme une augmentation de l'acidité, induirait une modification de conformation qui ouvrirait les pores de UreI (Merrell et Camilli, 2002).

L'arginine déiminase est un autre système connu pour intervenir dans la résistance au stress acide. Il a également été identifié chez une grande variété de bactéries, comme les bactéries lactiques, les mycoplasmes, les halobactéries, *Pseudomonas* sp., ou encore *Bacillus* spp. (Van de Guchte *et al.*, 2002 ; Cotter et Hill, 2003). Ce système d'arginine déiminase est composé de trois enzymes et d'un transporteur : l'arginine déiminase (ADI), l'ornithine carbamyl transférase, la carbamate kinase et un antiporteur arginine/ornithine codés respectivement par les gènes *arcA*, *arcB*, *arcC* et *arcD* (Cotter et Hill, 2003 ; Budin-Verneuil *et al.*, 2006). Ces trois enzymes catalysent les réactions suivantes :



4.2.3. Homéostasie du pH interne

Le pH interne (pH_i) est un facteur important de la physiologie bactérienne pour lequel la cellule exerce une régulation pointue. Il n'existe pas une valeur de pH_i physiologique commune à tous les micro-organismes. Ainsi, les organismes acidophiles ont un pH_i compris entre 6,5 et 7,0, les neutrophiles ont un pH_i compris entre 7,5 et 8,0 et les alcalophiles ont un pH_i compris entre 8,4 et 9,0 (Booth, 1985). Les organismes fermentaires ont une gamme de pH_i plus importante que celle des organismes non fermentaires, pour laquelle la croissance peut s'effectuer. La régulation du pH_i implique un contrôle accru de la perméabilité membranaire envers les protons, qui peut s'effectuer via les transporteurs d'ions qui facilitent l'entrée des protons.

De manière générale, des études de croissance ont permis de montrer que le pH_i diminuait avec le pH de culture. Par exemple, *Streptococcus bovis* est capable de croître dans des milieux où le pH externe (pH_e) est compris entre 6,7 et 4,5, son pH_i diminuant respectivement de 7,8 à 5,6 (Russell, 1991). Avec un pH externe de 2,5, le pH interne d' *E.*

coli diminue de 7,5 à 4,5 (Foster, 2004). Ces études montrent que certaines bactéries sont capables de croître avec un pH cytoplasmique relativement bas. Lorsque le pH_e diminue de 7,0 à 5,0, le pH_i de *Listeria innocua* ne varie que de 8,0 à 7,1 (Siegumfeldt *et al.*, 2000), ce qui montre que la régulation du pH_i diffère entre les bactéries.

4.2.3.1. Perturbation du pH_i

Le pH_i est perturbé par deux principaux facteurs, le mouvement passif des protons à travers la membrane cytoplasmique et la production d'acides et de bases dans le cytoplasme. Ainsi chez les bactéries fermentaires, l'accumulation des produits de fermentation dans le cytoplasme peut engendrer une diminution du pH_i malgré une expulsion continue des protons (Russell, 1992 ; Russell et Diez-Gonzalez, 1998).

Les acides organiques présents dans le milieu de culture peuvent aussi être néfastes pour l'homéostasie du pH_i surtout lorsque celui-ci est supérieur au pH_e . Les bactéries qui laissent leur pH_i diminuer, permettant de conserver un faible ΔpH ($pH_i - pH_e$), seraient plus résistantes aux acides que les bactéries qui maintiennent leur pH_i neutre. C'est le cas pour *Lactobacillus delbrueckii*, *L. lactis* et *Streptococcus thermophilus* qui lorsqu'elles sont soumises à une baisse de pH_e , leur pH_i diminue tout en restant légèrement supérieur au pH_e (Siegumfeldt *et al.*, 2000). Les acides organiques non dissociés passent librement à travers la membrane dont la bicouche lipidique est perméable ce qui limite leur accumulation dans la cellule. Chez les bactéries qui conservent un pH_i plus élevé, les acides organiques, une fois dans le cytoplasme plus alcalin, se dissocient et vont s'accumuler dans la cellule, stoppant la croissance de la bactérie (Mercade *et al.*, 2000). Leur dissociation dépend de leur pK_a , généralement inférieur à 5.0 (Tableau I.1). L'accumulation de ces acides organiques sous forme anionique, dépend du gradient de pH à travers la membrane (ΔpH , Russell, 1991).

TABLEAU I.1 - *pKa* de quelques acides organiques (à 25°C).

Acide organique	pKa
Acide acétique	4,76
Acide formique	3,74
Acide lactique	3,86
Acide succinique	4,21 et 5,64

4.2.3.2. Régulation du pH_i

Afin de maintenir le pH interne à une valeur conservant l'intégrité physiologique de la cellule, outre la capacité tampon du cytoplasme, les bactéries possèdent de nombreuses stratégies permettant de contrôler le flux de protons comme le transport actif de protons à travers la membrane (F₁F₀-ATPase) et les systèmes de décarboxylation (glutamate décarboxylase, par exemple). Les pompes à proton permettent l'extrusion de protons du cytoplasme vers le milieu extérieur, générant ainsi un gradient de protons électrochimique trans-membranaire, appelée force protomotrice (fpm) indispensable à la production d'énergie. Les systèmes de décarboxylation sont constitués d'une ou plusieurs enzymes décarboxylase, qui convertissent leur substrat en un dérivé aminé et en CO₂ (ou en bicarbonate) et d'un antiporteur qui échange l'acide aminé contre le dérivé aminé qui est son produit de décarboxylation. La décarboxylation de la lysine, l'arginine et du glutamate prédominent dans l'acido-tolérance (Booth *et al.*, 2002).

Chez *E. coli*, il a été montré qu'au cours de la phase stationnaire, au moins trois systèmes distincts de résistance à l'acide sont déclenchés sous différentes conditions (Richard et Foster, 2003). Le premier système (AR1, "Acid resistance") est induit par l'acide et réprimé par le glucose. Les composants de ce système ainsi que ses mécanismes sont à ce jour inconnus. Les deux autres systèmes sont des systèmes de décarboxylation et font intervenir deux acides aminés (glutamate, AR2 et arginine, AR3).

Systeme AR1

Le système de résistance à l'acide AR1 est un système oxydatif qui se met en place au cours de la phase stationnaire de croissance. Ce système est induit par l'acide et est réprimé par le glucose. Il requiert le facteur sigma alternatif RpoS pour être exprimé. Sur un milieu dépourvu de glucose, ce système permet aux cellules cultivées à pH 5,5 de survivre à un pH de 2,5. Les facteurs clés intervenant dans la régulation de ce système comprennent le facteur sigma σ^S (RpoS), l'AMP cyclique (AMPC) et les protéines réceptrices de l'AMPC (CRP). Une mutation dans un gène correspondant bloque l'action du système AR1. Cependant, les mécanismes précis de cette protection AR1 ne sont pas encore parfaitement connus (Castanie-Cornet *et al.*, 1999 ; Richard et Foster, 2003).

Le transporteur de protons F_1F_0 -ATPase serait également lié au système AR1. La F_1F_0 -ATPase joue deux rôles chez les bactéries. Elle catalyse aussi bien la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique en utilisant la force protomotrice transmembranaire, que l'hydrolyse de l'ATP en générant ainsi un gradient transmembranaire de protons. La F_1F_0 ATPase est composée de 2 complexes protéiques (Van de Guchte *et al.*, 2002 ; Cotter et Hill, 2003). Le complexe F_0 , intégré à la membrane, permet le passage des protons à travers la membrane. Le complexe F_1 porte le site catalytique de la synthèse d'ATP. Le locus *atp* code pour les 5 sous unités α , β , δ , γ et ϵ qui forment le complexe F_1 et les 3 sous-unités a, b et c qui composent F_0 . La F_1F_0 -ATPase membranaire est connue pour jouer un rôle dans la résistance à l'acidité chez de nombreuses bactéries : bactéries du rumen, *Lactobacillus acidophilus* et *Listeria monocytogenes* notamment (Cotter et Hill, 2003). Il a été montré chez *L. acidophilus* que l'expression de l'opéron qui code cette ATPase est induite par un pH acide. Chez *E. coli*, cette ATPase pourrait agir comme une pompe à protons au cours du stress acide excréant les protons hors de la cellule avec une hydrolyse de l'ATP en parallèle (Richard et Foster, 2003). Les pompes à protons pourraient ainsi aider au maintien du pH intracellulaire qui conduirait à la survie de la cellule dans des conditions acides extrêmes. Cependant, il n'a pas encore été clairement établi si ce complexe protéique produit de l'ATP dans le contexte de l'opération du système AR1, ou si c'est un composant de ce

système qui excrète les protons directement hors du cytoplasme, comme c'est le cas chez *Streptococcus* spp. (Foster, 2004).

Par ailleurs, comme déjà mentionné ci-dessus, outre l'action probable des pompes à protons F_1F_0 -ATPase, les différences de composition des membranes en acides gras cyclopropane (CFA, cf. paragraphe 4.2.1) sont également un facteur important dans la diminution de la perméabilité aux protons au cours d'un stress acide (Richard et Foster, 2003).

La protéine HdeA est un autre composant potentiel de AR1. Cette protéine est exprimée par l'opéron *hdeAB* placé sous le contrôle du facteur sigma RpoS et d'une protéine de la famille H-NS (régulateur global de l'expression de gènes, Booth *et al.*, 2002). Les protéines HdeA et HdeB sont présentes dans le périplasme sous forme d'un hétérodimère. En phase stationnaire de croissance chez *E. coli*, la protéine HdeA est une des plus abondantes dans le périplasme. La protéine HdeA préserverait les protéines de l'agrégation provoquée par l'acide comme par exemple pour la Rhodanèse. Le mécanisme exact n'est pas connu. Le modèle le plus courant de ce mécanisme (Figure I.8) est que les protéines HdeA et HdeB formeraient un hétéroooligomère qui se dissocierait en monomères à pH acide, et qui se lierait aux protéines dénaturées de l'espace périplasmique afin de prévenir leur agrégation (Booth *et al.*, 2002). Cette interaction préviendrait des agrégations irréversibles de ces protéines jusqu'au rétablissement d'un environnement moins acide. Ces protéines, HdeA et HdeB, peuvent intervenir dans les trois systèmes de résistance à l'acide en phase stationnaire (AR1, AR2 et AR3) et sont également présentes chez *Shigella flexneri*. La perte de cette fonction chez des mutants *hdeAB* de *E. coli* et *S. flexneri* entraîne une importante perte de viabilité à un pH acide, ce qui suggère que la protection du périplasme d'agrégation des protéines est primordial.

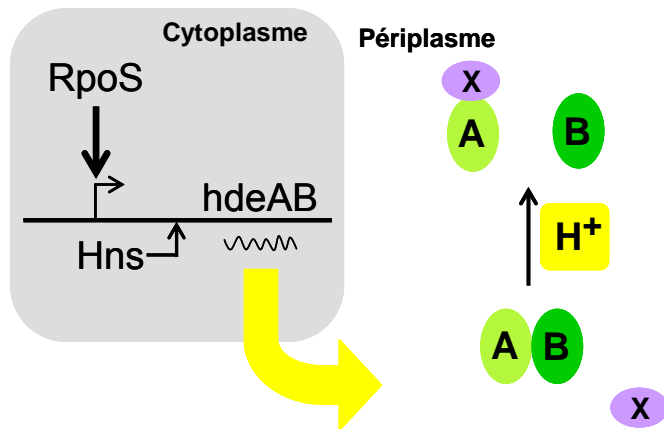


FIGURE I.8 -: Protection des chaperonnes périplasmiques HdeAB chez *E. coli* et *Shigella* d'après Booth et al., 2002. Les protéines sont exprimées dans le cytoplasme sous le contrôle de RpoS avec modulation de l'expression par la protéine H-NS. Après exportation dans le périplasm, les protéines sont sous forme d'un hétérodimère à pH neutre, et se dissocient à pH acide. Elles sont alors capables de se fixer sur les protéines dépliées / dénaturées (X) et ainsi prévenir leur agrégation.

Système AR2

Parmi les systèmes de résistance à l'acide en phase stationnaire recensés chez *E. coli*, le système AR2 (glutamate décarboxylase, système GAD) est le plus étudié. Son activation se fait en milieu contenant du glucose qui réprime le système AR1 (Richard et Foster, 2003). La survie des mutants de *S. flexneri* et d'*E. coli*, pour lesquels le système de décarboxylation du glutamate est inactif, est extrêmement compromise à un pH de 2,5, ce qui montre bien l'importance du rôle de ce système (Booth et al., 2002).

Le glutamate est décarboxylé dans le cytoplasme. Son produit, l' γ -aminobutyrate (GABA), sort de la cellule par échange contre du glutamate via l'antiporteur codé par le gène *gadC*. L'hypothèse généralement privilégiée en ce qui concerne la manière dont ce système protège la cellule est que la consommation de protons intracellulaires au cours de la décarboxylation permet le maintien du pH interne à un niveau qui favorise la survie de la cellule (Richard et Foster, 2003).

Le système GAD est composé des gènes *gadA* et *gadB* qui codent chacun pour une glutamate décarboxylase, et du gène *gadC* qui code pour un antiporteur glutamate / GABA. Le gène *gadC* forme un opéron avec le gène *gadB*. Les gènes *gadX* et *gadW* appartiennent à une famille de régulateurs transcriptionnels, et sont localisés en aval du gène *gadA*. Le gène *gadE* code pour GadE, une protéine de 20,6 kDa, qui est l'activateur central de ce système (Richard et Foster, 2003 ; Foster, 2004). La souche *L. monocytogenes* possède également un tel système, où le gène *gadB* code pour une glutamate décarboxylase induite par l'acide et co-transcrite avec *gadC*, le gène *gadC* code pour un antiporteur glutamate / GABA, et le gène *gadA* code pour une glutamate décarboxylase additionnelle, exprimée constitutivement à un faible niveau et non induite par l'acide (Merrell et Camili, 2002). Le système GAD a été également retrouvé chez *Lactococcus lactis* (Cotter et Hill, 2003). De plus, des analyses bioinformatiques pour rechercher des homologies de séquences suggèrent que *Clostridium perfringens*, *Brucella melitensis*, *Chlamydia pneumoniae* pourraient également posséder ce système (Foster, 2004).

Régulation du système AR2

Les systèmes qui régulent l'expression de AR2 sont complexes. Trois systèmes de régulation ont été recensés (Figure I.9). En raison des multiples circuits d'activation de *gadE*, l'AR2 peut être induit sous une variété de conditions environnementales. Le système *gadA/BC* est toujours exprimé en phase stationnaire, et ceci indépendamment du pH. En phase exponentielle, le système n'est exprimé que lorsque les cellules sont cultivées sur un milieu minimum en conditions acides (pH 5,5 ou inférieur).

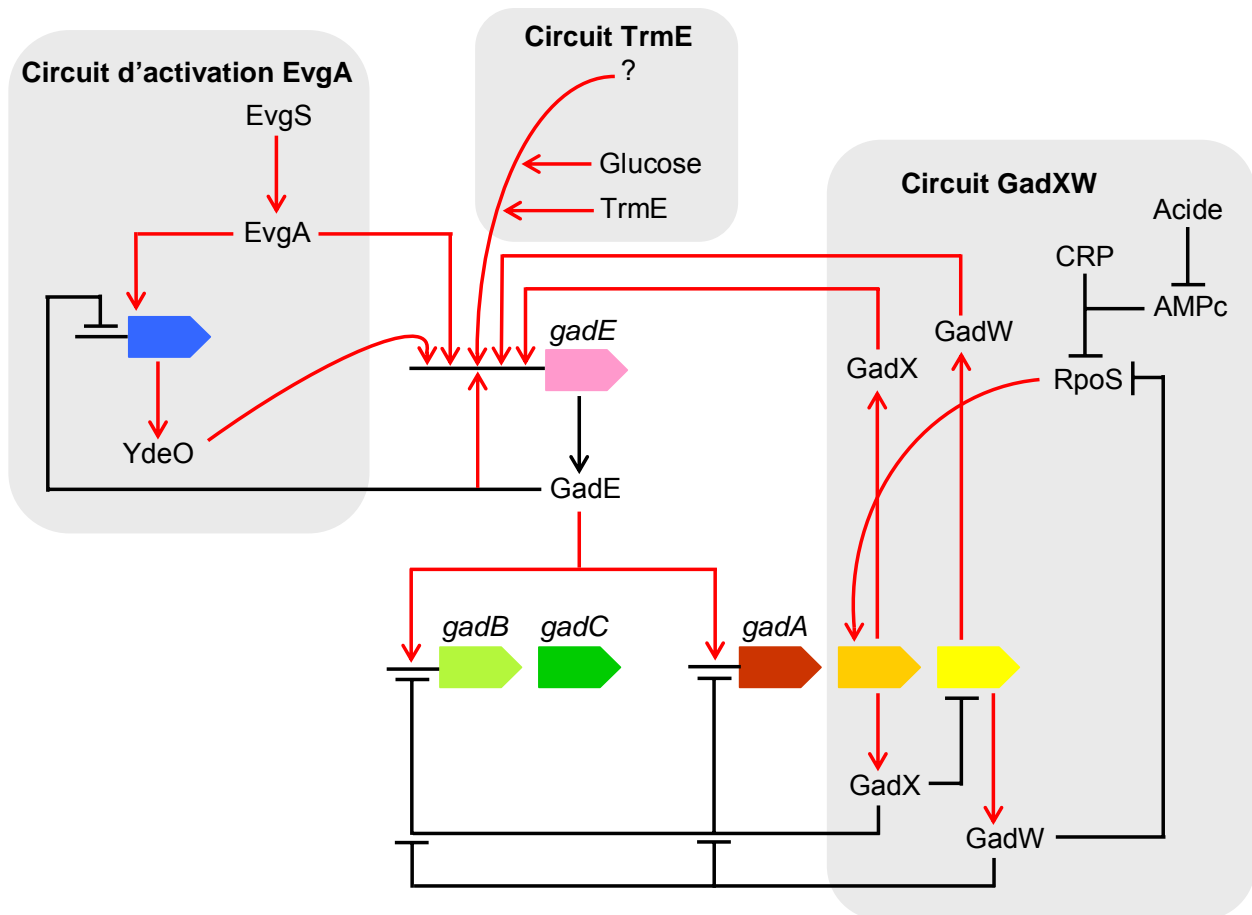


FIGURE 1.9 - Activation des circuits contrôlant le système de résistance à l'acide dépendant du glutamate chez *E. coli* (Foster, 2004). Les flèches pleines représentent les gènes. Les flèches noires indiquent les contrôles négatifs et celles en rouge les régulations positives.

Un premier circuit d'activation de *gadE* inclut le récepteur membranaire EvgS, le régulateur de réponse EvgA et le régulateur YdeO (Foster, 2004). EvgA régule indirectement l'acido-tolérance par l'activation de la transcription de *ydeO* (EvgA → YdeO → GadE → acido-résistance) et active directement la transcription de *gadE*. Dans ce circuit, l'activation de GadE est donc dépendante de EvgA. Cependant, GadE peut également s'autoréguler et réprimer la transcription de *ydeO*. Ce circuit mettant en jeu le couple EvgAS et YdeO est fonctionnel en phase exponentielle lorsque les souches sont cultivées en milieu minimum. En phase stationnaire, ce sont les autres circuits, décrits ci-dessous, qui sont importants.

Le second circuit d'activation inclut les récepteurs de l'AMPc (CRP), le facteur sigma σ^S (RpoS), et les deux régulateurs GadX et GadW (Richard et Foster, 2003). Ce circuit joue un rôle important pour les cellules se développant sur milieu riche. Les gènes *gadX* et *gadW* sont localisés en aval du gène *gadA* et peuvent être co-transcrits mais, la plupart du temps, sont transcrits à partir de promoteurs indépendants. Les produits de ces gènes activent la transcription de *gadE* lorsque les cellules poussent sur milieu riche (LB) et par conséquent induisent *gadA/BC*. De plus, ces deux gènes semblent aussi réprimer les promoteurs de *gadA* et *gadBC*. Ce double rôle de GadX/W suggère qu'ils jouent le rôle d'activateur sous certaines conditions et de répresseur sous d'autres conditions (Foster, 2004). GadW a un autre rôle dans ce circuit, en inhibant la synthèse de RpoS qui est un facteur requis pour l'expression de GadX. Sans GadW, il y a surexpression de GadX, de GadE et des opérons de décarboxylation. Le circuit GadX/W est complété par la répression de la transcription de *gadW* par GadX. L'équilibre dans ce circuit est influencé par AMPc et les récepteurs CRP qui inhibent la synthèse de RpoS. Sur milieu riche, la cellule possède un haut niveau de AMPc, le complexe CRP-AMPc réprime l'expression de RpoS. En phase stationnaire, le niveau de RpoS augmente et déclenche l'expression de plusieurs gènes incluant le gène *gadX* dont le produit induit l'expression de *gadA/BC* et réprime celle de *gadW*. Lors de la croissance en conditions acides, la concentration en AMPc est réduite et augmente l'expression de RpoS qui à son tour augmente la synthèse de GadX. Ceci explique partiellement l'induction par l'acide de ce circuit.

Un troisième facteur qui affecte l'expression du système GAD a été récemment découvert (Cabedo *et al.*, 1999). Une mutation dans le gène codant la protéine GTPase TmrE empêche la synthèse des produits des gènes *gadA* et *gadBC* lors de la croissance en milieu riche (LB) contenant du glucose. En absence de glucose, aucun effet n'est observé. La fonction de TmrE n'est pas clairement définie. Il semble que cette protéine ait un double rôle dans le contrôle des gènes *gadA* et *gadBC*. D'une part, elle active la transcription de *gadE* par modification de la production ou de l'activité d'un régulateur encore inconnu induit en phase stationnaire. D'autre part, elle est requise dans la traduction efficace de *gadA* et plus encore dans celle de *gadBC* (Foster, 2004). En effet, une mutation dans *trmE* n'affecte pas la

traduction de *gadA* mais réduit nettement les niveaux de la décarboxylase et de l'antiporteur. La manière dont TrmE accomplit cette double tâche est encore inconnue.

Systeme AR3

Le système de résistance à l'acide AR3 est arginine-dépendant. Sa régulation semble moins complexe que celle de AR2 (Richard et Foster, 2003). Ce système est composé d'une arginine décarboxylase codée par le gène *adiA*, localisé en aval du gène *adiC* (antiporteur arginine / agmatine). Ces deux gènes sont séparés par un troisième gène *adiY* qui code pour un régulateur. Lorsque ce dernier est surexprimé, il active l'expression des gènes *adiA* et *adiC*. Une mutation dans ce gène n'a aucun effet discernable sur la transcription des gènes *adiA/C*. Il est possible que ce gène *adiY* nécessite des conditions environnementales particulières qui n'ont pas été encore identifiées. Le gène *cysB* s'avère être un activateur de tous ces gènes. Les gènes *adiA/C* sont seulement transcrits sous conditions anaérobies à bas pH sur milieu riche. CysB peut être un récepteur de ces facteurs extérieurs. Le facteur sigma alternatif RpoS joue aussi un rôle dans ce système de régulation mais il n'est pas indispensable pour la transcription de ces gènes (Foster, 2004).

Rôle des canaux à chlorure dans AR2 et AR3

Les systèmes de décarboxylation du glutamate et de l'arginine provoquent des perturbations dans la cellule. Pour pallier ces perturbations, d'autres facteurs interviennent. En conditions aérobies à pH 7, le potentiel électrique est maintenu à une valeur négative à l'intérieur de la cellule (-90 mV). En phase stationnaire, il est de -50 mV. Mais si l'arginine ou le glutamate sont présents, le potentiel électrique de *E. coli* est positif (respectivement de +80 mV et +30 mV). Il est possible que ce mécanisme protège les cellules du stress acide par une charge positive interne qui par le biais de la répulsion, ralentit le mouvement des protons dans la cellule (Foster, 2004). Cet excès intracellulaire de charges positives électrostatiques qui en résulte est sans doute dû au fait qu'en conditions acides extrêmes, les protons entrent dans la cellule au moyen de protéines de transport ou directement à travers la membrane cellulaire.

A pH acide, les systèmes AR2 et AR3 contribuent à régler le potentiel électrique de membrane de la cellule. Les antiporteurs glutamate / GABA et arginine / agmatine sont

électrogéniques avec génération d'une charge supplémentaire de +1 lors du transport à travers la membrane (Figure I.10). En effet, une fois entrées dans les cellules stressées par l'acide, les molécules de glutamate ont une charge neutre ou de -1 selon l'état de protonation des groupes ionisables. GABA a une charge de +1 après sortie de la cellule via l'antiporteur. De même, l'arginine qui a une charge de +1 donne après décarboxylation l'agmatine qui a une charge de +2. L'échange des produits de décarboxylation contre un nouvel acide aminé contribue donc à expulser les protons et à augmenter le pH. Cependant, un pool de produits de décarboxylation doit être présent dans la cellule pour le fonctionnement de l'antiporteur, et peut ainsi partiellement contribuer à un excès de charges positives à l'intérieur de la cellule.

L'existence de ce transport électrogénique de type antiport qui contribue à la force promotrice, suggérerait que les systèmes AR2 et AR3 soient couplés à la production d'énergie via un transporteur de protons F_1F_0 -ATPase. Or, il a récemment été montré que, contrairement à cette prédiction, les transporteurs de protons F_1F_0 -ATPase n'étaient pas requis pour ces types de résistance à l'acide (Richard et Foster, 2003). Par contre, des canaux antiporteurs H^+ / Cl^- (CIC) semblent être impliqués dans ces mécanismes de décarboxylation (Figure I.10). Ceux-ci permettent de faire entrer des charges négatives dans la cellule pour contrebalancer un excès de charges positives tout en contribuant à l'excrétion de protons. Ces canaux pourraient ainsi prévenir l'hyperpolarisation de la membrane due à l'activité des antiporteurs et aider la cellule à retrouver un potentiel électrique négatif (Foster, 2004).

Depuis, l'implication ce type de canaux à chlorure CIC dans la résistance à l'acide a été mise en évidence chez d'autres bactéries, comme par exemple chez *Vibrio cholerae* (Ding et Waldor, 2003), où ces canaux y joueraient également un rôle dans la résistance à l'acide. Ces canaux joueraient aussi un rôle dans la déshalogénéation chez certaines bactéries. C'est le cas de la souche *Burkholderia cepacia* qui est capable de cataboliser un composé chloré, le 2,4-dichlorophénoxyacétate. Les canaux à chlorures CIC ont été directement impliqués dans ce métabolisme qui génère de l'acide. Dans ce cas, le rôle physiologique des CIC serait de maintenir l'homéostasie cellulaire qui peut être bouleversée par le catabolisme de composés chlorés (Sebastianelli et Bruce, 2007). Il est donc possible que la souche DM4 dispose de

mécanismes similaires pour se débarrasser de l'acide produit lors de la dégradation du dichlorométhane.

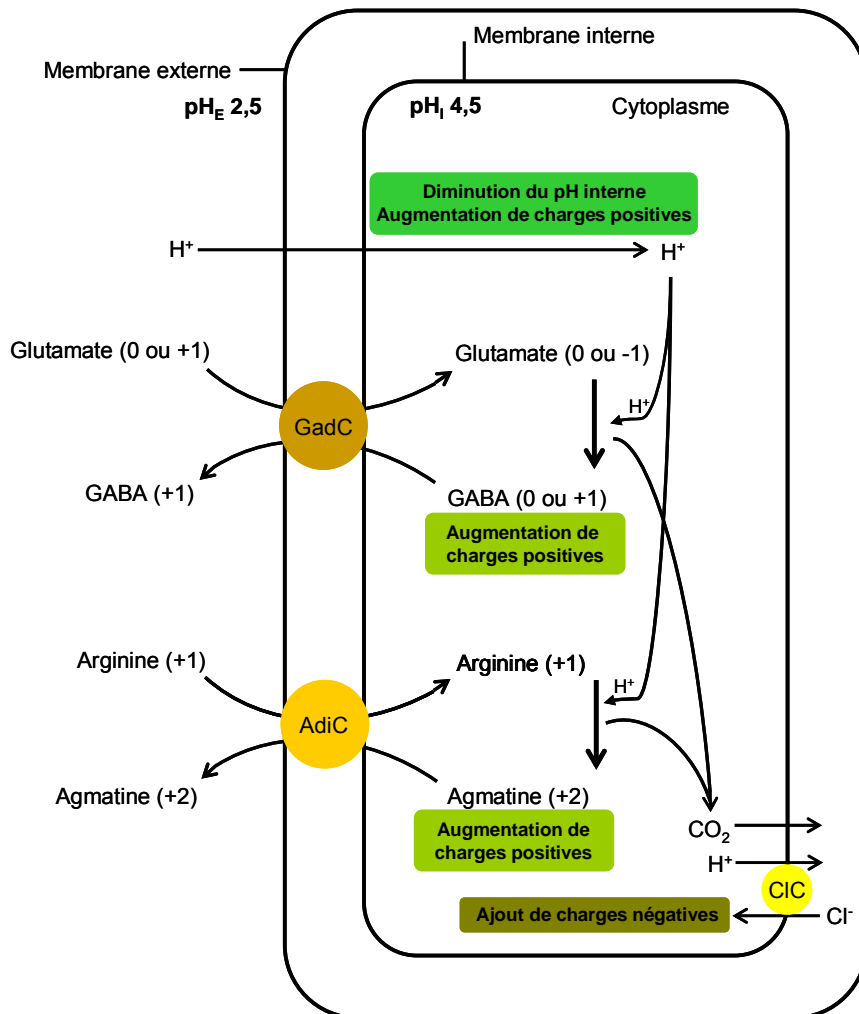


FIGURE I.10 - Modèle de canaux à chlorure ClC impliqués dans le système glutamate décarboxylase et le système arginine décarboxylase (d'après Foster, 2004 ; Richard et Foster, 2003).

Capacité tampon du cytoplasme

Indépendamment de l'intervention de ces systèmes, le pH_i d'une cellule peut rester stable grâce à la capacité tampon relativement importante du cytoplasme. Cette capacité est essentiellement due aux protéines et à leur composition en acides aminés. Elle dépend donc de l'espèce bactérienne (Booth, 1985, McLaggan *et al.*, 1997). Lorsque des composés acides

ou alcalins rentrent dans la cellule, la capacité tampon du cytoplasme tend à compenser ces variations pour garder le pH_i neutre.

Rius et Loren ont comparé la capacité tampon de *Bacillus alcalophilus*, bactérie alcalophile et de *B. subtilis* et *S. aureus*, bactéries neutrophiles (Tableau I.2, Rius et Loren, 1998). Ils ont montré que la capacité tampon de *B. alcalophilus*, est influencée par le pH de culture, et par les conditions de culture. En croissance à pH 10,5, *B. alcalophilus* a une capacité tampon 2 à 10 fois supérieure par rapport à pH 8,5. De plus, cette capacité tampon est meilleure en croissance anaérobie (sans agitation) dans le milieu H. A. (Halobacterium Agar) qu'en croissance aérobie (avec agitation) dans un milieu malate, indiquant bien que les cellules ont une capacité tampon significativement supérieure en métabolisme fermentaire. L'oxygénation du milieu et sa composition ont ainsi un effet sur la capacité tampon du cytoplasme.

TABLEAU I.2 - Capacité tampon du cytoplasme (Booth, 1985).

Organisme	Capacité tampon (nmol H ⁺ / UpH/ mg de protéine)	pH	
		minimum	maximum
<i>Bacillus acidocaldarius</i>	20-400	4	7
<i>Bacillus subtilis</i>	400-1000	5	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	160-360	5,5	8
<i>Escherichia coli</i>	120-480	4	7
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	20-400	4	7
<i>Bacillus alkalophilus</i>	260-800	8	9,5
<i>Bacillus firmus</i>	260-1000	8	9,5

En conclusion, différents systèmes de régulation permettent l'homéostasie du pH_i . De ce fait, la croissance et l'activité bactériennes peuvent s'effectuer dans une gamme de pH_e plus ou moins large selon l'espèce.

4.2.4. Protection et réparation des protéines et de l'ADN

Protection et réparation des protéines

En situation de stress, les protéines peuvent subir des modifications, des changements de conformation allant jusqu'à la dénaturation, qui vont significativement affecter leur activité. Les protéines dénaturées sont prises en charge par des protéines chaperonnes dont les plus connues sont DnaK, DnaJ et GroES/L. Elles interviennent dans le repliement, l'adressage et la renaturation des protéines. Elles reconnaissent des régions exposées des protéines dépliées et de certaines protéines natives. Ces chaperonnes interviennent dans de nombreux stress. Deux mécanismes sont connus pour empêcher les interactions incorrectes et permettre un repliement correct (Jobin, 1999). Le premier mécanisme, faisant intervenir les protéines chaperonnes de classe I, permet de protéger les surfaces hydrophobes des protéines exposées aux solvants hydrophiles afin de prévenir l'agrégation. Ces protéines chaperonnes de classe I comprennent DnaK, DnaJ, GrpE. DnaK (70 kDa) est caractérisée par une région N-terminale responsable de la fixation de l'ATP et une région C-terminale responsable de la fixation du substrat. Elle a une faible activité ATPasique qui est stimulée par DnaJ et GrpE, permettant ainsi la fixation du substrat protéique. DnaJ (40 kDa) se lie à la protéine dénaturée et exerce son activité de protéine chaperonne spécifique. Enfin, GrpE (21 kDa) stimule l'échange ADP / ATP sur DnaK, et induit la dissociation de l'ADP de DnaK. La protéine HrcA jouerait un rôle-clé dans la régulation de l'expression de ces protéines chaperonnes. Le second mécanisme, faisant intervenir les protéines chaperonnes de classe II, permet d'éviter l'agrégation des protéines et de favoriser leur repliement dans leur conformation native. Ces protéines chaperonnes de classe II comprennent GroEL (60 kDa) et GroES (10 kDa). Le double heptamère de GroEL est associé avec un anneau de sept GroES. GroES régule l'activité ATPasique que possède GroEL et son association aux substrats (Jobin, 1999).

En cas de choc acide, chez *L. lactis*, les chaperonnes DnaK et GroES/L connues pour intervenir dans la réponse au stress thermique sont induites à pH 4,5, et non à pH 5,5. Ces protéines répondent donc à un certain niveau d'acidité dans le milieu ou à une certaine concentration de protéines dénaturées dans le cytoplasme (Frees *et al.*, 2003). De même, chez *S. mutans*, l'expression du gène *dnaK* et la quantité de protéine DnaK sont plus élevées dans

les cellules adaptées à l'acide que dans les cellules non adaptées, et augmentent en réponse à un choc acide (Jayaraman *et al.*, 1997), ce qui suggère que la régulation de *dnaK* par le pH est transcriptionnelle chez cette bactérie. Chez *Salmonella typhimurium* DT104, une augmentation des protéines chaperonnes DnaK et GroEL est observée chez les cellules adaptées à l'acide (Berk *et al.*, 2005). D'autres protéines de stress de classe III, ClpE et ClpP, sont aussi induites à bas pH, chez *L. lactis* par exemple (Frees *et al.*, 2003). Les protéines Clp sont des protéases ATPase-dépendant impliquées dans le turn-over des protéines dénaturées.

Système de réparation de l'ADN

Lorsque le pH_i est trop acide, l'ADN subit une perte de purines et de pyrimidines (Cotter et Hill, 2003). Dans un premier temps, les bases sont protonées, puis subissent une rupture de la liaison glycosidique. Le système UvrA-UvrB est connu pour réparer les dommages que l'ADN a subi lors d'irradiation aux UV, ou par exposition à de nombreuses molécules chimiques (Figure I.11). Le complexe UvrA-UvrB identifie les modifications de conformation ou de structure de l'ADN endommagé. Une fois cette étape effectuée, UvrA se dissocie de UvrB qui reste lié à l'ADN. UvrC vient se lier au complexe UvrB-ADN permettant ainsi l'incision de sept nucléotides. UvrD intervient pour enlever UvrC et les nucléotides endommagés. UvrB reste lié à l'ADN jusqu'à ce que l'ADN polymérase I synthétise la séquence excisée (Truglio *et al.*, 2004). Ce mécanisme de réparation semble également intervenir lors de stress acide. Il a été montré, chez *S. mutans*, que *uvrA* est un gène induit par l'acidité et qu'il est impliqué dans la réponse adaptative à bas pH (Hanna *et al.*, 2001). Le mutant *uvrA* de *S. mutans* est plus sensible à la croissance à pH 5,0 que la souche sauvage et lorsqu'il est pré-incubé à un pH acide non létal, il est incapable de survivre à pH 3,0. Chez *Methylobacterium dichloromethanicum*, une mutation *uvrA* limite significativement sa viabilité et sa croissance sur le dichlorométhane au cours de laquelle de l'acide chlorhydrique est produit au niveau intracellulaire (Kayser, 2002). Cette déshalogénéation produit un composé intermédiaire génotoxique (Kayser et Vuilleumier, 2001). Cependant, on ne sait pas encore si les lésions de l'ADN sont le résultat de ce composé ou de l'acide lui-même. Des mutations dans les gènes *recA* (codant pour une protéine impliquée dans la recombinaison homologue et est un régulateur de la réponse SOS) et *uvrB* provoquent une

diminution significative de la tolérance à faible pH chez *H. pylori* (Thompson *et al.*, 1998 ; Thompson et Blaser, 1995), et montrent l'importance de ces mécanismes de réparation d'ADN pour la survie dans des conditions acides.

