



UNIVERSITE DE STRASBOURG

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

présentée pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Sciences du Vivant

Domaine : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

par

Sandro ROSELLI

GENOMIQUE FONCTIONNELLE DE LA DEGRADATION MICROBIENNE DU CHLOROMETHANE

Soutenue publiquement le 15 décembre 2009 devant la commission d'examen :

Pr. Jean-Charles PORTAIS

Pr. Laurence SABATIER

Dr. Hendrik SCHÄFER

Pr. Julia VORHOLT

Dr. Françoise BRINGEL

Pr. Stéphane VUILLEUMIER

Examineur

Rapporteuse interne

Rapporteur externe

Rapporteuse externe

Co-directrice de thèse

Co-directeur de thèse

Résumé

Le chlorométhane est un composé organique volatile, majoritairement d'origine naturelle. Il est notamment produit par les plantes, les algues et les champignons, les marais salants ou par combustion de biomasse. C'est l'halocarbone le plus abondant de l'atmosphère, responsable à lui seul de plus de 15% de la dégradation de l'ozone stratosphérique causée par les composés halogénés. L'inventaire des sources et des puits du chlorométhane dans l'estimation du budget global du chlorométhane est encore incertain, et sous-estime potentiellement l'importance des émissions végétales de ce composé et sa dégradation par les microorganismes.

L'objectif de ce projet de thèse a été de développer la compréhension des bases moléculaires de la dégradation bactérienne du chlorométhane dans une perspective de valorisation des ressources génétiques de l'environnement et de l'utilisation de ces connaissances pour la dépollution de sites contaminés. C'est dans la bactérie méthylo-trophe chlorométhane-dégradante *Methylobacterium extorquens* CM4 qu'avaient été précédemment identifiés les gènes *cmu* de dégradation aérobie du chlorométhane, la caractérisation *in vitro* de l'activité de déchloration correspondante par les protéines CmuA et CmuB, ainsi que la voie correspondante d'utilisation du chlorométhane pour la croissance bactérienne. Dans le contexte de la souche CM4, dont le génome a été séquencé au cours de ce travail, une approche combinant génomique comparative et fonctionnelle a été développée pour une étude approfondie de l'adaptation de bactéries méthylo-trophes du genre *Methylobacterium* à la croissance sur chlorométhane comme seule source de carbone et d'énergie.

L'analyse du génome de la souche CM4 et la comparaison avec d'autres souches *M. extorquens* a révélé l'existence chez CM4 d'un plasmide spécifique de 380 kb, porteur des gènes connus pour leur implication dans l'utilisation du chlorométhane, de paralogues de gènes de biosynthèse et de transport de la cobalamine, ou liés au métabolisme du tétrahydrofolate, cofacteurs tous deux essentiels à l'utilisation microbienne du chlorométhane par la voie *cmu*. Il reste à évaluer si ce plasmide est capable de conférer seul à une bactérie la capacité de croître sur le chlorométhane.

L'analyse différentielle du protéome de la souche CM4 cultivée sur le chlorométhane ou sur le méthanol a permis de confirmer la voie d'utilisation précédemment proposée, et d'identifier de nouvelles protéines vraisemblablement associées au métabolisme du chlorométhane par cette souche, dont les gènes ont d'ailleurs pour partie été retrouvés associés aux gènes *cmu* chez d'autres bactéries chlorométhane-dégradantes. En revanche, l'expression du gène *cmuC*, essentiel pour la croissance avec le chlorométhane chez CM4 mais de fonction inconnue, n'a pas été détectée au niveau protéique.

Un autre volet de ce travail a consisté en l'étude de la diversité des bactéries chlorométhane-dégradantes associées à la phyllosphère. Trois souches ont été isolées à partir de cultures d'enrichissement réalisées à partir de feuilles d'*Arabidopsis thaliana*, une plante-modèle connue pour émettre du chlorométhane, et représentent à notre connaissance les premières souches chlorométhane-dégradantes obtenues de la phyllosphère. Le potentiel de dégradation du chlorométhane de ces souches a été évalué par des mesures de l'activité de déchloration du chlorométhane. Par une approche de PCR et de séquençage, l'organisation des gènes *cmu* des bactéries chlorométhane-dégradantes nouvellement isolées dans ce travail ainsi que celles décrites précédemment ont été comparées, confirmant l'organisation unique à ce jour des gènes *cmu* du plasmide p1MCHL de la souche CM4.

Les résultats obtenus dans ce travail serviront de base aux études de génomique comparative et fonctionnelle à venir sur l'utilisation du chlorométhane chez la souche de référence *Methylobacterium extorquens* CM4 et chez d'autres bactéries utilisant le chlorométhane pour leur croissance.

Mots clés : Bactéries méthylo-trophes, chlorométhane, génomique fonctionnelle, gènes *cmu*, cobalamine, phyllosphère

Abstract

Chloromethane is a volatile organic compound, mainly of natural origin - plants, algae, wood-rotting fungi, salt marshes and burning biomass all produce chloromethane. It is the most abundant halocarbon in the atmosphere, and accounts for at least 15% of chlorine-catalysed ozone depletion. At present, it is difficult to evaluate the global chloromethane budget, as the inventory of chloromethane sources and sinks suffers from poor estimates of plant emissions and microbial degradation for this compound.

The aim of this PhD thesis was to better understand the molecular basis of chloromethane microbial degradation and contribute to develop the use of microbial genetic resources of interest from the environment in the perspective of the bioremediation of contaminated environments. The *cmu* (chloromethane utilisation) genes for aerobic degradation of chloromethane were previously identified and characterised in *Methylobacterium extorquens* CM4, the corresponding dehalogenation activity was characterised *in vitro* using purified CmuA and CmuB proteins, and a metabolic pathway for the use of chloromethane for growth was defined. In this study, the genome sequence of strain CM4 was obtained and analysed, and chloromethane utilisation by methylotrophic bacteria of the genus *Methylobacterium* was further investigated using comparative genomics and functional genomic approaches.

Comparative analysis of the genome of different *M. extorquens* strains revealed the presence of a unique 380 kb plasmid p1MCHL in strain CM4 which harbours the known genes for chloromethane utilization, as well as both orphan and duplicated genes involved in the biosynthesis, transport, and metabolism of cobalamin and tetrahydrofolate, the two essential cofactors for chloromethane utilization by the *cmu* pathway. Whether the p1MCHL plasmid alone may confer the ability to grow with chloromethane remains to be investigated.

The proteomes from chloromethane- and methanol-grown cultures further confirmed the proposed *cmu* pathway for chloromethane utilisation. Some of the 33 proteins more abundant in chloromethane-grown cells were encoded by genes associated with the *cmu* gene cluster found in other chloromethane-degrading bacteria. However, expression at the protein level of *cmuC*, a gene of unknown function essential for growth of strain CM4 with chloromethane, was not detected.

In addition, the diversity of chloromethane-degrading bacteria associated with the phyllosphere was investigated by a cultural approach. Leaves of *Arabidopsis thaliana*, known to emit chloromethane, were used as inocula to obtain liquid cultures growing with chloromethane as the sole carbon and energy source. Three *Hyphomicrobium* strains, possibly the first chloromethane-degrading strains isolated from the phyllosphere, were obtained, and their specific activity for chloromethane dehalogenation was determined. Using newly designed PCR primers, the *cmu* genes of these isolates were sequenced, and their organisation was compared to that of previously reported chloromethane-degrading strains. The *cmu* gene clusters of the new isolates differ from that found on the p1MCHL plasmid of strain CM4.

The results obtained in this work will serve as the basis for future studies of comparative and functional genomics of chloromethane utilisation, both in the reference strain *Methylobacterium extorquens* CM4 and in other aerobic bacteria capable of using chloromethane as the sole carbon and energy source for growth.

Keywords: Methylotrophic bacteria, chloromethane, functional genomics, *cmu* genes, cobalamin, phyllosphere.

Remerciements

Le travail présenté dans ce manuscrit a été effectué dans l'unité de « Génétique Moléculaire, Génomique et Microbiologie » de l'Université de Strasbourg (UMR 7156 UDS / CNRS). Je tiens à remercier en premier lieu son directeur Monsieur le Professeur Serge Potier, ainsi que tous les personnels permanents et non permanents pour l'accueil qui m'a été fait.

Je remercie les membres de mon jury de thèse, Mesdames Laurence Sabatier (Université de Strasbourg) et Julia Vorholt (Institut für Mikrobiologie ETH, Zurich) et Messieurs Jean-Charles Portais (Université Paul Sabatier de Toulouse) et Hendrik Schäfer (University of Warwick, Royaume-Uni), d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je tiens à témoigner toute ma gratitude à mes co-directeurs de thèse Françoise Bringel et Stéphane Vuilleumier pour leur encadrement et l'apprentissage dont j'ai bénéficié au cours de ces trois années. Françoise, un grand merci pour tes conseils avisés lors de nos nombreux échanges, Stéphane merci à toi pour ta rigueur et la disponibilité accordée ces derniers mois.

Un grand merci également à Thierry Nadalig pour son encadrement durant l'année de master et son aide précieuse durant les années de thèse.

Merci à tous les thésards et post-doctorants que j'ai pu côtoyer durant ces trois années, Christian, Mickaël, Nicolas, Emile M., Emilie F., Paul, Chris, Jeannette.