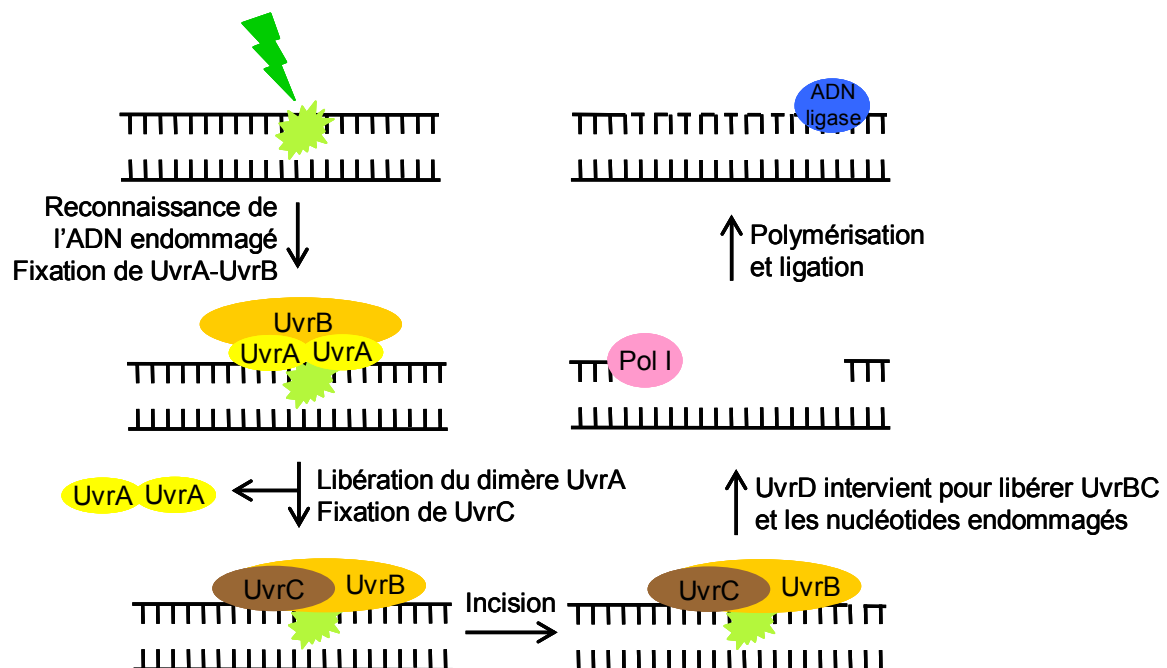


FIGURE I.11 - Réparation de l'ADN par excision de nucléotides (adapté de Sancar, 1998).

4.2.5. Autres mécanismes régulationnels contribuant à la résistance à l'acide

Systèmes à deux composants

Quelques systèmes de transduction du signal à 2 composants sont aussi connus pour intervenir dans la réponse au stress, et notamment à l'acidité en phase stationnaire. Ils impliquent une molécule réceptrice histidine kinase liée à la membrane qui détecte les changements environnementaux, et un régulateur de réponse cytoplasmique qui permet à la cellule de répondre à ces changements en régulant l'expression de gènes. Ces systèmes sont retrouvés chez *L. monocytogenes* (système LisRK) et *B. subtilis* (système YkoGH) et interviennent dans la tolérance au stress acide (Cotter *et al.*, 1999). Ce système à 2 composants est aussi impliqué dans la régulation de l'expression d'une protéase sérine HtrA chez *L. monocytogenes* (Stack *et al.*, 2005). Cette protéase est nécessaire pour la croissance

de cette bactérie en conditions acides, dans lesquelles sa transcription est activée. Un autre système à 2 composants, comprenant le récepteur Hk11 et le régulateur de réponse Rr11, intervient dans la résistance au stress acide et la formation de biofilm chez *S. mutans* (Li *et al.*, 2002). Hk11 agirait comme un récepteur du pH et jouerait un rôle important dans l'induction de l'ATR.

Système de quorum sensing

Le système de quorum sensing peut aussi intervenir dans la régulation de la réponse au stress acide. Il s'agit d'un mécanisme de régulation qui, en réponse à des fluctuations de densité cellulaire, engendre des modifications physiologiques chez les bactéries par la production de molécules de signalisation (acyl-homosérine lactones). Chez *S. mutans*, il a été montré que des cellules en phase logarithmique, mises en présence d'un filtrat neutralisé de cellules cultivées à bas pH, deviennent plus résistantes au pH létal que les cellules mises en présence avec du filtrat de cellules cultivées à pH 7.0 (Li *et al.*, 2001). Un composé extracellulaire présent dans le filtrat, intervenant dans la communication entre cellules, serait impliqué dans l'induction de la résistance à l'acide. Li et ses collègues ont montré que les produits des gènes *comC*, *comD* et *comE*, codant pour un système de quorum-sensing essentiel pour l'induction de la compétence génétique dépendante de la densité cellulaire, interviendrait dans cette communication et induirait l'expression de mécanismes de résistance au stress acide. Toujours chez cette souche, le gène *luxS* impliqué dans la synthèse de signal dans le quorum sensing joue un rôle dans la régulation de la tolérance au stress acide (Wen et Burne, 2004). Chez *Lactococcus lactis*, un homologue de LuxS est également induit à faible pH. Les homologues de LuxS sont hautement conservés chez de nombreuses bactéries à Gram-positif et Gram-négatif. La synthèse de LuxS est induite chez *E. coli* lors d'exposition à l'acétate suggérant que chez cet organisme, son expression serait induite à bas pH (Frees *et al.*, 2003).

4.2.6. Systèmes d'acido-tolérance en phase exponentielle

Des systèmes de tolérance à l'acide en phase exponentielle ont été décrits chez de nombreux organismes. Plusieurs observations distinguent les systèmes d'acido-tolérance

induits au cours de la phase exponentielle de ceux induits dans la phase stationnaire. Tout d'abord, les systèmes de la phase exponentielle ne peuvent pas protéger les cellules d'un pH inférieur à 3. De plus, il ne nécessite pas la présence d'acides aminés comme pour les systèmes AR2 et AR3. Les niveaux de résistance de la phase logarithmique sont significativement beaucoup moins efficaces que ceux de la phase stationnaire (Richard et Foster, 2003).

Parmi les systèmes observés en phase exponentielle, on trouve, par exemple, le phénomène d'adaptation appelé ATR ("Acid Tolerance Response") dépendante du pH qui permet aux cellules pré-adaptées à l'acide d'avoir une meilleure résistance. Ce type d'adaptation a été observé chez *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus mutans*, *Salmonella spp.* ou encore *E. coli* où un pH acide non létal de 5,5 ou une culture à bas pH induit une résistance à l'acide à des pH plus bas (pH 3, Richard et Foster, 2003). Chez *E. coli*, la production de CFA dans la membrane cellulaire joue également un rôle dans l'acidotolérance, au cours de cette phase de croissance (Richard et Foster, 2003, paragraphe 4.2.1).

La production de facteurs extracellulaires, encore non identifiés, a aussi été suggérée par Rowbury comme étant impliquée dans la résistance à l'acide de cellules d'*E. coli* pré-adaptées au cours de la phase logarithmique (Rowbury, 2001). Dans le modèle de Rowbury, les composants extracellulaires ("extracellular components", ECs) impliqués dans l'induction de réponse au stress fonctionnent par paire (ESC / EIC). Les composants extracellulaires ESC ("extracellular sensing components") sont impliqués dans la réception et dans la réponse aux agents de stress extracellulaire. Un régulateur constitutif interagit avec les opérons ESC générant ainsi une synthèse des composants ESC qui sont excrétés dans le milieu. En réponse à des modifications du pH du milieu, les récepteurs ESC détectent ce stress extracellulaire et interagissent avec lui. Une fois activés par ce stress, ils sont convertis en EIC ("extracellular induction components"), et ce, même en absence de bactéries. Les EIC sont de petites molécules qui, de ce fait, peuvent diffuser dans l'environnement bactérien permettant une communication intercellulaire et induire la synthèse de protéines intracellulaires qui entraînent une réponse dans l'ensemble de la population de cet organisme. Les EIC

interagissent avec les cellules en présence ou en absence de stress et propagent l'induction de la réponse adaptative au stress acide au sein de la population. Ainsi, des filtrats neutralisés de cellules cultivées à pH 5 induisent une acido-tolérance chez des cellules non-stressées cultivées à pH 7 (Rowbury, 2001).

Les ESC sont donc à la fois des récepteurs de stress et des précurseurs des EIC formés à faible densité cellulaire. Ces récepteurs extracellulaires ont une fonction d'alerte avancée du stress et entraînent une réponse rapide, les molécules-signal agissant à l'extérieur des cellules. Contrairement aux EIC qui peuvent induire une tolérance dans toutes les cellules à proximité, les ESC n'induisent pas une tolérance au stress chez des cellules non-stressées sans être activées. Par leur nature, ces composants extracellulaires contrastent avec les acyl-homosérine lactones (AHLs), qui sont les ECs utilisés pour induire de nombreuses réponses de quorum sensing. En effet, ce type de ECs fonctionnent seuls, et entraînent une réponse à haute concentration cellulaire. De plus, le couple ESC/EIC sont des molécules plus petites que les AHLs (Rowbury, 2001).

5. OBJECTIFS DE TRAVAIL

Au laboratoire, nous étudions la dégradation de méthanes chlorés toxiques par les bactéries méthylophiles du genre *Methylobacterium* tant au niveau génétique, biochimique que physiologique. L'objectif de mon travail a été de poursuivre l'identification et la caractérisation des modes de résistance à la toxicité du dichlorométhane de la souche *Methylobacterium dichloromethanicum* DM4 sur la base de travaux effectués précédemment (Kayser). Nous nous sommes focalisés sur les aspects relatifs à la capacité de résistance à l'acide chez la souche DM4. La première partie de cette étude a été consacrée à la caractérisation au niveau physiologique de la capacité de cette souche à résister à l'acide chlorhydrique produit de manière intracellulaire par déchloration du dichlorométhane. Il s'agissait, ici, d'évaluer l'existence et l'importance d'une réponse adaptative à l'acide en suivant la viabilité de la souche DM4. En parallèle, nous nous sommes également attachés à mettre en place une nouvelle stratégie de mutagenèse aléatoire de la souche DM4 visant à identifier les gènes essentiels à la croissance sur le dichlorométhane ou induits par une exposition à ce

composé. Cette approche expérimentale a ensuite été renforcée par l'analyse des séquences génomiques complètes obtenues alors que notre travail était en cours, de *M. dichloromethanicum* DM4 et de la souche de référence *M. extorquens* AM1 incapable de croître avec le dichlorométhane, dans le but de mieux caractériser, à ce niveau également, les modes de résistance à l'acide de ce modèle microbien.

M MATÉRIEL ET MÉTHODES

Sauf indication spécifique, les produits chimiques utilisés dans cette étude sont d'une pureté supérieure à 98 % et proviennent des fournisseurs Prolabo, Sigma-Aldrich, Fluka, Merck, Fisher ou Acros. L'eau ultrapure utilisée pour la préparation des tampons et solutions a été obtenue par filtration par un appareil de type PURELAB Classic (ELGA) et l'eau distillée par un appareil de type PURELAB Prima (ELGA).

1. SOUCHES BACTERIENNES

La souche sauvage *Methylobacterium dichloromethanicum* DM4 (Gälli et Leisinger, 1985) est une souche bactérienne modèle capable d'utiliser le dichlorométhane comme unique source de carbone et d'énergie. Elle a été isolée d'échantillons de sol d'une usine de traitement d'hydrocarbures halogénés en Allemagne. La dégradation aérobie du dichlorométhane met en jeu une enzyme cytoplasmique, la dichlorométhane déshalogénase codée par le gène *dcmA* et régulée négativement par le gène présumé *dcmR* (La Roche et Leisinger, 1991).

La souche *M. dichloromethanicum* DM4-2cr (Gälli et Leisinger, 1988) est caractérisée par une délétion, chez la souche sauvage DM4, de plus de 20 kb comprenant le gène *dcmA* et son gène régulateur présumé *dcmR*.

La souche aérobie *Methylobacterium chloromethanicum* CM4 (Doronina et al., 1996) est capable d'utiliser pour sa croissance le chlorométhane comme unique source de carbone et d'énergie. Elle a été isolée d'échantillons de sol d'une usine pétrochimique en Russie.

La souche *Methylobacterium extorquens* AM1 (Vorholt et al., 1998 ; Pomper et al., 1999) est la souche de référence du genre *Methylobacterium* dans l'étude du métabolisme des composés en C1 (DSMZ 1338).

Les souches DM4-2cr, CM4 et AM1 ne se développent pas sur le DCM. Les souches DM4-2cr(pME8221), CM4(pME8221) et AM1(pME8221) ont reçu par conjugaison le plasmide pME8221 qui contient les gènes *dcmA* et *dcmR* (Kayser et al., 2002), permettant l'expression de l'enzyme dichlorométhane déshalogénase sous forme fonctionnelle et de manière régulée par le dichlorométhane.

La souche *Escherichia coli* S17-1(λ pir) est une souche mobilisatrice contenant les gènes de transfert RP4 (plasmide à large spectre d'hôte type *inc-P*) intégrés dans son chromosome. Elle comporte également le phage lysogène λ pir qui code pour la protéine π , essentielle au maintien de plasmides possédant l'origine de réplication R6K (plasmide suicide, Filutowicz et Rakowski, 1998). La souche *Escherichia coli* S17-1(λ pir)(pAG408) (Suarez et al., 1997), qui possède un plasmide portant un mini-transposon qui contient un gène codant pour une GFP sans promoteur obtenu par transformation, est utilisée lors de la mutagenèse par transposition aléatoire.

2. MILIEUX ET CONDITIONS DE CULTURES

Tous les milieux, tampons, et solutions sont stérilisés à l'autoclave pendant 20 minutes à 121°C sous une pression de 1 bar.

2.1. *Escherichia coli*

Les souches d'*Escherichia coli* ont été cultivées sur milieu riche LB (Luria Bertani, Difco Laboratories) composé de 10 g.L⁻¹ de tryptone, 5 g.L⁻¹ d'extrait de levure et de 10 g.L⁻¹ de NaCl. Pour les cultures sur milieu solide, 15 g.L⁻¹ d'agar sont ajoutés. Le pH final obtenu est compris entre 6,8 et 7,2 à 25°C. Les cultures sont incubées à 37°C pendant une nuit. Les cultures en milieu liquide sont agitées à 140 rpm (Infors).

2.2. *Methylobacterium*

2.2.1. Milieux de culture

Différents milieux ont été utilisés pour cultiver les souches de ce genre : un milieu riche (nutrient agar) et un milieu sélectif (milieu minéral tamponné à 10 mM, 50 mM ou 100 mM de phosphate pH 7,15).

Le milieu riche nutrient agar (Fluka) est composé de 1 g d'extrait de bœuf, 2 g d'extrait de levure, 5 g de chlorure de sodium, 5 g de peptone et de 15 g d'agar pour 1 L d'eau. Le pH est de 7,2-7,6 à 37°C.

Les compositions des différents milieux minéraux utilisés sont présentées dans le Tableau M.1.

TABLEAU M.1 - Compositions par litre des différents milieux minéraux utilisés.

Composés	10 mM (solide)	50 mM	100 mM
K ₂ HPO ₄	1,04 g	-	-
NaH ₂ PO ₄	0,57 g	-	-
KH ₂ PO ₄	-	6,8 g	13,6 g
NaOH 5M	-	5,85 mL	11,7 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g	0,1 g	0,1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,2 g	0,2 g	0,2 g
Bleu de bromothymol	0,1 g	-	-
Bacto agar	15 g	-	-
Eau ultra pure (qsp)	1000 mL	1000 mL	1000 mL

Le pH est ajusté à 7,15 à l'aide d'une solution de NaOH à 5 M. Le dichlorométhane et le méthanol étant des composés volatils, la culture de ces bactéries en présence de ces sources

de carbone est réalisée en système clos. Le milieu liquide est distribué dans des fioles de verre à pas de vis fabriquées à façon (norme 14,5 ; Verlabo) à partir de bouchons munis d'un septum hermétique au gaz (diamètre 24 mm, Sigma, cf. Figure M.1 A). Après autoclavage, lorsque le milieu est refroidi jusqu'à une température d'environ 40°C, les solutions d'éléments minéraux (éléments trace et nitrate de calcium) détaillées ci-dessous sont ajoutées (1 mL par litre de milieu). Si nécessaire, des solutions d'antibiotiques sont également ajoutées.



FIGURE M.1 - Flasque (A) et jarre de verre (B) utilisées pour la culture des bactéries du genre *Methylobacterium* en milieu confiné.

Solution d'éléments trace

La solution d'éléments trace contient pour 1 L d'eau ultrapure : 0,5 ml de H_2SO_4 concentré (95%), 100 mg de $\text{Fe(II)SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 25 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mg de H_3BO_3 , 25 mg de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 29,5 mg de ZnSO_4 , 11,4 mg de NH_4VO_3 , 25 mg de $\text{Co(NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ et 10 mg de $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Solution de $\text{Ca(NO}_3)_2$

Cette solution contient 25 g de $\text{Ca(NO}_3)_2$ pour 1 L d'eau ultrapure.

2.2.2. Conditions de culture

Les cultures en milieu liquide ont été réalisées dans des fioles de 300 mL contenant 50 mL de milieu minéral liquide supplémenté en dichlorométhane (10 mM, 32 μ L) ou en méthanol (10 mM, 20 μ L), seule source de carbone et d'énergie disponible. Avant utilisation, les solutions d'éléments trace et de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ sont ajoutées. Les cultures sont réalisées en condition aérobie dans un incubateur thermostaté à 30°C agité à 140 rpm (Infors).

Les cultures en boîte de Petri sur milieu solide en présence de dichlorométhane ou de méthanol se font en jarres de verre de 2 litres étanches aux gaz (cf. Figure M.1 B). Cette dernière est recouverte d'une plaque en verre rodé joint hermétiquement à l'aide de graisse à rodage. Le substrat carboné, dichlorométhane ou méthanol (300 μ L), est déposé dans la jarre dans un tube eppendorf de 1,5 mL. La jarre est incubée à 30°C. Les cultures en milieu riche (boîtes de Petri avec nutrient agar) sont incubées à l'air à 30°C. Des colonies roses de la souche DM4 apparaissent au bout de 10 jours de culture en présence de dichlorométhane. Un virement de l'indicateur coloré du vert au jaune indique une acidification du milieu de culture lors du métabolisme du dichlorométhane.

2.3. Contrôle de pureté des souches et conservation

Pour vérifier qu'une culture est effectivement axénique, outre l'examen microscopique en contraste de phase, une observation de la morphologie et de la couleur des colonies est réalisée après croissance sur milieu gélosé (nutrient agar, milieu minimum tamponné à 10 mM de phosphate avec du dichlorométhane ou du méthanol). Les souches sont conservées dans un cryo-tube (cryotubeTM vials, NUNC) à -80°C, à partir d'une suspension cellulaire dense obtenue par concentration de 50 mL de culture liquide en phase stationnaire par centrifugation, avec ajout de glycérol stérile à une concentration finale de 30 % (v/v).

2.4. Antibiotiques

Les solutions stock d'antibiotiques sont stérilisées par filtration (membrane filtrante de porosité 0,22 μ m, VWR), puis stockées à -20°C. Les concentrations et les solvants utilisés pour leurs préparations sont rapportés dans le Tableau M.2.

TABLEAU M.2 - Solutions d'antibiotiques utilisées au cours de cette étude

Nom	Concentration solution stock	Solvant	Concentration d'utilisation
Tétracycline	10 mg/mL	éthanol à 70%	10 µg/mL
Kanamycine	50 mg/mL	eau	25 µg/mL
Ampicilline	100 mg/mL	eau	100 µg/mL

3. SUIVI TEMPOREL DE LA CROISSANCE BACTERIENNE

La croissance bactérienne est suivie par la mesure de la densité optique à 600 nm (DO_{600}) par spectrophotométrie dans une cuve de 1 cm de largeur (SmartSpecTM 3000, BioRad) ou sur microplaque à fond plat (KC⁴, Bio-Tek, microplaque NUNC 96 puits, NunclonTMSurface). Une unité d'absorbance équivaut à 10^8 cellules de *Methylobacterium* / mL et à 9.10^7 cellules de *E. coli* / mL.

4. SUIVI DE LA DECHLORATION BACTERIENNE

La dégradation du dichlorométhane est suivie par la mesure du chlorure formé dans le milieu de culture ainsi que par la baisse du pH. La quantité de chlorure produite est déterminée par une méthode colorimétrique (Jörg et Bertau, 2004) basée sur la formation en milieu acide du complexe coloré $[FeCl^{2+}]$ en présence d'acide perchlorique ($HClO_4$), adaptée au format microplaque. Un volume de 20 µL de surnageant de culture obtenu par centrifugation d'une suspension cellulaire (13 000 rpm, 5 minutes, Biofuge fresco, HERAUS) est transféré dans un puits de microplaque contenant 65 µL d'eau ultrapure, 95 µL de $HClO_4$ (12 M) et 20 µL de $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ (0,2 M). La concentration en chlorure est déterminée par comparaison de l'absorbance du complexe $[FeCl^{2+}]$ formé, mesurée à 340 nm, avec une courbe de calibration réalisée à partir de solutions de concentration connue de chlorure (0,1 – 50 mM $[Cl^-]$). Une relation linéaire existe entre la DO_{340} et la concentration de chlorure allant de 0,1 à 50 mM.

5. TRAITEMENT A L'ACIDE

Les souches sont cultivées dans du milieu minéral liquide tamponné à 100 mM de phosphate pH 7,15, avec une seule source de carbone, le méthanol (10 mM) ou le dichlorométhane (10 mM), selon l'expérience. La présence du plasmide pME8221 (Kayser et *al.*, 2002) est maintenue par addition de 10 mg.L⁻¹ de tétracycline. Les cultures sont placées sous agitation à 140 rpm dans un incubateur thermostaté à 30°C. A une DO₆₀₀ de 0,2, les cultures sont aliquotées et centrifugées à 13000 rpm pendant 10 minutes (Biofuge fresco, HERAUS), puis les surnageants sont recueillis de manière stérile. Les surnageants de culture ou alternativement du milieu minéral 100 mM phosphate contenant éléments trace, Ca(NO₃)₂ et 5 mM de méthanol, sont amenés à pH 3, 4 ou 5 avec de l'acide formique (pur ou 1 M) ou de l'acide chlorhydrique 37 % (1 M ou 0,3 M). Les culots sont repris à température ambiante dans ces différentes solutions à une DO₆₀₀ finale de 0,2 et les suspensions résultantes sont incubées en tube eppendorf sous agitation à 140 rpm et 30°C pendant 6 heures.

6. MESURE DE LA VIABILITE CELLULAIRE

La viabilité des souches dans les différentes conditions étudiées est effectuée à partir d'échantillons de suspensions cellulaires de DO₆₀₀ connue. Les prélèvements sont dilués successivement au dixième, de 10⁻¹ à 10⁻⁵ avec du milieu minimum 100 mM phosphate. Les dilutions sont déposées à raison de 5 µL sur milieu riche nutrient agar sous forme d'une goutte. Les boîtes de Petri sont incubées à 30°C jusqu'à 10 jours. Les colonies sont ensuite dénombrées à la dilution la plus appropriée, puis ramenées au nombre de bactéries de l'inoculum de départ exprimé en unité formant colonie par mL (UFC.mL⁻¹). Les résultats sont normalisés pour une DO₆₀₀ de 1 ou exprimés par le $\log(N/N_0)t$, où N représente le nombre de cellules viables à un temps t après une exposition à l'acide et N₀ est le nombre de cellules viables dans la suspension cellulaire à temps 0.

7. MESURE DE LA FLUORESCENCE DE LA GFP

Cette expérience a été réalisée sur des mutants fluorescents et sur leurs extraits cellulaires. Des mutants fluorescents obtenus par mutagenèse aléatoire sont cultivés dans du milieu minéral liquide tamponné à 100 mM de phosphate pH 7,15, avec comme seule source

de carbone du méthanol (10 mM) ou du dichlorométhane (10 mM), ainsi que 25 mg.L⁻¹ de kanamycine. Les cultures sont placées sous agitation à 140 rpm dans un incubateur thermostaté à 30°C. A une DO₆₀₀ de 0,2, les cultures sont centrifugées à 9000 rpm pendant 15 minutes (Centrifuge 5804R, Eppendorf) puis les culots sont remis en suspension à température ambiante dans du milieu minéral 100 mM phosphate à une DO₆₀₀ finale de 0,2 et mis en microplaque à raison de 180 µL par puits. Dans chaque puits, 20 µL de différentes solutions réalisées avec de l'acide formique (pur ou à 1 M) ou de l'acide chlorhydrique (0,3 M) sont ajoutés, permettant d'obtenir une gamme de pH comprise entre 2 et 7. L'intensité de la fluorescence est mesurée à intervalles réguliers avec un lecteur microplaque KC⁴ (BIOTEK, excitation 380 nm, émission 516 nm). Afin d'observer la fluorescence de la GFP libre, des expériences similaires sont réalisées avec des extraits cellulaires obtenus par sonication (Vibracell 75042, Bioblock, amplitude 40%, température max. 25°C, 15 minutes, 2 secondes "pulse on" et 8 secondes "pulse off") de 50 mL de culture sur méthanol concentrés dans 5 mL de milieu minéral.

8. METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

8.1. Extraction plasmidique

Les plasmides présents dans une souche d'*E. coli* cultivée dans du milieu LB liquide à 37°C sous agitation durant une nuit sont extraits par lyse alcaline au moyen du kit Miniprep Plasmid Extraction Kit en suivant les instructions du fabricant (Qiagen). La qualité de l'extraction est vérifiée par migration sur gel d'agarose.

8.2. Extraction d'ADN génomique

8.2.1. Préparation rapide d'ADN génomique

Les extractions d'ADN génomiques ont été réalisées sur 5 mL de culture dense en phase stationnaire à l'aide d'un kit commercial (Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit, Promega) selon les recommandations du fournisseur. Toutefois, l'addition de 60 µL de protéinase K (solution à 20 mg.mL⁻¹) est nécessaire lors de la première étape de lyse cellulaire, facilitant ainsi la lyse des cellules bactériennes du genre *Methylobacterium*.

8.2.2. Préparation d'ADN génomique (Saito et Miura, 1963)

Les cellules d'une culture de *Methylobacterium* de 500 mL en début de phase stationnaire sont récoltées par centrifugation (20 minutes à 7000 rpm, SORVALL[®] Evolution RC, Kendro). Le culot est alors remis en suspension dans 5 mL d'une solution saline-EDTA (0,15 M NaCl ; 0,1 M EDTA) avec 10 mg par ml de lysozyme et incubé pendant 2 heures à 37°C sous agitation à 140 rpm (Infors). Le mélange est ensuite placé à -80°C pendant au moins 1 heure puis 10 mL d'une solution de Tris-SDS (0,1 M Tris-HCl pH 9,0 ; 1 % SDS ; 0,1 M NaCl) sont ajoutés. Le lysat est incubé à 50°C et doucement remué jusqu'à ce que le mélange redevienne visqueux. Les tubes sont alors mis dans la glace et 8 mL de solution phénol neutre (Aquaphénol[™]) sont ajoutés. La suspension est doucement mélangée jusqu'à l'obtention d'une fine émulsion puis centrifugée 20 minutes à 12000 rpm à 10°C. La phase aqueuse supérieure est transférée dans un nouveau tube et additionnée d'un volume d'isopropanol en agitant doucement la solution. Une fois précipité, l'ADN est récupéré avec une baguette de verre et séché à l'air libre. La baguette est placée dans un nouveau tube avec 3 mL d'éthanol à 70% et stockée à -20°C pendant au moins 1 heure tout en changeant régulièrement l'éthanol. L'ADN est séché et réhydraté avec 0,5 ml de tampon TE pendant une nuit à 4°C.

8.3. Electrophorèse

Les fragments d'ADN chargés négativement sont séparés selon leur taille par migration électrophorétique dans un gel d'agarose (Agarose type D-5, Euromedex) à 1 % (m/v) dans un tampon TAE 1X (Tris-Base 4,84 g ; acétate de sodium 0,68 g ; EDTA 0,336 g ; acide acétique 1,35 mL ; eau ultra pure qsp 1L) sous une tension de 100 V durant 30 minutes. La migration des ADN se fait en parallèle d'un marqueur de poids moléculaire composé de plusieurs fragments de taille et de concentration connues (GeneRuler[™] 1 kb DNA Ladder, Fermentas). Ces fragments sont visibles aux UV grâce au bromure d'éthidium (BET : agent intercalant de l'ADN) contenu dans le gel (0,5 µg.mL⁻¹) qui s'insère entre les plateaux de bases de l'ADN.

8.4. Précipitation alcoolique de l'ADN

La précipitation alcoolique d'ADN total permet de concentrer l'ADN et d'éliminer certaines impuretés. Elle requiert l'addition d'un dixième de volume d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 et de 2,5 volumes d'éthanol pur (stocké à -20°C). L'ADN précipite en 2 heures à -20°C et une centrifugation à 13000 rpm pendant 30 minutes (Biofuge fresco, HERAUS) permet de l'obtenir sous la forme d'un culot. Après lavage à l'éthanol à 70 %, le culot est séché et repris dans de l'eau distillée ou du tampon TE stérile.

8.5. Purification d'ADN par gel

Ce type de purification permet d'isoler une seule ou plusieurs bandes d'intérêt qui ont été séparées sur gel. L'ADN à purifier est déposé sur gel d'agarose en présence de BET. Les conditions électrophorétiques sont celles décrites dans le paragraphe 8.3. La bande de gel contenant le fragment d'ADN d'intérêt, est découpée sous UV. L'ADN est extrait au moyen du kit QIAQuick Gel Extraction Kit en suivant les instructions du fabricant (Qiagen).

8.6. Détermination de la concentration d'ADN

La concentration d'une solution d'ADN peut être estimée par comparaison sur gel avec un marqueur de poids moléculaire ou bien par mesure de l'absorbance à 260 nm par spectrophotométrie (SmartSpecTM 3000, Biorad). Une unité d'absorbance correspondant à 50 µg.mL d'ADN bicaténaire.

8.7. Digestion enzymatique

Les enzymes de restriction sont des endonucléases qui coupent l'ADN bicaténaire au niveau d'une séquence spécifique, généralement sous la forme d'un palindrome. La coupure produit des extrémités franches ou cohésives. L'hydrolyse a été réalisée dans le tampon réactionnel préconisé par le fournisseur (Roche Diagnostics, Fermentas) avec 10 unités d'enzyme pour digérer environ 1 µg d'ADN. Après une incubation d'une nuit dans les conditions optimales d'activité de l'enzyme utilisée (température, tampon, présence de BSA...), celle-ci, si elle est thermosensible, est inactivée par un choc thermique de 15

minutes à 65°C. L'efficacité de la digestion est évaluée par électrophorèse en comparant les échantillons digérés et non-digérés.

8.8. Déphosphorylation

La déphosphorylation de vecteur digéré est réalisée par l'enzyme "Shrimp Alkaline Phosphatase" (SAP, Fermentas) en présence de son tampon réactionnel. Elle permet de conserver le plasmide sous forme linéaire en évitant la recircularisation. La réaction nécessite 10 unités d'enzyme pour déphosphoryler 1 µg d'ADN pour une incubation de 1h30 à 37°C. L'enzyme est inactivée à 65°C pendant 15 minutes.

8.9. Polymérisation

La polymérisation permet de générer des extrémités à bout franc à partir d'extrémités cohésives, par l'action d'une T4 DNA polymérase en présence d'ATP, de dNTPs et de son tampon, suivant les instructions du fabricant (New England Biolabs). L'enzyme est inactivée à 70°C pendant 10 minutes.

8.10. Ligation de molécules d'ADN

La ligation permet la construction *in vitro* de molécules d'ADN recombinées, comme l'insertion d'un fragment d'ADN dans un plasmide linéarisé. Cette manipulation utilise la DNA ligase du bactériophage T4 (Quick Ligation Kit, New England Biolabs). Cette enzyme et son tampon réactionnel sont ajoutés à l'ADN et incubés à 25°C pendant 15 minutes sous agitation.

8.11. Transformation

Ce type de transformation fait appel à la compétence naturelle des cellules bactériennes. Les cellules deviennent compétentes après une incubation dans du chlorure de calcium puis sont soumises à un choc thermique en présence du matériel génétique à transférer.

La souche réceptrice *E.coli* (S17-1(λ pir) ou DH5 α) est cultivée dans 10 mL de milieu LB à 37°C jusqu'à une DO₆₀₀ comprise entre 0,3 et 0,6. Après centrifugation (13000rpm, 10

minutes), le culot est resuspendu dans 5 mL d'une solution stérile de CaCl_2 à 50 mM et laissé 20 minutes dans la glace. Puis, 200 μL de cellules compétentes sont mélangés à 100 ng de plasmide. Le mélange est successivement incubé 30 minutes dans la glace, subit un choc thermique de 37°C pendant 2 min et à nouveau dans la glace pendant 5 minutes. La suspension bactérienne est ensuite diluée dans 1 ml de milieu LB, et 100 à 200 μL sont étalés sur milieu gélosé. Les cellules transformées par le plasmide sont sélectionnées sur milieu sélectif solide composé de LB et de l'antibiotique pour lequel le vecteur de résistance est porteur d'un gène de résistance.

8.12. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La PCR est une méthode permettant d'obtenir rapidement une quantité importante d'un segment précis d'ADN contenu dans une matrice complexe d'ADN génomique grâce à l'utilisation de deux amorces de polarité opposée encadrant le fragment à amplifier. Un thermocycleur automatisé (MastercyclerTM Gradient, Eppendorf) répète des cycles de trois étapes : la dénaturation de l'ADN par élévation de température, l'hybridation des amorces et la synthèse du brin complémentaire grâce à une ADN polymérase thermostable. L'amplification du fragment d'ADN cible est exponentielle. La durée et la température des différentes étapes sont des paramètres essentiels qui sont définis pour chaque expérience.

La dénaturation permet la formation d'ADN simple brin. Sa durée est souvent plus longue que nécessaire car quelques secondes suffisent à obtenir une bonne dénaturation. L'hybridation est l'étape déterminant la spécificité et le rendement de l'amplification. La température d'hybridation est estimée en fonction de la taille et de la séquence des oligonucléotides utilisés (cf. par ex. le logiciel Oligocalc, <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>). Cette température est la température à laquelle la moitié des hybrides possibles est formée. La concentration saline du tampon agit sur l'astringence de l'hybridation des oligonucléotides. La polymérisation est généralement effectuée à une température légèrement inférieure à la température optimale de l'ADN polymérase utilisée. La durée de polymérisation dépend de la taille du fragment d'ADN à amplifier. Le nombre de cycles varie en général entre 25 et 35 cycles. Une étape de

post-élongation est effectuée après la fin des cycles pour terminer la synthèse des brins inachevés.

La réaction de PCR est préparée dans un volume final de 20 μ L, contenant l'ADN matriciel (1 à 10 ng d'ADN plasmidique ou 10 à 100 ng d'ADN génomique), 0,5 μ M de chacune des deux amorces utilisées (Tableau M.3), 0,25 mM de dNTPs, 0,2 U de Taq polymérase (New England Biolabs) avec son tampon réactionnel 1X final contenant notamment 1,5 mM de $MgCl_2$. Le choix des amorces et la taille des ADN amplifiés sont répertoriés dans le Tableau M.3 et la Figure M.2. Les conditions d'amplification de l'ADN sont répertoriées dans le Tableau M.4.

TABLEAU M.3 - Caractéristiques des différentes séquences nucléotidiques des amorces spécifiques utilisées lors de cette étude

	Gène ou site amplifié	Amorces	Taille du fragment	Séquences (5' → 3')
Kanamycine du mini-Tn5	<i>aphA-3</i> Num.acces. M26832	eh12 eh13	605 pb	CCGGTATAAAGGGACCACCT CAGGCTTGATCCCCAGTAAG
GFP du mini-Tn5	<i>gfp</i> Num.acces. AJ251839	atpE5in delt3in	770 pb	AAAGAATTCCTCGAGTAATTTACCAAC (Kunert et al. , 2000) CCGGAATTCCTTATTTGTAGAGCTCATC (Kunert et al. , 2000)
Région encadrée par les bornes I et O du mini-Tn5	mini-Tn5	atpE5in eh14	2300 pb	AAAGAATTCCTCGAGTAATTTACCAAC ATCTCGGCTTGAACGAATTG
Site d'insertion du mini-Tn5		pAGO pAGI		TGGGACAACCTCCAGTGAAAA CAATTCGTTCAAGCCGAGAT
Site d'insertion du mini-Tn5		Oout Iout		GGCAGAGCATTACGCTGACT GGCCAGATCTGATCAAGAGA
Site d'insertion du mini-Tn5		Oend Iend		ACTTGTGTATAAGAGTCAG AGATCTGATCAAGAGACAG
Site d'insertion du mini-Tn5 du côté borne O		Ylinker Oout		CTGCTCGAATTCAAGCTTCT (Kwon et Rieke, 2000) GGCAGAGCATTACGCTGACT
Site d'insertion du mini-Tn5 du côté borne I		Iout Ylinker		GGCCAGATCTGATCAAGAGA CTGCTCGAATTCAAGCTTCT (Kwon et Rieke, 2000)

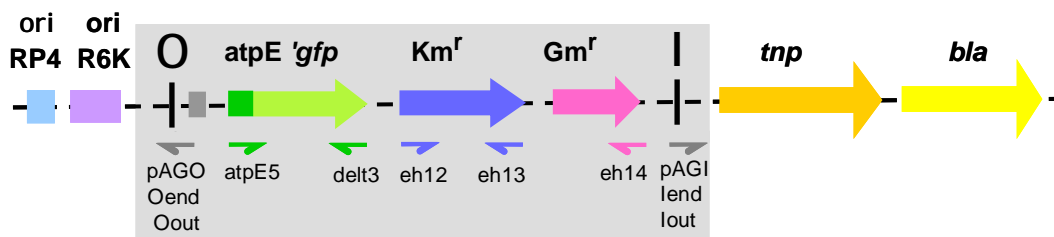


FIGURE M.2 - Localisation des amorces spécifiques du mini-transposon Tn5

TABLEAU M.4 - Conditions de PCR selon le couple d'amorces utilisé

<i>aphA-3</i> <i>gfp</i> mini-Tn5	Ylinker / Oout Iout / Ylinker	pAGO / pAGI Oout / Iout Oend / Iend
10 min à 95 °C	2 min à 94 °C	3 min à 95 °C
1 min à 94 °C	15 sec à 94 °C	1 min à 94 °C
1 min à 52 °C	30 sec à 55 °C	1 min à 52 °C
1 min à 72 °C	2 min à 70 °C	2 min à 72 °C
	} 35 cycles	} 30 cycles
10 min à 72 °C	5 min à 70 °C	7 min à 72 °C

8.13. Hybridation ADN/ADN

L'hybridation ADN/ADN appliquée à des fragments séparés par électrophorèse a été décrite initialement par Southern (1975). Cette technique permet de visualiser sur support solide des fragments d'ADN présentant une homologie de séquence avec une sonde spécifique d'ADN. Une expérience d'hybridation comporte deux étapes : le transfert de l'ADN sur un support solide et l'hybridation proprement dite.

8.13.1. Préparation de l'ADN

Les ADN génomiques ont été digérés pendant une nuit par des enzymes de restriction. Les produits de restriction sont séparés dans un gel d'agarose 0,8 % avec le tampon électrophorétique TAE 1X sous une tension de 30 V pendant une nuit, puis visualisés sous UV.

8.13.2. Transfert

Les molécules d'ADN présentes dans le gel sont soumises à une dépurination par une solution HCl 0,25 M pendant 30 minutes (pour fragmenter les molécules à hauts poids moléculaires) et à une dénaturation de l'ADN double brin par une solution NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M pendant 45 minutes. Le gel est ensuite plongé dans un bain de neutralisation (Tris-HCl pH 7,5 0,5 M, NaCl 3 M) pendant 30 minutes. L'ADN localisé sur le gel est transféré durant la nuit sur une membrane de nylon Hybond N⁺ (Amersham) (solution SSC 20 fois concentrée, NaCl 3 M ; Tri-sodium citrate 0,3 M). Un dispositif permet de réaliser ce transfert par capillarité. L'ADN est fixé à la membrane de manière covalente par traitement aux UV (3 minutes de chaque face).

8.13.3. Préparation des sondes froides

Cette technique présente l'avantage d'éviter l'utilisation de produits radioactifs. Elle est basée sur l'utilisation d'anticorps anti-digoxigénine ayant une activité phosphatase alcaline (anti-DIG-AP) qui se fixent sur des dNTPs marqués à la digoxigénine (DIG) contenus dans la sonde. La phosphatase alcaline provoque l'apparition d'un précipité coloré après réaction avec un substrat, NTB/BCIP, révélant ainsi le fragment nucléotidique recherché.

La sonde utilisée correspond à la séquence du gène *gfp* (fragment de 770 pb) porté par le mini-transposon Tn5. Elle a été synthétisée par PCR en présence de dNTPs marqués à la digoxygénine (DIG DNA Labeling and Detection Kit, Roche) et du couple d'amorces atpE5/delt3. Les conditions de la PCR sont décrites dans le Tableau M.4. Les produits PCR ont ensuite été purifiés à l'aide du kit QIAquick PCR purification selon les instructions du fabricant (Qiagen).

8.13.4. Préhybridation et hybridation

La membrane fixée est préhybridée à 68°C durant 2 heures avec du tampon d'hybridation (SSC (5X), N-lauroylsarcosine (0,1 %), SDS (0,02 %), solution bloquante (1 %, w/v). Les sondes sont dénaturées par chauffage (10 minutes, 95°C) puis placées dans la glace. L'hybridation se fait dans le même tampon, en présence de la sonde dénaturée (20 ng.mL⁻¹) pendant une nuit à 68°C.

Afin d'éliminer l'excès de sonde, la membrane est lavée à température ambiante deux fois dans du tampon 2x SSC ; SDS 1 % puis deux fois dans du tampon 0,1x SSC ; 1 % SDS.

8.13.5. Détection par colorimétrie

Les nucléotides marqués de la sonde sont révélés par colorimétrie. Un anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline se lie aux résidus de digoxygénine. La présence de la phosphatase alcaline est révélée par clivage d'une molécule de 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) avec réduction simultanée d'une molécule de chlorure de tétrazolium nitrobleu (NBT). Le produit obtenu donne une couleur bleutée.

Toutes les étapes se déroulent à température ambiante. La membrane est équilibrée pendant 1 minute dans du tampon de lavage (Tris-HCl 100 mM pH 7,5 ; NaCl 150 mM), puis incubée durant 30 minutes dans un tampon de saturation (Tris-HCl 100 mM pH 7,5 ; NaCl 150 mM ; lait en poudre ½ écrémé 5 %) permettant de saturer les sites aspécifiques aux anticorps anti-DIG-AP. Elle est enfin placée dans un tampon de saturation (20 mL pour une membrane de 100 cm²) additionné d'anticorps (150 mU.mL⁻¹ final) pendant 30 minutes. Elle est ensuite lavée deux fois dans un tampon de lavage, puis équilibrée 2 minutes dans la solution de révélation (Tris-HCl 100 mM pH 9,5 ; NaCl 100 mM ; MgCl₂ 50 mM). Elle est finalement placée à l'obscurité dans 5 mL de cette solution additionnée de NBT/BCIP, jusqu'à apparition de la coloration (en général de 2 à 16 heures).

8.14. Détermination de la séquence d'un fragment d'ADN

D'après la méthode de Sanger (1992), la réaction de séquençage est basée sur le principe d'une réaction cyclique (dénaturation, hybridation, élongation). Le fragment à séquencer est utilisé comme matrice d'une synthèse nucléotidique réalisée par une ADN polymérase. Le brin complémentaire de l'ADN matrice est synthétisé à partir de l'extrémité 3'OH de l'amorce appariée, en présence de désoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs). Cette réaction s'effectue, dans un même tube, en présence des quatre analogues (A, T, G et C) portant quatre fluorochromes différents, les ddNTPs (didésoxyribonucléotides triphosphates). Lors de la polymérisation, ces derniers s'incorporent au hasard, ce qui arrête la synthèse car bien qu'ils soient des analogues structuraux des dNTPs, ils ne possèdent pas d'extrémités OH en 3' (arrêt de l'élongation). Les fragments néo-synthétisés, de longueurs variées, sont ensuite séparés en fonction de leur taille par électrophorèse capillaire. Il devient alors possible de déterminer pour chacun des quatre fluorochromes utilisés, la taille des fragments obtenus et d'en déduire la séquence nucléotidique du fragment analysé.

Le séquençage d'ADN a été effectué par la plate-forme technique de l'IBMP (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Strasbourg) à l'aide d'un séquenceur automatique (Biosystems 373 XL Sequencer, ABIPRISM™). Les réactions de séquençage ont été réalisées en utilisant le kit PRISM AmpliTaq® FS Big Dye Terminator.

9. MUTAGÈNESE PAR TRANSPOSITION ALEATOIRE

Afin d'identifier les gènes impliqués dans le métabolisme du dichlorométhane dans la souche DM4, nous avons développé une approche de mutagenèse aléatoire mettant en jeu un système rapporteur de fluorescence. Pour cette mutagenèse, nous avons utilisé le plasmide suicide pAG408 (Suarez *et al.* 1997) porteur d'un mini-transposon Tn5 qui contient un gène codant pour une protéine fluorescente sans promoteur ainsi que deux gènes de résistance à la kanamycine et à la gentamycine. Les mutants ont été obtenus par conjugaison entre la souche DM4 et la souche *E.coli* S17-1(λ pir)(pAG408).

Pour la mutagenèse, une conjugaison a été réalisée à 30°C entre la souche donneuse *E. coli* S17-1(λ pir)(pAG408) et la souche réceptrice DM4. La conjugaison prend lieu après avoir mélangé 1 ml d'une culture de *E. coli* S17-1(λ pir)(pAG408) (milieu LB contenant 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de kanamycine, 37°C) à une $\text{DO}_{600} = 0,5$ à 1 mL d'une culture de la souche DM4 (milieu minimum 50 mM de phosphate et 40 mM de méthanol, 30°C) à une $\text{DO}_{600} = 1$. Les culots cellulaires (4000 rpm, 5 minutes, Biofuge fresco, HERAUS) ont été lavés avec une solution stérile de NaCl à 0,9 % puis récupérés dans 50 μL NaCl à 0,9 % stérile. Le mélange est déposé sous forme de gouttes sur un milieu minimum gélosé dépourvu de source de carbone et d'antibiotiques permettant ainsi aux transconjugants de se former sans se dupliquer, et incubé à 30°C. Au bout de 24 heures d'incubation, les transconjugants et les bactéries parentales restantes sont récoltés et repris dans du sérum physiologique (1,4 mL) stérile. Cette suspension est étalée sur milieu gélosé à raison de 50 μL par boîte. Les mutants d'insertion de la souche DM4 sont sélectionnés sur milieu minimum contenant de la kanamycine à 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et 40 mM de méthanol. Après une semaine d'incubation à 30°C, les colonies de transconjugants viables sont mises individuellement en culture liquide dans des plaques de micro-titration, contenant par puits 150 μL de milieu minimum tamponné à 50 mM de phosphate, 40 mM de méthanol comme source de carbone et 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de kanamycine. Les mutants sont conservés à -80°C, après ajout de glycérol stérile à une concentration finale de 25 % (v/v).

La fréquence de conjugaison a été calculée en faisant le rapport du nombre de mutants obtenus sur le nombre de cellules parentales initiales. Le nombre de mutants nécessaires pour couvrir la totalité du génome (noté N) a été estimé grâce à la formule suivante :

$$N = \ln q / \ln (1-p)$$

où $q = 1 - r$ avec r comme intervalle de confiance (ici 95 %) et p représente 1 / nombre de gènes présents dans le génome.

10. CRIBLAGE DES MUTANTS / DETERMINATION DES PHENOTYPES

L'insertion du mini-transposon dans le génome de DM4 en aval d'un promoteur actif est mise en évidence par l'observation de la fluorescence de la protéine GFP avec une simple lampe UV à main (Blak-Ray[®], UVP, 366 nm; 100 W).

Le criblage a été réalisé en observant la fluorescence et la capacité de croissance des mutants obtenus par mutagenèse aléatoire sur différentes sources de carbone en milieu gélosé (vapeur de dichlorométhane, vapeur de méthanol ou 40 mM de succinate présent dans le milieu) et ce selon deux méthodes :

- le repiquage : les mutants conservés sur microplaque sont repiqués à l'aide d'un peigne sur milieu solide,

- les répliques velours : cette technique permet de transférer toutes les colonies d'une boîte mère sur un velours stérile puis sur une ou plusieurs boîtes filles en une seule étape et d'observer la fluorescence de mutants ayant perdu leur capacité de croissance dans des conditions données.

11. ANALYSE DU SITE D'INSERTION DU MINI-TRANSPONON

Afin de localiser et de séquencer le site d'insertion du mini-Tn5, différentes techniques ont été utilisées. Tout d'abord le clonage, qui a pour but d'obtenir des copies identiques d'un gène ou d'un fragment de gène (insert) en l'intégrant dans un plasmide (vecteur). Cette méthode est la plus souvent utilisée afin d'aboutir au séquençage de la région d'insertion du mini transposon. Hormis le clonage, deux méthodes basées sur l'amplification directe par PCR des régions flanquant le mini-transposon ont été utilisées afin d'identifier le site d'insertion du transposon.

11.1 PCR inverse (I-PCR, Ochman et *al.*, 1990)

Afin de séquencer les régions flanquantes du mini-Tn5, les ADN subissent une digestion, une ligation sur eux-même, puis une amplification par PCR en utilisant les bornes du transposon comme amorces (Figure M.3).

Les ADN génomiques de variants de la souche DM4 sont digérés pendant une nuit par une enzyme de restriction qui coupe en-dehors du mini-transposon Tn5 et qui génère des fragments de petite taille. La ligation des fragments obtenus est effectuée avec une T4 DNA ligase (paragraphe 8.10). Une PCR est ensuite réalisée avec des oligonucléotides qui étaient divergents sur le chromosome, et qui se retrouvent ainsi convergents après ligation (couples d'amorces pAGO / pAGI, Oout / Iout et Oend / Iend). Les conditions de PCR sont décrites dans le paragraphe 8.12.

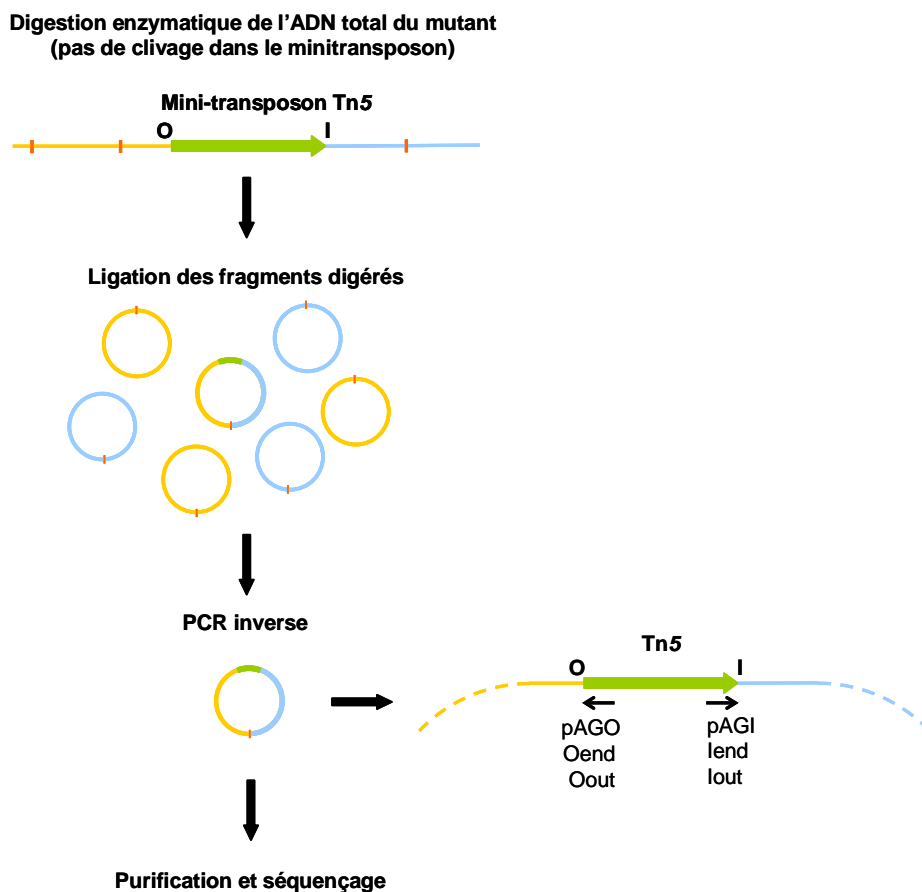


FIGURE M.3 - Diagramme schématique du principe de la PCR inverse

11.2. Amplification des gènes comportant le mini-transposon (linker Y)

La méthode proposée par Kwon et Ricke (2000) fait intervenir une étape de ligation entre l'ADN génomique et un " linker " Y, appelé ainsi en raison de sa forme. Une PCR avec deux amorces spécifiques (une au mini-transposon et l'autre au linker Y, Figure M.4 B) permet d'amplifier la région d'insertion du mini-transposon.

11.2.1. Préparation du linker Y et de l'ADN génomique

Le linker Y été obtenu à partir de deux oligonucléotides spécifiques (linker1 et linker2, Sigma-Proligo, Sigma-Aldrich Inc, Figure M.4 A), permettant l'obtention d'un linker compatible avec les extrémités générées par l'enzyme de restriction *AgeI*.

Le linker 2 est tout d'abord phosphorylé en 5' afin de permettre la ligation ultérieure du linker. A 3,2 µg de linker 2, sont ajoutés 2 unités de polynucléotide kinase avec son tampon réactionnel PNK 1X (New England Biolabs) et de l'ATP (0,75 mM). Après une incubation d'une heure à 37°C, la réaction est stoppée par la dénaturation de l'enzyme (20 minutes, 70°C). Le linker 1 est ensuite additionné à un volume final de 29 µL. Le mélange est placé 2 minutes à 95°C puis lentement refroidi jusqu'à température ambiante pour aboutir à la formation du linker Y (200 ng.µL⁻¹).

Après digestion, l'ADN génomique des mutants (60 ng) est ligué au linker Y (1 µg) après incubation d'une nuit à 25°C, en présence de la T4 Ligase (New England Biolabs) et du tampon qui lui est associé. La ligase est ensuite inactivée par chauffage 20 minutes à 70°C.

11.2.2. Amplification par PCR

Les régions flanquant le mini-transposon sont amplifiées par PCR, avec 1 unité de Taq DNA polymérase (Expand High Fidelity PCR System, Roche), son tampon réactionnel à 1 X et les couples d'amorces spécifiques au mini-transposon et au linker Y (Y linker / Iout et Y linker / Oout). Les produits PCR sont ensuite purifiés à l'aide du kit QIAquick PCR purification selon les instructions du fabricant (Qiagen). Les conditions de PCR et les séquences des amorces utilisées sont notées dans le paragraphe 8.12. Le séquençage des produits PCR est réalisé avec l'amorce Y linker par la plate-forme technique de l'IBMP.

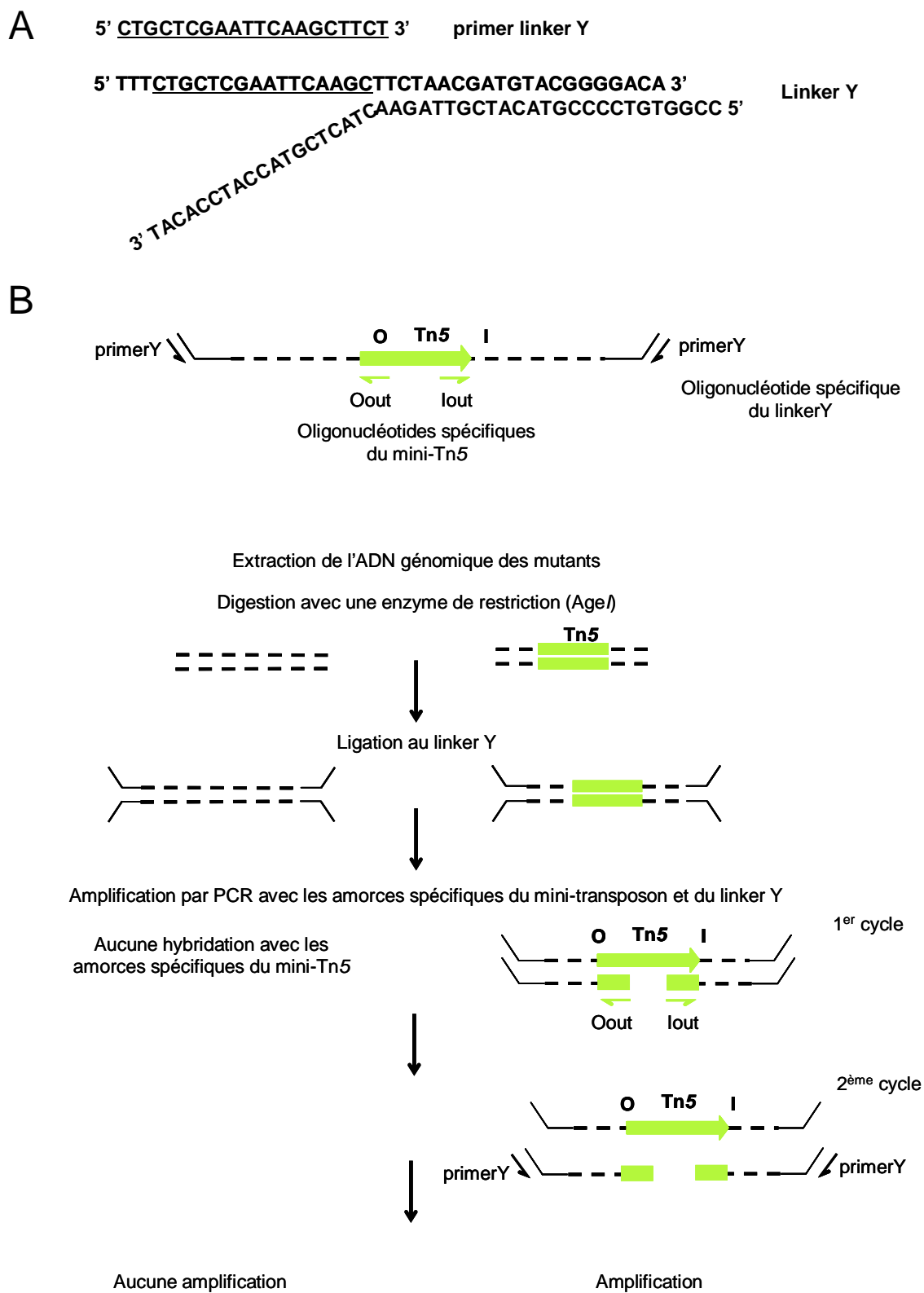


FIGURE M.4 - Diagramme schématique du linkerY (A) et de la stratégie d'amplification des régions flanquant le mini-transposon à l'aide du linker Y (B).

1

RÉSISTANCE À L'ACIDE CHEZ *METHYLOBACTERIUM*

INTRODUCTION

Notre étude porte sur la dégradation microbienne du dichlorométhane, solvant chloré toxique, par la souche *M. dichloromethanicum* DM4. Au laboratoire, la dégradation de méthanes chlorés toxiques par les bactéries méthylophiles du genre *Methylobacterium* est utilisée comme système expérimental pour l'étude des aspects génétiques, biochimiques et physiologiques du métabolisme des polluants halogénés au niveau moléculaire. Le métabolisme de dégradation du dichlorométhane chez la souche DM4 a été caractérisé en détail (Vuilleumier, 2002). L'étude de ses mécanismes de résistance à la toxicité du dichlorométhane a été initiée au cours d'un précédent travail de thèse (Kayser, 2001). Mon objectif était d'approfondir la compréhension des mécanismes recrutés pour contrer l'effet délétère de l'acide produit lors de la déchloration du dichlorométhane. L'acidité est un défi important auquel les bactéries doivent faire face. Un environnement acide peut affecter la cellule en diminuant son pH interne (pH_i), un paramètre déterminant pour l'efficacité du métabolisme cellulaire et la croissance de la cellule (Foster, 2004). Ces mécanismes d'adaptation à l'acide sont essentiels à la survie des bactéries lors de croissance en conditions dégradantes, mais ne sont pas encore clairement identifiés.

La dégradation du dichlorométhane par la souche DM4 met en jeu une enzyme cytoplasmique, la dichlorométhane déshalogénase codée par le gène *dcmA*. Cette dégradation a lieu dans le cytoplasme (Leisinger et al., 1994) et s'accompagne d'une production intracellulaire d'acide chlorhydrique. L'acide chlorhydrique est ensuite excrété dans le milieu de culture. Afin de tester l'effet d'une acidification intracellulaire dans des contextes génétiques où la voie de dégradation du dichlorométhane n'est pas présente à l'état sauvage, des souches non dégradantes ont été transformées par un plasmide recombinant exprimant le

gène *dcmA*. Ainsi, lorsque la dichlorométhane déshalogénase est exprimée dans *E. coli*, une γ -protéobactérie sans relation proche avec le genre *Methylobacterium*, l'ajout de dichlorométhane conduit à une production d'acide et à une baisse du pH cytoplasmique, avec inhibition immédiate de la croissance bactérienne (Evans et al., 2000). D'une manière plus surprenante, l'expression de la dichlorométhane déshalogénase fonctionnelle dans le contexte d'une bactérie proche phylogénétiquement, la souche de référence *M. extorquens* AM1, ne suffit pas pour permettre sa croissance sur le dichlorométhane (Kayser et al., 2002). Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour comprendre cette dernière observation. Il est possible que la souche AM1 ne possède pas les mécanismes de résistance requis pour résister à la génotoxicité que génère la dégradation du dichlorométhane (Kayser, 2001). Cependant, d'autres facteurs pourraient également jouer un rôle important dans le métabolisme du dichlorométhane chez les bactéries du genre *Methylobacterium* (Vuilleumier, 2002). Parmi ceux-ci, l'excrétion d'acide chlorhydrique par la souche DM4 entraîne une acidification du milieu, acidification qui doit être neutralisée pour permettre la croissance bactérienne sur le dichlorométhane.

Le premier objectif de notre travail a été d'explorer les réponses physiologiques spécifiques de *M. dichloromethanicum* DM4 à l'acide chlorhydrique produit de manière intracellulaire lors de la déchloration du dichlorométhane. Or, cette dégradation s'accompagne aussi d'une acidification extracellulaire qui induit des réponses adaptatives spécifiques (cf. introduction). Parmi celles-ci, on peut rappeler la résistance de type "Acid Tolerance Response" naturellement induite au cours de la phase stationnaire de croissance, "l'Acid Tolerance Response" dépendante du pH induite par une pré-adaptation à un pH acide ou une culture à bas pH ; ou l'adaptation de type quorum sensing dépendante de la densité cellulaire, dont l'existence démontrée chez les souches du genre *Methylobacterium* (Nieto Peñalver et al., 2006) serait une source d'interférence pour l'étude de la réponse au stress acide intracellulaire induite au cours de la dégradation du dichlorométhane.

Pour clarifier les aspects spécifiques de la réponse à un stress acide intracellulaire et extracellulaire, nous avons augmenté les capacités tampon du milieu de culture et cultivé les

souches jusqu'à une DO_{600} de 0,2. Les expériences ont été conduites dans un milieu tamponné avec 100 mM de phosphate, une concentration plus élevée que celle utilisée en routine dans des études précédentes (Kayser et al., 2000, 2001, 2002, par exemple). En effet, avec un milieu minéral tamponné à 50 mM de phosphate, une diminution du pH de 7,15 à 6 est observée après croissance de la souche DM4 sur le dichlorométhane à une DO_{600} de 0,2, alors qu'aucune variation notable de pH n'est détectée au cours de la culture dans les conditions de milieu minéral tamponné à 100 mM de phosphate. Ces conditions permettent ainsi de limiter, voire de prévenir la mise en place d'éventuels mécanismes de tolérance à un stress acide extracellulaire au cours de la croissance. Au cours de notre étude, la viabilité de différentes souches du genre *Methylobacterium* a été étudiée sur des cultures ayant poussé soit sur dichlorométhane soit sur méthanol comme seule source de carbone, après exposition à différents acides, et de comparer la viabilité de ces cultures. L'acido-tolérance de *Methylobacterium* a d'abord été évaluée avec deux acides de nature différente : un acide organique faible pour l'étude du stress intracellulaire et un acide fort pour celle du stress extracellulaire.

1. TOLÉRANCE DE *M. DICHLOROMETHANICUM* DM4 SELON LA NATURE DE L'ACIDE

La tolérance à l'acide a été étudiée pour la souche DM4 avec l'acide formique et l'acide chlorhydrique. L'acide formique, un acide organique, pénètre rapidement dans la cellule sous sa forme non-ionisée. Dans ce cas, le pH interne présente la même valeur que le pH externe, permettant l'étude de l'effet de conditions acides à l'intérieur de la cellule sur la viabilité (Bang et Drake, 2005). Le choix de l'acide formique a été motivé par le fait que le formate est un substrat naturel de croissance des bactéries méthylophiles (Doronina et al., 2000) démontrant que cet acide organique est capable de diffuser à l'intérieur de la cellule. L'acide chlorhydrique, en revanche, ne pénètre que très lentement dans la cellule du fait de sa nature ionisée (Bang et Drake, 2005). En d'autres termes, les résultats obtenus après exposition à l'acide chlorhydrique contribuent essentiellement à caractériser l'effet du pH extracellulaire sur la viabilité de la souche DM4.

Après croissance sur dichlorométhane ou méthanol, la souche DM4 est incubée dans un milieu minéral 100 mM phosphate ajusté à des valeurs de pH comprises entre 2 et 7. Des différences de viabilité entre les cellules cultivées sur méthanol et sur dichlorométhane ont été observées à pH 4 en présence d'acide formique, alors qu'un pH de 3 est nécessaire pour obtenir le même effet avec l'acide chlorhydrique (Figure 1.1). Après exposition à l'acide pendant 4 heures, la viabilité de la souche DM4 est plus importante par un facteur de 1000 lorsque celle-ci a été cultivée au préalable sur le dichlorométhane comme seule source de carbone. En revanche, pour un pH supérieur à pH 3 dans le cas de l'acide chlorhydrique, et pour un pH 4 dans le cas de l'acide formique, aucune modification significative de la viabilité de la souche DM4 n'est observée après 4 heures d'exposition à l'acide. A noter qu'une exposition à des pH plus bas a un effet immédiat et drastique sur la viabilité cellulaire. En effet, aucune survie significative n'est observée après exposition à des valeurs de pH inférieures à 3 dans les conditions de l'expérience, avec une perte de viabilité très importante en moins de 5 minutes, indépendamment de l'acide utilisé (viabilité résiduelle relative inférieure à 10^{-6} , données non présentées).

A noter également qu'aucun effet du formate sur le taux de survie de la souche DM4 n'a été observé. En effet, une expérience de contrôle en présence de formate (pH 7), ajouté à la même concentration que celle d'acide formique nécessaire à atteindre pH 4 (soit 70 mM), indique que la perte de viabilité observée après exposition à pH 4 est due au pH et non au formate lui-même (expérience non présentée).

Ces résultats ont permis d'établir que l'exposition de la souche DM4 à un pH acide de 4, réalisée par l'ajout d'acide formique, permet de caractériser son acido-tolérance dans le détail souhaité. Dans ces conditions, une viabilité plus importante de la souche DM4 a été mise en évidence après exposition à l'acide lorsque celle-ci s'est développée au préalable sur le dichlorométhane (Figure 1.1). Des résultats similaires ont été obtenus en contexte de choc acide extracellulaire à pH 3 avec l'acide chlorhydrique. En résumé, le métabolisme du dichlorométhane chez la souche *M. dichloromethanicum* DM4 s'accompagne d'une résistance

accrue à l'acide. Pour la suite de notre étude, nous avons choisi de conduire nos expériences en condition de stress intracellulaire à pH 4.

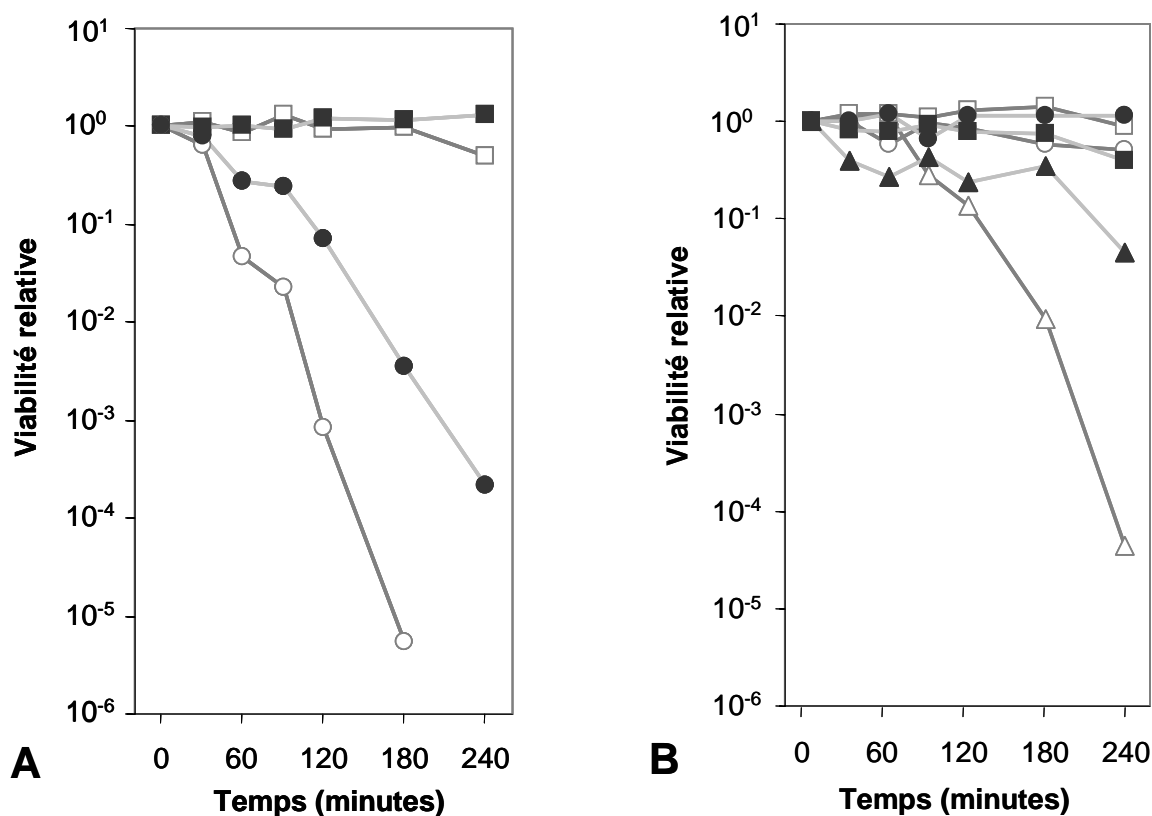


FIGURE 1.1 - Acido-tolérance de la souche *M. dichloromethanicum* DM4 en fonction de la nature de l'acide, du temps d'exposition, du pH et des conditions de cultures. La viabilité de la souche a été évaluée sur des cellules cultivées sur le méthanol 10 mM (symboles clairs) ou sur le dichlorométhane 10 mM (symboles pleins) comme seule source de carbone, après exposition à l'acide à pH 3 (triangles), pH 4 (cercles) et pH 5 (carrés), avec de l'acide formique (A) ou de l'acide chlorhydrique (B). Les résultats représentent la moyenne de deux expériences distinctes (cf. Annexe A.1).

2. EFFET DES IONS CHLORURE SUR L'ACIDO-TOLÉRANCE DE LA SOUCHE DM4

Au cours de la dégradation du dichlorométhane, les ions chlorure sont excrétés dans le milieu sous forme d'acide chlorhydrique. Pour évaluer si la seule présence d'ions chlorure dans le milieu module la réponse de la tolérance adaptative à l'acide chez *Methylobacterium*, l'acido-tolérance a été testée sur la souche DM4 ayant poussé en présence de NaCl. Une concentration de 10 mM de NaCl a été choisie car cette concentration d'ions chlorure

correspond à celle produite après culture sur dichlorométhane jusqu'à une DO_{600} de 0,2. De plus, comme précédemment démontré (Fig. 1.1), l'acido-tolérance de la souche DM4 varie en fonction de la source de carbone, l'impact des ions chlorure a été testée sur des cellules cultivées avec du méthanol ou du dichlorométhane. Après culture, les cellules sont exposées à pH 4 dans du milieu 100 mM phosphate ajusté avec l'acide formique.

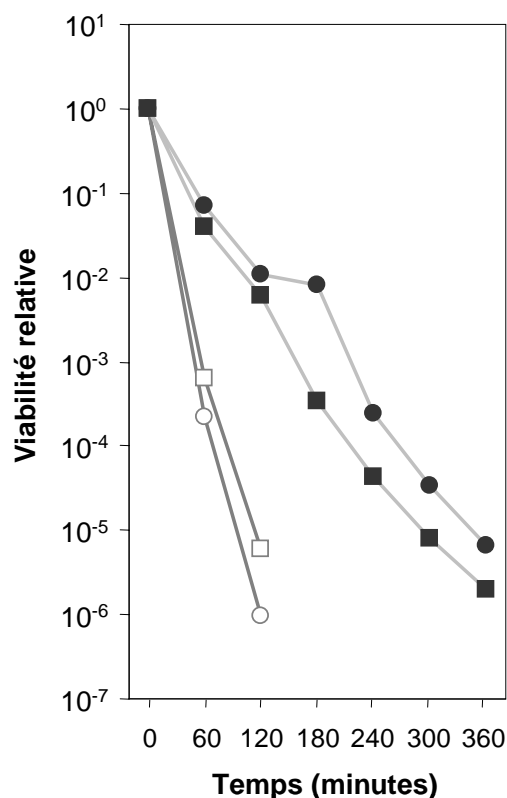


FIGURE 1.2 - Effet de la source de carbone et des ions chlorure sur la viabilité de la souche *M. dichloromethanicum* DM4 soumise à un choc acide à pH 4 par ajout d'acide formique, après culture sur méthanol (symboles clairs) ou sur dichlorométhane (symboles pleins), avec (cercles) ou sans (carrés) NaCl (10 mM), (cf. Annexe A.2).

La présence d'ions chlorure au cours de la croissance de la souche DM4 sur méthanol ou dichlorométhane n'a aucun effet significatif sur la viabilité des cellules après exposition à l'acide et ceci sur les deux sources de carbone testées, méthanol et dichlorométhane (Figure 1.2). Nous concluons que les ions chlorure n'affectent pas la viabilité de la souche DM4 dans les conditions du test, et de manière plus générale sa réponse à l'acido-tolérance. En revanche, la viabilité plus importante de la souche DM4 cultivée sur le dichlorométhane est confirmée.

En l'absence de variation de pH du milieu et d'un effet des ions chlorure sur la viabilité, la production de protons à l'intérieur de la cellule lors de la croissance est bien le facteur associé à une plus grande résistance de la souche DM4 à une exposition à l'acide.