Je tiens à adresser enfin un énorme merci à celle qui m'a épaulé durant les moments les plus difficiles, je n'oublierai pas tout ce que tu as fait pour moi ma chère et tendre Bettina.

Enfin je tiens à remercier les membres de ma famille, ma mère, mon père, mon frère Jean-Louis, pour leur soutien indéfectible tout au long de mon cursus universitaire et plus particulièrement lors de ces dernières années.

Un grand merci également à tous mes amis : Chiheb, Kader, Jean, Guillaume et Fanny, Charles, Bouli et Luce, Pierre et J-B, Anicet, Edouard, Caroline, Gilles et Alex, ainsi que tous ceux que j'ai pu et dû oublier.

Ce travail a été financé par une allocation du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Table des matières

Résumé	3
Remerciements	5
Table des matières	7
Liste des figures	11
Liste des tableaux	14
Introduction	17
Chapitre I. Synthèse bibliographique	19
1.1. Les méthanes chlorés	22
1.2 Le chlorométhane dans l'environnement	23
1.3 La méthylophie	25
1.3.1 Les bactéries méthanotrophes	28
1.3.2 Les bactéries méthylophes	28
1.3.3 <i>Methylobacterium</i> , bactérie modèle pour l'étude de la méthylophie	29
1.4 Dégradation microbienne du chlorométhane	35
1.5 Métabolisme du chlorométhane dans le contexte de la méthylophie	37
1.6 La cobalamine	43
1.6.1 L'importance de la cobalamine dans le métabolisme des méthanes chlorés	48
1.6.2 Les transporteurs du cobalt et de la cobalamine	51
1.6.3 Biosynthèse de la cobalamine chez les microorganismes	55
1.6.4 La voie d'utilisation de corrinoïdes préformés	57
1.6.5 La voie de biosynthèse du 5,6-diméthylbenzimidazole (DMB) et la voie alternative de la pseudo-vitamine B ₁₂	58
1.6.6. Régulation de l'expression génique des voies de biosynthèse de la cobalamine	59

1.7 Le tétrahydrofolate et ses dérivés	61
1.7.1 Voie de biosynthèse <i>de novo</i> du folate, branche de la ptérine	62
1.7.2 Réactions majeures dépendantes du folate du métabolisme en C ₁	63
1.8 La révolution génomique	64
1.8.1 La génomique comparative	64
1.8.2 Description des outils bioinformatiques de l'interface MaGe	67
1.9 Objectifs du projet de thèse	70
Chapitre II. Exploration génomique de l'adaptation au chlorométhane chez <i>Methylobacterium</i>	73
2.1 Le génome de CM4	75
2.2 Le plasmide p1MCHL porte les gènes <i>cmu</i> d'utilisation du chlorométhane	79
2.3 Gènes communs de <i>M. extorquens</i> et gènes spécifiques de la souche CM4	89
2.4 Génomique comparative de la biosynthèse de la cobalamine chez <i>M. extorquens</i>	93
2.4.1 Les enzymes B ₁₂ -dépendantes codées dans le génome de <i>M. extorquens</i> CM4	93
2.4.2 Le transport du cobalt et de la cobalamine	97
2.4.3 Voie de biosynthèse des précurseurs de la cobalamine	99
2.4.4 Voie aérobie de biosynthèse de la cobalamine chez <i>Methylobacterium</i>	105
2.4.5 Duplication plasmidique de gènes de biosynthèse de la cobalamine chez CM4	111
2.4.6. Riboswitch cobalamine chez CM4	112
2.5 Gènes de biosynthèse du tétrahydrofolate (H ₄ F) chez CM4	113
2.5.1 La biosynthèse du chorismate à partir du D-érythrose-4-phosphate	113
2.5.2 Voie de biosynthèse <i>de novo</i> du H ₄ F	115
2.6 Réactions d'interconversion du H ₄ F chez CM4	119

Chapitre III. Diversité microbienne des gènes d'utilisation du chlorométhane 125

Article: Diversity and organisation of chloromethane utilisation genes in bacterial strains isolated from the phyllosphere

Résumé en français 127

Abstract 128

Introduction 129

Experimental procedures 132

Results 137

Discussion 145

Chapitre IV. Génomique fonctionnelle de l'utilisation du chlorométhane chez *M. extorquens* CM4 149

Article: Probing the cmu pathway for chloromethane utilization in Methylobacterium extorquens CM4 by proteomic analysis and the elusive role of cmuC

Résumé en français 150

Abstract 152

Introduction 155

Experimental procedures 157

Results 165

Discussion 179

Chapitre V. Conclusions et perspectives 187

5.1 Exploration génomique de l'adaptation au chlorométhane chez *Methylobacterium* 189

5.2 Transmission horizontale de la capacité d'utilisation du chlorométhane 191

5.3 Diversité des bactéries chlorométhane-dégradantes dans le contexte phyllosphérique 192

5.4 Rôle de <i>cmuC</i> et études biochimiques de l'activité de la chlorométhane déshalogénase	194
5.5 Etude de gènes nouvellement identifiés comme potentiellement impliqués dans l'utilisation du chlorométhane	195
5.6 Vers l'utilisation de nouvelles approches globales de génomique fonctionnelle chez CM4	197
Bibliographie	199
Liste des communications scientifiques	221

Liste des figures

Figure I.1. Voies centrales du métabolisme méthylotrophe chez <i>Methylobacterium</i> AM1 et DM4 pour la conversion du carbone lors de la croissance méthylotrophe	30
Figure I.2. Structure des cofacteurs porteurs de groupes à un atome de carbone chez <i>Methylobacterium</i>	32
Figure I.3. Utilisation du chlorométhane dans la souche <i>Methylobacterium</i> sp. CM4	38
Figure I.4. Voie proposée pour l'utilisation du chlorométhane chez <i>M. chloromethanicum</i> CM4	40
Figure I.5. Observation microscopique d'une culture de <i>Methylobacterium</i> sp. CM4 en phase exponentielle de croissance (grossissement x 1000)	42
Figure I.6. Structure de la cobalamine	44
Figure I.7. L'acétogénèse	46
Figure I.8. La méthanogénèse	46
Figure I.9. La croissance sur chlorométhane requiert la présence de cobalt	50
Figure I.10. Différents systèmes bactériens de transport du cobalt et de dérivés corrinoïdes	52
Figure I.11. Biosynthèse de l'adénosylcobalamine et autres cofacteurs tétrapyrroliques chez les bactéries	54
Figure I.12. Représentation schématique des voies métaboliques impliquant le tétrahydrofolate (H ₄ F)	60
Figure I.13. La fenêtre d'analyse de l'interface MaGe	66
Figure II.1. Arbre phylogénétique réalisé à partir d'une analyse des séquences des gènes d'ADNr 16S d'Alpha-Protéobactéries situant les positions des représentantes du genre <i>Methylobacterium</i>	76
Figure II.2. Représentation schématique de l'étendue de conservation de blocs d'au moins 8 gènes entre les chromosomes des souches CM4 et DM4	78
Figure II.3. Une région d'environ 130 kb du mégaplasmide de AM1 figure sur le chromosome des souches déchlorantes	78

Figure II.4. Plasmide p1MCHL d'utilisation du chlorométhane chez <i>Methylobacterium extorquens</i> CM4	82
Figure II.5. Représentation de la région <i>cmu</i> du plasmide circulaire p1MCHL étendue à 138 kb	84
Figure II.6. Conservation de fonctions de transfert et de réplication de 3 plasmides de 3 souches du genre <i>Methylobacterium</i>	87
Figure II.7. Homologues et gènes orphelins dans 4 génomes de souches méthylophiles	94
Figure II.8. Voie de biosynthèse de l'uroporphyrinogène III chez <i>M. extorquens</i> CM4	100
Figure II.9. Voie de biosynthèse du 5,6-diméthylbenzimidazole chez <i>M. extorquens</i> CM4	102
Figure II.10. Biosynthèse de l'adénosylcobalamine à partir des précurseurs (uroporphyrinogène III, riboflavine et DMB) chez <i>M. extorquens</i> CM4	104
Figure II.11. Organisation et synténie des gènes de biosynthèse de la cobalamine chez <i>M. extorquens</i> et chez <i>M. nodulans</i> ORS2060	108
Figure II.12. Tétrapyrroles dérivant du précurseur uroporphyrinogène III	109
Figure II.13. Représentation schématique des protéines CysG et CobA	110
Figure II.14. Voie de biosynthèse du tétrahydrofolate chez CM4	114
Figure III.1. Phylogenetic affiliation of chloromethane-degrading bacteria on obtained partial 16S rRNA gene sequences	136
Figure III.2. Comparison of <i>cmu</i> gene organisation in chloromethane-degrading bacteria	138
Figure III.3. Phylogenetic analysis of characterised <i>cmu</i> genes in chloromethane degrading strains	142
Figure IV.1. Image of the 2D-DIGE master gel of total protein extracts from chloromethane- and methanol-grown <i>M. extorquens</i> CM4 labelled with Cy2 (internal standard)	164
Figure IV.2. Methylophile metabolism and chloromethane utilization pathway in <i>Methylobacterium extorquens</i> CM4	170
Figure IV.3. Representation of the <i>cmu</i> region of strain CM4	172

Figure V.1. Les 8 souches de *Methylobacterium* dont les séquences génomiques sont aujourd'hui disponibles