3. EFFET DU SURNAGEANT DE CULTURE SUR LA TOLÉRANCE À L'ACIDE

Chez *E. coli*, l'adaptation à l'acide semble faire intervenir la synthèse par la cellule de facteurs extracellulaires encore mal identifiés qui peuvent induire une tolérance à l'acide chez des cellules qui n'ont pas été exposées à l'acide (cf. introduction ; Rowbury, 2001). Cette possibilité a été évaluée ici pour *Methylobacterium*, en recherchant la présence de facteurs extracellulaires dans le surnageant de culture. L'effet de ces facteurs a été évalué sur des cellules ayant poussé sur le dichlorométhane ou sur le méthanol.

Pour ces expériences, les surnageants de culture de la souche DM4 cultivée sur méthanol ou dichlorométhane comme source de carbone sont prélevés après centrifugation. Les culots cellulaires sont remis en suspension, soit dans un milieu minéral 100 mM phosphate, soit avec les différents surnageants issus de ces mêmes cultures. Dans tous les cas, le pH a été ajusté à 4 avec de l'acide formique avant de procéder à l'analyse de viabilité.

Dans ces conditions, le taux de survie de la souche DM4 cultivée sur le dichlorométhane dépend principalement de la nature de la source de carbone sur laquelle les cellules ont été cultivées, et non pas de la provenance du surnageant dans lequel les cellules ont été resuspendues (Figure 1.3). Les taux de survie les plus importants sont observés pour les cultures ayant poussé sur le dichlorométhane et non sur le méthanol. En d'autres termes, les cellules exposées à l'acide produit lors de la déchloration du dichlorométhane semblent avoir acquis une tolérance à l'acide. Toutefois, cette tolérance semble intrinsèque aux cellules elles-mêmes et ne dépend pas de la nature des surnageants.

Par contre, il semblerait que des facteurs extracellulaires interviennent dans une moindre mesure dans les phénomènes de tolérance à l'acide. En effet, les cultures ayant poussé sur le méthanol présentent une tolérance à l'acide légèrement accrue seulement

lorsqu'elles sont reprises dans le surnageant de culture sur le dichlorométhane (Figure 1.3). Cette tolérance "intermédiaire" n'atteint pas le niveau de tolérance à l'acide des cellules cultivées avec du dichlorométhane comme seule source de carbone et d'énergie, mais suggère la possibilité d'existence de facteurs extracellulaires qui seraient impliqués dans la résistance adaptative à l'acide chez les méthylobactéries, comme précédemment observé chez *E. coli* (Rowbury, 2001).

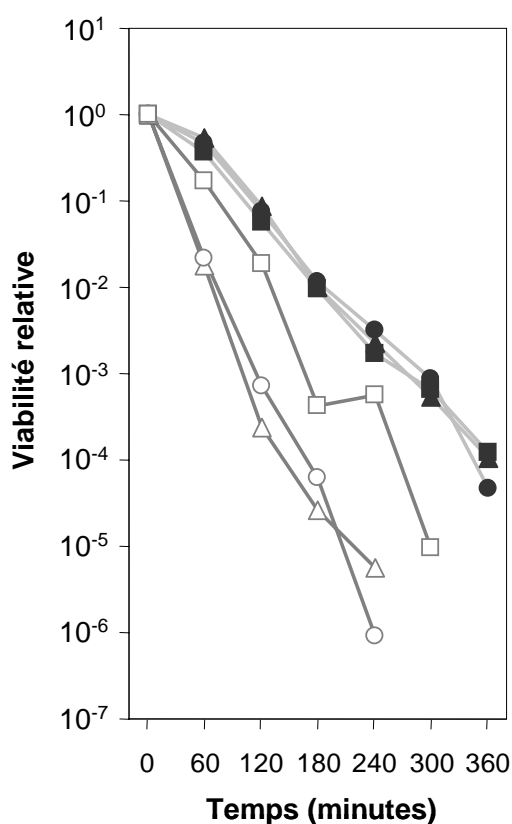


FIGURE 1.3 - Effet du surnageant de culture sur la tolérance à l'acide chez la souche DM4

Les surnageants de culture de la souche DM4 cultivée sur méthanol (symboles clairs) ou sur dichlorométhane (symboles pleins) jusqu'à une DO_{600} de 0,2 sont recueillis, et les culots cellulaires de ces mêmes cultures sont remis en suspension avec chacun de ces surnageants (culture sur le dichlorométhane (carrés) ou sur le méthanol (cercles) ou milieu 100 mM phosphate (triangles), ajustés à pH 4 avec de l'acide formique. Les points indiqués représentent la moyenne de trois expériences distinctes (cf. Annexe A.3).

4. EFFET DE DIFFÉRENTES FRACTIONS DE SURNAGEANT SUR LA TOLÉRANCE À L'ACIDE

Les facteurs extracellulaires décrits par Rowbury chez *E. coli* (2001) ont été décrits comme présentant des tailles variables (protéines ou petites molécules), selon le type de stress auquel les cellules ont été soumises. Nous avons tenté de définir plus précisément d'éventuels facteurs extracellulaires intervenant dans la tolérance à l'acide chez *Methylobacterium*, en évaluant l'effet de différentes fractions du surnageant de culture obtenues par séparation grossière en fonction de la taille moléculaire.

Les surnageants de la souche DM4 cultivée sur méthanol ou dichlorométhane jusqu'à une DO_{600} de 0,2 sont recueillis après centrifugation (9000 rpm, 15 minutes), filtrés à l'aide d'un tube de centrifugation composé d'une membrane filtrante de porosité 10 kDa (microsepTM microconcentrators 10K, Fisher scientific, 8000 rpm, 40 minutes), puis conservés à -80°C. Pour chaque surnageant de culture, trois fractions ont été étudiées : une fraction totale correspondant au surnageant non filtré, une fraction correspondant aux molécules recueillies dans le filtrat (taille théorique nominale inférieure à 10 kDa), et la fraction correspondant aux molécules retenues par le filtre taille théorique nominale supérieure à 10 kDa), remises en suspension avec un volume de milieu 100 mM phosphate équivalent au volume filtré. Ces différentes fractions ont ensuite été ajustées à pH 4 avec de l'acide formique et utilisées pour remettre en suspension les cellules de nouvelles cultures de la souche DM4 obtenues sur méthanol ou dichlorométhane comme seule source de carbone pour la croissance.

Les résultats présentés dans la Figure 1.4 confirment la tolérance à l'acide plus importante des cultures réalisées sur dichlorométhane. Toutefois, aucune différence n'est observée en fonction du milieu utilisé pour remettre en suspension les cellules. En particulier, la relative résistance à l'acide observée dans l'expérience précédente (Figure 1.3), dans laquelle les cellules cultivées sur méthanol sont reprises avec le surnageant de culture sur dichlorométhane, n'a pas été retrouvée dans cette expérience. La principale différence entre les conditions expérimentales des deux expériences réside dans le stockage préalable des

surnageants utilisés (Figure 1.4), en raison des contraintes liées à la préparation et à l'utilisation d'un grand nombre de fractions de surnageants différentes dans le test effectué. Ces expériences préliminaires suggèrent donc que, si l'on ne peut exclure la présence de facteurs extracellulaires favorisant la tolérance à l'acide et présents dans les surnageants de culture exposés au dichlorométhane (Figure 1.4), ces facteurs seraient relativement peu stables, et ne résistant pas à une période de stockage à -80°C .

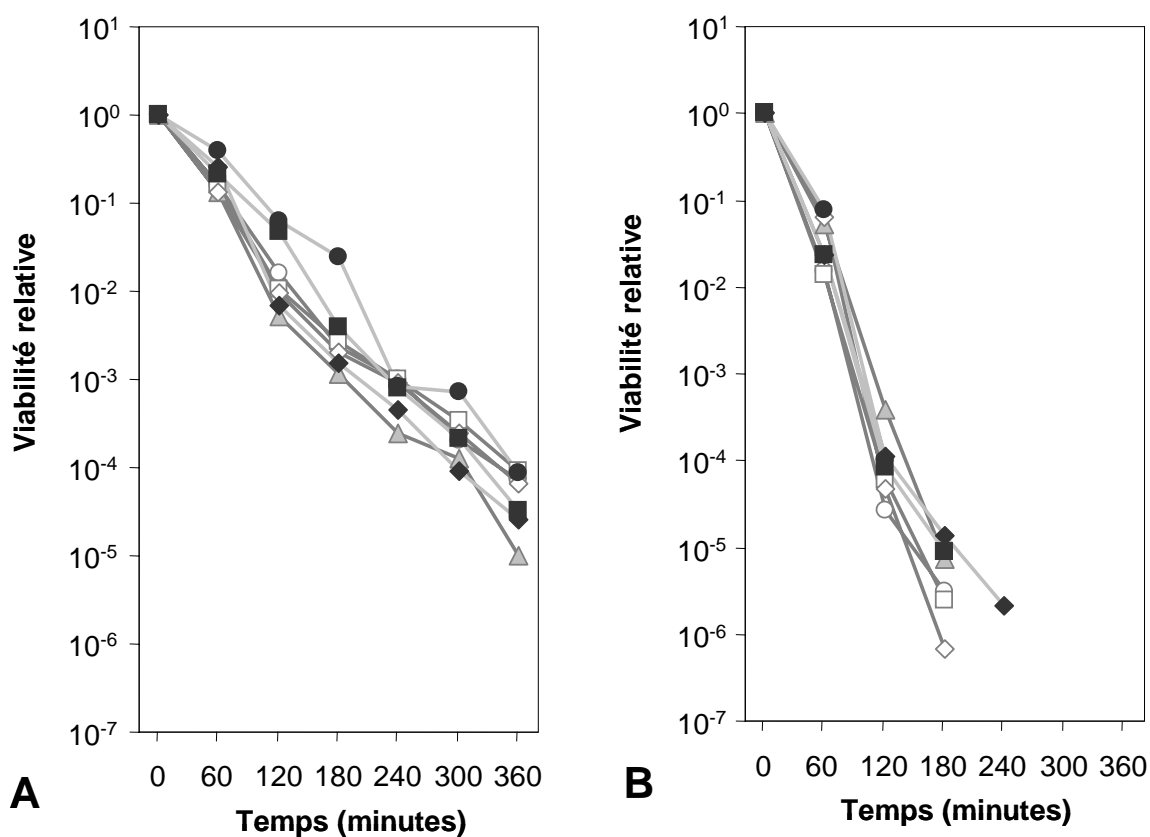


FIGURE 1.4 - Effet de différentes fractions de surnageant de culture sur la tolérance à l'acide.

Après croissance sur dichlorométhane (A) ou méthanol (B) jusqu'à une DO_{600} de 0,2, la souche DM4 est incubée en présence de fractions de surnageants de culture cultivées sur dichlorométhane (symboles pleins) ou sur méthanol (symboles clairs) ajustés à pH 4 avec de l'acide formique, (cercles : surnageant total non filtré ; carrés : filtrat contenant les molécules de tailles inférieures à 10 kDa ; losanges : fraction contenant les molécules de taille supérieure à 10 kDa ; triangles : milieu 100 mM phosphate). Les résultats représentent la moyenne de deux expériences distinctes (cf. Annexe A.4).

5. ACIDO-TOLÉRANCE DE LA SOUCHE CM4 EXPRIMANT LA DICHLOROMÉTHANE DÉSHALOGÉNASE DE LA SOUCHE DM4

La dégradation du dichlorométhane met en jeu une enzyme, la dichlorométhane déshalogénase, qui transforme le dichlorométhane en formaldéhyde avec génération d'acide intracellulaire (Vuilleumier 2002). La question s'est donc posée de savoir si l'activité de cette enzyme suffit à elle seule à conférer une tolérance accrue à l'acide chez des bactéries du genre *Methylobacterium*. Pour répondre à cette question, cette enzyme exprimée sur le plasmide pME8221 a été introduite par transformation dans différentes souches dépourvues de cette enzyme et incapables naturellement de dégrader le dichlorométhane. La souche de référence *M. extorquens* AM1 ne se développe pas sur le dichlorométhane lorsqu'elle exprime le gène *dcmA* sous forme d'enzyme fonctionnelle (Kayser *et al.*, 2002) ce qui empêche d'aborder cette question avec cette souche de référence. La résistance à l'acide produit par déchloration du dichlorométhane a été étudiée pour la souche *M. chloromethanicum* CM4, souche déchlorant le chlorométhane. La souche CM4 a été transformée par le plasmide pME8221 qui contient les gènes *dcmA* et *dcmR*, permettant l'expression de la dichlorométhane déshalogénase fonctionnelle et la croissance de cette souche sur le dichlorométhane (CM4(pME8221), Kayser *et al.*, 2002). La souche *M. dichloromethanicum* DM4-2cr est caractérisée par son incapacité à pousser sur le dichlorométhane du fait d'une délétion d'au moins 20 kb qui contient le gène *dcmA* et son gène régulateur présumé *dcmR* (Gälli et Leisinger, 1988). Le transconjugant DM4-2cr(pME8221) est en revanche capable de croître sur le dichlorométhane (Kayser et Vuilleumier, 2001).

Les résultats présentés dans la Figure 1.5 montrent que les profils des courbes de survie des souches CM4(pME8221) et DM4-2cr(pME8221) à pH 4 sont similaires. Il apparaît des différences de viabilité entre les cellules cultivées sur méthanol ou dichlorométhane, comme précédemment pour la souche DM4, avec un taux de survie plus important de 3 ordres de grandeur lorsque les souches se sont développées sur le dichlorométhane. On peut donc faire l'hypothèse que la souche *M. chloromethanicum* CM4(pME8221) possède également des mécanismes d'adaptation à l'acide intracellulaire généré par la transformation du dichlorométhane.

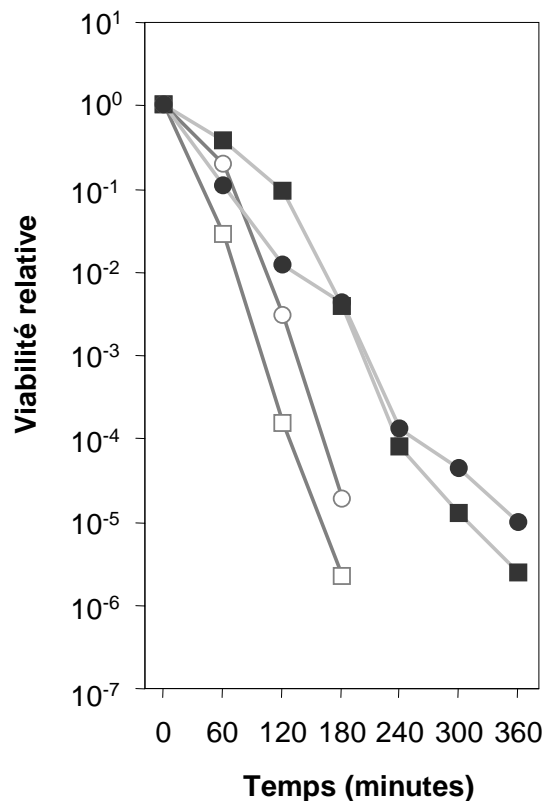


FIGURE 1.5 - Viabilité des souches CM4(pME8221) (cercles) et DM4-2cr(pME8221) (carrés) après exposition à l'acide formique à pH 4 sur milieu 100 mM phosphate. Ces souches ont été cultivées sur méthanol (symboles clairs) ou dichlorométhane (symboles pleins) et 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de tétracycline, à partir d'une préculture sur méthanol à une DO_{600} de 0,2. Chaque point représente la moyenne de deux expériences (cf. Annexe A.5).

On constate toutefois que le taux de survie de ces deux souches cultivées sur dichlorométhane est plus faible que celui de la souche DM4 (Figure 1.3). Ceci constitue une surprise au moins peut être pour la souche DM4-2cr(pME8221), pour laquelle on s'attendait a priori à des résultats similaires à ceux de la souche DM4. Plusieurs facteurs sont susceptibles d'expliquer ces observations. Tout d'abord, il a été déjà montré que pour d'autres souches bactériennes la tétracycline pouvait diminuer la tolérance à l'acide (Hung *et al.*, 2006). Ensuite l'éthanol dans lequel la tétracycline est ajoutée (concentration finale dans la culture 12 mM) peut aussi être utilisé comme source de carbone par les souches appartenant au genre

Methylobacterium (Doronina et al., 2000). A DO_{600nm} égale, les cultures poussant sur un mélange de substrats carbonés utilisent moins de substrat halogéné. Alternativement, la présence d'une source de carbone autre que le dichlorométhane pourrait agir sur l'induction de la dégradation du dichlorométhane au cours de la croissance voire sur l'expression d'éventuels facteurs de résistance à l'acide intracellulaire. Dans un cas comme dans l'autre, l'adaptation à l'acide de ces deux souches serait donc moins importante du fait de la disponibilité d'une source de carbone autre que le dichlorométhane. Des observations similaires ont été mises en évidence lorsque la souche DM4 est cultivée sur un mélange méthanol / dichlorométhane (expériences non montrées).

6. TOLÉRANCE DE *METHYLOBACTERIUM CHLOROMETHANICUM* CM4 À L'ACIDE

Comme pour le dichlorométhane, la déchloration du chlorométhane par la souche CM4 lors de sa croissance sur ce composé s'accompagne d'une production d'acide chlorhydrique avec excrétion d'acide dans le milieu. Il est donc possible que le métabolisme du chlorométhane nécessite la mise en place de mécanismes d'acido-tolérance semblables à ceux observés pour le dichlorométhane chez la souche DM4. Ceci est d'ores et déjà suggéré par le fait que la souche chlorométhane-dégradante CM4(pME8221) se développe aussi sur le dichlorométhane lorsqu'elle exprime la dichlorométhane déshalogénase (Kayser et al., 2002), et, comme pour la souche DM4, l'induction du métabolisme du dichlorométhane dans cette souche s'accompagne d'une réponse adaptative à l'acide. Il s'agirait donc, le cas échéant, davantage d'une adaptation à l'acide produit qu'à la nature du composé soumis à déchloration (cf. ci-dessus).

De fait, des différences de viabilité entre les cultures de la souche CM4 cultivées sur méthanol ou chlorométhane sont observées, et une viabilité plus importante est obtenue lorsque la souche CM4 est cultivée sur le chlorométhane comme seule source de carbone. Ceci confirme notre hypothèse selon laquelle indépendamment du composé chloré, la génération intracellulaire d'acide induit une tolérance à l'acide chez les bactéries du genre *Methylobacterium*. Cependant, cette tolérance à l'acide induite par le métabolisme du chlorométhane semble moins importante que celle induite par le métabolisme du

dichlorométhane. Il est tentant d'expliquer cette observation en invoquant la quantité d'acide produite au cours de cette dégradation qui, à quantité égale de carbone oxydé pour la croissance, est deux fois moins importante que celle produite par la dégradation du dichlorométhane. Par ailleurs, pour une quantité égale de carbone, l'énergie libérée par l'oxydation du dichlorométhane (à l'état formel d'oxydation du formaldéhyde, soit 0) est moindre que celle libérée par l'oxydation du chlorométhane (état formel du méthanol, soit -1). Il pourrait en résulter une réponse adaptative à l'acide moins importante.

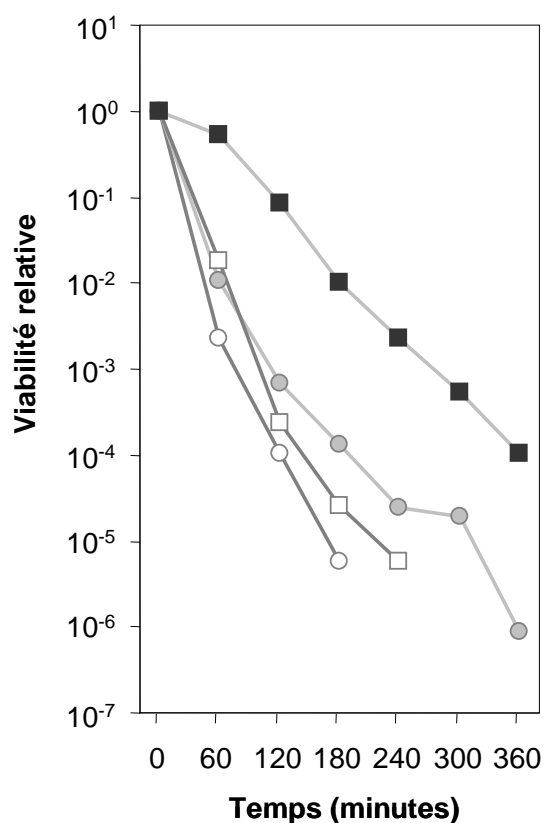


FIGURE 1.6 - Tolérance à l'acide de *Methylobacterium chloromethanicum* CM4

Les souches DM4 (carrés) et CM4 (cercles) sont cultivées jusqu'à une DO_{600nm} de 0,2 sur méthanol (symboles clairs), dichlorométhane (symboles pleins) ou chlorométhane (symboles gris) comme seule source de carbone puis resuspendues dans du milieu 100 mM phosphate ajusté à pH 4 avec de l'acide formique (cf. Annexe A.6).

7. MESURE DE L'INTENSITÉ DE FLUORESCENCE DE LA GFP

Nous interprétons la viabilité plus importante des souches cultivées sur le dichlorométhane après exposition à l'acide formique par une acido-tolérance intracellulaire accrue, sur la base de l'hypothèse d'une pénétration de cet acide organique sous sa forme non-ionisée dans la cellule. Nous supposons également que l'acide chlorhydrique ne pénètre pas de manière significative dans la cellule (Figure 1.1). Nous avons cherché à obtenir des indications expérimentales supplémentaires en faveur de cette hypothèse en étudiant les changements d'intensité de fluorescence de variants de la souche DM4 exprimant la GFP. L'intensité de fluorescence de cette protéine est sensible au pH, et peut être utilisée comme indicateur de pH intracellulaire (Kneen *et al.*, 1998). Une collection de mutants de la souche DM4 possédant un gène codant pour une protéine de fluorescence verte (GFP) inséré dans leur génome ont été obtenus au laboratoire (cf. chapitre 2). Parmi la collection de mutants, deux mutants indépendants et exprimant une forte intensité de fluorescence au cours de la croissance sur le dichlorométhane comme sur le méthanol ont été utilisés. Les cellules issues de cultures de ces mutants sur méthanol ou dichlorométhane, sont incubées dans un milieu minéral 100 mM phosphate ajusté à des valeurs de pH comprises entre 2 et 7 avec de l'acide formique ou de l'acide chlorhydrique. Des expériences identiques ont été réalisées à partir d'extraits cellulaires obtenus par sonication de cellules de ces mêmes mutants cultivées sur méthanol.

Que ce soit en présence d'acide formique ou d'acide chlorhydrique, l'intensité de fluorescence de la GFP en extrait cellulaire décroît avec le pH (Figure 1.7B). A noter qu'aucune variation significative de la GFP n'a été observée entre les cultures sur dichlorométhane ou sur méthanol. Cette fluorescence diminue pour un pH compris entre 7 et 5, pour tendre à une valeur minimale à un pH égal ou inférieur à 5 (Figure 1.7 A). Cette altération pH-dépendante de la fluorescence de la GFP a été caractérisée en détail et décrite précédemment (Kneen *et al.*, 1998 ; Enoki *et al.*, 2004). Un résultat similaire est observé avec l'intensité de fluorescence de la GFP de suspensions cellulaires de variants fluorescents de la souche DM4 incubés en présence d'acide formique (Figure 1.7 B, carrés). Ces résultats indiquent donc bien que l'acide formique pénètre dans la cellule et impose ainsi un pH interne

égal au pH externe du milieu. En revanche, en présence d'acide chlorhydrique, l'intensité de fluorescence de la GFP contenue dans les cellules chute bien pour un pH inférieur à 3, mais aucune variation n'est observée sur les pH allant de 3 à 6, et ce, même après 4 heures d'exposition. Cette observation indique que sur 4 heures (temps d'exposition utilisé dans nos expériences, Figure 1.1) et pour un pH égal ou supérieur à 3, l'acide chlorhydrique ne pénètre pas à l'intérieur des cellules. Des expériences préliminaires de souches variantes exprimant à la fois la GFP et une dichlorométhane déshalogénase active n'ont pas permis dans ces conditions d'observer une baisse même transitoire de la fluorescence après exposition au dichlorométhane.

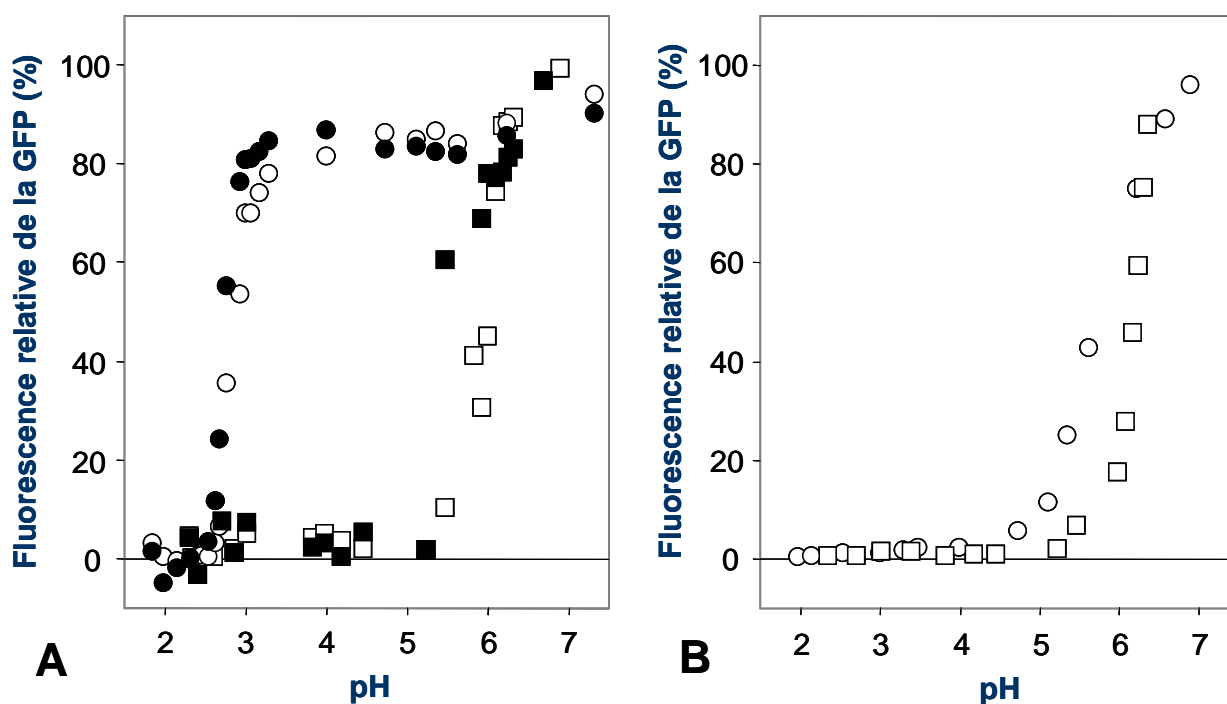


FIGURE 1.7 - Variation de l'intensité fluorescence de la GFP avec le pH

Après croissance sur méthanol (symboles clairs) ou dichlorométhane (symboles pleins), des variants fluorescents de la souche DM4 (B) ou leurs extraits cellulaires obtenus par sonication (A) sont resuspendus en microplaque avec du milieu 100 mM phosphate, préalablement ajusté à différents pH compris entre 2 et 7 avec de l'acide formique (carrés) ou de l'acide chlorhydrique (cercles). Les

points représentent l'intensité de fluorescence de la GFP mesurée à t = 0 heure pour les extraits cellulaires et t = 4 heures pour les cellules bactériennes (excitation 380 nm, émission 516 nm). Les données présentées représentent la moyenne des données obtenues pour deux mutants représentatifs (10C7 et 10A7, cf. Annexe A.7).

Nos travaux ont permis de mettre en évidence une réponse adaptative à l'acide mise en place au cours de la croissance sur le dichlorométhane chez les souches DM4 et CM4(pME8221). Une réponse équivalente a été observée chez la souche CM4 pour le métabolisme du chlorométhane. Nos résultats suggèrent que l'acido-tolérance chez ces deux souches résulterait de la quantité d'acide produite lors de la déshalogénéation du dichlorométhane et du chlorométhane.

2 CRIBLAGE DE MUTANTS ET TECHNIQUES DE CARACTÉRISATION

INTRODUCTION

Le métabolisme de déshalogénéation de la souche *M. dichloromethanicum* DM4 met en jeu une enzyme cytoplasmique, la dichlorométhane déshalogénase codée par le gène *dcmA*. Cette enzyme transforme le dichlorométhane en formaldéhyde, intermédiaire central du métabolisme méthylotrophe, avec libération d'acide chlorhydrique (Vuilleumier, 2002). Hormis cette enzyme, d'autres facteurs sont indirectement impliqués dans la croissance de la souche DM4 sur ce composé, afin de contrer les effets toxiques de ce métabolisme. Des mécanismes de réparation d'ADN efficaces sont notamment requis pour résister aux effets génotoxiques du composé intermédiaire, le S-chlorométhylglutathion, produit au cours de cette dégradation (Kayser et Vuilleumier, 2001). Une acido-tolérance accrue associée à la déchloration du dichlorométhane a également été mise en évidence dans notre travail (cf. chapitre 1). Toutefois, les bases génétiques et moléculaires de tels mécanismes restent encore à élucider. De plus, le métabolisme de déshalogénéation de la souche DM4 soulève également d'autres questions, qui concernent aussi bien l'entrée du dichlorométhane dans la cellule que l'excrétion d'acide chlorhydrique.

Dans le but d'analyser les gènes et les protéines associés au métabolisme du dichlorométhane chez la souche DM4, une première approche basée sur une mutagenèse aléatoire, mettant en jeu un mini-transposon Tn5 et un système rapporteur bleu/blanc avec le gène *lacZ*, avait déjà été réalisée (Kayser *et al.*, 2000). Ce système a permis de montrer le rôle indispensable du gène *polA* qui code pour la DNA polymérase I, une enzyme au rôle bien connu dans la réparation de l'ADN. En effet, le mutant dont le gène *polA* est interrompu exprime toujours une dichlorométhane déshalogénase active comme la souche sauvage, mais a perdu sa capacité à se développer sur le dichlorométhane. Toutefois, cette mutagenèse n'a

pas été effectuée à "saturation" puisque, parmi les mutants analysés, aucune insertion du mini-transposon dans le gène *dcmA* n'a été trouvée. Nous nous sommes donc attachés à mettre en place une nouvelle stratégie de mutagenèse aléatoire mettant en jeu un système rapporteur de fluorescence, afin d'identifier plus facilement d'autres gènes spécifiquement induits au cours de la croissance avec le dichlorométhane.

Dans ce deuxième chapitre, nous décrivons cette stratégie ainsi que la méthode de criblage des différents mutants réalisée après croissance sur différentes sources de carbone. L'analyse du site d'insertion dans les mutants d'intérêt a également été initiée à partir de différentes approches complémentaires.

1. OBTENTION DES MUTANTS

Une banque de mutants de la souche DM4 a été construite par transposition d'un élément mobile mini-Tn5 qui contient un gène codant pour une protéine fluorescente délivré par le plasmide suicide pAG408 (Suarez *et al.* 1997 ; Figure 2.4). Le plasmide pAG408 porte la transposase du mini-transposon Tn5 et, entre les bornes O et I du mini-Tn5, le gène sans promoteur d'un variant de la protéine fluorescente verte (GFP) caractérisée par une fluorescence plus intense que la protéine d'origine (Kunert *et al.*, 1990), ainsi que deux gènes de résistance à la kanamycine et à la gentamycine sous le contrôle d'un promoteur constitutif. L'insertion du mini-transposon dans le génome de DM4 en aval d'un promoteur actif peut ainsi être détectée par observation de l'intensité de la fluorescence sous UV à 366 nm (Figure 2.1A), permettant de déterminer les gènes cibles qui expriment la GFP au cours de la croissance sur dichlorométhane. Le niveau de sensibilité de ce système permet de nombreuses applications pour l'analyse de cellule à cellule (Suarez *et al.*, 1997). Les cellules individuelles exprimant la GFP peuvent être observées au microscope optique (Figure 2.1B et 2.1C) ou encore triées par cytométrie en flux (Ropp *et al.*, 1995 ; Hawley *et al.*, 2001). La détection des cellules par cytométrie en flux permet par exemple de sélectionner les cellules d'intérêt qui ne fluorescent que dans une condition choisie, en les séparant des autres cellules. Cette technique présente l'avantage potentiel de s'affranchir d'étapes plus ou moins fastidieuses comme l'isolement, la culture des transconjugants et le criblage sur boîtes de Petri.

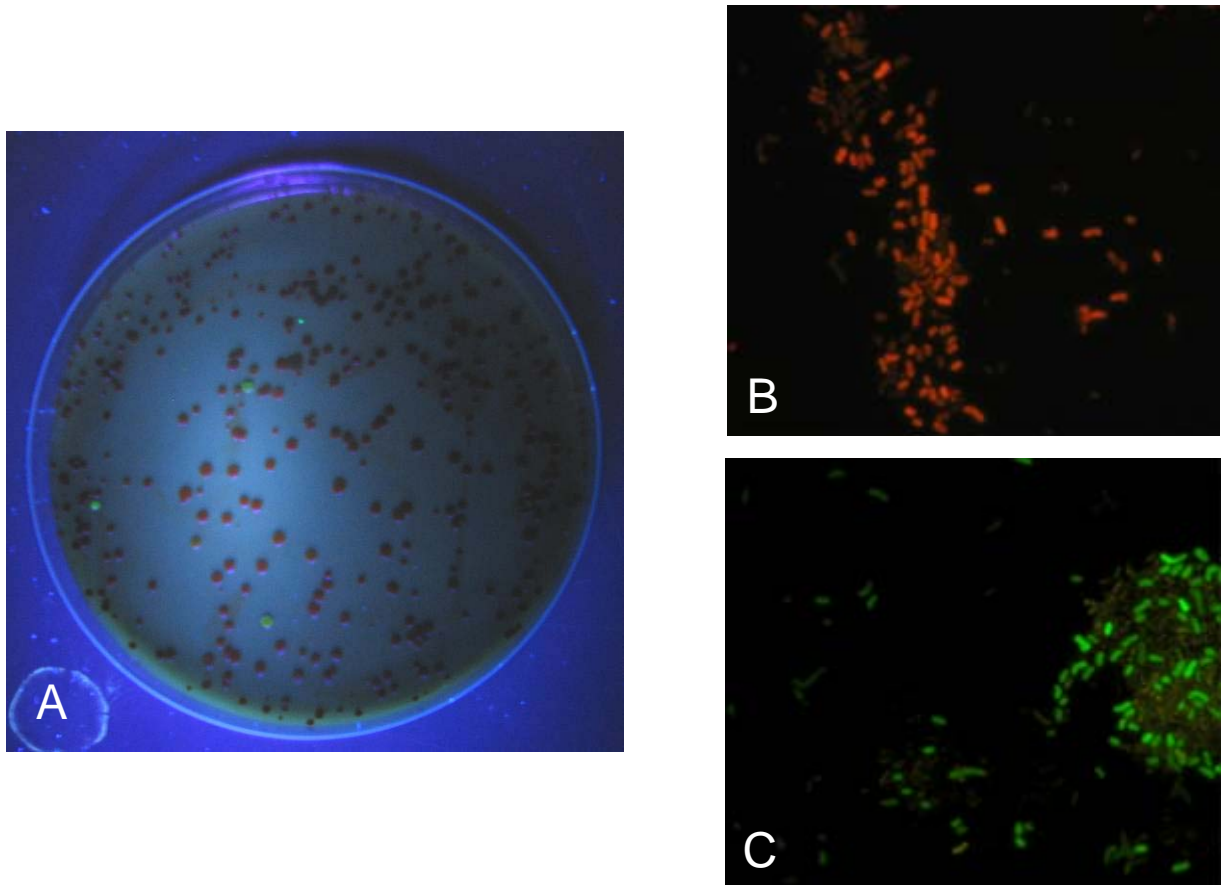


FIGURE 2.1 - (A) Observation de la fluorescence de transconjugants de la souche DM4 avec une lampe UV portable (Blak-Ray[®], UVP, 366 nm ; 100 W) et de la souche DM4 type sauvage (B) et d'un mutant de la souche DM4 exprimant la GFP (C) sous microscope (Leica DM4000B, objectif 100x, filtre I3, excitation 450-490 nm).

Les mutants ont été obtenus par conjugaison biparentale entre la souche DM4 et la souche *E.coli* S17-1(λ pir)(pAG408), et sélectionnés sur milieu minéral contenant de la kanamycine et du méthanol (40 mM). Dans ces conditions, on obtient une fréquence de 400 transconjugants pour 10^8 cellules de la souche DM4. Comme décrit plus bas, le génome de la souche DM4 est composé de plus de 6000 gènes (cf. chapitre 3). Ainsi, pour pouvoir couvrir la totalité de ce génome, l'obtention de 18 000 mutants est nécessaire (cf. paragraphe 9, matériel et méthodes). A ce jour, une banque de 6054 mutants a été constituée. Une expérience d'hybridation ADN/ADN selon Southern avec comme sonde la séquence

correspondant à celle du gène *gfp* confirme l'insertion aléatoire du mini-transposon (Figure 2.2).

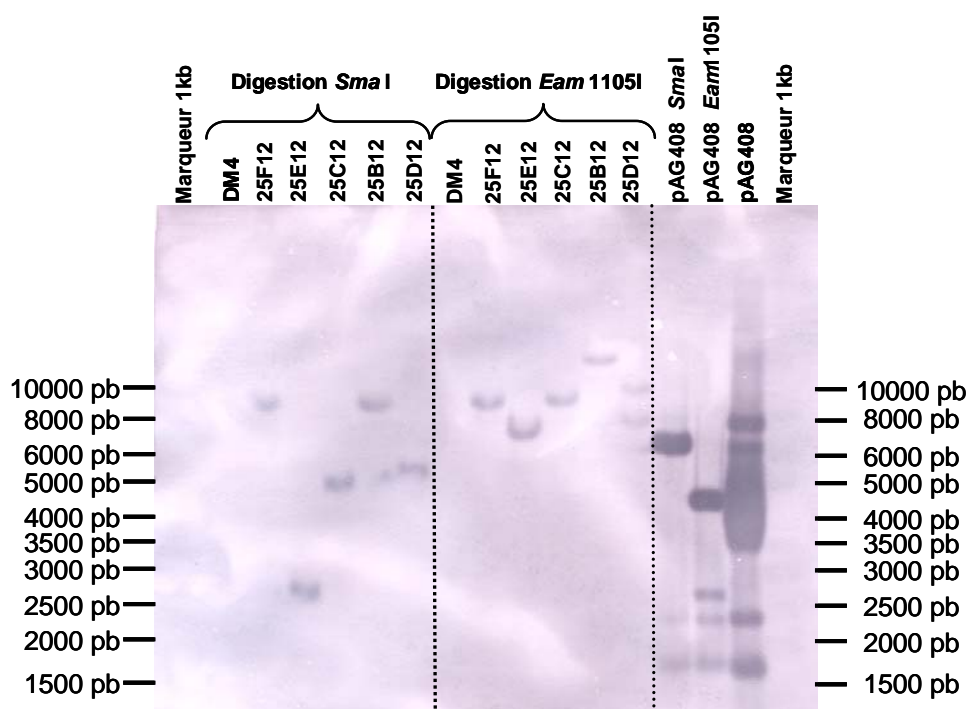


FIGURE 2.2 - Hybridation ADN/ADN de type Southern, avec une sonde spécifique de la région codant la protéine GFP, de l'ADN génomique de 5 mutants et du plasmide pAG408 digérés par l'enzyme de restriction *SmaI* ou *Eam1105I* (*AspEI*).

2. CRIBLAGE DES MUTANTS / DETERMINATION DES PHENOTYPES

L'intensité de fluorescence et la croissance des 6054 mutants obtenus ont été évaluées après culture en présence de différentes sources de carbone (Figure 2.3).

Un premier criblage a permis de repérer les mutants qui fluorescent sur le dichlorométhane même s'ils ne poussent pas sur ce composé, par des répliques réalisées à partir des mutants cultivés sur une autre source de carbone. Ce criblage a également permis de distinguer les gènes induits spécifiquement par le dichlorométhane de ceux qui sont impliqués dans le métabolisme d'autres composés en C1. Pour cela, les mutants conservés sur microplaque à -80°C sont repiqués à l'aide d'un peigne sur milieu minéral solide sélectif contenant de la kanamycine. Après incubation en présence de vapeur de méthanol (300 μ L / 2

L de volume d'air), la totalité des mutants a été transférée par répliques velours sur un nouveau milieu minéral contenant de la kanamycine exposé aux vapeurs de dichlorométhane (300 μ L / 2 L de volume d'air) par incubation dans une jarre en verre étanche. Un second criblage permettant de repérer les mutants ayant perdu leur capacité à se développer sur le dichlorométhane a été réalisé. Les mutants ont été repiqués à partir des microplaques sur milieu minéral exposé aux vapeurs de dichlorométhane. En parallèle, ils ont été observés dans les mêmes conditions après croissance sur succinate (10 mM).

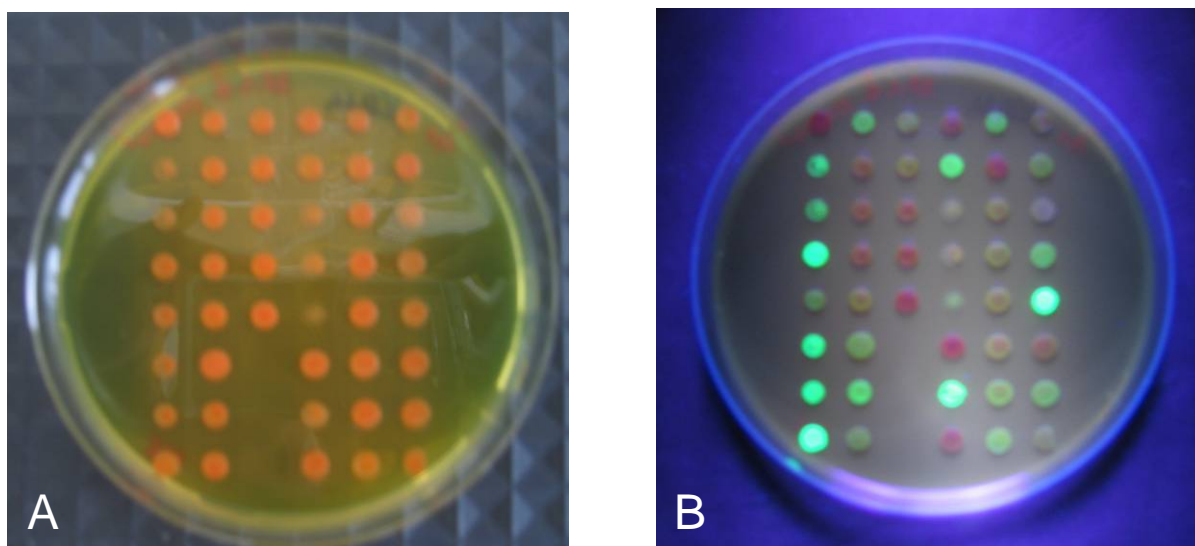


FIGURE 2.3 - Observation typique de la croissance (A) et de l'intensité de fluorescence (B, lampe UV à 366 nm) de mutants sur le méthanol.

A l'issue de ces différents criblages, 414 mutants fluorescents ont été mis en évidence, soit 6,8% de mutants fluorescents sur les 6054 testés (Tableau 2.1). Ces mutants ont été classés en 7 catégories : ceux dont la fluorescence est induite par une seule source de carbone, deux des sources de carbone ou fluorescents quelle que soit la source de carbone. Parmi les mutants fluorescents en présence de dichlorométhane, seuls 12 présentent une fluorescence qui a été retrouvée de manière reproductible dans les différentes procédures de criblages qui ont été effectuées. La totalité des 6054 mutants ont présenté une croissance sur les différentes sources de carbone testées.

TABLEAU 2.1 - Résultats du criblage des 6054 mutants obtenus

Fluorescence			Nombre de mutants fluorescents	Pourcentage de mutants fluorescents (N=6054)
DCM	Méthanol	Succinate		
+	-	-	51	0,84
-	+	-	82	1,35
-	-	+	65	1,07
+	+	-	30	0,49
+	-	+	40	0,66
-	+	+	33	0,54
+	+	+	113	1,86

A l'issue de cette étape, 29 mutants ont été choisis pour un criblage plus poussé : 12 fluorescant uniquement sur le dichlorométhane, 11 montrant une très faible intensité de fluorescence sur le dichlorométhane au cours d'une des procédures de criblage, et 6 contrôles appartenant aux autres catégories d'intérêt. Ces mutants ont été évalués à la fois sous la forme de gouttes et étalement, afin d'observer la fluorescence au niveau d'une seule colonie sur milieu minimum contenant de la kanamycine (Figure 2.4A).

Un éventail de sources de carbone plus large que pour les deux premiers criblages a été utilisé à différentes concentrations : vapeurs de dichlorométhane (300 µL / 2 L de volume d'air), méthanol à 10 mM et 40 mM, formate à 10 mM, méthylamine à 10 mM et 20 mM, succinate à 2,5 mM et 10 mM et succinate à 2,5 mM et 10 mM + vapeurs de chlorométhane (300 µL / 2 L de volume d'air).

Ce dernier criblage a permis de mettre en évidence 3 mutants au phénotype particulièrement intéressant. Le mutant 21A3 présente une fluorescence importante uniquement induite par le dichlorométhane. Le mutant 54B4 est fluorescent dans la plupart des conditions testées (méthanol, formate, succinate) hormis le dichlorométhane. Chez ce mutant, il est possible que le dichlorométhane réprime l'expression du gène dans lequel le

mini-transposon s'est inséré. Enfin, le mutant 54H7 émet une fluorescence en présence du mélange succinate / chlorométhane mais pas avec le succinate seul.

Au terme de ces criblages, il est quelques fois apparu que certains mutants présentaient une hétérogénéité en intensité de fluorescence, par exemple, pour la fluorescence observée sur goutte et sur étalement. Ainsi, il a été observé pour un des mutants que seules les colonies isolées émettaient une fluorescence. C'est sans doute le fait que la disponibilité de la source de carbone ne soit pas la même pour toutes les cellules concentrées au niveau d'une goutte. De même, sur plusieurs essais dans des conditions similaires, la fluorescence n'est pas toujours retrouvée. Le fait de tester plusieurs mutants sur une même boîte peut également créer des interférences. Après examen de mutants fluorescents au microscope à fluorescence, il a parfois été observé que la totalité des cellules n'étaient pas fluorescentes (Figure 2.4B). Ceci pourrait expliquer l'hétérogénéité de fluorescence observée dans certain cas.

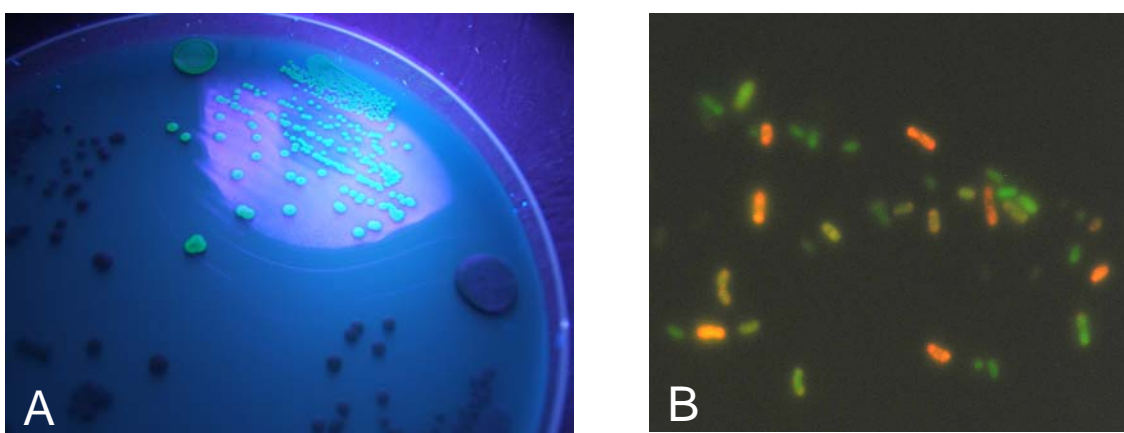


FIGURE 2.4 - Observation de la fluorescence d'un transconjugant avec une lampe UV portable (A, 366 nm; 100 W). Observation sous microscope à fluorescence (objectif 100x, excitation 450-490 nm) d'un transconjugant exprimant la GFP dont la fluorescence n'est pas répartie dans toutes les cellules (B).

3. RECONSTRUCTION *IN SILICO* DE LA SEQUENCE DU MINI-TRANSPONON DELIVRE PAR LE PLASMIDE PAG408

La séquence du mini-transposon du plasmide pAG408 utilisé pour la mutagenèse de la souche *Methylobacterium dichloromethanicum* DM4 n'est pas disponible dans les banques de données. Cette information est importante pour la caractérisation des mutants obtenus dans le

but d'identifier le gène interrompu par l'insertion du mini-transposon, et responsable à ce titre présumé du phénotype observé.

La séquence du plasmide pAG408 a été reconstituée *in silico* (Figure 2.5) grâce aux informations de la publication originale (Suarez *et al.*, 1997), aux séquences partielles disponibles dans les banques de données (entrées AJ251329 et M26832), et à la séquence du vecteur pBSL202 (Alexeyev *et al.*, 1995, communication personnelle). En bref, le fragment d'ADN *XhoI-EcoRI* de 777 pb contient le site de fixation ribosomal *atpE* de *E. coli* et le gène *gfp* sans promoteur d'une version modifiée codant pour un variant hautement fluorescent d'une protéine fluorescente verte (GFP, numéro d'accession AJ251329) provenant d'un mutant mini-transposon obtenu par Kunert et collègues (1990). Ce fragment *XhoI-EcoRI* a été joint au fragment *EcoRI* contenant le gène *aphA-3* codant pour la résistance à la kanamycine du plasmide pAT187 (entrée M26832), flanqué par une séquence GAATTCG de chaque côté et contenant le site de reconnaissance de l'enzyme *EcoRI*. Cette séquence résulte d'une amplification par PCR de la cassette de résistance à la kanamycine décrit dans la publication de Suarez *et al.* (1997). Cependant, l'amorce "sens" (CCTTAAGGTTGGGGTATCTTTAAATACT) décrite par les auteurs pour la PCR est erronée, car elle ne contient aucun site *EcoRI*. Nous pensons que la séquence oligonucléotidique utilisée pour cette PCR était probablement GGAATTCGTTGGGGTATCTTTAAATACT, séquence qui contient les sites *EcoRI* requis ainsi que l'extrémité 5' de la séquence cible pour l'amplification par PCR. Les séquences ne diffèrent de la publication qu'au niveau de la position soulignée. Après amplification, le fragment digéré par *EcoRI* est inséré dans le plasmide patpEGFP42 pour produire pAG108.

La séquence résultant de cet assemblage est transformée en fragment *KpnI* par les amorces décrites dans Suarez *et al.* (1997), et ensuite amplifiée dans le plasmide pAG108 dérivé de Bluescript pour être clonée dans le plasmide pBSL202. L'amorce "sens" GGGGTACCCCGCTCGAGTAATTTACCAA permet de supprimer le site *EcoRI* localisé en amont du site *XhoI* dans pAG408, tout en conservant le site *KpnI* (souligné) ; l'amorce "antisens" GGGGTACCCCGCTTTTGTAGACATCTAAATC introduit le site *KpnI* requis,

tout en délétant le site *EcoRI* de cette région de la séquence de pAG108. Il en résulte un fragment *KpnI* de 1664 pb (de 5' à 3' : le site de liaison ribosomal du gène *atpE*, le gène *gfp* sans promoteur et le gène *aphA-3*) qui est inséré dans le site unique du vecteur pBSL202 (Alexeyev *et al.*, 1995). Il est à noter que la séquence utilisée pour pBSL202 est d'une longueur de 4,6 kb, comparé à celle de 4,1 kb donnée dans la publication originale (Alexeyev *et al.*, 1995). Cette taille plus grande est en accord avec la valeur expérimentale observée de 6,2 kb pour pAG408, contrairement à celle de 5,7 kb indiquée par Suarez *et al.* (1997). L'origine de cette différence de taille significative de 0,5 kb est toutefois inconnue.

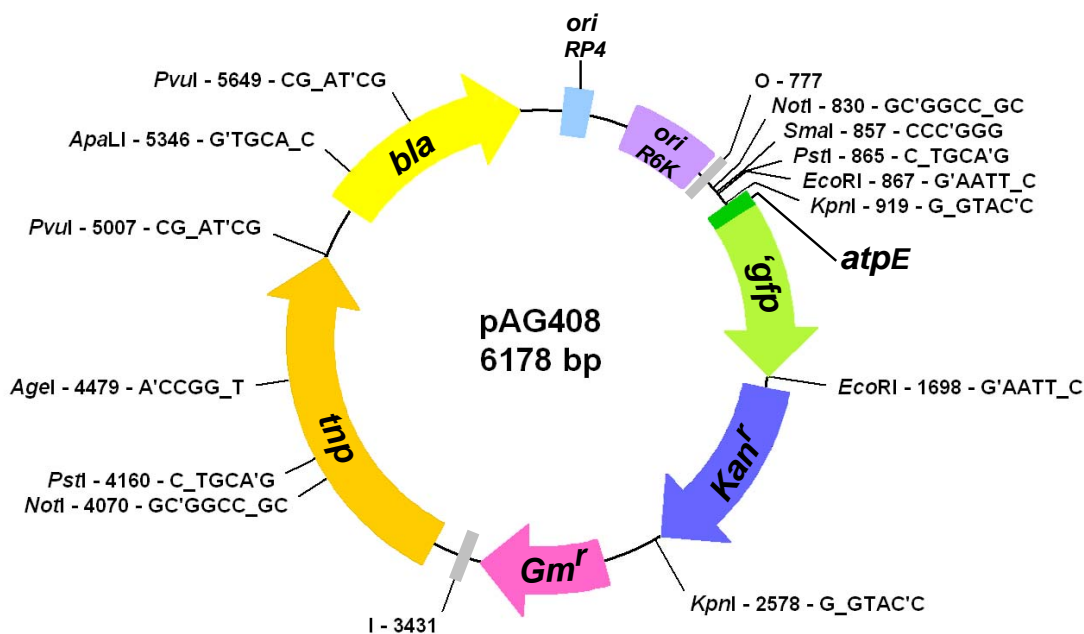


FIGURE 2.5 - Représentation schématique du plasmide pAG408 après reconstruction.

bla, gène codant pour la β-lactamase (N°accession U35129) ; *oriT RP4*, origine de transfert ; *ori R6K*, origine de répllication ; *I* et *O*, bornes du mini-transposon (N°accession U32991) ; *gfp*, gène codant pour la GFP (Green Fluorescent Protein, (N°accession AJ251839) ; *Kan^R* (*aphA-3*), gène codant pour la résistance à la kanamycine (N°accession M26832) ; *Gm^R*, gène codant pour la résistance à la gentamycine (N°accession U35129) ; *tnp*, transposase du mini-Tn5 (N°accession U73849).

La séquence obtenue du plasmide pAG408 a ensuite été vérifiée expérimentalement par analyse de restriction à l'aide de différentes enzymes de restriction (Figure 2.6). Ceci a confirmé que l'ensemble des données de la séquence obtenue est correct.

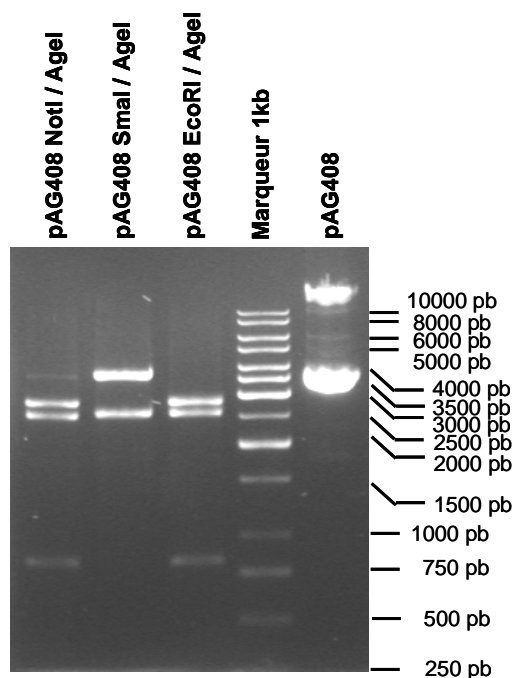


FIGURE 2.6 – Exemple de gel électrophorétique du plasmide pAG408 digéré par les enzymes NotI, AgeI et EcoRI (Bandes attendues : NotI et AgeI : 3213 pb, 2529 pb et 409 pb ; SmaI et AgeI : 3622 pb et 2556 pb ; EcoRI et AgeI : 2781 pb et 2566 pb et 831 pb).

4. ANALYSE DES SITES D'INSERTION DU MINI-TRANSPONON

Différentes techniques ont été utilisées afin de tenter de localiser et de caractériser le site d'insertion du mini-Tn5. Tout d'abord le clonage, qui est la méthode la plus souvent utilisée afin d'aboutir au séquençage de la région d'insertion du mini transposon. Deux méthodes basées sur l'amplification directe par PCR des régions flanquant le mini-transposon ont également été mises en place.

4.1. Méthode de clonage

La séquence assemblée du plasmide pAG408 a été analysée pour identifier les sites de restriction utilisables pour le clonage et l'amplification des régions contenant le mini-

transposon des mutants d'intérêt de la souche DM4. De telles enzymes doivent présenter une fréquence de coupure importante dans le génome de *Methylobacterium dichloromethanicum* DM4 afin d'obtenir des fragments d'ADN de taille relativement réduite et donc plus faciles à cloner. Toutefois, ces enzymes ne devront pas couper la séquence de 2,7 kb entre les bornes O et I du mini-transposon (position de 777 à 3450 de pAG408, Figure 2.5). Par ailleurs, ces enzymes devraient de préférence générer des extrémités cohésives après digestion. Enfin, le choix du vecteur dans lequel les fragments recherchés seront clonés est également important. De fait, les vecteurs typiquement utilisés en clonage ne présentent que rarement un site unique de clonage correspondant aux enzymes adaptées pour la souche DM4 (Tableau 2.2).

Dans le cas du clonage, l'ADN génomique des mutants d'intérêt et le vecteur de clonage sont digérés par les enzymes de restriction choisies. A la suite de cette analyse *in silico*, une série de clonages a été réalisée avec l'enzyme de restriction *AgeI* (séquence A/CCGG_T). Cette enzyme ne coupe pas à l'intérieur de la région du mini-transposon Tn5. De plus, elle présente une fréquence de coupure importante (3148) pour DM4 qui génère de petits fragments (2 kb), théoriquement plus faciles à cloner. Cependant, le vecteur pBluescript ne comporte aucun site de restriction correspondant à cette enzyme. Par contre, l'enzyme *AvaI* (C/YCGR_G) permet d'obtenir des extrémités compatibles dans le but d'une ligation avec les fragments d'ADN génomiques digéré par *AgeI*. Or, le plasmide Bluescript pBLS-TKS(II)+ (Ichihara et Kurosawa, 1993) possède 2 sites de restriction de l'enzyme *AvaI*, localisés en position 695 et 780, dont un site génère des extrémités cohésives identiques à celles produites par *AgeI*. En revanche, le site en position 780 chevauche un site *XhoI*. Le plasmide a donc été modifié par destruction du site *XhoI* pour obtenir un plasmide avec un site unique *AvaI*. Pour ce faire, le plasmide Bluescript TSK+ a été digéré par *XhoI*. La polymérisation des extrémités cohésives générées par l'enzyme *XhoI*, permet d'obtenir des extrémités à bout francs. Le plasmide à bout francs est recircularisé par ligation. Un dérivé du plasmide pBluescript (pME8408) ne possédant qu'un seul site de restriction *AvaI*, pour le clonage de fragments digérés par *AgeI* ou *AvaI*, a ainsi été obtenu.

TABLEAU 2.2 – Liste des enzymes de restriction utilisables pour la caractérisation des mutants.

Enzyme de restriction	Site de reconnaissance	Fréquence de coupure / génome de DM4	Taille moyenne des fragments dans DM4 (kbp)	Fragment du minitransposon (kbp)	Unique site de clonage dans pBluescript
<i>A. Fragments de mutants contenant le mini-transposon dans son intégrité (O-end à I-end)</i>					
<i>Age</i> I	ACCGGT	3148	2.0	2.7	<i>Ava</i> I (construction pME8408 avec un site unique <i>Ava</i> I)
<i>Bsp</i> EI	TCCGGA	4076	1.5	2.7	<i>Ava</i> I (construction pME8408 avec un site unique <i>Ava</i> I)
<i>Bss</i> HII	GCGCGC	21394	0.3	2.7	<i>Bss</i> HII (MCS : 2 sites)
<i>Nar</i> I	GGCGCC	20854	0.3	2.7	<i>Cla</i> I
<i>Pvu</i> II	CAGCTG	1344	4.6	2.7	<i>Pvu</i> II (dans le gène <i>lacZ</i>)
<i>B. Fragments de mutants contenant seulement le côté I-end du mini-transposon minitransposon</i>					
<i>Apa</i> I	GGGCCC	4246	1.5	2.6	<i>Apa</i> I
<i>Bam</i> HI	GGATCC	2564	2.4	2.0	<i>Bam</i> HI
<i>Cla</i> I	ATCGAT	4004	1.5	2.6	<i>Cla</i> I
<i>Eag</i> I	CGGCCG	27878	0.2	2.6	<i>Eag</i> I
<i>Eco</i> RI	GAATTC	1884	3.2	1.8	<i>Eco</i> RI
<i>Hin</i> dIII	AAGCTT	1312	4.7	2.6	<i>Hind</i> III
<i>Not</i> I	GCGGCCGC	2340	2.6	2.6	<i>Not</i> I
<i>Pst</i> I	CTGCAG	952	6.5	2.6	<i>Pst</i> I
<i>Sac</i> I	GAGCTC	2158	2.9	1.8	<i>Sac</i> I
<i>Sal</i> I	GTCGAC	4066	1.5	1.9	<i>Sal</i> I
<i>Xba</i> I	TCTAGA	1104	5.6	2.6	<i>Xba</i> I
<i>Xho</i> I	CTCGAG	3084	2.0	2.0	<i>Xho</i> I

Dans une expérience préliminaire, réalisée avec l'enzyme *Pst*I (obtention de la séquence du côté de la borne I du mini-Tn5), le clonage a permis d'identifier la région flanquant le mini-transposon de 4 mutants qui présentent une importante fluorescence sur le dichlorométhane, le méthanol et le succinate au cours des deux premiers criblages. Le mutant 26F12 a été interrompu au niveau du gène codant pour une protéine membranaire de fonction inconnue (METDI4743) qui est retrouvée chez la souche AM1 (95% d'identité). Chez les mutants 4C6 et 6A10, le mini-Tn5 s'est respectivement inséré dans les gènes METDI1402 qui code pour un transporteur Pb/Cd/Zn/Hg, et METDI1422 qui code pour une protéine hypothétique conservée, qui ne sont toutefois pas présents chez AM1. Le site d'insertion chez le mutant 4D6 correspond à la région intergénique localisée entre METDI_5S_5 et METDI_23S_5. Ce mutant a donc une intensité de fluorescence qui est exprimée constitutivement et pourra être utile pour des expériences de contrôle ou de suivi.

4.2. Méthodes d'amplification par PCR

Deux stratégies complémentaires pour l'identification du site d'insertion basées sur l'amplification directe par PCR ont été utilisées. Ce type d'approche permet de s'affranchir de nombreuses étapes par rapport au clonage et apporte ainsi potentiellement un important gain de temps. La PCR inverse ou I-PCR consiste à circulariser sur eux-mêmes les fragments d'ADN préalablement digérés de mutants sélectionnés (Ochman *et al.*, 1988). Les régions flanquant le mini-transposon sont amplifiées par PCR en utilisant les bornes du transposon comme amorces. Trois couples d'amorces (pAGO / pAGI, Oout / Iout et Oend / Iend) ont été testées (Figure M.3; Matériel et méthodes, paragraphe 11.1). Cette méthode n'a pas donné de résultats concluants pour l'identification de site d'insertion et donne de nombreuses amplifications non spécifiques. Une autre stratégie a donc été mise en oeuvre.

La méthode proposée par Kwon et Ricke (2000) fait intervenir une étape de ligation entre l'ADN génomique et un " linker " Y, appelé ainsi en raison de sa forme. Une PCR avec deux amorces spécifiques, une au mini-transposon (Iout ou Oout) et l'autre au linker Y (Y linker), permet d'amplifier la région d'insertion du mini-transposon (Figure M.4, matériels et méthodes, paragraphe 11.2). Cette approche a l'avantage d'obtenir une amplification plus

spécifique qu'avec la PCR inverse. De plus, les fragments à identifier sont de taille plus petite et donc plus faciles à amplifier.

Cette stratégie a permis d'amplifier spécifiquement le site d'insertion du mini-transposon à partir du couple d'amorces Y / Iout. Cependant, cette méthode doit encore être optimisée notamment avec le couple d'amorces Y / Oout qui n'a pas encore donné de résultat (Figure 2.7).

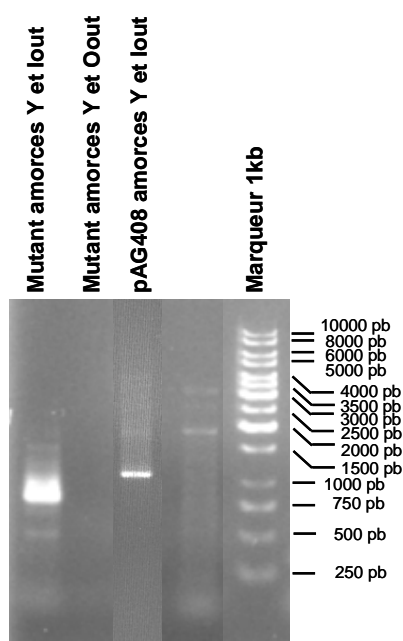


FIGURE 2.7 – Amplification du site d'insertion du mini-transposon d'un mutant et du pAG408 (taille attendue de 1048 pb).

Ces différentes méthodes nécessitent encore différentes optimisations. Elles permettront alors d'identifier la région d'insertion du mini-transposon des mutants d'intérêt présentant une fluorescence induite par le dichlorométhane d'autant plus facilement que les séquences génomiques de plusieurs espèces de *Methylobacterium* sont désormais disponibles. *In fine*, l'ensemble de ces méthodes devrait nous permettre de détecter puis d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans le métabolisme de dégradation du dichlorométhane chez la souche DM4.

3

EXPLORATION GÉNOMIQUE DU GENRE *METHYLOBACTERIUM*

INTRODUCTION

Historiquement, l'anatomie comparée a permis l'élaboration de classifications du monde vivant, qui sont à l'origine des premières théories de l'évolution. Aujourd'hui, l'accumulation en dix ans de séquences complètes de génomes d'un nombre important d'organismes (568 génomes complets publiés, et 2572 projets de séquençage, www.genomesonline.org, mise à jour du 3 juin 2007) permet d'établir l'architecture de leur génome et d'utiliser cette stratégie de comparaison au niveau moléculaire. On parle alors de génomique comparative. Ce type d'analyse repose sur le fait que les génomes d'espèces phylogénétiquement proches présentent une similarité de séquence importante. Ainsi, deux micro-organismes avec un ancêtre commun et proches phylogénétiquement vont tendre à présenter des génomes construits sur des fondations communes, avec différentes spécificités pour chaque souche, en fonction des contraintes propres à leur physiologie ou à l'écosystème où ils se développent.

La souche *Methylobacterium extorquens* AM1 est devenu l'organisme de choix pour la caractérisation du métabolisme méthylotrophe dans le monde microbien (Marx *et al.*, 2005). Le séquençage du génome de cette souche a été entrepris il y a quelques années déjà (Chistoserdova *et al.*, 2003). La souche *Methylobacterium dichloromethanicum* DM4, quant à elle, est étudiée pour sa capacité à pousser sur dichlorométhane (Vuilleumier, 2002). Le séquençage du génome de cette souche a été mené à bien au cours de l'année 2005 au Génoscope. Une première annotation automatique de la séquence complètement assemblée a été obtenue en janvier 2006. Ce nouveau développement nous a conduit à nous associer plus étroitement au laboratoire nord-américain de Mary Lidstrom, pour une étude comparative des

génomés de la souche DM4 et de la souche de référence *M. extorquens* AM1. Ce projet de génomique comparative de ces souches permettra d'apporter de nouvelles informations sur leurs différences, et notamment sur les déterminants génétiques de la dégradation du dichlorométhane par la caractérisation des régions spécifiques du génome de la souche DM4.

Par ailleurs, les séquences de six autres génomes de souches de *Methylobacterium*, possédant chacune des caractéristiques physiologiques particulières, viennent d'être obtenues au Joint Genome Institute dans le cadre d'un projet impliquant un large consortium international (<http://www.jgi.doe.gov/sequencing/DOEmicrobes2006.html>) :

- *M. chloromethanicum* CM4 qui utilise un autre méthane chloré toxique, le chlorométhane, comme seule source de carbone et d'énergie, par une voie n'impliquant pas la formation de formaldéhyde,
- *M. extorquens* PA1, capable de coloniser efficacement la phyllosphère d'*Arabidopsis thaliana*,
- *M. nodulans* ORS2060, souche sans pigmentation rouge capable de noduler *Crotalaria*, et d'utiliser de nombreux composés carbonés, dont le benzoate,
- *Methylobacterium* sp. 4-46, souche photosynthétique capable de noduler *Lotononis bainesii*,
- *M. populi* BJ001, endophyte du peuplier *Populus deltoides* x *P. nigra* DN-34,
- *M. radiotolerans* JCM 2831T, souche très résistante aux radiations et capable d'utiliser de nombreux substrats carbonés.

Pour parvenir à une bonne compréhension des informations disponibles sur la structure et l'organisation génétique des souches DM4 et AM1, nous faisons usage d'une plateforme bioinformatique d'annotation de génome, appelée MaGe, mise au point par le Génoscope. Cet outil développé pour l'annotation de génomes bactériens qui propose l'atout original de tenir compte non seulement des rapports d'homologie entre les gènes, mais également de leur environnement génétique, en intégrant la recherche de synténie, notion de plus en plus utilisée pour décrire la conservation de l'ordre des gènes entre deux espèces apparentées (Vallenet *et al.*, 2006). L'interface MaGe intègre également différents outils d'analyse et d'interprétation des séquences.

1. SEQUENÇAGE ET PRÉSENTATION DE L'OUTIL D'ANNOTATION DE GÉNOMES : L'INTERFACE MAGE

Le génome de la souche DM4 a été séquençé avec une couverture de 13x permettant ainsi une bonne qualité de séquence, tout l'ADN étant en théorie bien représenté. Le séquençage a nécessité la mise en œuvre de 3 banques génomiques différentes : une première banque d'inserts de 2 à 3 kb clonés dans un vecteur plasmidique multicopies, une deuxième avec des fragments d'une dizaine de kb dans un vecteur plasmidique à faible nombre de copies et une dernière utilisant des chromosomes artificiels bactériens monocopies (BAC) contenant des fragments de 40 à 50 kb (Tableau 3.1).

TABLEAU 3.1 – Banques génomiques utilisées pour le séquençage.

Banque	Inserts (kb)	Nombre de lectures			Moyenne / lecture (nt)	
		utiles	total	%	lu	utile
pCDNA2.1	3	75028	79968	93,8	988,0	739,2
pCNS	10	24624	27648	89,1	1127,8	700,9
pBBC	~40	12254	13056	93,9	937,7	699,5
Assemblage		111906	120672	92,7	1013.2	726.5

Le séquençage n'est pas un but final, il n'est que la première étape de l'analyse d'un génome. La qualité de l'information issue des génomes dépend de la séquence mais également de l'annotation qui en est faite et des outils dont dispose l'annotateur. Ainsi, le séquençage a été suivi par une phase d'annotation qui consiste à identifier les ORFs ("Open Reading Frames") présentes dans le génome. Cette étape est indispensable afin de pouvoir comparer les ORFs les unes aux autres. L'atelier de génomique comparative du Génoscope a développé un système d'annotation automatique lié à de nombreuses bases de données permettant de stocker les séquences et les résultats d'analyse. Cet outil présente une interface simple, l'interface MaGe, disponible sur internet (<http://www.genoscope.cns.fr/agc/mage>), qui permet ainsi l'annotation simultanée d'un même génome. Ce système permet la détermination des ORFs ainsi que la recherche de similarité entre ces séquences et les séquences d'une banque

de données pour aboutir à une prédiction de fonction. Une validation manuelle de l'annotation est ensuite effectuée en ligne avec MaGe.

Actuellement, plus d'une centaine de génomes ont été annotés ou sont en cours d'annotation grâce à cet outil, qui repose sur trois parties complémentaires qui en font sa force : un regroupement d'outils bioinformatiques, une banque de données "relationnelle" et une interface web graphique (Vallenet *et al.*, 2006).

1.1. Les outils bioinformatiques

La détermination des CDS potentielles (CoDing Sequence, ORFs) est réalisée grâce au logiciel AMIGene qui détermine les phases de lecture ouverte (Bocs *et al.*, 2003). AMIGene est couplé au programme RBSfinder qui permet de déterminer les codons d'initiation. D'autres programmes tels que tRNAscan-SE (qui permet de prédire un gène de tRNA), Rfam (pour prédire d'autres petits ARN) et Petrin (qui détermine les terminaisons rho-indépendantes), ont été ajoutés afin d'affiner les résultats proposés par AMIGene.

Une fois bien identifié, la protéine produite par ce gène théorique est, elle aussi, analysée par une série d'outils bioinformatiques tels que des BlastP contre la banque de séquences non redondantes UniProt (Bairoch *et al.*, 2005). La protéine est alors comparée à des banques de familles, domaines et motifs protéiques comme InterPro et COG pour affiner les résultats (Mulder *et al.*, 2005 ; Natale *et al.*, 2000). Ces informations obtenues, la protéine théorique sera annotée automatiquement par HAMAP ("High Quality Automated and Manual Annotation") aussi précisément que possible. Pour ce qui est des prédictions de structures, d'autres outils sont utilisés comme tmHMM pour identifier les domaines transmembranaires et SignalIP qui, comme son nom l'indique, permet de prédire la présence d'une séquence signal dans la protéine hypothétique. IIMPs (Integral Inner Membrane Proteins) permet également de prédire sa localisation cellulaire.

L'outil le plus original du système MaGe est l'utilisation du contexte génétique du gène. Cet outil n'est pas basé sur une homologie mais sur la synténie (ensemble de gènes

présentant la même organisation locale dans deux organismes). Le principe sous-jacent à cette analyse est le fait que des protéines dont la fonction est associée sont codées par des gènes qui subissent une même pression évolutive. Un outil graphique a également été réalisé afin de visualiser les synténies : Syntonizer (Boyer *et al.*, 2005). Il prend en compte tous les réarrangements chromosomiques connus tels que les inversions, les insertions ou les délétions.