190

Liste des tableaux

Tableau I.1. Les méthanes halogénés dans la troposphère	22
Tableau I.2. Estimations des sources et puits du chlorométhane dans l'atmosphère	24
Tableau I.3. Souches bactériennes chlorométhane-dégradantes isolées	36
Tableau I.4. Outils utilisés dans la plateforme MaGe	68
Tableau II.1. Comparaison des caractéristiques générales de trois génomes de <i>Methylobacterium extorquens</i>	74
Tableau II.2. Classes fonctionnelles (COG) des CDSs prédits des réplicons de <i>M. extorquens</i> CM4 et comparaison de la répartition des classes dans deux autres génomes de <i>Methylobacterium extorquens</i>	80
Tableau II.3. Parenté de fonctions de réplication et de transfert entre les épisomes p1MCHL, p1METDI et p5Mrad	86
Tableau II.4. Région de synténie S4 spécifique des souches déchlorantes entre le plasmide p1MCHL et une région dupliquée du chromosome de la souche déchlorante DM4	88
Tableau II.5. Régions uniques du chromosome de la souche CM4 au sein de l'espèce <i>M. extorquens</i>	90
Tableau II.6. Synténie entre deux blocs de gènes de deux îlots génomiques des souches déchlorantes	92
Tableau II.7. Ensemble de gènes communs entre deux souches déchlorantes du chlorométhane : <i>M. extorquens</i> CM4 et <i>Roseovarius</i> sp. 217	95
Tableau II.8. Transporteurs putatifs du cobalt et de la cobalamine chez <i>M. extorquens</i>	96
Tableau II.9. Les gènes de la biosynthèse de l'adénosylcobalamine chez <i>M. extorquens</i> : duplication partielle chez CM4	98
Tableau II.10. Biosynthèse du tétrahydrofolate chez <i>M. extorquens</i> : gènes uniques chez la souche CM4	116
Tableau II.11. Voies de conversion des dérivés du tétrahydrofolate chez <i>M. extorquens</i> : des gènes uniques au plasmide p1MCHL	120

Tableau III.1. Growth of chloromethane-degrading strains and activities of resting cells with chloromethane	136
Tableau III.2. Primers used in this study	140
Tableau III.S1. Sequence identity for two regions of the amplified <i>cmuA</i> gene fragments	147
Tableau IV.1. Bacterial strains and plasmids used in this study	158
Tableau IV.2. <i>M. extorquens</i> CM4 differentially expressed proteins in chloromethane- and methanol-grown cultures	166-167
Tableau IV.3. Growth characteristics and chloride production of <i>M. extorquens</i> CM4 and its <i>cmuC</i> mutant	176
Tableau IV.4. Complementation with a functional <i>cmuC</i> gene restores growth and chloromethane dehalogenation in <i>M. extorquens cmuC</i> mutant	177
Tableau IV.S1. Proteome comparison of <i>cmuC</i> mutant and wild-type (wt) strains grown with or without chloromethane	180

Introduction

J'ai choisi, pour la restitution du travail effectué, de structurer le manuscrit de thèse en quatre chapitres.

Le chapitre I présentera un exposé bibliographique des connaissances actuelles sur l'utilisation du chlorométhane par les bactéries dans le contexte du métabolisme méthylotrophe en conditions aérobies, en mettant l'accent sur l'état des connaissances sur la bactérie *M. chloromethanicum* CM4 au départ de la thèse. En raison de leur importance pour le projet, ce chapitre abordera également, par une présentation relativement détaillée, les voies de biosynthèse de cofacteurs essentiels pour l'utilisation du chlorométhane que sont la cobalamine et le tétrahydrofolate.

Le chapitre II présentera ensuite les résultats obtenus par l'exploration du génome de la souche CM4, dont l'assemblage a été terminé au JGI (Joint Genome Institute) en décembre 2008. Cette partie comporte une analyse des entités constituant le génome de CM4, avec une attention toute particulière pour les régions du génome portant les gènes de la voie d'utilisation du chlorométhane précédemment identifiées. Les régions génomiques de la souche CM4 présentant une synténie avec les autres souches séquencées du genre *Methylobacterium* (« core genome »), de même que les régions uniques du génome de CM4, ont été définies et analysées. Ce chapitre aborde également de manière plus détaillée les gènes impliqués dans la biosynthèse de la cobalamine et du tétrahydrofolate.

Le chapitre III, rédigé sous forme de manuscrit à soumettre pour publication, a été écrit en anglais. Il décrit l'isolement et la caractérisation de bactéries chlorométhane-dégradantes à partir de feuilles d'*Arabidopsis thaliana*. Ce travail s'articule en deux volets. L'approche culturale a permis l'isolement, la détermination du taux de croissance et de l'activité de déchloration de souches chlorométhane-dégradantes isolées au laboratoire. L'approche moléculaire par PCR, quant à elle, a permis la caractérisation de ces souches

du point de vue taxonomique, mais aussi le développement d'une stratégie pour la caractérisation de la séquence des gènes *cmu* d'utilisation du chlorométhane. Ensuite, l'agencement des gènes *cmu* dans le génome des souches chlorométhane-dégradantes a été comparé.

Le chapitre IV, lui aussi rédigé sous forme de manuscrit en anglais en vue d'une soumission pour publication dans une revue scientifique d'audience internationale, présente l'étude de la réponse au chlorométhane de la souche CM4 par l'approche protéomique. Cette étude comporte deux volets : l'étude de la réponse au chlorométhane dans le contexte de la souche sauvage, et d'un mutant dérivé de cette souche muté pour le gène *cmuC*, de fonction inconnue mais essentiel pour l'utilisation du chlorométhane chez CM4. Les analyses différentielles 2D-PAGE et 2D-DIGE ont porté sur la comparaison des protéomes de la souche sauvage obtenus en conditions d'utilisation de méthanol ou de chlorométhane, et des analyses différentielles 2D-DIGE pour la comparaison des protéomes de la souche sauvage et du mutant *cmuC* en présence des deux substrats.

Enfin, les conclusions tirées de ce travail, ainsi que les perspectives envisagées pour la poursuite des recherches sur la thématique de la thèse, sont brièvement présentées au chapitre V.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

Les composés organohalogénés sont des polluants majeurs des sols et des nappes d'eau souterraines, détectés dans une grande partie des sites répertoriés en France par le Ministère de l'Ecologie et du Développement durable (<http://basol.ecologie.gouv.fr>). Leur toxicité tient à leur faible dégradation dans l'environnement, aux effets néfastes de leurs propriétés lipophiles pour l'intégrité cellulaire, conduisant également souvent à leur accumulation dans la chaîne trophique, ou encore à leurs effets mutagènes, ou à ceux de leurs produits de transformation s'ils sont métabolisés. Paradoxe apparent : de très nombreux composés organohalogénés sont produits de manière naturelle sur notre planète (Gribble, 2003). De ce fait même, l'existence de ces composés dès les origines de la vie a vraisemblablement guidé l'évolution de nombreux catalyseurs enzymatiques, le plus souvent dans le monde microbien, qui permettent leur dégradation et ainsi l'utilisation de ces composés comme sources de carbone pour la croissance. On a ainsi pu estimer que si de telles réactions de biodégradation des composés organohalogénés n'avaient pas été développées, notre planète serait aujourd'hui recouverte d'une couche de plusieurs millimètres de ces composés (Vetter et Gribble, 2007). A l'ère industrielle toutefois, ces composés se sont disséminés dans l'environnement de manière accrue. Ils atteignent aujourd'hui des niveaux de concentration élevés, jusqu'alors inédits dans la biosphère (Montzka et Fraser, 2003). Ces composés, souvent toxiques, confèrent un avantage sélectif aux microorganismes qui leur sont résistants, et plus particulièrement à ceux qui sont capables de les utiliser comme substrats de croissance. Ce phénomène a conduit à la sélection et à la dissémination rapides des gènes de résistance et de dégradation de composés organohalogénés dans le monde microbien.

1.1. Les méthanes chlorés

Le chlorométhane fait partie de la famille des halométhanés, composés organiques contenant un seul atome de carbone substitué par l'hydrogène et des atomes d'éléments halogènes (brome, fluor, chlore ou iode) en nombre variable. Ces méthanes halogénés ont reçu une attention particulière du fait de leur implication dans la destruction de l'ozone stratosphérique (Harper, 2000). Le chlorométhane (CH_3Cl), le dichlorométhane (CH_2Cl_2), le chloroforme (CHCl_3) et le tétrachlorure de carbone (CCl_4), en particulier, ont été utilisés de manière intensive dans l'industrie chimique (Tableau I.1). Les trois derniers, liquides à température ambiante et pression atmosphérique, ont des propriétés intéressantes comme solvants et pour le dégraissage des métaux dans les processus industriels. Le chlorométhane, en revanche, est très réactif, et sous forme de gaz en conditions standards. A ce titre il a été principalement employé comme intermédiaire de synthèse dans les réactions de méthylation, et aussi dans la production de silicone (ATSDR, 1998).