MaGe offre aussi la capacité d'identifier les différentes voies métaboliques possibles de la souche séquencée à partir des numéros EC et des noms des produits des ORFs. Pour cela, MaGe présente des liens vers Biocyc (www.biocyc.org) qui décrit plus de 450 voies métaboliques connues ainsi que les enzymes qui les composent. Il est également connecté au serveur web PHT ("Pathway Hunter Tool") qui permet de rechercher de nouvelles voies à partir des numéros EC et de métabolites finaux. Les voies de méthylothrophie, en cours de caractérisation (Ensign, 2006), n'y figurent pas encore.

1.2. Une base de données relationnelle

MaGe utilise une base de données appelée PkGDB (Prokaryotic Genome DataBase) pour stocker, modifier et accéder à un très grand nombre d'informations. PkGDB est constituée de trois grandes parties : la première comporte les séquences et les données d'annotations, la seconde les outils d'annotation et la troisième les outils de prédiction de fonctions (Vallenet *et al.*, 2006). La PkGDB peut être confrontée à d'autres bases de données spécifiques d'un organisme. Les résultats ainsi obtenus pourront être visualisés par les outils graphiques de MaGe et permettront une meilleure interprétation des données.

1.3. Fonctionnalités de l'interface graphique

La prise en main de l'interface a été axée sur les aspects graphiques et rend ainsi simple d'accès l'annotation par l'utilisateur. La carte du génome est affichée avec les 6 phases ouvertes de lecture et permet une navigation simple et efficace sur le génome de la bactérie étudiée. Sous cette représentation, sont alignées les cartes de synténie des génomes les plus proches, où les gènes co-localisés dans une synténie sont représentés dans une même couleur.

De nombreux outils sont présents sous forme de liens et sont disposés juste en dessous de ces cartes. On y retrouve le logiciel java Artemis (Berriman et Rutherford, 2003) qui permet de chercher des codons d'initiation alternatifs, la possibilité d'extraire les séquences nucléotidiques des parties observées, d'explorer les différents cycles métaboliques à l'aide de BioCyc (Vallenet *et al.*, 2006).

2. CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES DES GÉNOMES DE *METHYLOBACTERIUM*

Le génome de *M. dichloromethanicum* DM4 comprend un chromosome circulaire de 5943769 paires de bases avec 5945 régions codantes (CDS) prédites automatiquement et actuellement en cours d'annotation manuelle, et deux plasmides : l'un de 141 kb et le second de 39 kb (Tableau 3.2). Le génome de *Methylobacterium extorquens* AM1, séquencé en 2003 par l'équipe du Professeur Lidstrom aux Etats-Unis, a été déclaré terminé et assemblé définitivement début 2007 seulement. Il en est sorti deux objets majeurs de 5511322 paires de bases (5345 gènes théoriques) et de 1261460 paires de bases (1373 gènes). En plus de ces deux chromosomes circulaires, la souche AM1 présente trois plasmides dont les tailles sont de 25, 38 et 44 kb.

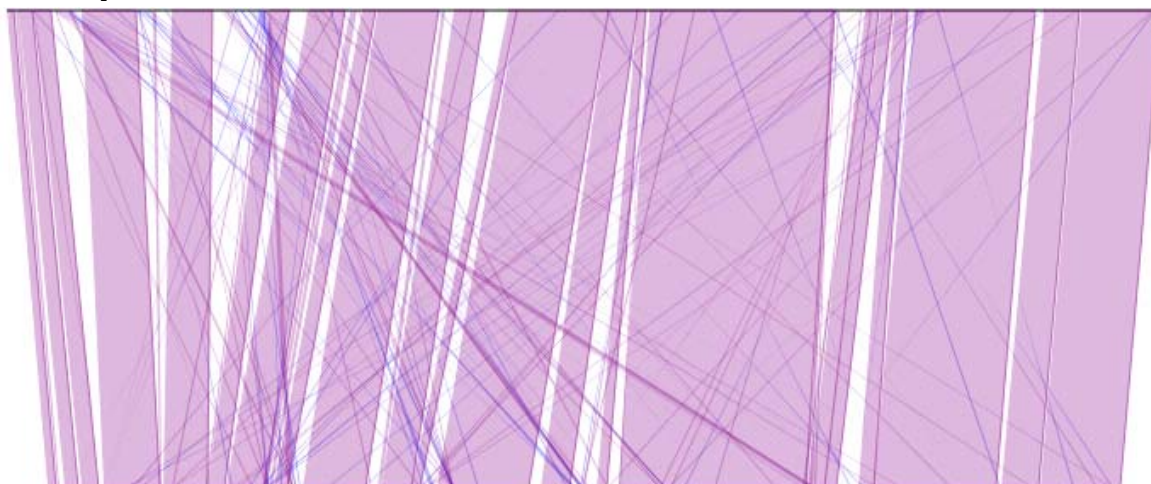
TABLEAU 3.2 – Caractéristiques générales des génomes des souches AM1 et DM4.

		Chromosomes								Plasmides				
		ARNr			ARNt	Taille	% GC	ORFs	% rep	Taille	% GC	ORFs	% rep	
		5S	16S	23S										
DM4	METDI	5	5	5	58	5 943 769	68,09	5923	7,7	p1METDI	141 504	65,32	141	1,34
										p2METDI	38 579	63,74	41	0,00
AM1	META1	5	5	5	57	5 511 322	68,71	5345	8,2	p1META	44 195	67,93	51	0,11
	META2				6	1 261 460	67,93	1373	7,89	p2META	37 858	65,25	45	2,7
										p3META	24 943	66,94	36	0,17

Ces deux souches ont en commun un pourcentage de GC de 68%. Leurs génomes sont extrêmement proches avec 95% d'identité de séquence sur plus de 2/3 de leurs génomes, dont 1057 gènes 100% identiques dans les deux souches. La synténie de ces génomes est

également remarquable. En effet, 80 % des gènes du génome de la souche DM4 appartiennent à des groupes de synténie retrouvés chez la souche AM1 (Figure 3.1).

***Methylobacterium dichlorométhanicum* DM4 chromosome METDI**



***Methylobacterium extorquens* AM1 chromosome META1**

FIGURE 3.1 - Synténie entre le génome de DM4 (en haut, chromosome METDI) et AM1 (en bas, chromosome META1) à l'aide du logiciel Syntonizer. Sont représentées les synténies de 5 gènes et plus sur le même brin (pourpre), sur le brin opposé (bleu).

Au niveau des chromosomes principaux des deux souches (METDI et META1), 70% des CDS sont classées dans au moins un groupe de COG (cluster de groupes orthologues, Natale *et al.*, 2000). Parmi ceux-ci, 24% sont impliqués dans les processus et la signalisation cellulaires, 16% dans le traitement et le stockage de l'information génétique et 41% dans le métabolisme et le transport (Figure 3.2). En l'état actuel, seul 40% des CDS localisées dans le chromosome META2 sont classées dans un groupe de COG, principalement dans le traitement et le stockage de l'information génétique (31%). Il n'apparaît pas pour le moment de différences marquées entre les chromosomes principaux des souches AM1 et DM4.

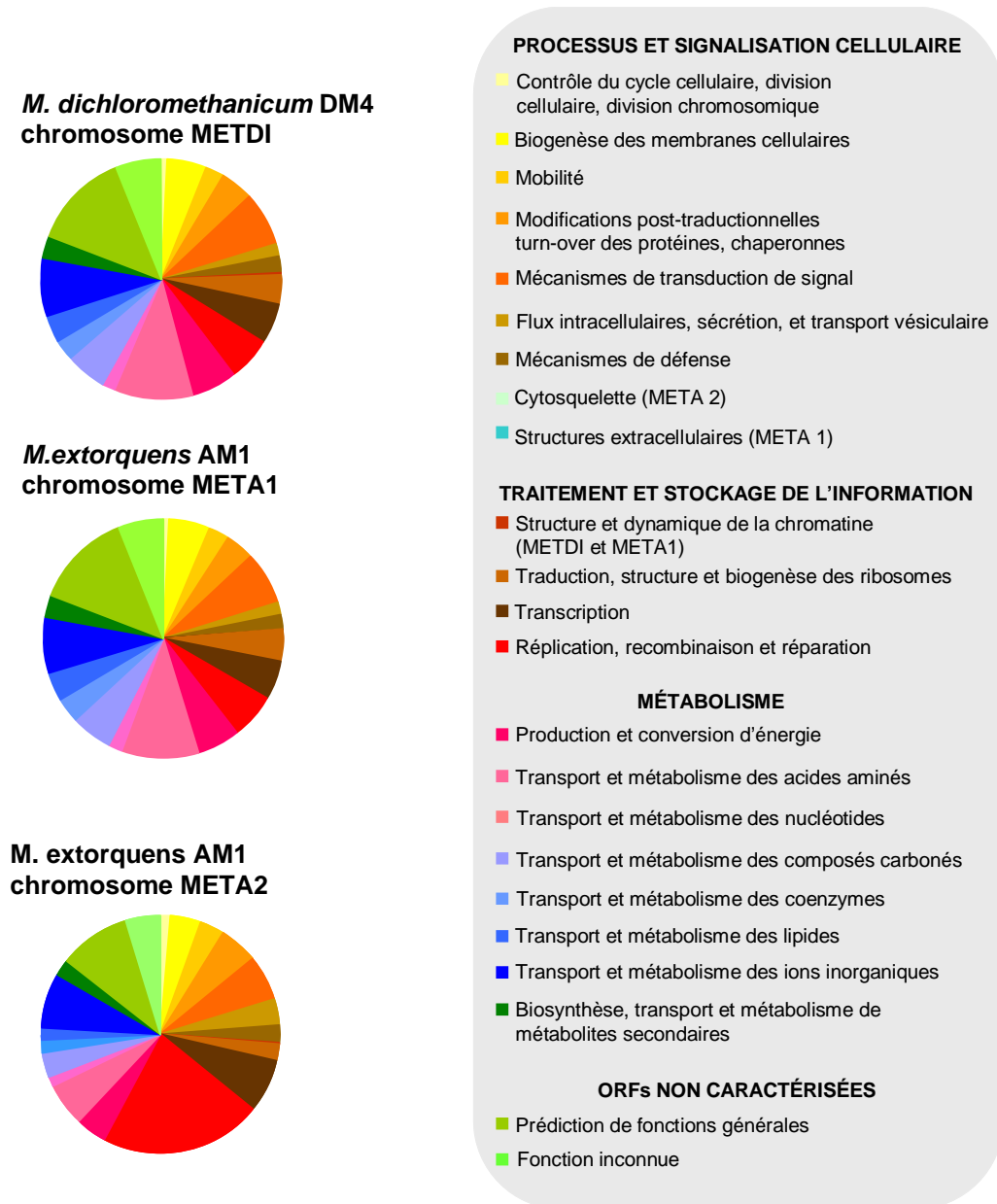


FIGURE 3.2 – Représentation graphique des fonctions attribuées aux ORFs des chromosomes des souches AM1 et DM4 en fonction de leur COG (cluster de groupes orthologues).

D'un point de vue génétique, ces deux souches sont également fascinantes par la plasticité de leur génome qui comprend une importante concentration en éléments mobiles (113 transposases et 30 intégrases pour DM4 ; 102 transposases et 69 intégrases pour AM1, en prédiction automatique) et par la relative instabilité structurale de leurs plasmides (Gälli et Leisinger, 1988). La détection de variations génomiques importantes entre les deux souches suggère une plasticité génomique importante de *Methylobacterium* en réponse aux contraintes

environnementales. Le nombre et la taille des plasmides de ces deux souches varient. Chez la souche DM4, deux plasmides ont été identifiés par séquençage. Des plasmides de taille différente ont toutefois été détectés dans une étude antérieure. Par exemple, dans notre actuelle étude, le plasmide de 8 kb visualisé par Gälli et Leisinger (1988) n'est pas défini par séquençage (Figure 3.4A). Ce plasmide contiendrait des gènes non essentiels à la dégradation du dichlorométhane puisque la souche peut croître sur ce composé même en absence de ce plasmide. Il est également possible que ce plasmide, suite à des réarrangements, se soit intégré ailleurs dans le chromosome ou un plasmide.

Plusieurs régions génomiques paraissent uniques à chaque souche, dont une région de plus de 1 Mb localisée sur le chromosome META2 (1,3 Mb) spécifique à la souche AM1, et plusieurs régions chromosomiques plus courtes spécifiques à la souche DM4, qui pourraient comporter les gènes-clé à l'adaptation dans la déshalogénéation du dichlorométhane. En revanche, les plasmides des deux souches sont entièrement différents. L'analyse détaillée des génomes est encore en cours. Dans le contexte de notre travail, certaines de ces régions ayant un intérêt particulier sont présentées plus spécifiquement ci-dessous.

3. RÉGIONS SPÉCIFIQUES

3.1. Région DCM126

Jusqu'au séquençage du génome de la souche DM4, il était supposé que la région contenant le gène *dcmA*, qui code pour la dichlorométhane déshalogénase, était localisée sur un mégaplasmide de 120 kb (Gälli et Leisinger, 1988). En effet, la perte de ce plasmide se traduit par la perte de la capacité de croître sur le dichlorométhane, suggérant que les gènes *dcmA* et *dcmR* sont localisés sur ce plasmide (Figure 3.4A). Aujourd'hui, les résultats apportés par le séquençage et l'annotation du génome de la souche DM4 ont montré que ces deux gènes sont en fait localisés sur un segment chromosomique de 126 kb unique à DM4 (DCM126, Figure 3.4B), et ancrée dans une région conservée codant pour des gènes impliqués dans le métabolisme en C1 (Figure 3.3). Il est possible que cette séquence de 126 kb comprenant le gène *dcmA* soit un épisode qui serait retrouvé aléatoirement intégré dans le chromosome. S'il est intégré, son locus d'intégration pourrait également varier. L'existence de ce genre de

plasmide a déjà été démontrée dans d'autres espèces (Chain *et al.*, 2006). Toutefois, bon nombre d'études font état de la stabilité de cette région dans DM4 (Schmid-Appert *et al.*, 1997), et semblent infirmer par la même occasion l'existence d'épisomes, du moins pour cette région.

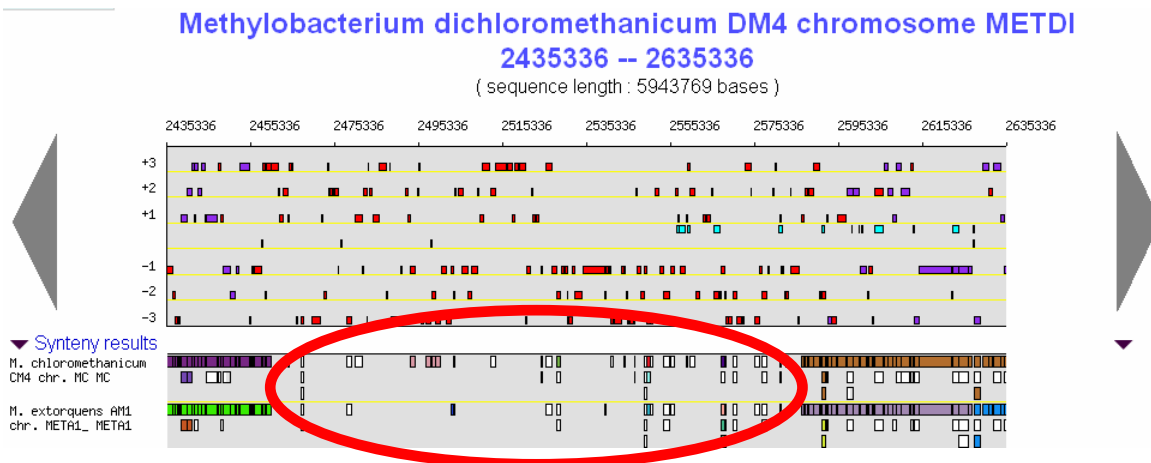


FIGURE 3.3 - Aperçu de la région spécifique de DM4 de 126 kb contenant les gènes *dcmA* et *dcmR* à l'aide de l'interface MaGe. Pour DM4, les 6 phases de lectures sont représentées avec les CDS en cours d'annotation. Pour *Methylobacterium extorquens* (en bas), les gènes homologues à ceux de DM4 sont colorés en vert et violet.

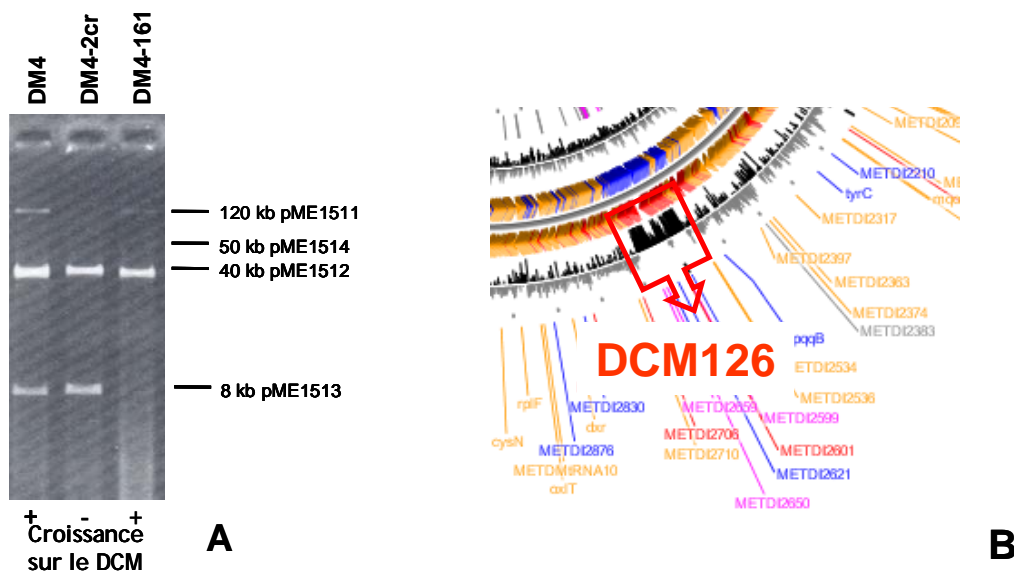


FIGURE 3.4 –Contenu plasmidique des souches DM4, DM4-161 et DM4-2cr, cette dernière ayant perdu la capacité de pousser avec le dichlorométhane (A, Gälli et Leisinger, 1988). Localisation de la région DCM126 sur une zone au contenu GC atypique (B).

Ce fragment de 126 kb interrompt un gène codant pour une chélatase (fragments de gènes METDI2684 et METDI2550). Ce gène est présent en un seul tenant dans la souche AM1 (META1-1797) et la souche CM4 (MC3270), mais il est également interrompu dans la souche PA1 (ME5061 et ME5040) par un segment contenant 20 gènes. Ce gène est également retrouvé chez d'autres organismes, autres que *Methylobacterium*, tel que *Bradyrhizobium japonicum* où il est présent en un seul fragment de même taille que chez la souche AM1, ou encore chez *Brucella melitensis*, *Rickettsia felis*, *Escherichia coli* et *Mesorhizobium loti* où il est séparé en deux fragments par une région de taille variable (91 pb à 49 kb), et *Rickettsia conorii* où il est présent en trois fragments. Cela suggère que ce gène pourrait être un site d'ancrage donnant lieu, parfois, à de nouvelles adaptations.

Le gène *dcmA*, bien qu'essentiel pour la croissance sur un milieu contenant du dichlorométhane, n'est pas pour autant suffisant pour croître sur un tel milieu. En effet, présent sur un plasmide et exprimé dans des souches proches de DM4, le gène *dcmA* peut induire la croissance sur dichlorométhane de *Methylobacterium chloromethanicum* CM4 mais pas de *Methylobacterium extorquens* AM1 (Kayser et al., 2002). La croissance sur dichlorométhane requiert donc d'autres facteurs (notamment les gènes *uvrA* et *polA* dont la fonction de réparation permet de résister à l'alkylation de l'ADN induite par le métabolisme du dichlorométhane, Kayser et al., 2000) en plus de la dichlorométhane déshalogénase. Le contenu de la région DCM126 a donc été étudié en détail.

Dans cette région DCM126, on trouve des gènes codant pour 82 protéines hypothétiques, 15 protéines apparentées à des éléments mobiles telles que des transposases, 3 transporteurs (oxaloacetate / formate ; molybdate ; sulfate). Trois gènes codant pour des GST sont également présents, dont l'un est interrompu par une transposase (~20% des GST totales de l'organisme) ainsi que 11 gènes métaboliques et 14 gènes du métabolisme de l'ADN (restriction / modification ; répliques mais aussi 2 gènes de réparation). Un gène codant pour une protéine UspA-like pouvant intervenir dans la réponse au stress est également retrouvé. Toutefois, cette première analyse de la région DCM126 n'a pas permis de mettre en évidence de gènes particuliers qui pourraient être impliqués dans le métabolisme du dichlorométhane.

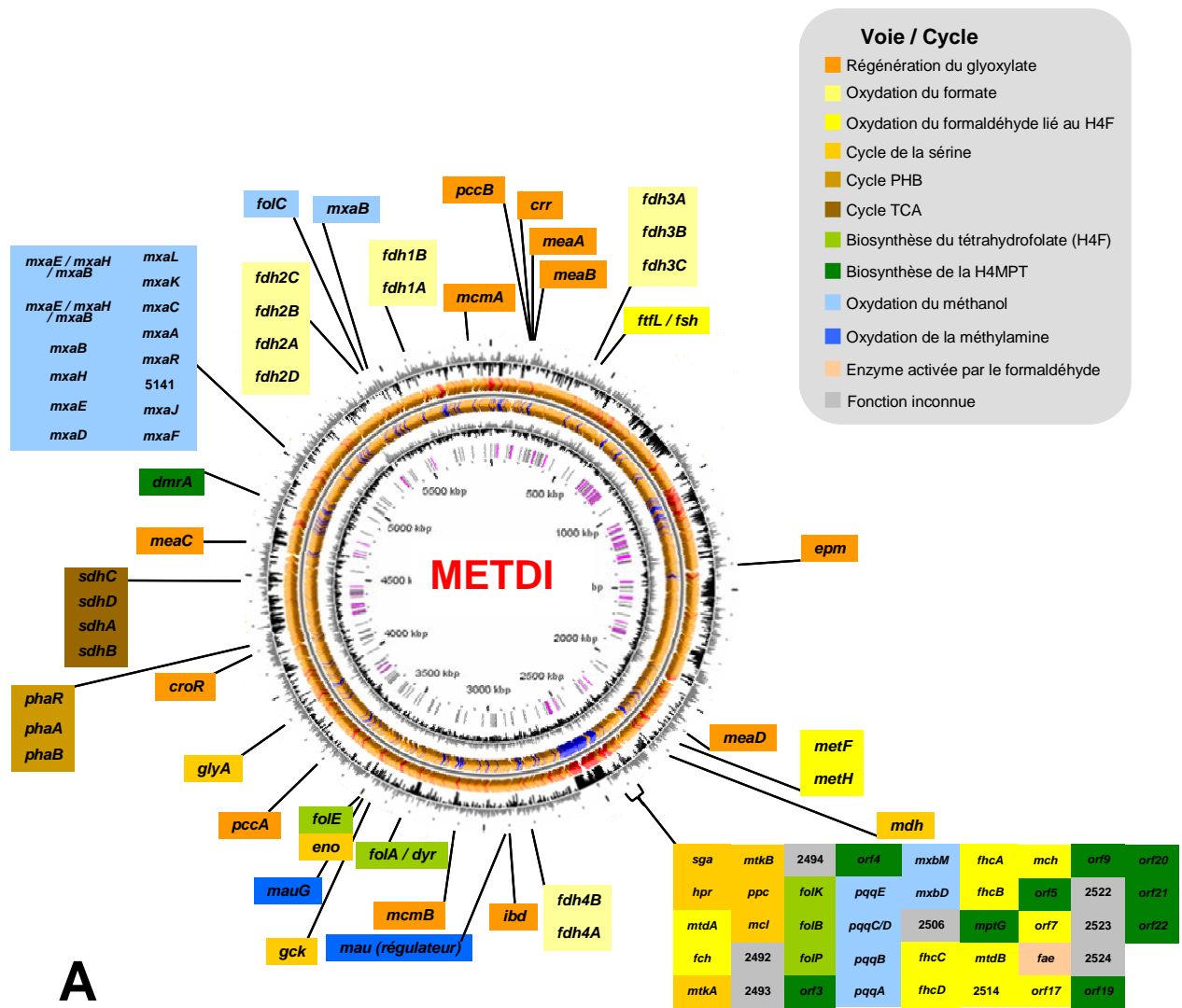
3.2. Gènes communs aux souches DM4 et CM4

L'ajout du gène *dcmA* est suffisant pour induire la croissance de la souche CM4 chlorométhane-dégradante sur le dichlorométhane (Kayser *et al.*, 2002). Une étude globale des gènes communs aux souches CM4 et DM4 qui ne sont pas présents chez la souche AM1 a donc été réalisée. Les génomes de ces deux souches possèdent 292 gènes en communs avec 80% et plus d'identité (sur les 840 gènes identifiés chez DM4 et non chez AM1). Plus des deux tiers codent pour des protéines hypothétiques. On trouve de nombreux régulateurs transcriptionnels (23) et des transporteurs (29) appartenant majoritairement à la famille ABC (dipeptides, sucres, acides aminés), 5 transposases et 5 intégrases, une protéine universelle de stress Usp et une désaturase d'acides gras. Parmi ces gènes résident sans doute quelques clés qui permettront de mieux comprendre la dégradation du dichlorométhane dans le genre *Methylobacterium*.

3.3. Régions de méthylotrophie

La totalité des gènes connus pour être impliqués dans la méthylotrophie, à l'exception notable de ceux impliqués dans l'oxydation de la méthylamine (cf. ci-dessous), respecte la même organisation au sein des génomes des souches AM1 et DM4 (Figure 3.5). A l'heure actuelle, plus d'une centaine de gènes impliqués dans la méthylotrophie ont été localisés, dans un total de huit régions chromosomiques différentes qui contiennent des gènes le plus souvent impliqués dans une même voie métabolique. Ces régions sont appelées "îlots de méthylotrophie" (Chistoserdova *et al.*, 2003). Un de ces îlots d'une taille de 60 kb contient la plupart des gènes impliqués dans les principales réactions du cycle de la sérine, de l'oxydation du formaldéhyde, de la biosynthèse du tétrahydrofolate et de la tétrahydrométhanoptérine. Les gènes impliqués dans l'oxydation du méthanol sont localisés dans trois régions chromosomiques différentes dont cet îlot de 60 kb. Toutefois, de nombreux gènes importants pour la méthylotrophie ne sont pas situés dans ces îlots de méthylotrophie, et laissent donc supposer une plasticité génomique importante au sein de ces deux souches. Ces données sont corroborées par le grand nombre d'éléments génétiques mobiles découverts tant dans *Methylobacterium extorquens* AM1 que dans *Methylobacterium dichloromethanicum* DM4. Les quatre formate déshalogénase non-homologues impliquées dans l'oxydation du formate

forment quatre clusters de gènes répartis dans le chromosome. La totalité des gènes de l'oxydation de la méthylamine sont répartis dans un cluster. Parmi les 13 gènes de l'oxydation de la méthylamine localisés chez les souches AM1, CM4 et *Methylobacillus flagellatus* (Chistoserdova *et al.*, 2007), seul deux gènes sont retrouvés chez la souche DM4. Or, cette souche peut croître sur milieu minimum contenant de la méthylamine comme seule source de carbone (Doronina *et al.*, 2000) laissant supposer qu'elle possède un autre système pour oxyder la méthylamine, qui reste encore à identifier. A noter que la perte de ces gènes a également été observée chez la souche *Methylobacterium extorquens* PA1.



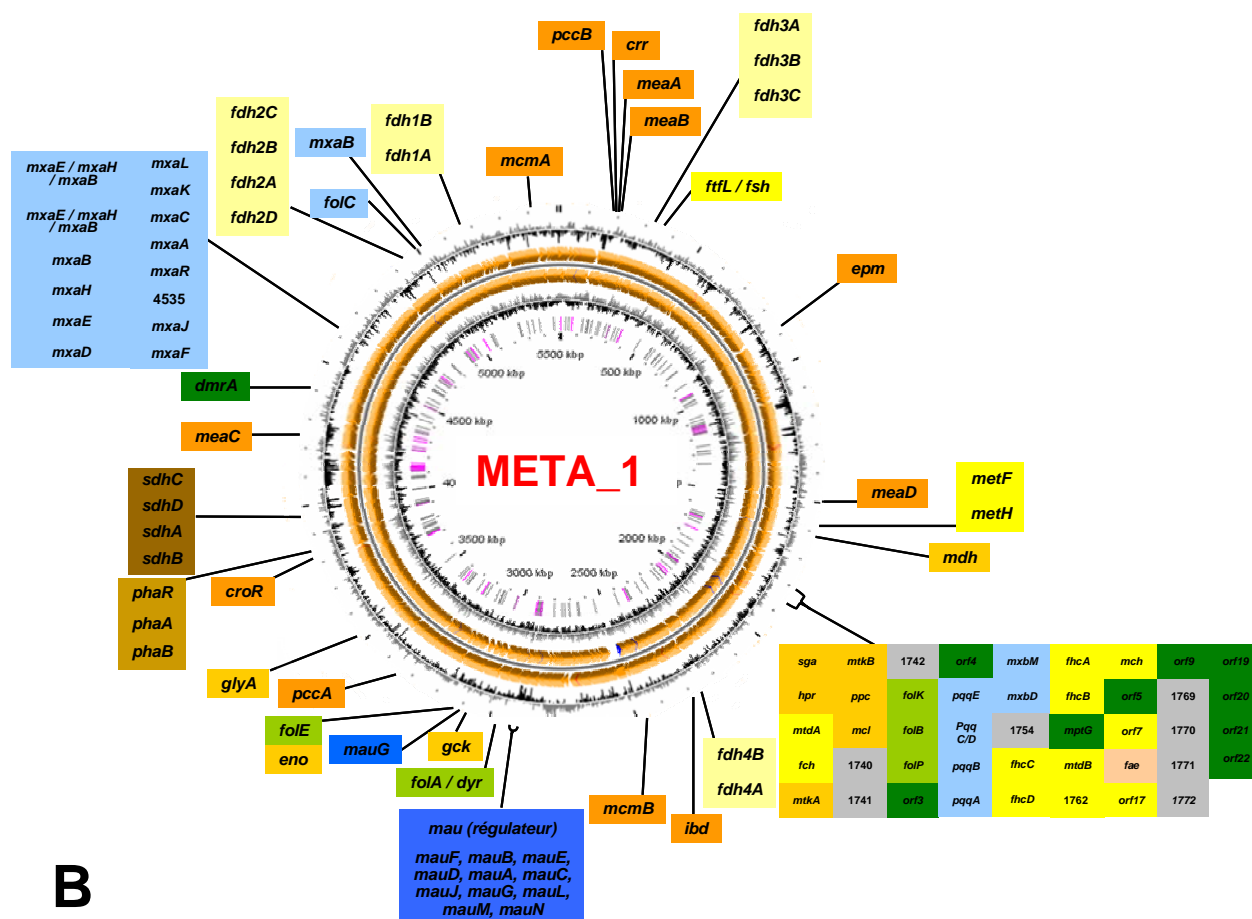


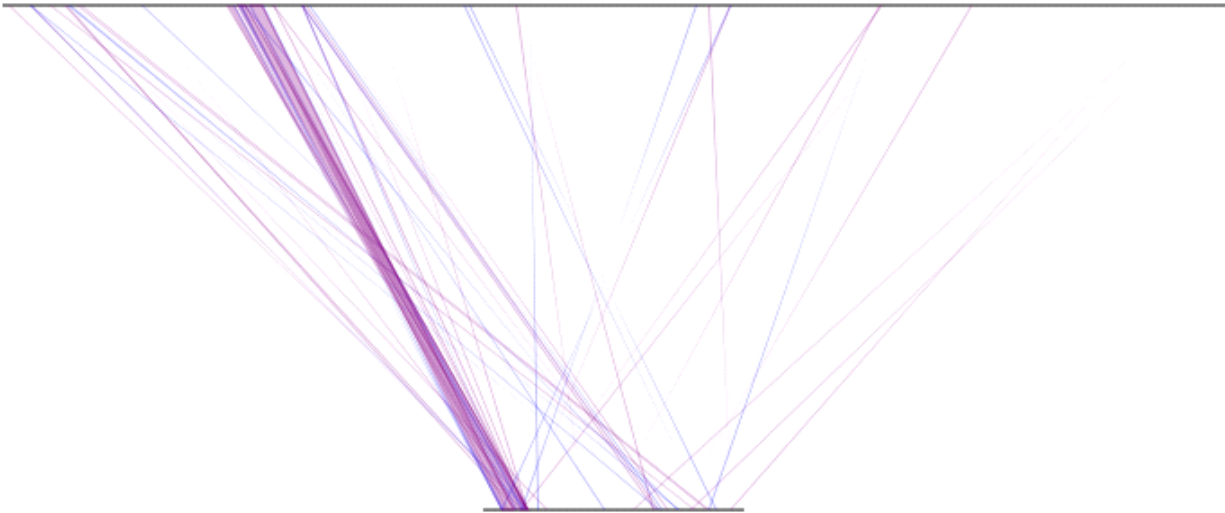
FIGURE 3.5 – Représentation des gènes impliqués dans la méthylotrophie sur le chromosome METDI de la souche DM4 (A) et sur le chromosome META1 de la souche AM1 (B).

3.4. Région de DM4 homologue au chromosome META2

Une région appartenant à un groupe de synténie (META2_0078 à META2_0237) qui représente 12% du chromosome META2, possède une forte homologie avec le chromosome METDI de DM4 (130 gènes avec plus de 95% d'homologie, Figure 3.6). Cette région comporte une trentaine de gènes codant pour des transposase / intégrase, divers transporteurs et pompes à efflux (cuivre, fer, zinc, cobalt, métaux lourds, arsénite) et 6 gènes codant pour des arséniate réductases et leurs régulateurs. La forte homologie de ce groupe de synténie commune au chromosome META2 de la souche AM1 et à celui de la souche DM4 illustre

bien la plasticité des génomes de ces deux souches et les remaniements qui peuvent en résulter.

***Methylobacteriumdichlorométhanicum*DM4 chromosome METDI**



***Methylobacteriumextorquens*AM1 chromosome META2**

FIGURE 3.6 - Synténie entre le génome de DM4 (en haut, chromosome METDI) et AM1 (en bas, chromosome META2) à l'aide du logiciel Syntonizer. Sont représentées les synténies de 5 gènes et plus sur le même brin (pourpre), sur le brin opposé (bleu).

3.5. Gènes impliqués dans l'adaptation à l'acide

Les différents systèmes impliqués dans l'adaptation à l'acide décrits ci-dessus dans le chapitre Introduction ont été recherchés chez les souches DM4 et AM1 (Figure 3.7). Les différents systèmes observés chez *E. coli* (AR1, et AR2 / AR3 pour la décarboxylation d'acides aminés, Richard et Foster, 2003) ne sont pas retrouvés dans les génomes de ces deux souches. Il en est de même pour le gène *cfa* qui joue un rôle dans la modification des membranes chez *E. coli* (Booth *et al.*, 2002 ; Merrell et Camilli, 2002). La présence d'une désaturase d'acide gras chez DM4 et CM4 mais pas chez AM1, suggère que ces deux souches pourraient, comme c'est le cas de certaines bactéries orales, enrichir leurs membranes cellulaires en acides gras mono-insaturés pour permettre aux cellules de mieux résister à l'acide (Fozo *et al.*, 2004 ; Fozo et Quivey, 2004). Il serait intéressant de générer un mutant de

ce gène (par exemple, avec un système de type cre-lox ; Marx et Lidstrom, 2004) et de voir l'effet de la mutation sur la viabilité.

Toutefois, la plupart des gènes pouvant jouer un rôle dans l'acido-tolérance qui ont été trouvés dans le génome de la souche DM4 sont également présents chez AM1. De plus, ils suivent la même organisation dans les deux génomes, à l'exception de trois gènes qui ont été localisés sur le second chromosome de AM1 (META2). Ainsi, les souches AM1 et DM4 possèdent toutes deux une uréase, en trois exemplaires chez AM1 et en quatre exemplaires chez DM4. Dans le système de l'arginine déiminase, seul le gène *argF* qui code pour l'arginine déiminase a été localisé. Les gènes codant pour des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN et les protéines chaperonnes sont présentes dans les deux génomes au même nombre d'exemplaires. DM4 comme AM1 possède également un gène codant pour un canal à chlorure de type CIC.

En résumé, cette première analyse du génome de ces deux souches n'a pas permis de mettre en évidence de gènes particuliers qui seraient uniques à la souche DM4. Cette observation suggère que ce serait plus un système de régulation plus performant que la présence de gènes spécifiques qui permettrait à la souche DM4 de croître sur le dichlorométhane. La découverte d'une vingtaine de gènes impliqués dans la régulation transcriptionnelle qui sont communs aux souches DM4 et CM4 et non à la souche AM1 va dans le même sens. Cependant, une étude plus approfondie de ces génomes ainsi que de nouvelles expérimentations sont nécessaires pour valider cette hypothèse, notamment des études de transcriptomique, déjà mise en place pour ce qui concerne la souche AM1 mais non encore publiées, par l'équipe de Mary Lidstrom aux Etats-Unis.