Tableau I.1. Les méthanes halogénés dans la troposphère

	Troposphère		Flux (Gg an^{-1})	
	Conc. (pptv)	Demi-vie ^a (année)	Industrie	Naturel
CH_3Cl	550 ± 30 ^a	1,3	10 ^a	1900 ^a
CH_2Cl_2	25 ± 5 ^d	0,38	530 ^e	160 ^e
CHCl_3	15 ± 5 ^c	0,41	60 ^b	595 ^b
CCl_4	95 ± 5 ^f	26	46 ^g	~0 ^g

^a Montzka et Fraser, 2003

^b McCulloch, 2003

^c O'Doherty *et al.*, 2001

^d Schauffler *et al.*, 2003

^e Kurylo et Rodriguez, 1999

^f Prinn *et al.*, 2000

^g UNEP, 1998

1.2. Le chlorométhane dans l'environnement

Le chlorométhane joue un rôle important dans la régulation de la concentration de l'ozone stratosphérique et dans le réchauffement global (Schäfer *et al.*, 2007). Dans la stratosphère, le chlorométhane est dégradé à parts égales par photodissociation et par réaction avec les radicaux hydroxyles (Robbins, 1976), et les radicaux chlorés qui résultent de ces réactions peuvent alors réagir avec l'ozone (Khalil et Rasmussen, 1999). Ainsi, le chlorométhane représente plus de 15% de la destruction de l'ozone par les composés chlorés (Montzka et Fraser, 2003). Son potentiel de réchauffement global (global warming potential; GWP) est 17 à 25 fois supérieur à celui du CO₂ pour une même masse (Grossman *et al.*, 1994; Schäfer *et al.*, 2007).

Le chlorométhane est classé dans le groupe D (non cancérigène pour l'homme) par l'Environmental Protection Agency (1997), des effets chroniques éventuels ou des effets sur le système reproducteur n'ayant pas été démontrés. Toutefois, l'inhalation de chlorométhane en grandes quantités peut entraîner des perturbations du système nerveux central, des atteintes au niveau du foie, des reins et du coeur (ATSDR, 1998).

Le chlorométhane est émis vers l'atmosphère pendant sa production ou lors de l'incinération de déchets industriels ou municipaux. Toutefois, la majeure partie du chlorométhane présente dans l'atmosphère est d'origine naturelle (Tableau I.2). La concentration du chlorométhane dans la troposphère, évaluée à 550±30 pptv (parties par 10¹²/vol, Tableau I.1), en fait le plus abondant des composés halogénés volatiles dans l'atmosphère. Toutefois, plus de 90% du chlorométhane émis dans l'environnement est d'origine naturelle (Tableau I.2). Les différentes sources identifiées comprennent les plantes supérieures (Yokouchi *et al.*, 2002; Saito and Yokouchi, 2006; Yokouchi *et al.*, 2007; Gebhardt *et al.*, 2008), les prairies (Rhew et Abel, 2007; Teh *et al.*, 2008), les marais salants (Rhew *et al.*, 2000; Rhew *et al.*, 2002), les tourbières (Dimmer *et al.*, 2001), la dégradation du bois par les champignons (Watling et

Harper, 1998; Saxena *et al.*, 1998), les feuilles en décomposition (Myneni, 2002; Hamilton *et al.*, 2003; Keppler *et al.*, 2004), les feux de forêt (Lobert *et al.*, 1999) et les océans (Moore *et al.*, 1996; Scarratt et Moore, 1998; Khalil et Rasmussen, 1999).

Tableau I.2. Estimations des sources et puits du chlorométhane dans l'atmosphère ^a

Nature des sources et des puits	Meilleure estimation (Gg an⁻¹)	Valeurs basses et hautes (Gg an⁻¹)
Sources		
Feux de forêts	911	655 à 1125
Plantes tropicales	910	820 à 8200
Océans	600	325 à 1300
Champignons	160	43 à 470
Marais salants	170	65 à 440
Zones humides	40	6 à 270
Rizières	5	-
Combustion de matières organiques fossiles	105	5 à 205
Incinération	45	15 à 75
Industrie	10	-
<i>Sous total des sources</i>	<i>2956</i>	<i>1934 à 12085</i>
Puits		
Réaction avec les OH de la troposphère	- 3180	- 2380 à - 3970
Perte dans la stratosphère	- 200	- 100 à - 300
Réaction avec les Cl ⁻ à la surface des océans	- 370	- 180 à - 550
Dégradation microbienne dans le sol	- 180	- 100 à - 1600
Perte dans les océans polaires	- 75	- 37 à - 113
<i>Sous total des puits</i>	<i>- 4005</i>	<i>- 2797 à - 6533</i>
BILAN sources et puits	- 1049	- 4599 à + 9288

^a Tableau adapté de Montzka et Fraser, 2003

Au total, la meilleure estimation des émissions de chlorométhane vers l'atmosphère par des sources naturelles est de 2,8 Tg par an. Le puits majeur de chlorométhane dans la troposphère correspond à la réaction avec les radicaux hydroxyles (Tableau I.2). Cette consommation de chlorométhane, estimée à environ 3,2 Tg par an, représente près de 80% des puits totaux (Koppmann *et al.*, 1993). La contribution de la dégradation bactérienne, chiffrée aujourd'hui à moins de 0,2 Tg par an, ne prend à ce jour en compte que les bactéries cultivables du sol (Montzka et Fraser, 2003). Elle est de ce fait probablement très sous-estimée.

De fait, les valeurs d'émission et de consommation de chlorométhane, très variables selon les études, souffrent le plus souvent d'incertitudes importantes. Ainsi, les sources varient de 1,9 à 12 Tg par an, et les puits de -2,8 à -6,5 Tg par an (Tableau I.2). La différence observée entre les meilleures estimations de sources et de puits pourrait ainsi s'expliquer par la sous-estimation des émissions naturelles, et notamment des zones de végétations tropicales. Dans le contexte du présent travail, il faut noter tout particulièrement que selon les études les plus récentes, les émissions de chlorométhane par les plantes représenteraient de 30 à 50% des émissions globales (Saito et Yokouchi, 2008; Saito *et al.*, 2008). En particulier, certaines fougères et plantes halophiles des forêts tropicales ont été identifiées comme des sources très significatives de chlorométhane, avec un taux de production de 1 µg par g de poids sec et par heure (Yokouchi *et al.*, 2007).

1.3. La méthylotrophie

La méthylotrophie est définie comme la capacité d'un organisme vivant à utiliser des composés monocarbonés réduits, sans liaison carbone-carbone, comme seule et unique source de carbone et d'énergie pour sa croissance. Cette définition s'applique à l'ensemble des organismes utilisant le méthane, le méthanol, le formaldéhyde, les méthylamines,

les méthanes halogénés ainsi que certains sulfures méthylés et couvre les trois domaines du Vivant : Eucaryotes, Bactéries et Archées (Anthony 1982). Toutefois, seuls les procaryotes, et les bactéries en particulier, seront traités dans les sections suivantes.

Il existe deux groupes distincts de procaryotes méthylophes : ceux pouvant utiliser le méthane, désignés méthanotrophes, utilisent une gamme restreinte de substrats carbonés (le méthane, voire le méthanol) ; et ceux capables d'utiliser d'autres composés méthylés à l'exception du méthane, parfois désignés par le terme de méthylophes non méthanotrophes, et pouvant également utiliser des substrats multicarbonés (De Marco, 2004).

Les bactéries méthylophes sont retrouvées de manière ubiquitaire dans l'environnement : elles sont présentes dans le sol, les eaux douces, les sédiments des lacs, les océans, les surfaces des feuilles et nodules de plantes, les graines de riz, l'air, et aussi l'environnement hospitalier par exemple (Omer *et al.*, 2004; Knief *et al.*, 2008; Madhaiyan *et al.*, 2009).

Les bactéries méthylophes, et plus particulièrement celles du genre *Methylobacterium*, sont connues pour entretenir des relations étroites avec les végétaux. Les plantes sont connues pour produire une large variété de composées organiques volatiles (COV) (Nemecek-Marshall *et al.*, 1995) participant de manière significative aux réactions physico-chimiques dans l'atmosphère. Le méthanol est l'un de ces COV retrouvés majoritairement dans l'air des forêts (la quantité de méthanol émise par les plantes dans l'atmosphère est de 156 millions de tonnes par an ; Kolb, 2009). Emis des surfaces foliaires, son flux est corrélé avec la distribution et la conductibilité des stomates des feuilles (Lindow et Brandl, 2003), et dépend de la déméthylation des pectines des cellules de parois des racines, des tiges, des feuilles et des fruits des plantes par les pectines méthylestérases et de l'activité des populations bactériennes méthylophes (Nemecek-Marshall *et al.*, 1995). Les émissions foliaires de chlorométhane ont quant à elles été mises en évidence pour un faible nombre de plantes supérieures, parmi lesquelles *Arabidopsis thaliana*, une plante de la famille

des *Brassicaceae* (Rhew *et al.*, 2003), chez qui elle atteint les 0,6 nmol/g de poids frais/jour pour l'écotype sauvage Col0.