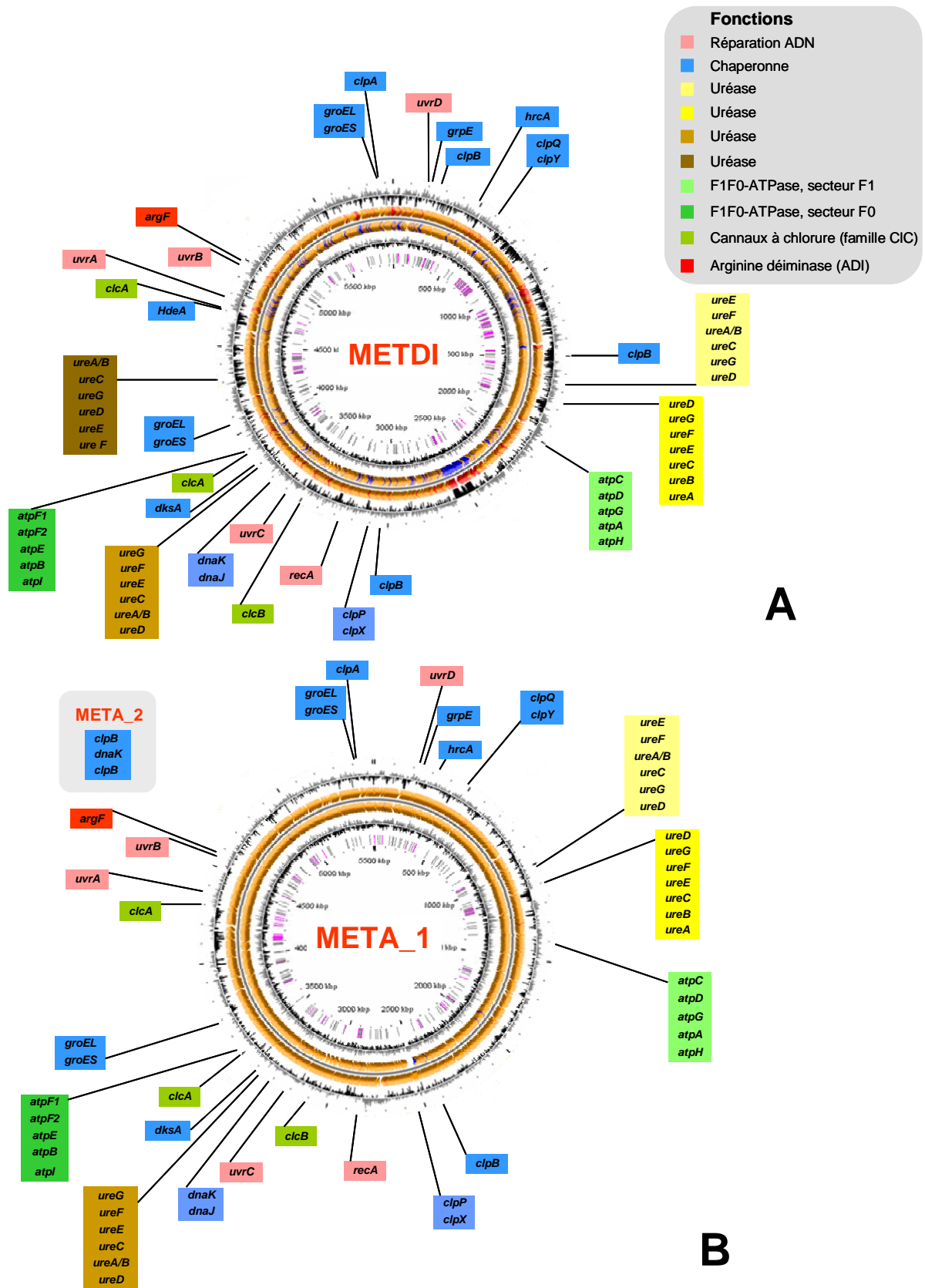


Figure 3.7 - Représentation des gènes impliqués dans l'adaptation à l'acide sur le chromosome METDI de la souche DM4 (A) et sur le chromosome META1 de la souche AM1 (B).

L'exploration fonctionnelle des génomes de ces deux souches appartenants au genre *Methylobacterium* permettra de répondre à de nombreuses questions, concernant autant le métabolisme que l'organisation génomique. La validation de l'annotation automatique est en cours. Dans le contexte du séquençage de 6 autres génomes de souches du genre *Methylobacterium* s'offre ainsi aujourd'hui, en perspective de notre travail, l'étude des bases moléculaires de différentes adaptations physiologiques spécifiques aux polluants au niveau génomique en utilisant des bactéries du genre *Methylobacterium* comme modèle.

C

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Dans notre étude, nous nous sommes attachés à explorer les réponses physiologiques spécifiques de *M. dichloromethanicum* DM4 à l'acide chlorhydrique produit de manière intracellulaire lors de la déchloration du dichlorométhane. Des expériences de viabilité ont été réalisées chez des souches appartenant au genre *Methylobacterium*, après exposition à l'acide. Nos expériences ont été conduites dans des conditions fortement tamponnées limitant les interférences liées à la réponse au stress acide extracellulaire. Ces expériences ont permis de mettre en évidence que le métabolisme du dichlorométhane chez DM4 est associé à une tolérance accrue à l'acide, que ce soit lors d'une exposition à l'acide intracellulaire ou extracellulaire. D'autres expériences ont été menées chez la souche *Methylobacterium chloromethanicum* CM4 qui utilise un autre composé en C1 halogéné, le chlorométhane, comme seule source de carbone et d'énergie. Au cours de la croissance de la souche CM4 sur ce composé, de l'acide chlorhydrique est également produit dans la cellule pour être ensuite expulsé dans le milieu. La souche CM4 ne pousse pas naturellement sur le dichlorométhane, par contre elle peut se développer sur ce composé lorsqu'elle exprime le gène *dcmA* par l'intermédiaire d'un plasmide. Les travaux réalisés chez la souche CM4 ont montré que le métabolisme du dichlorométhane comme celui du chlorométhane s'accompagnent d'une réponse adaptative à l'acide produit.

Ainsi, la génération intracellulaire d'acide chlorhydrique induirait une tolérance à l'acide chez ces deux bactéries du genre *Methylobacterium*. Cependant, l'acido-tolérance induite par le métabolisme du chlorométhane semble moins importante que celle induite par le métabolisme du dichlorométhane. A quantité égale de carbone oxydé pour la croissance, la quantité d'acide produite au cours de la dégradation du chlorométhane est deux fois moins

importante que celle produite par la dégradation du dichlorométhane. Il est donc probable que cette réponse à l'acide soit régulée par la quantité d'acide produite.

Afin de poursuivre l'exploration de la réponse adaptative à l'acide chez *Methylobacterium*, d'autres expériences de viabilité pourraient être également réalisées. Ainsi, il serait intéressant d'observer l'incidence de la densité optique de la culture sur la tolérance à l'acide. Cela permettrait de déterminer si les cellules prélevées en phase stationnaire de croissance sont plus résistantes ou non au stress acide que les cellules prélevées au cours des autres phases de croissance, comme c'est le cas pour *E. coli* par exemple (ATR naturelle, Richard et Foster, 2003). La viabilité de cellules pré-exposées ou cultivées à différents pH acides non létaux, puis soumises à un pH léthal, permettrait également de déterminer si la souche DM4 possède des systèmes d'acido-tolérance dépendant du pH (ATR dépendante du pH). La recherche de protection croisée avec d'autres stress comme le stress thermique ou les sels pourrait également être étudiée.

Au cours de notre étude, une banque de plus de 6000 mutants de la souche DM4 a été construite par transposition d'un élément mobile mini-Tn5 qui contient un gène codant pour une protéine fluorescente délivré par le plasmide suicide pAG408. Les criblages réalisés sur ces mutants ont permis de mettre en évidence 3 mutants intéressants en cours de caractérisation: le mutant 21A3 dont la fluorescence est uniquement induite par le dichlorométhane, le mutant 54B4 où le dichlorométhane réprime l'expression du gène dans lequel le mini-transposon s'est inséré, et le mutant 54H7 qui fluoresce en présence du mélange succinate / chlorométhane mais pas avec le succinate seul. Il serait intéressant de générer un nombre de mutants plus important afin d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans le métabolisme du dichlorométhane, mais aussi dans l'oxydation de la méthylamine. Le système de mutagenèse aléatoire utilisé ici met en jeu un système rapporteur de fluorescence permettant de nombreuses applications pour l'analyse de cellule à cellule. La détection des cellules individuelles exprimant la GFP par cytométrie en flux permettra de sélectionner les cellules d'intérêt qui ne fluorescent que dans une condition choisie (dichlorométhane, méthylamine), en les séparant des autres cellules. Cette technique présente l'avantage de

s'affranchir d'étapes plus ou moins fastidieuses et de tester un nombre plus important de mutants dans un délai de temps plus court.

Notre première analyse des séquences des génomes de ces deux souches, obtenues au cours de notre travail, ainsi que de la souche *Methylobacterium extorquens* AM1 qui ne se développe ni sur le chlorométhane ni sur le dichlorométhane, même en présence du gène *dcmA*, va dans ce sens. En effet, cette analyse n'a pas encore permis d'identifier de gènes particuliers impliqués dans l'acido-tolérance qui seraient présents uniquement dans les souches DM4 et CM4. Cela suggère que ce serait plus un système de régulation plus performant que la présence de gènes spécifiques qui permettrait à la souche DM4 de croître sur le dichlorométhane. Cette hypothèse est appuyée par la découverte d'une vingtaine de gènes impliqués dans la régulation transcriptionnelle qui sont communs aux souches DM4 et CM4 et absents dans la souche AM1.

Dans la suite de notre étude, il serait entre autre intéressant de réaliser des expériences qui consisteraient à construire des mutants où ces gènes de régulation seraient interrompus (par exemple, avec un système de type *cre-lox*). L'objectif serait d'observer l'effet de ces mutations sur la viabilité des souches DM4 et CM4 lors d'une exposition à l'acide. De même, une approche protéomique permettrait d'identifier les protéines dont l'expression est induite ou surexprimée par le métabolisme du dichlorométhane. Cependant, au cours de la croissance de la souche DM4, la dichlorométhane déshalogénase peut représenter jusqu'à 20% des protéines totales présentes dans la cellule, ce qui rend difficile une étude comparative des protéomes de cette souche obtenus sur méthanol et sur dichlorométhane. Il serait donc souhaitable de réaliser cette étude sur des cellules cultivées sur le méthanol à un pH acide non létal, permettant ainsi de repérer les protéines impliquées dans l'adaptation à l'acide. Des analyses sur puces à ADN permettraient d'étudier, les systèmes de régulation liés au métabolisme du dichlorométhane. Ce système est déjà disponible avec le génome de la souche AM1. L'analyse génétique plus poussée de ces régulateurs transcriptionnels permettrait également de mieux connaître leurs fonctions et de voir si ils possèdent un rôle dans l'adaptation à l'acide.

Parmi les gènes trouvés dans les génomes des souches DM4 et CM4 et non dans celui de la souche AM1, un gène codant pour une désaturase d'acides gras a été trouvée. Cette enzyme pourrait intervenir dans la résistance à l'acide, en enrichissant les membranes cellulaires en acides gras mono-insaturés pour permettre aux cellules de mieux résister à l'acide, comme c'est le cas de certaines bactéries orales (Fozo *et al.*, 2004 ; Fozo et Quivey, 2004). Afin de vérifier cette hypothèse, une étude comparative de la composition lipidique des membranes cellulaires de cellules cultivées sur dichlorométhane ou sur méthanol serait également utile pour évaluer cette hypothèse.

L'étude de génomique comparative des souches AM1 et DM4 a également permis de mettre en évidence que la totalité des gènes connus pour être impliqués dans la méthylothrophie, à l'exception notable de ceux impliqués dans l'oxydation de la méthylamine, respecte la même organisation au sein des génomes de ces deux souches. Parmi les 13 gènes de l'oxydation de la méthylamine localisés chez les souches AM1, CM4 et *Methylobacillus flagellatus* (Chistoserdova *et al.*, 2007), seul deux gènes sont retrouvés chez la souche DM4. Or, cette souche peut croître sur milieu minimum contenant de la méthylamine comme seule source de carbone (Doronina *et al.*, 2000) laissant supposer qu'elle possède un autre système pour oxyder la méthylamine, qui reste encore à identifier. La perte de ces gènes a également été constatée au niveau du génome de la souche *Methylobacterium extorquens* PA1. L'obtention de nouveaux mutants de la souche DM4 générés par mutagenèse aléatoire avec le plasmide pAG408, devrait permettre de détecter des mutants dont l'intensité de fluorescence est induite par la méthylamine, et ainsi découvrir des gènes impliqués dans son oxydation.

Plus généralement, notre étude a permis d'apporter des éléments de réponse quant aux questions que nous nous étions posées initialement sur les mécanismes de résistance liés à la déchloration du dichlorométhane. L'étude du stress acide au niveau physiologique a mis en évidence une réponse adaptative à l'acide induite au cours du métabolisme du dichlorométhane chez les souches DM4 et CM4. Une réponse similaire a été observée pour le métabolisme du chlorométhane chez la souche CM4. Les résultats obtenus suggèrent qu'il

s'agirait davantage d'une adaptation à la quantité d'acide produit qu'à la nature du composé qui est déchloré. Bien que les mécanismes mis en jeu dans cette adaptation sont encore inconnus, une première analyse des génomes des souches *M. dichloromethanicum* DM4, *M. extorquens* AM1 et *M. chloromethanicum* CM4 a permis d'orienter le champ de nos recherches vers des mécanismes de régulations transcriptionnels présents dans les souches DM4 et CM4.

Les criblages de la collection de mutants obtenue au cours de ce travail, ont permis de trouver un mutant (21A3) en cours de caractérisation dont le site d'insertion correspondrait à un gène impliqué dans le métabolisme du dichlorométhane. A l'avenir, cette stratégie permettra d'identifier de nouveaux gènes spécifiquement induits au cours de la croissance sur le dichlorométhane.

Lors de l'analyse de génomique comparative des souches appartenant au genre *Methylobacterium*, nous avons également observé un fait intéressant concernant le métabolisme des composés en C1. En effet, cette analyse a montré que les souches DM4 et *M. extorquens* PA1 ne possédaient pas le cluster impliqué dans l'oxydation de la méthylamine, présent chez les autres souches de *Methylobacterium*. Cette observation rend bien compte des réarrangements génomiques et des événements de transfert horizontal de gènes qui ont lieu au sein du genre *Methylobacterium* et souligne l'importance de tels événements dans l'acquisition de nouvelles adaptations. L'acquisition récente de nouvelles séquences de souches *Methylobacterium* permettra une étude plus complète sur ces événements.

R RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Alemayehu D., O'Sullivan E. & S. Condon (2000) Changes in acid tolerance of *Lactococcus lactis* during growth at constant pH. *International Journal of Food Microbiology* **55**: 215-221.

Alexeyev M. F., Shokolenko I. N. & Croughan T. P. (1995) New mini-Tn5 derivatives for insertion mutagenesis and genetic engineering in gram-negative bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* **41**: 1053-1055.

Anthony C. (1982) The biochemistry of methylotrophs. *Academic Press*, London.

Bairoch A., Apweiler R., Wu C. H., Barker W. C., Boeckmann B., Ferro S., Gasteiger E., Huang H., Lopez R., Magrane M., Martin M. J., Natale D. A., O'Donovan C., Redaschi N. & Yeh L. S. (2005) The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Research* **33**: D154-D159.

Bang W. & Drake M. A. (2005) Acid adaptation of *Vibrio vulnificus* and subsequent impact on stress tolerance. *Food Microbiology* **22**: 301-309.

Belli W. A. & Marquis R. E. (1991) Adaptation of *Streptococcus mutans* and *Enterococcus hirae* to acid stress in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 1134-1138.

Berriman M. & Rutherford K. (2003) Viewing and annotating sequence data with Artemis. *Brief Bioinform* **4**: 124-132.

Berk P. A., de Jonge R., Zwietering M. H., Abee T. & Kieboom J. (2005) Acid resistance variability among isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Journal of Applied Microbiology* **99**: 859-866.

Blackman A. J., Davies N. W. & Ralph C. E. (1992) Volatile and odorous compounds from the bryozoan *Biflustra perfragilis*. *Biochemical Systematics and Ecology* **20**: 339-342.

Bocs S., Cruveiller S., Vallenet D., Nuel G. & Medigue C. (2003) AMIGene: Annotation of Microbial Genes. *Nucleic Acids Research* **31**: 3723-3726.

Booth I. R. (1985) Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiology Review* **49**: 359-378.

Booth I. R., Cash P. & O'Byrne C. (2002) Sensing and adapting to acid stress. *Antonie Van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* **81**: 33-42.

Boyer F., Morgat A., Labarre L., Pothier J. & Viari A. (2005) Syntons, metabolons and interactons: an exact graph-theoretical approach for exploring neighbourhood between genomic and functional data. *Bioinformatics* **21**: 4209–4215.

Budin-Verneuil A., Maguin E., Auffray Y., Ehrlich Dusko S. & Pichereau V. (2006) Genetic structure and transcriptional analysis of the arginine deiminase (ADI) cluster in *Lactococcus lactis* MG1363. *Canadian Journal of Microbiology* **52**: 617-622.

Butler J. H. (2000) Better budgets for methyl halides? *Nature* **403**: 260-261.

Byers H. K. & Sly L. I. (1993) Toxic effects of dichloromethane on the growth of methanotrophic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* **12**: 35-38.

Cabedo H., Macian F., Villarroya M., Escudero J. C., Martinez-Vicente M., Knecht E. & Armengod M. E. (1999) The *Escherichia coli* trmE (mnmE) gene, involved in tRNA modification, codes for an evolutionarily conserved GTPase with unusual biochemical properties. *EMBO Journal* **18**: 7063-7076.

Canet S., Heyde M., Portalier R. & Laloï P. (2003) Involvement of phospholipids in resistance and adaptation of *Escherichia coli* to acid conditions and to long-term survival. *FEMS Microbiology Letters* **225**: 207-211.

Casadei M. A., Ingram R., Hitchings E., Archer J. & Gaze J. E. (2001) Heat resistance of *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* and *Lactobacillus delbrueckii* in relation to pH and ethanol. *International Journal of Food Microbiology* **63**: 125-134.

Castanie-Cornet M. P., Penfound T. A., Smith D., Elliot J. F. & Foster J. W. (1999) Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **181**: 3525–3535.

Chain P. S. G., Denev V. G., Konstantinidis K. T., Vergez L. M., Agullo L., Reyes, V. L. Hauser L., Cordova M., Gomez L., Gonzalez M., Land M., Lao V., Larimer F., LiPuma J. J., Mahenthiralingam E., Malfatti S. A., Marx C. J., Parnell J. J., Ramette A., Richardson P., Seeger M., Smith D., Spilker T., Sul W. J., Tsoi T. V., Ulrich L. E., Zhulin E. B. & Tiedje J. M. (2006) *Burkholderia xenovorans* LB400 harbors a multi-replicon, 9.73-Mbp genome shaped for versatility. *Proceedings of National Academy of Sciences*, **103**: 15280–15287.

Chen Y. Y., Weaver C. A., Mendelsohn D. R. & Burne R. A. (1998) Transcriptional regulation of the *Streptococcus salivarius* 57.I urease operon. *Journal of Bacteriology* **180**: 5769-5775.

Chistoserdova L. & Lidstrom M. E. (1996) Molecular characterization of a chromosomal region involved in the oxidation of acetyl-CoA to glyoxylate in the isocitrate-lyase-negative methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1. *Microbiology* **142**: 1459-1468.

Chistoserdova L., Vorholt J. A., Thauer R. K., and Lidstrom M. E. (1998) C-1 transfer enzymes and coenzymes linking methylotrophic bacteria and methanogenic archaea. *Science* **281**: 99-102.

- Chistoserdova L., Chen S. W., Lapidus A. & Lidstrom M. E. (2003) Methylotrophy in *Methylobacterium extorquens* AM1 from a genomic point of view. *Journal of Bacteriology* **185**: 2980-2987.
- Chistoserdova L., Lapidus A., Han C., Goodwin L., Saunders L., Brettin T., Tapia R., Gilna P., Lucas S., Richardson P. M. & Lidstrom M. E. (2007) Genome of *Methylobacillus flagellatus*, molecular basis for obligate methylotrophy, and polyphyletic origin of methylotrophy. *Journal of Bacteriology* **189**: 4020-4027.
- Cotter P. D., Emerson N., Gahan C. G. & Hill C. (1999) Identification and disruption of *lisRK*, a genetic locus encoding a two-component signal transduction system involved in stress tolerance and virulence in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology* **181**: 6840-6843.
- Cotter P. D. & Hill C. (2003) Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**: 429-453.
- Davis M. J., Coote P. J. & O'Byrne C. P. (1996) Acid tolerance in *Listeria monocytogenes*: the adaptive acid tolerance response (ATR) and growth-phase-dependent acid resistance. *Microbiology* **142**: 2975-2982.
- Ding Y. & Waldor M. K. (2003) Deletion of a *Vibrio cholerae* CIC channel results in acid sensitivity and enhanced intestinal colonization. *Infection and Immunity* **71**: 4197-200.
- Doronina N. V., Trotsenko Y. A., Tourova T. P., Kuznetsov B. B. & Leisinger T. (2000) *Methylopila helvetica* sp nov and *Methylobacterium dichloromethanicum* sp nov - Novel aerobic facultatively methylotrophic bacteria utilizing dichloromethane. *Systematic and Applied Microbiology* **23**: 210-218.
- Enoki S., Saeki K., Maki K. & Kuwajima K. (2004) Acid denaturation and refolding of green fluorescent protein. *Biochemistry* **43**: 14238-14248.
- Ensign S. A. (2006) Revisiting the glyoxylate cycle : alternate pathways for microbial acetate assimilation. *Molecular Microbiology*, **61**: 274-276.
- Evans G., Ferguson G. P., Booth I. R. & Vuilleumier S. (2000) Growth inhibition of *Escherichia coli* by dichloromethane in cells expressing dichloromethane dehalogenase/glutathione S-transferase. *Microbiology* **146**: 2967-2975.
- Foster J. W. (2004) *Escherichia coli* acid resistance: Tales of an amateur acidophile. *Nature Review Microbiology* **2**: 898-907.
- Fozo E. M. & Quivey R. G. Jr. (2004) Shifts in the membrane fatty acid profile of *Streptococcus mutans* enhance survival in acidic environments. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 929-936.
- Fozo E. M., Kajfasz J. K. & Quivey R. G. Jr. (2004) Low pH-induced membrane fatty acid alterations in oral bacteria. *FEMS Microbiology Letter* **238**: 291-295.

- Frees D., Vogensen F. K. & Ingmer H. (2003) Identification of proteins induced at low pH in *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology* **87**: 293-300.
- Futterer O., Angelov A., Liesegang H., Gottschalk G., Schleper C., Schepers B., Dock C., Antranikian G. & Liebl W. (2004) Genome sequence of *Picrophilus torridus* and its implications for life around pH 0. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**: 9091-9096.
- Gälli R. & Leisinger T. (1985) Specialized bacterial strains for the removal of dichloromethane from industrial waste. *Conservation and Recycling* **8**: 91-100.
- Galli R. & Leisinger T. (1988) Plasmid analysis and cloning of the dichloromethane-utilization genes of *Methylobacterium* sp. DM4. *Journal of general microbiology* **134**: 943-952.
- Gisi D., Leisinger T. & Vuilleumier S. (1999) Enzyme-mediated dichloromethane toxicity and mutagenicity of bacterial and mammalian dichloromethane-active glutathione S-transferases. *Archives of Toxicology* **73**: 71-79.
- Gisi D., Maillard J., Flanagan J. U., Rossjohn J., Chelvanayagam G., Board P. G., Parker M. W., Leisinger T. & Vuilleumier S. (2001) Dichloromethane mediated in vivo selection and functional characterization of rat glutathione S-transferase theta 1-1 variants. *European Journal of Biochemistry* **268**: 4001-4010.
- Green P. N. & Bousfield I. J. (1982) A taxonomic study of some Gram-negative facultatively methylotrophic bacteria. *Journal of General Microbiology* **128**: 623-638.
- Green, P. N. (1992) The genus *Methylobacterium*, p. 2342-2349. In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (eds), *The Prokaryotes*, vol. 3. Springer-Verlag, New York.
- Greenacre E. J. & Brocklehurst T. F. (2006) The acetic acid tolerance response induces cross-protection to salt stress in *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology* **112**: 62-65.
- Ichihara Y. & Kurosawa Y. (1993) Construction of new T vectors for direct cloning of PCR products. *Gene* **130**: 153-154.
- Hanna M. N., Ferguson R. J., Li Y. H. & Cvitkovitch D. G. (2001) *uvrA* is an acid-inducible gene involved in the adaptive response to low pH in *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology* **183**: 5964-5973.
- Hanson R. S. & Hanson T. E. (1996) Methanotrophic bacteria. *Microbiology Reviews* **60**: 439-471.
- Hanson R. S., Tsien H. C., Tsuji K., Brusseau G. A. & Wackett L. P. (1990) Biodegradation of low-molecular-weight halogenated hydrocarbons by methanotrophic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **7**: 273-278.
- Harper D. B. (2000) The global chloromethane cycle: biosynthesis, biodegradation and metabolic role. *Natural Product Reports* **17**: 337-348.

- Hashmi M., Dechert S., Dekant W., & Anders M. W. (1994) Bioactivation of [¹³C]dichloromethane in mouse, rat, and human liver cytosol: [¹³C] nuclear magnetic resonance spectroscopic studies. *Chemical Research in Toxicology* **7**: 291-296.
- Hawley T. S., Telford W. G., Ramezani A. & Hawley R. G. (2001) Four-color flow cytometric detection of retrovirally expressed red, yellow, green, and cyan fluorescent proteins. *Biotechniques* **30**: 1028-1034.
- Hung KF, Byrd JJ, Bose JL, Kaspar CW. (2006) Reduction of acid tolerance by tetracycline in *Escherichia coli* expressing tetA(C) is reversed by cations. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 4472-4474.
- INERIS, Pichard A., Bisson M., Lacroix G., Lefèvre J. P., Magaud H., Strub M. P. & Gillet C. (2003) Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques: le chlorure de méthylène. Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques.
- INERIS, Brignon J. M. (2006) Données technico-économiques sur les substances en France: le dichloromethane. Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques.
- Jayaraman G. C., Penders J. E. & Burne R. A. (1997) Transcriptional analysis of the *Streptococcus mutans* *hrcA*, *grpE* and *dnaK* genes and regulation of expression in response to heat shock and environmental acidification. *Molecular Microbiology* **25**: 329-341.
- Jemth P. & Mannervik B. (1997) Kinetic characterization of recombinant human glutathione transferase T1-1, a polymorphic detoxication enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **348**: 247-254.
- Jobin M. P. (1999) Approches physiologique et moléculaire de la réponse au stress chez *Oenococcus oeni*- Identification de marqueurs spécifiques utilisables dans l'étude de la préparation des levains malolactiques pour l'ensemencement direct des vins. Thèse, Université de Bourgogne, Dijon, pp 59-62.
- Jourand P., Giraud E., Bena G., Sy A., Willems A., Gillis M., Dreyfus B. & de Lajudie P. (2004) *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 2269-2273.
- Kato Y., Asahara M., Arai D., Goto K. & Yokota A. (2005) Reclassification of *Methylobacterium chloromethanicum* and *Methylobacterium dichloromethanicum* as later subjective synonyms of *Methylobacterium extorquens* and of *Methylobacterium lusitanum* as a later subjective synonym of *Methylobacterium rhodesianum*. *Journal of General and Applied Microbiology* **51**: 287-299.
- Kayser M. F., Stumpp M. T. & Vuilleumier S. (2000) DNA polymerase I is essential for growth of *Methylobacterium dichloromethanicum* DM4 with dichloromethane. *Journal of Bacteriology* **182**: 5433-5439.

- Kayser M. F. & Vuilleumier S. (2001) Dehalogenation of dichloromethane by dichloromethane dehalogenase/glutathione S-transferase leads to formation of DNA adducts. *Journal of Bacteriology*, **183**: 5209-5212.
- Kayser M. (2001) Genes and proteins associated with dichloromethane metabolism in *Methylobacterium dichloromethanicum* DM4. Thèse 14417, Swiss Federal Institute of Technology Zürich
- Kayser M. F., Ucurum Z. & Vuilleumier S. (2002) Dichloromethane metabolism and C1 utilization genes in *Methylobacterium* strains. *Microbiology* **148**: 1915-1922.
- Keene W. C., Khalil M. A. K., Erickson D. J., McCulloch A., Graedel T. E., Lobert J. M., Aucott M. L., Gong S. L., Harper D. B., Kleiman G., Midgley P., Moore R. M., Seuzaret C., Sturges W. T., Benkovitz C. M., Koropalov V., Barrie L. A. & Li Y. F. (1999) Composite global emissions of reactive chlorine from anthropogenic and natural sources: Reactive Chlorine Emissions Inventory. *Journal of Geophysical Research-Atmospheres* **104**: 8429-8440.
- Khalil M. A. K., Moore R. M., Harper D. B., Lobert J. M., Erickson D. J., Koropalov V., Sturges W. T. & Keene W. C. (1999) Natural emission of chlorine-containing gases: reactive chlorine emission inventory. *Journal of Geophysical Research* **104**: 8333-8346.
- Kneen M., Farinas J., Li Y. & Verkman A. S. (1998) Green fluorescent protein as a non invasive intracellular pH indicator. *Biophysical Journal* **74**: 1591-1599.
- Kohler-Staub D. & Leisinger T. (1985) Dichloromethane dehalogenase of *Hyphomicrobium* sp. strain DM2. *Journal of Bacteriology* **162**: 676-681.
- Korotkova N., Chistoserdova L. & Lidstrom M. E. (2002a) Poly-beta-hydroxybutyrate biosynthesis in the facultative methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1: Identification and mutation of *gap11*, *gap20*, and *phaR*. *Journal of Bacteriology* **184**: 6174-6181.
- Korotkova N., Chistoserdova L., Kuksa V. & Lidstrom M. E. (2002b) Glyoxylate regeneration pathway in the methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1. *Journal of Bacteriology* **184**: 1750-1758.
- Koutsoumanis K. P., Kendall P. A. & Sofos J. N. (2003) Effect of food processing-related stresses on acid tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 7514-7516.
- Kunert A., Hagemann M. & Erdmann N. (2000) Construction of promoter probe vectors for *Synechocystis* sp. PCC 6803 using the light-emitting reporter systems Gfp and LuxAB. *Journal of Microbiological Methods* **41**: 185-194.
- Kwon Y. M. & Ricke S. C. (2000) Efficient amplification of multiple transposon-flanking sequences. *Journal of Microbiological Methods* **41**: 195-199.

- Kwon Y. M., Park S. Y. & Birkhold S. G. (2000) Induction of resistance of *Salmonella typhimurium* to environmental stresses by exposure to short-chain fatty acids. *Journal of Food Science* **65**: 1037-1040.
- La Roche S. D. & Leisinger T. (1990) Sequence analysis and expression of the bacterial dichloromethane dehalogenase structural gene, a member of the glutathione *S*-transferase supergene family. *Journal of Bacteriology* **172**: 164-171.
- La Roche S. D. & Leisinger T. (1991) Identification of *dcmR*, the regulatory gene governing expression of dichloromethane dehalogenase in *Methylobacterium* sp. DM4. *Journal of Bacteriology* **173**: 6714-6721.
- Laukel M., Rossignol M., Borderies G., Volker U. & Vorholt J. A. (2004) Comparison of the proteome of *Methylobacterium extorquens* AM1 grown under methylotrophic and nonmethylotrophic conditions. *PROTEOMICS* **4**: 1247-1264.
- LCPE, (1993) Liste des substances d'intérêt prioritaire. Rapport d'évaluation. Loi Canadienne sur la Protection de l'Environnement.
- Leisinger T., Bader R., Hermann R., Schmid-Appert M. & Vuilleumier S. (1994) Microbes, enzymes and genes involved in dichloromethane utilization. *Biodegradation* **5**: 237-248.
- Leisinger T. (1996) Biodegradation of chlorinated aliphatic compounds. *Current Opinion in Biotechnology* **7**: 295-300.
- Li Y. H., Hanna M. N., Svensater G., Ellen R. P. & Cvitkovitch D. G. (2001) Cell density modulates acid adaptation in *Streptococcus mutans*: implications for survival in biofilms. *Journal of Bacteriology* **183**: 6875-6884.
- Li Y. H., Lau P. C., Tang N., Svensater G., Ellen R. P. & Cvitkovitch D. G. (2002) Novel two-component regulatory system involved in biofilm formation and acid resistance in *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology* **184**: 6333-6342.
- Lidstrom M. E. (1999) Aerobic methylotrophic prokaryotes. In: *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the microbiological Community* 3rd edn., release 3.7 (Dworkin, M., Ed.). Springer-Verlag, New York..
- Lorca G. L. & Valdez G. F. (2001) A low-pH-inducible, stationary-phase acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus* CRL 639. *Current Microbiology* **42**: 21-25.
- Mägli A., Messmer M. & Leisinger T. (1998) Metabolism of dichloromethane by the strict anaerobe *Dehalobacterium formicoaceticum*. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 646-650.
- Marx C. J. & Lidstrom M. E. (2004) Development of an insertional expression vector system for *Methylobacterium extorquens* AM1 and generation of null mutants lacking *mtdA* and/or *fch*. *Microbiology* **150**: 9-19.

- Marx C. J., Van Dien S. J. & Lidstrom M. E. (2005) Flux analysis uncovers key role of functional redundancy in formaldehyde metabolism. *PLOS Biology* **3**: 244-253.
- McLaggan D., Stephen J. & Booth I. R. (1997) Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Principles of medical biology*, edn. JAI.
- Mercade M., Lindley N. D. & Loubiere P. (2000) Metabolism of *Lactococcus lactis* subsp. cremoris MG 1363 in acid stress conditions. *International Journal of Food Microbiology* **55**: 161-165.
- Merrell D. S. & Camilli A. (2002) Acid tolerance of gastrointestinal pathogens. *Current Opinion in Microbiology* **5**: 51-55.
- Messmer M., Reinhardt S., Wohlfarth G. & Diekert G. (1996) Studies on methyl chloride dehalogenase and O-demethylase in cell extracts of the homoacetogen strain MC based on a newly developed coupled enzyme assay. *Archives of Microbiology*. **165**: 18-25.
- Mulder N. J., Apweiler R., Attwood T. K., Bairoch A., Bateman A., Binns D., Bradley P., Bork P., Bucher P., Cerutti L., Copley R., Courcelle E., Das U., Durbin R., Fleischmann W., Gough J., Haft D., Harte N., Hulo N., Kahn D., Kanapin A., Krestyaninova M., Lonsdale D., Lopez R., Letunic I., Madera M., Maslen J., McDowall J., Mitchell A., Nikolskaya A. N., Orchard S., Pagni M., Ponting C. P., Quevillon E., Selengut J., Sigrist C. J., Silventoinen V., Studholme D. J., Vaughan R. & Wu C. H. (2005) InterPro, progress and status in 2005. *Nucleic Acids Research* **33**: D201-D205.
- Natale D. A., Galperin M. Y., Tatusov R. L. & Koonin E. V. (2000) Using the COG database to improve gene recognition in complete genomes. *Genetica* **108**: 9-17.
- Nicolaidis A. A. & Sargent A. W. (1987) Isolation of methane monooxygenase-deficient mutants from *Methylosinus trichosporium* Ob3b using dichloromethane. *FEMS Microbiology Letters* **41**: 47-52.
- Nieto Peñalver C. G., Morin D., Cantet F., Saurel O., Milon A. & Vorholt J. A. (2006) *Methylobacterium extorquens* AM1 produces a novel type of acyl-homoserine lactone with a double unsaturated side chain under methylotrophic growth conditions. *FEBS Letters* **580**: 561-567.
- Ochman H., Gerber A. S. & Hartl D. L. (1988) Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* **120**: 621-623.
- Ochman H., Ajioka J. W., Garza D. & Hartl D. L. (1990) Inverse polymerase chain reaction. *Biotechnology (N Y)* **8**: 759-760.
- O'Driscoll B., Gahan C. G. & Hill C. (1996) Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 1693-1698.

- Oh D. H. & Marshall D. L. (1996) Monolaurin and acetic acid inactivation of *Listeria monocytogenes* attached to stainless steel. *Journal of Food Protection* **59**: 249-252.
- Omer Z. S., Tombolini R., & Gerhardson B. (2004) Plant colonization by pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria (PPFMs). *FEMS Microbiology Ecology* **46**: 319-326.
- Papadimitriou K., Pratsinis H., Nebe-von-Caron G., Kleetsas D. & Tsakalidou E. (2007) Acid tolerance of *Streptococcus macedonicus* as assessed by flow cytometry and single-cell sorting. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 465-476.
- Pomper B., Vorholt J., Chistoserdova L., Lidstrom M. & Thauer R. K. (1999) A methenyl tetrahydromethanopterin cyclohydrolase and a methenyl tetrahydrofolate cyclohydrolase in *Methylobacterium extorquens* AM1. *European Journal of Biochemistry* **261**: 475-480.
- Richard H. T. & Foster J. W. (2003) Acid resistance in *Escherichia coli*. *Advances in Applied Microbiology* **52**: 167-186.
- Rius N. & Loren J. G. (1998) Buffering capacity and membrane H⁺ conductance of neutrophilic and alkalophilic gram-positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 1344-1349.
- Ropp J. D., Donahue C. J., Wolfgang-Kimball D., Hooley J. J., Chin J. Y., Hoffman R. A., Cuthbertson R. A. & Bauer K. D. (1995) Aequorea green fluorescent protein (GFP) analysis by flow cytometry. *Cytometry* **21**: 309-317.
- Rowbury R. J. (2001) Extracellular sensing components and extracellular induction component alarmones give early warning against stress in *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology* **44**: 215-257.
- Russell J. B. (1991) Resistance of *Streptococcus bovis* to acetic acid at low pH: relationship between intracellular pH and anion accumulation. *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 255-259.
- Russell J. B. (1992) Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. *Journal of Applied Bacteriology* **73**: 363-370.
- Russell J. B. & Diez-Gonzalez F. (1998) The effects of fermentation acids on bacterial growth. *Advances in Microbial Physiology* **39**: 205-234.
- Saito H. & Miura K. I. (1963) Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. *Biochimica et Biophysica Acta* **72**: 619-629.
- Sancar A. (1998) DNA excision repair. *Annual review of biochemistry*. **65**: 43-81.
- Sanger F., Nicklen S. & Coulson A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* **24**: 104-108.