De manière générale, les bactéries tirent un avantage des composés organiques produits par les plantes (Lindow et Brandl, 2003). En échange, les plantes profitent de différentes manières de la colonisation bactérienne, comme en témoignent par exemple la production par les bactéries d'auxines (Omer *et al.*, 2004), de cytokinines (Lidstrom et Chistoserdova, 2002), de zéatine (Ivanova *et al.*, 2000) ou encore d'acide indole acétique (Ivanova *et al.*, 2001). Certaines souches *Methylobacterium* contribueraient ainsi à la maturation des fraises (Zabetakis *et al.*, 1997), d'autres s'associeraient avec des plantes légumineuses ou des bourgeons de pins en développant des symbioses (Sy *et al.*, 2001; Pirtilla *et al.*, 2000). Des expériences avec la souche sauvage *M. extorquens* AM1 et des mutants défectifs dans des étapes différentes du métabolisme méthylotrophe ont montré que la capacité d'utiliser le méthanol comme source de carbone et d'énergie fournit un avantage sélectif durant la colonisation de *Medicago trunculata* (Sy *et al.*, 2005)

Parmi les bactéries méthylotrophes, on compte aussi bien des bactéries aérobies strictes que des bactéries aéro-anaérobies facultatives, appartenant aux Alpha-, Bêta- ou Gamma-Protéobactéries, et pouvant être à Gram positif ou négatif (Lidstrom, 2006). Alors que la majorité des bactéries méthylotrophes sont des méthylotrophes strictes, à l'exemple des bactéries des genres *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylosinus* ou *Methylocystis*, certaines bactéries méthylotrophes sont des organismes méthylotrophes facultatifs, c'est-à-dire qu'elles peuvent aussi utiliser pour leur croissance des substrats multicarbonés, comme c'est le cas chez les bactéries des genres *Rhodopseudomonas* ou *Methylobacterium* par exemple.

1.3.1. Les bactéries méthanotrophes

On désigne par le terme de bactéries méthanotrophes les bactéries utilisant le méthane comme unique source de carbone. La plupart d'entre elles sont des organismes méthylotrophes stricts, c'est-à-dire qu'elles sont incapables d'utiliser des composés multicarbonés pour leur croissance. Les bactéries méthanotrophes possèdent une ou plusieurs versions de l'enzyme méthane monooxygénase (MMO), qui peut être soluble ou associée à la membrane pour l'oxydation du méthane en méthanol (Hakemian et Rozenzweig, 2007). L'une des caractéristiques les plus marquantes de ces bactéries est la présence de systèmes membranaires internes (Hanson et Hanson, 1996; Hakemian et Rozenzweig, 2007). Les bactéries méthanotrophes sont ainsi classifiées en deux grands ensembles d'organismes, selon leurs membranes internes, leur voie d'assimilation du carbone et leurs séquences d'ARNr 16S. Les bactéries méthanotrophes du type I (*Methylomonas* et *Methylobacter*) assimilent le carbone via la voie de la ribulose monophosphate, et appartiennent aux Gamma-Protéobactéries. Les bactéries du type II, en revanche, utilisent le cycle de la sérine pour l'assimilation du carbone et constituent une subdivision des Alpha-Protéobactéries (Hanson et Hanson, 1996).

1.3.2. Les bactéries méthylotrophes

Le terme de « bactéries méthylotrophes » désigne implicitement les méthylotrophes dépourvues de la capacité d'oxyder le méthane (DeMarco, 2004). Celles-ci peuvent généralement utiliser le méthanol et d'autres substrats monocarbonés. Par opposition aux méthylotrophes strictes, les bactéries méthylotrophes n'utilisant pas le méthane sont souvent des organismes méthylotrophes facultatifs, c'est-à-dire capables d'utiliser des composés multicarbonés. De manière générale, les bactéries méthylotrophes n'utilisant pas le méthane ne présentent pas de système membranaire interne, à l'exception des bactéries

phototrophes. Du point de vue de la phylogénie, on compte dans ce groupe des bactéries à Gram positif ainsi que des bactéries à Gram négatif (subdivision Alpha, Bêta et Gamma des Protéobactéries) (Lidstrom, 2006; Chistoserdova *et al.*, 2005).

1.3.3. *Methylobacterium*, bactérie modèle pour l'étude de la méthylothrophie

La méthylothrophie est largement étudiée depuis maintenant plusieurs décennies, et ce chez les bactéries méthylothrophes utilisant ou non le méthane (Quayle, 1963; Anthony, 1982). Le métabolisme méthylothrophe peut être décrit en trois grands volets : l'oxydation initiale des différents composés en C₁ (généralement en formaldéhyde) ; l'assimilation du carbone pour la production de biomasse ; l'oxydation complète du carbone en CO₂ pour la génération d'énergie (Anthony, 1982; Chistoserdova *et al.*, 2005; Chistoserdova *et al.*, 2009). Pour ce qui concerne l'assimilation du carbone, trois grandes voies métaboliques sont connues : la voie de la sérine à partir de formaldéhyde et de CO₂ ; la voie du ribulose monophosphate (RuMP) à partir du formaldéhyde ; la voie du ribulose biphosphate (RuBP, ou cycle de Calvin-Benson-Bassham) à partir du CO₂ (Vorholt, 2002; Chistoserdova *et al.*, 2005; Lidstrom, 2006; Chistoserdova *et al.*, 2009).

La souche *Methylobacterium extorquens* AM1, qui fait usage de la voie de la sérine, est un organisme modèle privilégié pour l'étude de la méthylothrophie (Quayle, 1963; Anthony, 1982; Chistoserdova *et al.*, 2003). La disponibilité à l'état d'ébauche de la séquence génomique de *M. extorquens* AM1 depuis 2003 a encore encouragé son utilisation, avec le développement d'études globales de protéomique et transcriptomique (Laukel *et al.*, 2007; Okubo *et al.*, 2007; Bosch *et al.*, 2008) et métabolomique (Marx *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2008; Kiefer *et al.*, 2008; Peyraud *et al.*, 2009). Le développement d'une large palette d'outils génétiques (Marx et Lidstrom, 2001, 2004; Marx, 2008) renforce encore le statut de modèle d'étude de *Methylobacterium*. De nombreuses enzymes de la souche *M. extorquens* AM1

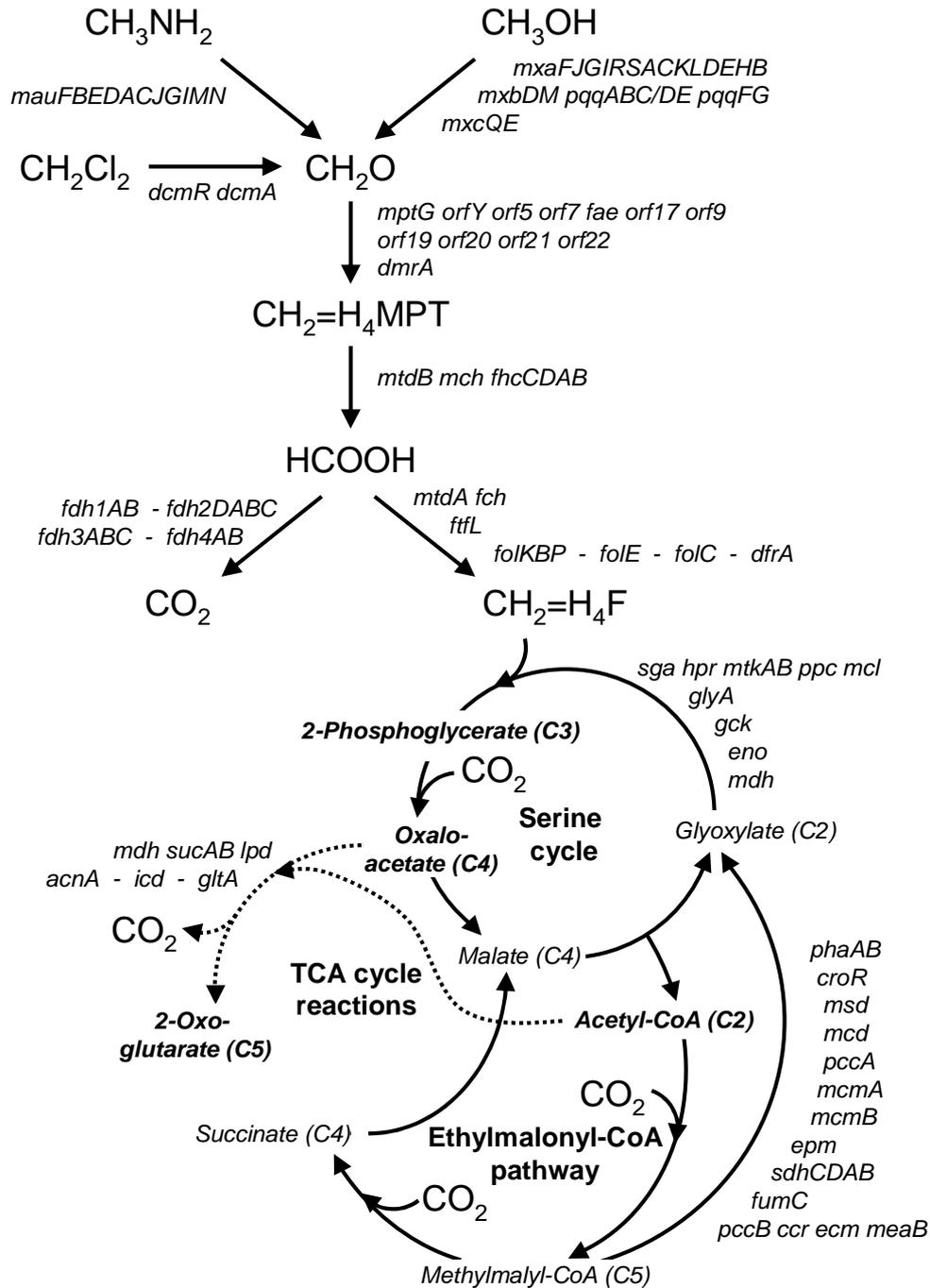


Figure I.1. Voies centrales du métabolisme méthylootrophe chez *Methylobacterium* AM1 et DM4 pour la conversion du carbone lors de la croissance méthylootrophe (d'après Vuilleumier *et al.*, 2009)

Les lignes pleines représentent les voies dépendantes du tétrahydrofolate (H_4F) et de la tétrahydrométhanoptérine (H_4MPT), le cycle de la sérine et la voie de l'éthylmalonyl-CoA permettant la régénération du glyoxylate. Les lignes discontinues correspondent aux réactions du cycle des acides tricarboxyliques (l'activité 2-oxoglutarate déshydrogénase n'est pas essentielle pour le métabolisme méthylootrophe). Les noms de gènes disposés côte à côte et non séparés d'un tiret indique des gènes co-localisés sur le chromosome. Les gènes et leur disposition le long du chromosome sont hautement conservés chez les souches AM1 et DM4, sauf le cluster *mau* d'utilisation de la méthylamine et le cluster *dcm*, qui sont tous deux uniques aux souches AM1 et DM4, respectivement.

ont ainsi pu être caractérisées.

Chez la plupart des bactéries méthylothropes, l'oxydation primaire de composés monocarbonés en formaldéhyde constitue la première étape du métabolisme méthylotrrophe. Pour ce qui concerne le méthanol, la méthanol déshydrogénase pyrroloquinoline quinone (PQQ) dépendante, caractérisée d'abord chez *M. extorquens* AM1, représente l'enzyme classique pour cette transformation, qui se déroule dans le périplasme (Fig. I.1; Anthony, 2000; Williams *et al.*, 2005). D'autres composés monocarbonés réduits comme la méthylamine peuvent également servir de substrats de croissance. Chez *M. extorquens* AM1, la méthylamine déshydrogénase MADH, en association avec son cofacteur, le tryptophane tryptophylquinone (TTQ), permet l'oxydation de la méthylamine en formaldéhyde (Fig. I.1; Chistoserdov *et al.*, 1994; Lidstrom, 2006). Toutefois, des systèmes alternatifs d'oxydation de ces deux composés sont également connus, même au sein du genre *Methylobacterium*.

Pour ce qui concerne les composés en C₁ halogénés, la souche *M. dichloromethanicum* DM4 étudiée au laboratoire est capable d'utiliser le dichlorométhane (DCM) comme unique source de carbone et d'énergie (Fig. I.1; Kayser *et al.*, 2002). L'enzyme responsable de la transformation du DCM en formaldéhyde, la dichlorométhane déshydrogénase DcmA, appartient à la famille des glutathion S-transférases (Vuilleumier et Leisinger, 1996; Vuilleumier *et al.*, 2001; Vuilleumier et Pagni, 2002) et catalyse cette réaction, qui s'accompagne de la production d'acide chlorhydrique dans le cytoplasme (Vuilleumier, 2002).

Le formaldéhyde, intermédiaire majeur des voies métaboliques méthylothropes, doit de par son caractère toxique (Feldman, 1973; Grafstrom, 1983) nécessairement être éliminé de manière rapide et efficace (Anthony, 1982). Des études du métabolisme méthylotrrophe ont en effet suggéré que si la consommation de formaldéhyde était brusquement arrêtée,

la concentration cytoplasmique de formaldéhyde atteindrait les 100 mM en moins d'une minute (Attwood et Quayle, 1984; Vorholt *et al.*, 2000; Marx *et al.*, 2003a). Chez *Methylobacterium*, le formaldéhyde peut être oxydé en CO₂ pour produire de l'énergie, ou assimilé en biomasse via le cycle de la sérine (Fig I.1; Anthony, 1982). Deux voies enzymatiques différentes, dépendantes de cofacteurs isofonctionnels mais de structure différente (Fig. I.2) sont ici potentiellement impliquées.

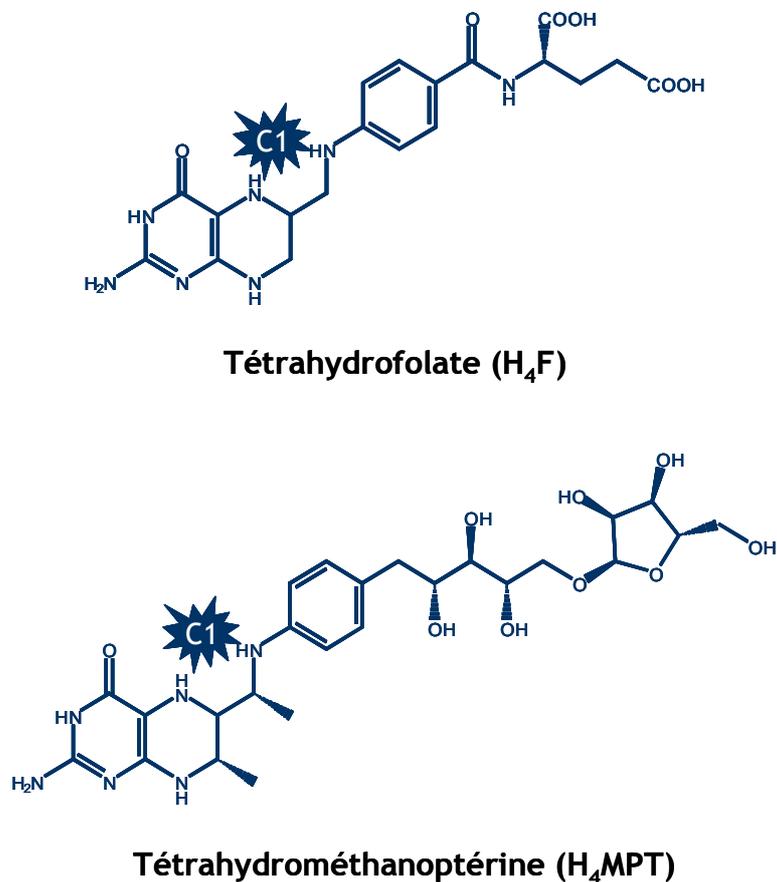


Figure I.2. Structure des cofacteurs porteurs de groupes à un atome de carbone chez *Methylobacterium*

L'étoile « C1 » symbolise les groupes méthyl-, méthylène-, méthényl-, et formyl- pouvant être liés à ces cofacteurs.

La première de ces deux voies dépend du tétrahydrofolate (H_4F : Fig. I.2) et met en jeu des réactions successives conduisant au méthylène- H_4F , au méthényle- H_4F , au formyl- H_4F puis au formiate. Cette voie similaire est retrouvée chez une grande diversité d'organismes. Il s'avère toutefois aujourd'hui que chez *M. extorquens*, cette voie semble avoir pour rôle principal le maintien en concentrations suffisantes des intermédiaires métaboliques liés au tétrahydrofolate pour les besoins d'assimilation du carbone en biomasse via le cycle de la sérine (Marx *et al.*, 2005; Crowther *et al.*, 2008), et qu'elle n'est pas la voie majeure pour la génération d'énergie par l'oxydation de composés monocarbonés en CO_2 .

La deuxième voie, découverte en 1998 (Chistoserdova *et al.*, 1998) et détectée depuis dans nombre de bactéries méthylophiles (Vorholt *et al.*, 1999), implique la tétrahydrométhanoptérine (H_4MPT : Fig. I.2), un analogue structurel du tétrahydrofolate, que l'on pensait être à l'origine exclusivement utilisé par les Archées méthanogènes anaérobies. Le formaldéhyde est d'abord activé par la protéine « formaldehyde activating enzyme » Fae (Vorholt *et al.*, 2000), puis converti en méthylène- H_4MPT (Vorholt *et al.*, 2000) qui est ensuite oxydé en méthényle- H_4MPT (Vorholt *et al.*, 1998; Hagemeyer *et al.*, 2000), puis en formyl- H_4MPT (Pomper *et al.*, 1999), et finalement en formiate puis en CO_2 (Pomper et Vorholt, 2001; Pomper *et al.*, 2002).

En raison de l'importance de l'activité élevée de Fae et des enzymes catalysant ces réactions dépendantes de la H_4MPT (deux méthylène- H_4MPT déshydrogénases (MtdA/MtdB) et un complexe formyltransférase-hydrolase), cette voie est considérée aujourd'hui comme la plus efficace dans l'oxydation du formaldéhyde en CO_2 (Vorholt *et al.*, 1998; Pomper *et al.*, 1999; Vorholt *et al.*, 2000; Pomper et Vorholt, 2001; Marx *et al.*, 2003a).