- Schmid-Appert M., Zoller K., Traber H., Vuilleumier S. & Leisinger T. (1997) Association of newly discovered *IS* elements with the dichloromethane utilization genes of methylotrophic bacteria. *Microbiology* **143**: 2557-2567.
- Scholtz R., Wackett L. P., Egli C., Cook A. M. & Leisinger T. (1988) Dichloromethane dehalogenase with improved catalytic activity isolated from a fast-growing dichloromethane-utilizing bacterium. *Journal of Bacteriology* **170**: 5698-5704.
- Schwandner F. M., Seward T. M., Gize A. P., Hall P. A. & Dietrich V. J. (2004) Diffuse emission of organic trace gases from the flank and crater of a quiescent active volcano (Vulcano, Aeolian Islands, Italy). *Journal of Geophysical Research* **109**: D04301.
- Sebastianelli A. & Bruce I. J. (2007) Tn5530 from *Burkholderia cepacia* strain 2a encodes a chloride channel protein essential for the catabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Environmental Microbiology* **9**: 256-265.
- Siegmundfeldt H., Bjorn Rechner K. & Jakobsen M. (2000) Dynamic changes of intracellular pH in individual lactic acid bacterium cells in response to a rapid drop in extracellular pH. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 2330-2335.
- Southern E. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel-electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* **98**: 503-517.
- Stack H. M., Sleator R. D., Bowers M., Hill C. & Gahan C. G. (2005) Role for HtrA in Stress Induction and Virulence Potential in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 4241-4247.
- Starr T. B., Matanoski G., Anders M. W. & Andersen M. E. (2006) Workshop overview: Reassessment of the cancer risk of dichloromethane in humans. *Toxicological Sciences* **91**: 20-28.
- Stortz G. & Hengge-Aronis R. (2000) Bacterial stress response. (eds) ASM Press, Washington, DC p485.
- Stourman N. V., Rose J. H., Vuilleumier S. & Armstrong R. N. (2003) Catalytic mechanism of dichloromethane dehalogenase from *Methylophilus* sp. strain DM11. *Biochemistry* **42**: 11048-11056.
- Studer A., Stupperich E., Vuilleumier S. & Leisinger T. (2001) Chloromethane:tetrahydrofolate methyl transfer by two proteins from *Methylobacterium chloromethanicum* strain CM4. *European Journal of Biochemistry* **268**: 2931-2938.
- Studer A., McAnulla C., Buchele R., Leisinger T. & Vuilleumier S. (2002) Chloromethane-induced genes define a third C-1 utilization pathway in *Methylobacterium chloromethanicum* CM4. *Journal of Bacteriology* **184**: 3476-3484.

- Suarez A., Guttler A., Stratz M., Staendner L. H., Timmis K. N. & Guzman C. A. (1997) Green fluorescent protein-based reporter systems for genetic analysis of bacteria including monocopy applications. *Gene* **196**: 69-74.
- Svensater G., Welin J., Wilkins J. C., Beighton D. & Hamilton I. R. (2001) Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiology Letter* **205**: 139-146.
- Thompson S. A. & Blaser M. J. (1995) Isolation of the *Helicobacter pylori* *recA* gene and involvement of the *recA* region in resistance to low pH. *Infection and Immunity* **63**: 2185-2193.
- Thompson S. A., Latch R. L. & Blaser M. J. (1998) Molecular characterization of the *Helicobacter pylori* *uvrB* gene. *GENE* **209**: 113-122.
- Tourova T. P., Kuznetsov B. B., Doronina N. V. & Trotsenko Y. A. (2001) Phylogenetic analysis of dichloromethane-utilizing aerobic methylobacterial bacteria. *Microbiology (Russian)* **70**: 92-97.
- Trotsenko Y. A. & Doronina N. V. (2003) The biology of methylobacteria capable of degrading halomethanes. *Microbiology* **72**: 121-131.
- Trotsenko Y. A. & Doronina N. V. (2003) The biology of methylobacteria capable of degrading halomethanes. *Microbiology* **72**: 121-131.
- Truglio J. J., Croteau D. L., Skorvaga M., DellaVecchia M. J., Theis K., Mandavilli B. S., Van Houten B. & Kisker C. (2004) Interactions between UvrA and UvrB: the role of UvrB's domain 2 in nucleotide excision repair. *EMBO Journal* **23**: 2498-2509.
- Vallenet D., Labarre L., Rouy Z., Barbe V., Bocs S., Cruveiller S., Lajus A., Pascal G., Scarpelli C. & Medigue C. (2006) MaGe: a microbial genome annotation system supported by synteny results. *Nucleic Acids Research* **34**: 53-65.
- van Aken B., Peres C. M., Doty S. L., Yoon J. M. & Schnoor J. L. (2004) *Methylobacterium populi* sp nov., a novel aerobic, pink-pigmented, facultatively methylobacterial, methane-utilizing bacterium isolated from poplar trees (*Populus deltoides* x *nigra* DN34). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 1191-1196.
- van de Guchte M., Serror P., Chervaux C., Smokvina T., Ehrlich S. D. & Maguin E. (2002) Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **82**: 187-216.
- van Dien S. J., Marx C. J., O'Brien B. N. & Lidstrom M. E. (2003) Genetic characterization of the carotenoid biosynthetic pathway in *Methylobacterium extorquens* AM1 and isolation of a colorless mutant. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 7563-7566.
- Vannelli T., Messmer M., Studer A., Vuilleumier S. & Leisinger T. (1999) A corrinoid-dependent catabolic pathway for growth of a *Methylobacterium* strain with chloromethane. *Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 4615-4620.

- Van Vliet A. H. M., Ernst F. D. & Kusters J. G. (2004) NikR-mediated regulation of *Helicobacter pylori* acid adaptation. *Trends in Microbiology* **12**: 489-494.
- Vorholt J. A., Chistoserdova L., Lidstrom M. E. & Thauer R. K. (1998) The NADP-dependent methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Journal of Bacteriology* **180**: 5351-5356.
- Vorholt J. A., Chistoserdova L., Stolyar S. M., Thauer R. K. & Lidstrom M. E. (1999) Distribution of tetrahydromethanopterin-dependent enzymes in methylotrophic bacteria and phylogeny of methenyl tetrahydromethanopterin cyclohydrolases. *Journal of Bacteriology* **181**: 5750-5757.
- Vorholt J. A., Marx C. J., Lidstrom M. E. & Thauer R. K. (2000) Novel formaldehyde-activating enzyme in *Methylobacterium extorquens* AM1 required for growth on methanol. *Journal of Bacteriology* **182**: 6645-6650.
- Vorholt J. A. (2002) Cofactor-dependent pathways of formaldehyde oxidation in methylotrophic bacteria. *Archives of Microbiology* **178**: 239-249.
- Vuilleumier S. (1997) Bacterial glutathione S-transferases: what are they good for? *Journal of Bacteriology* **179**: 1431-1441.
- Vuilleumier S., Ivos N., Dean M. & Leisinger T. (2001) Sequence variation in dichloromethane dehalogenases/glutathione S-transferases. *Microbiology* **147**: 611-61.
- Vuilleumier S. & Pagni M. (2002) The elusive roles of bacterial glutathione S-transferases: new lessons from genomes. *Applied Microbiology and Biotechnology* **58**: 138-146.
- Vuilleumier S. (2002) Coping with a halogenated one-carbon diet: aerobic dichloromethane-mineralising bacteria. *S. Agathos and W. Reineke (ed), Biotechnology for the environment, Focus on biotechnology series*, vol. 3, Kluwer Academic Publishers BV, Dordrecht, The Netherlands 105-130.
- Wallace P., Hollis D. Weaver R. & Moss C. (1990) Biochemical and chemical characterization of pink-pigmented oxidative bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* . **28**: 689-693.
- Ward N., Larsen O., Sakwa J., Bruseth L., Khouri H., Durkin A. S., Dimitrov G., Jiang L., Scanlan D., Kang K. H., Lewis M., Nelson K. E., Methe B., Wu M., Heidelberg J. F., Paulsen I. T., Fouts D., Ravel J., Tettelin H., Ren Q., Read T., DeBoy R. T., Seshadri R., Salzberg S. L., Jensen H. B., Birkeland N. K., Nelson W. C., Dodson R. J., Grindhaug S. H., Holt I., Eidhammer I., Jonassen I., Vanaken S., Utterback T., Feldblyum T. V., Fraser C. M., Lillehaug J. R., Eisen J. A. (2004) Genomic insights into methanotrophy: the complete genome sequence of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *PLoS Biology* **2**: e303.
- Wen Z. T. & Burne R. A. (2004) LuxS-mediated signaling in *Streptococcus mutans* is involved in regulation of acid and oxidative stress tolerance and biofilm formation. *Journal of Bacteriology* **186**: 2682-2691.

Wheeler J. B., Stourman N. V., Thier R., Dommermuth A., Vuilleumier S., Rose J. A., Armstrong R. N. & Guengerich F. P. (2001) Conjugation of haloalkanes by bacterial and mammalian glutathione transferases: mono- and dihalomethanes. *Chemical Research in Toxicology* **14**: 1118-1127.

Whittington A. T., Vichai V., Webb G. C., Baker R. T., Pearson W. R. & Board P. G. (1999) Gene structure, expression and chromosomal localization of murine Theta class glutathione transferase mGSTT1-1. *Biochemical Journal* **337**: 141-151.

Wohlfarth G. & Diekert G. (1997) Anaerobic dehalogenases. *Current Opinion in Biotechnology* **8**: 290-295.

Wood A. P., Kelly D. P., McDonald I. R., Jordan S. L; Morgan T. D., Khan S., Murrell J. C. & Borodina E. (1998) A novel pink-pigmented facultative methylotroph, *Methylobacterium thiocyanatum* sp. Nov., capable of growth on thiocyanate as sole nitrogen sources. *Archives of Microbiology*. **169**: 148-158.

Yuk H. G. & Marshall D. L. (2004) Adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 to pH Alters Membrane Lipid Composition, Verotoxin Secretion, and Resistance to Simulated Gastric Fluid Acid. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 3500-3505.

Agence de protection environnementale américaine, www.epa.gov

Agence européenne de l'environnement, <http://eper.eea.eu.int/eper/>.

Interface MaGe du génoscope, <http://www.genoscope.cns.fr/agc/mage>

www.biocyc.org

www.genomesonline.org

A ANNEXES

TABLEAU A.0 - Exemple de tableau rassemblant les résultats obtenus pour une seule courbe au cours d'une expérience. Chaque point obtenu au cours d'une expérience représente la moyenne de 6 gouttes. Exemple de résultats obtenus pour la résistance à l'acide formique à un pH de 4 de la souche DM4 cultivées sur le DCM et suspendue dans son surnageant de culture. Résultats sur la page <http://meg.u-strasbg.fr/~labo/hourcade-thesis.xls>.

Temps (minutes)	Nombre de UFC / goutte de 5 µL						Dilution	Moyenne des 6 gouttes	UFC / mL / DO=0,126	UFC / mL / DO=1	Moyenne UFC / mL / DO=1
	Goutte 1	Goutte 2	Goutte 3	Goutte 4	Goutte 5	Goutte 6					
0	10	9	14	8	9	10	-4	10,0	2,00E+07	1,6E+08	1,72E+08
	3	0	0	2	2	0	-5	1,2	2,33E+07	1,9E+08	
60	15	15	24	16	19	17	-3	17,7	3,53E+06	2,8E+07	3,23E+07
	1	4	3	3	3	2	-4	2,7	5,33E+06	4,2E+07	
	0	0	0	1	0	0	-5	0,2	3,33E+06	2,6E+07	
120	17	21	23	19	24	17	-2	20,2	4,03E+05	3,2E+06	2,79E+06
	2	4	1	1	0	1	-3	1,5	3,00E+05	2,4E+06	
180	5	5	10	6	6	8	-2	6,7	1,33E+05	1,1E+06	6,61E+05
	1	0	0	0	0	0	-3	0,2	3,33E+04	2,6E+05	
240	14	10	8	22	13	20	-1	21,8	4,35E+04	3,5E+05	2,26E+05
	1	0	0	3	0	0	-2	0,7	1,33E+04	1,1E+05	
300	6	4	7	3	4	3	-1	4,5	9,00E+03	7,1E+04	7,54E+04
	1	2	0	0	0	0	-2	0,5	1,00E+04	7,9E+04	
360	25	23	21	15	19	17	0	20,0	4,00E+03	3,2E+04	1,98E+04
	1	1	0	1	0	0	-1	0,5	1,00E+03	7,9E+03	

TABLEAU A.1 - Valeurs utilisées pour la figure 1.1, représentant la moyenne de deux expériences indépendantes. Acido-tolérance de la souche *M. dichloromethanicum* DM4 cultivée sur le méthanol ou sur le dichlorométhane, après exposition à l'acide à pH 3, pH 4 et pH 5, avec de l'acide formique ou de l'acide chlorhydrique.

Résultats pour HCOOH exprimés en UFC / mL / DO de 1

Temps (minutes)	Cellules cultivées sur MeOH		Cellules cultivées sur DCM	
	pH5	pH4	pH5	pH4
0	1,02E+08	2,00E+08	1,86E+08	2,03E+08
30	1,41E+08	1,29E+08	1,85E+08	1,59E+08
60	1,11E+08	9,31E+06	1,87E+08	5,52E+07
90	1,66E+08	4,57E+06	1,77E+08	4,99E+07
120	1,20E+08	1,69E+05	2,22E+08	1,45E+07
180	1,26E+08	1,08E+03	2,18E+08	7,02E+05
240	6,35E+07		2,47E+08	4,36E+04

Résultats pour HCOOH exprimés en LOG

Temps (minutes)	Cellules cultivées sur MeOH		Cellules cultivées sur DCM	
	pH5	pH4	pH5	pH4
0	0	0	0	0
30	0,042927466	-0,190516983	-0,003485817	-0,105438592
60	-0,063720542	-1,332557146	0,001072928	-0,566160218
90	0,113877739	-1,641079818	-0,022165788	-0,609443451
120	-0,02963348	-3,073953218	0,07674829	-1,146302305
180	-0,007829498	-5,267077817	0,067637943	-2,461705972
240	-0,304460673		0,121641211	-3,668788917

Résultats pour HCl exprimés en UFC / mL / DO de 1

Temps (minutes)	Cellules cultivées sur MeOH			Cellules cultivées sur DCM		
	pH5	pH4	pH3	pH5	pH4	pH3
0	1,01E+08	2,58E+08	3,88E+07	9,38E+07	1,39E+08	9,78E+07
30	2,17E+08	2,61E+08	4,46E+07	1,26E+08	1,43E+08	3,92E+07
60	1,84E+08	1,50E+08	4,40E+07	1,25E+08	1,68E+08	2,63E+07
90	1,45E+08	2,51E+08	1,08E+07	1,49E+08	9,15E+07	5,10E+07
120	2,06E+08	2,23E+08	5,33E+06	1,21E+08	1,60E+08	2,29E+07
180	2,25E+08	1,47E+08	3,61E+05	1,18E+08	1,60E+08	3,41E+07
240	1,19E+08	1,34E+08	1,73E+03	6,25E+08	1,57E+08	4,42E+06

Résultats pour HCl exprimés en LOG

Temps (minutes)	Cellules cultivées sur MeOH			Cellules cultivées sur DCM		
	pH5	pH4	pH3	pH5	pH4	pH3
0	0	0	0	0	0	0
30	0,072550667	0,004935218	0,060371475	-0,09588694	0,01158187	-0,39717114
60	0,081992223	-0,234437877	0,054850964	-0,101026579	0,08178182	-0,56995013
90	0,037788561	-0,012589127	-0,556991034	-0,025305865	-0,18200012	-0,36635048
120	0,109144469	-0,064061101	-0,862205022	-0,116820846	0,06188699	-0,63097658
180	0,15490196	-0,243038049	-2,030524803	-0,127678774	0,06188699	-0,45767952
240	-0,047641634	-0,283996656	-4,351560733	-0,402056575	0,05158703	-1,3446895

TABLEAU A.2 - Valeurs utilisées pour la figure 1.2. Acido-tolérance de la souche *M. dichloromethanicum* DM4 cultivée sur le méthanol ou sur le dichlorométhane, avec ou sans NaCl, après exposition à l'acide formique à pH 4.

Résultats exprimés en UFC / mL / DO de 1

Temps (minutes)	MeOH	MeOH + Chlorure	DCM	DCM + Chlorure
0	1,70E+08	2,06E+08	7,94E+07	3,85E+07
60	1,08E+05	4,49E+04	3,12E+06	2,74E+06
120	1,00E+03	2,01E+02	4,87E+05	4,23E+05
180			2,67E+04	7,44E+05
240			3,46E+03	9,49E+03
300			6,29E+02	1,28E+03
360			1,57E+02	2,56E+02

Résultats exprimés en Log

Temps (minutes)	MeOH	MeOH + Chlorure	DCM	DCM + Chlorure
0	0	0	0	0
60	-3,194462949	-3,661446338	-1,405166373	-1,146707481
120	-5,227886705	-6,010723865	-2,211929684	-1,958607315
180			-3,472842457	-1,713693261
240			-4,360868697	-3,607889535
300			-5,101231387	-4,477121255
360			-5,703291378	-5,176091259

TABLEAU A.3 - Valeurs utilisées pour la figure 1.3, représentant la moyenne de trois expériences indépendantes. Les culots cellulaires de culture de la souche DM4 cultivée sur méthanol ou sur dichlorométhane sont remis en suspension avec les surnageants de culture sur le dichlorométhane ou sur le méthanol ou avec du milieu 100 mM phosphate, ajustés à pH 4 avec de l'acide formique.

Résultats exprimés en UFC / mL / DO de 1

Temps (minutes)	Cellules cultivées sur DCM			Cellules cultivées sur MeOH		
	Milieu minéral	Surnageant MeOH	Surnageant DCM	Milieu minéral	Surnageant MeOH	Surnageant DCM
0	1,90E+08	1,42E+08	1,89E+08	1,36E+08	1,90E+08	1,78E+08
60	1,02E+08	6,70E+07	6,95E+07	2,41E+06	4,17E+06	3,07E+07
120	1,63E+07	1,06E+07	1,05E+07	3,15E+04	1,34E+05	3,25E+06
180	1,95E+06	1,66E+06	1,77E+06	3,49E+03	1,18E+04	7,63E+04
240	4,26E+05	4,49E+05	3,21E+05	7,60E+02	1,72E+02	9,99E+04
300	1,03E+05	1,25E+05	1,26E+05			1,71E+03
360	2,01E+04	6,67E+03	2,30E+04			

Résultats exprimés en Log

Temps (minutes)	Cellules cultivées sur DCM			Cellules cultivées sur MeOH		
	Milieu minéral	Surnageant MeOH	Surnageant DCM	Milieu minéral	Surnageant MeOH	Surnageant DCM
0	0	0	0	0	0	0
60	-0,27280818	-0,32493175	-0,43514695	-1,75014787	-1,65921244	-0,76391405
120	-1,06636966	-1,1242543	-1,25502973	-3,63312282	-3,15145882	-1,73935832
180	-1,98984191	-1,93133105	-2,02972085	-4,58894783	-4,2064251	-3,36897218
240	-2,6496041	-2,49834639	-2,77083969	-5,2511053	-6,04455203	-3,2521599
300	-3,26442699	-3,05535788	-3,17714115			-5,01816105
360	-3,97558063	-4,3271084	-3,91591617			

TABLEAU A.4 - Valeurs utilisées pour la figure 1.4, représentant la moyenne de trois expériences indépendantes. Les culots cellulaires de culture de la souche DM4 cultivée sur méthanol ou sur dichlorométhane sont remis en suspension avec les filtrats congelés de surnageants de culture sur le dichlorométhane ou sur le méthanol ou avec du milieu 100 mM phosphate, ajustés à pH 4 avec de l'acide formique.

Cellules cultivées sur le DCM Résultats exprimés en Log

Temps (min)	milieu frais	Surnageant de culture sur MeOH			Surnageant de culture sur DCM		
		Total	Filtrat	Molécules non filtrées	Total	Filtrat	Molécules non filtrées
0	0	0	0	0	0	0	0
60	-0,88645386	-0,79423807	-0,78683743	-0,88719118	-0,40521886	-0,67560379	-0,59207577
120	-2,29010835	-1,78612018	-1,98313207	-2,01430333	-1,21017719	-1,31658184	-2,1563472
180	-2,93952663	-2,62641934	-2,5810755	-2,69080412	-1,61649296	-2,41689811	-2,8205551
240	-3,6072523	-2,99476747	-2,99289191	-3,04067057	-3,08038595	-3,10295342	-3,3397377
300	-3,89505403	-3,68600503	-3,4696608	-3,60994417	-3,13920591	-3,67251271	-4,03140846
360	-4,99196404	-4,1383027	-4,05007886	-4,19364175	-4,05919665	-4,49951253	-4,59870635

Résultats exprimés en UFC / mL / DO de 1

Temps (min)	milieu frais	Surnageant de culture sur MeOH			Surnageant de culture sur DCM		
		Total	Filtrat	Molécules non filtrées	Total	Filtrat	Molécules non filtrées
0	8,73E+07	9,17E+07	7,40E+07	1,00E+08	1,74E+08	2,09E+08	2,39E+08
60	1,13E+07	1,47E+07	1,21E+07	1,30E+07	6,86E+07	4,40E+07	6,11E+07
120	4,47E+05	1,50E+06	7,69E+05	9,69E+05	1,07E+07	1,01E+07	1,67E+06
180	1,00E+05	2,17E+05	1,94E+05	2,04E+05	4,22E+06	7,99E+05	3,61E+05
240	2,16E+04	9,28E+04	7,52E+04	9,12E+04	1,45E+05	1,65E+05	1,09E+05
300	1,11E+04	1,89E+04	2,51E+04	2,46E+04	1,27E+05	4,43E+04	2,22E+04
360	8,89E+02	6,67E+03	6,59E+03	6,41E+03	1,52E+04	6,60E+03	6,02E+03

Cellules cultivées sur le MeOH Résultats exprimés en Log

Temps (min)	milieu frais	Surnageant de culture sur MeOH			Surnageant de culture sur DCM		
		Total	Filtrat	Molécules non filtrées	Total	Filtrat	Molécules non filtrées
0	0	0	0	0	0	0	0
60	-1,28744573	-1,81687347	-1,8517126	-1,19787003	-1,10895897	-1,62937171	-1,63128132
120	-3,41170311	-4,5733788	-4,21717835	-4,32706736	-3,99E+00	-4,0680066	-3,96131667
180	-5,13706169	-5,50E+00	-5,61465659	-6,16275793		-5,05E+00	-4,86648374
240							-5,6793971
300							
360							

Résultats exprimés en UFC / mL / DO de 1

Temps (min)	Surnageant de culture sur MeOH				Surnageant de culture sur DCM		
	milieu frais	Total	Filtrat	Molécules non filtrées	Total	Filtrat	Molécules non filtrées
0	2,01E+08	1,74E+08	3,02E+08	2,05E+08	1,61E+08	1,88E+08	1,32E+08
60	1,04E+07	2,66E+06	4,24E+06	1,30E+07	1,25E+07	4,42E+06	3,08E+06
120	7,78E+04	4,66E+03	1,83E+04	9,63E+03	1,66E+04	1,61E+04	1,44E+04
180	1,46E+03	5,54E+02	7,33E+02	1,41E+02		1,66E+03	1,79E+03
240							2,75E+02
300							
360							

TABLEAU A.5 - Valeurs utilisées pour la figure 1.5, représentant la moyenne de deux expériences distinctes. Acido-tolérance des souches CM4(pME8221) et DM4-2cr(pME8221) cultivées sur méthanol ou dichlorométhane, après exposition à l'acide formique à pH 4.

Résultats exprimés en UFC / mL / DO de 1

Temps (minutes)	DM4-2cr(pME8221)		CM4(pME8221)	
	MeOH	DCM	MeOH	DCM
0	2,09E+08	2,01E+08	2,47E+08	1,75E+08
60	5,81E+06	7,52E+07	4,75E+07	1,93E+07
120	3,18E+04	1,86E+07	7,24E+05	2,14E+06
180	4,50E+02	7,75E+05	4,57E+03	7,59E+05
240		1,59E+04		2,22E+04
300		2,48E+03		7,79E+03
360		4,78E+02		1,75E+03

Résultats exprimés en Log

Temps (minutes)	DM4-2cr(pME8221)		CM4(pME8221)	
	MeOH	DCM	MeOH	DCM
0	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
60	-1,56E+00	-4,28E-01	-7,16E-01	-9,58E-01
120	-3,82E+00	-1,04E+00	-2,53E+00	-1,91E+00
180	-5,67E+00	-2,41E+00	-4,73E+00	-2,36E+00
240		-4,10E+00		-3,90E+00
300		-4,91E+00		-4,35E+00
360		-5,62E+00		-5,00E+00

TABLEAU A.6 - Valeurs utilisées pour la figure 1.6. Acido-tolérance des souches CM4 et DM4 cultivées sur méthanol, dichlorométhane ou chlorométhane, après exposition à l'acide formique à pH 4.

Résultats exprimés en UFC / mL / DO de 1

Temps (minutes)	CM4		DM4	
	MeOH	CM	MeOH	DCM
0	2,49E+08	2,17E+08	1,36E+08	1,90E+08
60	5,66E+05	2,29E+06	2,41E+06	1,02E+08
120	2,62E+04	1,44E+05	3,15E+04	1,63E+07
180	1,41E+03	2,92E+04	3,49E+03	1,95E+06
240		5,36E+03	7,60E+02	4,26E+05
300		4,12E+03		1,03E+05
360		1,92E+02		2,01E+04

Résultats exprimés en Log

Temps (minutes)	CM4		DM4	
	MeOH	CM	MeOH	DCM
0	0	0	0	0
60	-2,64450893	-1,97823409	-1,75014787	-0,27280818
120	-3,97939719	-3,17800868	-3,63312282	-1,06636966
180	-5,24656892	-3,87125164	-4,58894783	-1,98984191
240		-4,60783783	-5,2511053	-2,6496041
300		-4,7225574		-3,26442699
360		-6,05499586		-3,97558063

TABLEAU A.7 - Valeurs utilisées pour la figure 1.7, représentant la moyenne des données obtenues pour deux mutants représentatifs. Variation de l'intensité de fluorescence de la GFP avec le pH chez des variants fluorescents de la souche DM4 (A7-1), cultivés sur méthanol ou dichlorométhane ou leurs extraits cellulaires obtenus par sonication (A7-2) exposés à différents pH compris entre 2 et 7 avec de l'acide formique ou de l'acide chlorhydrique.

A7-1 : sur cellules bactériennes avant sonication

pH	Cellules cultivées sur le méthanol					Cellules cultivées sur le dichlorométhane				
	0 heure	1 heure	2 heures	3 heures	4 heures	0 heure	1 heure	2 heures	3 heures	4 heures
	2,3	6,3	3,7	3,9	4,1	4,1	6,9	5,8	2,0	2,9
2,4	2,0	-0,6	-0,5	-0,3	-0,3	1,4	0,8	-2,5	-2,9	-1,8
2,4	1,7	-1,0	-0,5	-0,6	-0,6	-0,1	-3,8	-4,1	-4,5	-3,6
2,6	1,8	-0,8	-0,6	-0,9	-0,9	3,4	0,0	-3,6	-4,4	-2,7
2,6	2,3	-0,4	-0,3	-0,1	-0,1	1,6	12,0	8,6	8,1	7,8
2,7	2,1	-0,4	-0,1	-0,2	-0,2	4,9	9,1	6,3	6,1	7,1
2,9	2,8	1,3	1,4	1,7	1,7	2,1	5,3	1,5	0,8	0,8
3,1	4,2	3,8	3,8	4,4	4,6	4,9	6,7	6,7	6,9	6,9
3,4	6,7	8,6	8,7	9,1	10,1	5,3	13,0	12,1	14,6	16,9
3,9	4,4	3,5	4,3	4,0	3,8	9,2	2,8	1,5	1,4	1,8
4,0	8,8	4,2	4,6	4,8	4,8	14,7	3,3	1,6	1,2	2,7
4,2	14,3	2,4	2,8	2,9	3,2	19,9	-0,5	-2,6	-1,4	-0,1
4,5	26,7	4,5	1,7	1,4	1,6	36,3	9,8	4,0	4,1	4,9
5,3	47,5	19,1	6,6	3,5	1,4	64,0	21,2	7,2	3,8	1,3
5,5	63,0	64,9	21,2	15,1	10,1	80,1	68,2	65,2	62,4	60,1
5,7	97,0	93,3	89,0	87,8	83,6	99,2	95,2	90,6	88,0	84,5
5,9	84,2	63,9	51,6	45,9	40,7	104,2	94,8	86,3	84,7	81,8
6,0	60,0	44,5	36,0	33,8	30,2	83,1	74,9	68,5	67,9	68,4
6,0	74,6	59,7	50,9	47,1	44,6	89,5	83,1	75,2	76,0	77,5
6,1	87,1	83,0	78,7	76,1	74,0	89,5	82,9	77,1	76,5	76,6
6,2	93,4	90,6	89,3	87,6	87,3	93,0	84,7	77,7	76,4	77,8
6,3	93,3	90,9	89,1	87,7	88,1	89,9	85,8	80,3	79,9	80,9
6,3	96,3	65,4	91,3	89,0	88,9	94,4	89,9	88,1	85,5	82,6
6,4	110,8	109,0	108,8	107,1	109,1	113,5	107,3	104,5	103,0	100,5
6,4	118,8	116,2	111,9	108,9	101,0	119,7	113,1	107,5	108,0	108,0
6,5	94,2	83,4	73,8	69,2	64,1	101,0	95,3	107,4	108,8	108,9
6,7	105,4	101,9	102,2	100,3	103,8	102,8	96,0	92,6	91,9	96,4
6,9	105,5	102,3	100,3	99,5	98,9	110,4	105,6	101,6	104,1	108,7
7,2	104,3	101,5	102,4	101,3	102,2	108,0	102,9	99,1	100,8	102,6

Acide chlorhydrique

pH	Cellules cultivées sur le méthanol				Cellules cultivées sur le dichlorométhane						
	0 heure	1 heure	2 heures	3 heures	4 heures	0 heure	1 heure	2 heures	3 heures	4 heures	
1,9	14,7	4,2	2,7	2,7	2,6	2,8	16,6	7,1	0,8	-0,5	1,0
2,0	20,4	1,0	0,3	0,3	0,0	-0,1	8,4	-0,1	-4,2	-5,9	-5,3
2,2	30,9	-0,1	-1,1	-1,1	-0,8	-1,0	10,1	3,0	-3,3	-2,7	-2,2
2,3	50,4	1,1	-0,5	-0,7	-0,7	-0,7	32,9	7,5	1,5	0,7	-0,3
2,4	60,1	1,7	0,1	-0,1	0,0	0,0	38,7	7,3	2,6	0,9	0,8
2,5	59,4	1,8	0,4	0,3	0,2	0,2	44,7	7,9	2,2	0,3	0,0
2,6	67,7	2,8	0,8	0,8	0,3	0,0	62,3	10,0	5,2	3,2	3,1
2,7	82,9	5,9	4,0	4,0	2,8	2,8	84,0	20,2	15,0	12,0	11,5
2,7	104,0	23,5	12,5	12,5	8,1	6,1	107,9	33,5	46,2	31,8	23,9
2,8	89,5	55,5	46,4	46,4	40,3	35,2	95,8	77,3	68,4	61,9	54,8
3,0	96,0	70,9	63,6	63,6	58,3	53,2	104,0	87,1	79,7	77,4	76,0
3,0	97,4	82,9	77,3	77,3	72,8	69,5	104,8	91,1	85,1	82,0	80,3
3,1	97,0	82,6	77,1	77,1	73,6	69,5	104,5	90,3	84,8	81,4	80,6
3,2	97,1	84,9	79,8	79,8	76,7	73,8	105,0	91,2	85,2	81,3	81,9
3,3	96,1	86,6	81,9	81,9	80,1	77,5	105,7	95,9	88,2	84,4	84,3
3,5	110,9	101,0	96,2	96,2	92,7	90,6	118,7	108,1	103,0	100,4	99,6
3,7	125,0	117,6	114,7	114,7	109,9	110,8	127,5	119,1	114,6	112,9	113,9
4,0	96,6	89,3	84,7	84,7	82,1	81,1	100,1	92,9	87,4	87,2	86,5
4,8	98,7	90,7	87,8	87,8	86,3	85,8	99,0	89,9	84,5	83,7	82,6
5,1	97,5	91,1	88,7	88,7	86,0	84,6	96,5	86,8	83,2	80,9	83,1
5,4	97,7	91,3	88,4	88,4	86,7	86,3	96,2	89,5	83,4	81,4	81,9
5,7	96,9	90,4	86,2	86,2	84,9	83,8	95,9	87,2	84,2	82,4	81,4
6,3	95,1	89,4	86,3	86,3	86,5	88,0	99,2	90,8	84,6	84,4	85,5
6,6	112,2	106,3	104,7	104,7	103,9	103,1	114,0	109,4	104,4	104,1	104,4
6,9	125,4	117,8	117,3	117,3	118,0	119,5	127,8	118,3	115,2	114,9	118,7
7,3	105,1	97,9	95,3	95,3	93,6	93,6	99,9	92,4	88,7	90,2	89,8

A7-2 : sur extraits cellulaires obtenus après sonication des cellules bactériennes

pH	HCl	pH	HCOOH
2,0	0,1	2,4	0,1
2,2	0,3	2,7	0,3
2,6	0,9	3,1	1,2
3,0	0,7	3,4	0,9
3,3	1,3	3,9	0,4
3,5	1,8	4,2	0,5
4,0	1,8	4,5	0,5
4,8	5,3	5,3	1,6
5,1	11,1	5,5	6,5
5,4	24,6	5,7	17,3
5,7	42,5	5,9	21,2
6,3	74,4	6,0	17,0
6,6	88,8	6,1	27,5
6,9	95,5	6,2	45,5
		6,3	58,9
		6,3	74,8
		6,4	87,6

Dégradation du dichlorométhane et adaptation à la production intracellulaire d'acide chez *Methylobacterium*

Le dichlorométhane (DCM) est un solvant chloré toxique dont l'origine est principalement anthropique. Sa production et son utilisation industrielles en grandes quantités ont conduit à la dissémination dans l'environnement de gènes permettant à des microorganismes spécialisés de dégrader et de se développer avec ce composé.

Au laboratoire, la dégradation de méthanes chlorés toxiques par les bactéries méthylophiles du genre *Methylobacterium* est étudiée par des approches génétiques, biochimiques et physiologiques. Le métabolisme de dégradation du DCM chez la souche *Methylobacterium dichloromethanicum* DM4 a été caractérisé en détail. L'objectif de mon travail a été de poursuivre l'identification et la caractérisation des modes de résistance à la toxicité du DCM de la souche DM4.

Au niveau physiologique, une étude de la réponse adaptative à l'acide intracellulaire produit lors de la dégradation microbienne du DCM a été réalisée. Elle a permis de mettre en évidence une viabilité plus importante de la souche DM4 après exposition à l'acide lorsque celle-ci s'est développée au préalable sur le DCM. Ainsi, le métabolisme du DCM chez cette souche s'accompagne d'une résistance accrue à l'acide produit à l'intérieur de la cellule, qui s'ajoute à la résistance à la génotoxicité déjà caractérisée au cours de travaux antérieurs.

Une stratégie de mutagenèse aléatoire mettant en jeu un système rapporteur de fluorescence a été mise en place, afin d'identifier les gènes spécifiquement induits au cours de la croissance en présence de DCM. L'analyse du site d'insertion dans les mutants d'intérêt a été initiée par différentes approches complémentaires.

Ces approches expérimentales ont été renforcées par l'analyse des séquences génomiques complètes de *M. dichloromethanicum* DM4 et de la souche de référence du genre *Methylobacterium*, *M. extorquens* AM1, incapable de croître avec le DCM.

Degradation of dichloromethane and adaptation to intracellular acid in *Methylobacterium*

Dichloromethane (DCM) is a toxic chloridic solvent, mainly of anthropogenic origin. Its production and large scale industrial application has lead to the wide dissemination of genes in the environment that permit its degradation by specialised microorganisms.

The degradation of DCM and other toxic chloridic methanes by methylophilic bacteria of the genus *Methylobacterium* was studied using genetic, biochemical and physiological approaches. The metabolism of dichloromethane degradation by the strain *Methylobacterium dichloromethanicum* DM4 was characterised in detail. The aim of this study was to identify and characterise different resistance pathways to dichloromethane toxicity in the DM4 strain.

At the physiological level the adaptive response to intracellular acid produced during microbial DCM degradation was analysed. This study provided evidence that DM4 strain viability after acid exposure is higher when previously grown on a dichloromethanic carbon source. DCM metabolism by this strain is accompanied by an increased resistance to intracellular acid, along with increased genotoxic resistance that has been demonstrated in previous studies.

A strategy involving random transposon mutagenesis using a fluorescent reporter system was used to identify genes specifically induced by dichloromethane. The insertion sites in the mutants of interest were analysed by different complementary approaches.

These experimental approaches were reinforced by the subsequent analysis and comparison of the complete genome sequences of *M. dichloromethanicum* DM4 and the reference strain, *M. extorquens* AM1, which is incapable of growth on DCM.

Mots-clés : *Methylobacterium dichloromethanicum* DM4, dichlorométhane, adaptations microbiennes, acido-tolérance, génomique comparative