Comme déjà mentionné ci-dessus, l'assimilation du carbone se fait par le cycle de la sérine chez *Methylobacterium* (Fig. I.1; Marx *et al.*, 2005; Crowther *et al.*, 2008; Chistoserdova

et al., 2009), par condensation du méthylène- H_4F avec la glycine par la sérine hydroxyméthyltransférase GlyA (Fig. I.1). L'induction de cette enzyme en conditions d'utilisation du méthanol a été démontrée dans des expériences de protéomique (Laukel *et al.*, 2004) et de microarrays (Okubo *et al.*, 2007). De plus, il a été démontré qu'un mutant *glyA* est capable de croître normalement sur succinate, suggérant que la sérine hydroxyméthyltransférase n'est pas essentielle pour la croissance sur des composés multicarbonés (Chistoserdova *et al.*, 1994). La régénération du précurseur de la glycine, le glyoxylate ne peut se faire via la voie classique de régénération du glyoxylate ; l'enzyme essentielle de cette voie l'isocitrate lyase, étant absente chez AM1 (Chistoserdova et Lidstrom, 1996). Une alternative au cycle de régénération du glyoxylate, impliquant les enzymes du cycle du poly- β -hydroxybutyrate avait d'abord été proposée pour répondre à cette fonction (Korotkova *et al.*, 2002a; Korotkova *et al.*, 2002b). Des expériences plus récentes, impliquant en particulier une élégante approche métabolomique, ont montré que les méthylotrophes se développant sur le méthanol utilisent une voie inédite de régénération du glyoxylate, appelée la voie de l'éthylmalonyl-CoA (Fig. I.1) (Erb *et al.*, 2007, 2008; Kiefer *et al.*, 2008; Peyraud *et al.*, 2009). Le nouveau schéma pour la conversion de l'acétyl-CoA en glyoxylate a des conséquences importantes en terme de flux de carbone, pour ce qui concerne l'assimilation du carbone à partir de composés en C_1 . Selon ce nouveau modèle, deux molécules de glyoxylate sont régénérées pour chaque molécule d'acétyl-CoA, de par l'apport de deux molécules de CO_2 (Fig. I.1). Ce schéma renverse l'idée prévalant jusqu'ici selon laquelle deux molécules de formaldéhyde et une molécule de CO_2 permettent la production d'un composé C_3 (Anthony, 1982; Ensign, 2006). De manière remarquable, ce nouveau schéma tient compte autant des expériences classiques de marquage réalisées par Quayle et ses collaborateurs il y a 40 ans (Large *et al.*, 1961) que des expériences de métabolomique les plus récentes (Peyraud *et al.*, 2009).

1.4. Dégradation microbienne du chlorométhane

L'utilisation du chlorométhane comme substrat de croissance par les bactéries a été décrit chez de nombreux organismes (cf. Schäfer *et al.*, 2007; Tableau I.3). La première souche décrite comme capable de dégrader le chlorométhane en conditions aérobies et d'utiliser ce composé comme unique source de carbone et d'énergie pour sa croissance, *Hyphomicrobium* sp. MC1 (Hartmans *et al.*, 1986) a été isolée à partir de boues activées d'une station d'épuration. La croissance microbienne sur le chlorométhane est cependant aussi possible en conditions anaérobies. Ainsi, la bactérie méthylotrophe acétogène anaérobie stricte *Acetobacterium dehalogenans* (Traunecker *et al.*, 1991) effectue la déshalogénéation du chlorométhane par transfert de groupement méthyle du chlorométhane vers le tétrahydrofolate grâce à une protéine corrinnoïde, générant ainsi le méthylène-tétrahydrofolate, avec production d'ion chlorure (Messmer *et al.*, 1993). La souche *Pseudomonas aeruginosa* NB1 est également capable d'utiliser le chlorométhane comme seule et unique source de carbone et d'énergie en conditions anaérobies, avec réduction du nitrate comme accepteur terminal d'électrons (Freedman *et al.*, 2004). Dans ce cas, en revanche, le mécanisme de déchloration du chlorométhane reste inconnu.

Pour l'essentiel toutefois, ce sont des organismes se développant avec le chlorométhane en conditions aérobies qui ont été décrits jusqu'ici. Ainsi, plusieurs souches microbiennes ont été isolées à partir d'échantillons de sols contaminés d'une usine pétrochimique en Russie (Doronina *et al.*, 1996). Ces souches assimilent toutes le formaldéhyde via le cycle de la sérine (Anthony, 1982), et l'analyse de leurs gènes ARNr 16S (McDonald *et al.*, 2001) a montré qu'elles appartenaient à deux genres différents, à savoir *Methylobacterium* et *Hyphomicrobium* (Tableau I.3).

A la suite de ces travaux, d'autres souches de bactéries méthylotrophes facultatives capables d'utiliser le chlorométhane comme seule source de carbone et d'énergie ont été isolées

Tableau I.3 : Souches bactériennes chlorométhane-dégradantes isolées

	Origine	Type de Gram	Type trophique	Présence de <i>cmuA</i>	Références
<i>Hyphomicrobium</i> sp. MC1	Station d'épuration industrielle (Schweizerhalle, Suisse)	négatif	Méthylotrophe facultatif	nd ^a	Hartmans <i>et al.</i> , 1986
<i>Acetobacterium dehalogenans</i> MC	Boue de digesteur industriel (Stuttgart, Allemagne)	positif	Homoacétogène	nd	Traunecker <i>et al.</i> , 1991
<i>Hyphomicrobium</i> sp. CM2	Sol d'une usine pétrochimique (Tatarstan, Russie)	négatif	Méthylotrophe facultatif	oui	Doronina <i>et al.</i> , 1996
<i>Methylobacterium</i> sp. CM4	Sol d'une usine pétrochimique (Tatarstan, Russie)	négatif	Méthylotrophe facultatif	oui	Doronina <i>et al.</i> , 1996
<i>Aminobacter ciceronei</i> IMB-1	Sol agricole traité par fumigation (Californie, USA)	négatif	Méthylotrophe facultatif	oui	Miller <i>et al.</i> , 1997
<i>Aminobacter lissarensis</i> CC495	Sol de bois de hêtre (County down, Irlande)	négatif	Méthylotrophe facultatif	oui	Coulter <i>et al.</i> , 1999
<i>Leisingera methylohalidivorans</i> MB2	Bassin de marée (Californie, USA)	négatif	Méthylotrophe facultatif	non	Schäfer <i>et al.</i> , 2002
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NB1	Boues activées, station d'épuration (USA)	négatif	Méthylotrophe facultatif	nd	Freedman <i>et al.</i> , 2004
<i>Roseovarius</i> sp. 179	Eau de mer côtière (Achmelvich Bay, Ecosse)	négatif	Méthylotrophe facultatif	oui	Schäfer <i>et al.</i> , 2005
<i>Roseovarius</i> sp. 217	Eau de mer, canal de la Manche (Plymouth, Angleterre)	négatif	Méthylotrophe facultatif	oui	Schäfer <i>et al.</i> , 2005
<i>Ruegeria</i> sp. 198	Eau de mer côtière (Achmelvich Bay, Ecosse)	négatif	Méthylotrophe facultatif	oui	Schäfer <i>et al.</i> , 2005

^a nd : données non disponibles

par d'autres équipes de recherche et affiliées au genre *Aminobacter* (Tableau I.3). La première d'entre elles, *Aminobacter lissarensis* IMB-1 a été isolée à partir d'échantillons de sol fumigés au bromométhane (Miller *et al.*, 1997), la seconde *Aminobacter ciceronei* CC495, a quant à elle été isolée de la couche supérieure d'un sol forestier du Nord de l'Irlande (Tableau I.3; Coulter *et al.*, 1999). Enfin, d'autres souches ont été isolées à partir d'environnements marins (Tableau I.3). C'est le cas de *Leisingera methylohalidovorans* MB2, premier isolat marin de la famille des *Rhodobacteraceae* à présenter cette capacité (Goodwin *et al.*, 1997). Trois autres souches méthylophes facultatives de la famille des *Rhodobacteraceae*, également isolées d'environnements marins, sont *Roseovarius* sp. 179, *Roseovarius* sp. 217, et *Ruegeria* sp. 198 (Tableau I.3).

1.5. Métabolisme du chlorométhane dans le contexte de la méthylophie

Des études biochimiques et génétiques portant sur le métabolisme du chlorométhane par la souche CM4 appartenant au genre *Methylobacterium* ont permis de proposer une voie d'utilisation pour ce composé (Fig. I.3 et Fig. I.4; Vannelli *et al.*, 1998, 1999). Dans un premier temps, des mesures de rendements cellulaires et de croissance de la souche CM4 ont permis d'établir la stoechiométrie de la réaction d'utilisation du chlorométhane. Ces auteurs ont observé que la souche CM4 métabolisait 1 mol de chlorométhane et 1,5 mol d'O₂ pour produire 1 mol de CO₂ et 1 mol de chlorure (Vannelli *et al.*, 1998). Cependant, les rendements molaires et de croissance observés ne permettaient pas de décider du type de réaction par laquelle la souche métabolise le chlorométhane, les données obtenues étant à la fois compatibles avec l'activité d'une enzyme de type hydrolase ou d'une voie de type méthyltransférase/déshydrogénase (Vannelli *et al.*, 1998).

L'inactivation génique par mutagénèse aléatoire grâce au transposon miniTn5 a conduit à l'obtention de 9 mutants de la souche CM4 poussant sur le méthanol et la méthylamine

mais incapables de se développer sur le chlorométhane (Vannelli *et al.*, 1998). L'analyse d'extraits protéiques de cultures sur chlorométhane, sur méthanol ou sur un mélange de méthanol et de chlorométhane a montré que l'expression de deux protéines de 65 et de 35 kDa, était induite par le chlorométhane, et que ces protéines étaient absentes chez les mutants incapables de se développer sur le chlorométhane seul (Vannelli *et al.*, 1998). L'analyse des sites d'insertion du mini-transposon par clonage des fragments d'ADN correspondants des mutants d'intérêt a ensuite permis l'identification des gènes impliqués (Vannelli *et al.*, 1999; Fig. I.3).

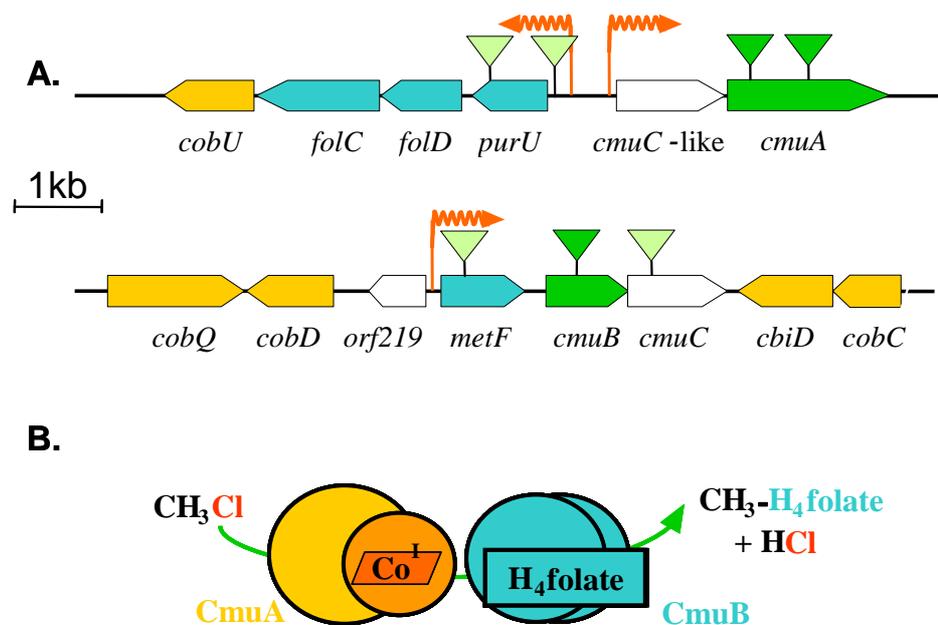


Figure I.3. Utilisation du chlorométhane dans la souche *Methylobacterium* sp. CM4 (d'après Studer, 2001)

(A) Les 2 fragments d'ADN portant les gènes essentiels à la croissance et à la déchloration identifiés par mutagenèse aléatoire. Un triangle indique le site d'insertion du mini-transposon dans les mutants obtenus, pour les gènes essentiels à la fois à la croissance sur le chlorométhane et à sa déchloration (vert foncé) ou par la croissance uniquement (vert clair). Les séquences promotrices identifiées sont également indiquées (flèches oranges). (B) Schéma de la réaction de déchloration du chlorométhane par les protéines purifiées CmuA et CmuB, indiquant la dépendance de la cobalamine (losange orange foncé) et du tétrahydrofolate.

Ainsi, les gènes désignés *cmuA*, *cmuB* et *cmuC* (pour chloromethane utilisation), codant pour des méthyltransférases sur la base de similarités de séquences avec des enzymes d'Archées méthanogènes, ont pu être identifiés (Vannelli *et al.*, 1999). Le gène *cmuA* code une protéine singulière de 617 résidus, avec un domaine méthyltransférase en sa partie N-terminale et un site de liaison corrinoïde sur son domaine C-terminal. Des protéines homologues à ces deux domaines avaient précédemment été identifiées chez *Methanosarcina barkeri*, où elles participent à la méthanogénèse à partir de composés sans liaison carbone-carbone comme la méthylamine (Krzycki, 2004). Plus précisément, le domaine N-terminal de CmuA a une séquence similaire à la méthylcobamide:CoM méthyltransférase MtbA opérant le transfert d'un corrinoïde méthylé dérivant de la vitamine B₁₂ au coenzyme M, tandis que le domaine C-terminal de CmuA présente quant à lui une ressemblance à la protéine corrinoïde monométhylamine MtmC de *M. barkerii* capable de se lier au groupe méthyle de la méthylamine (Krzycki, 2004). La purification des protéines CmuB (Studer *et al.*, 1999) et CmuA (Studer *et al.*, 2001) de la souche CM4 a ensuite permis de montrer que ces deux enzymes étaient suffisantes pour catalyser en conditions *in vitro* la réaction de transfert du groupement méthyle du chlorométhane vers le tétrahydrofolate (Fig. I.3), et aussi que la tétrahydrométhanoptérine, l'autre cofacteur de la voie d'oxydation des C₁ présente chez *M. extorquens* AM1, n'était pas l'accepteur du groupement méthyle (Studer, 2001). D'autres gènes également identifiés par mutagénèse ont pu être localisés dans le voisinage des gènes *cmuA*, *cmuB* et *cmuC*. Le caractère essentiel pour la croissance de la souche CM4 sur le chlorométhane des gènes *metF* et *purU*, codant respectivement pour une méthylène-tétrahydrofolate réductase et une formyl-tétrahydrofolate hydrolase, localisés respectivement en amont de *cmuA* et de *cmuB*, a également été montré (Studer *et al.*, 2001, 2002).

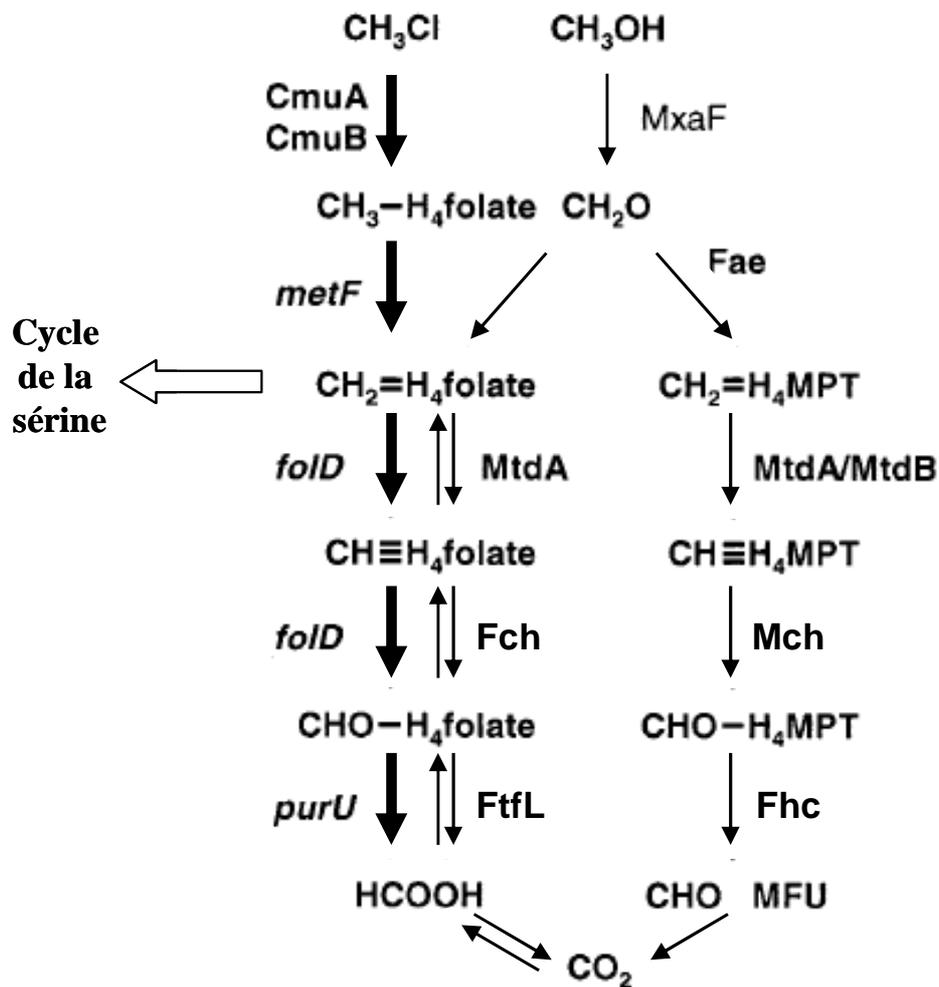


Figure I.4. Voie proposée pour l'utilisation du chlorométhane chez *M. chloromethanicum* CM4 (d'après Studer *et al.*, 2002)

Les réactions figurées par des flèches fines indiquent des réactions impliquées dans la croissance sur méthanol chez la souche *M. extorquens* AM1 (Chistoserdova *et al.*, 1998). Les réactions représentées par des flèches épaisses correspondent à des étapes supposées être spécifiques à la souche *M. chloromethanicum* CM4. CmuA, protéine à deux domaines méthyltransférase et de liaison du groupe corrinnoïde (Studer *et al.*, 2001); CmuB, méthyltransférase méthylcobalamine:H₄F (Studer *et al.*, 1999); MetF, méthylène-H₄F réductase; FolD, enzyme bifonctionnelle méthylène-H₄F déshydrogénase / méthényl-H₄F cyclohydrolase, PurU, 10-formyl-H₄F hydrolase; MtdA, méthylène-H₄F / méthylène-H₄MPT déshydrogénase NADP-dépendante (Vorholt *et al.*, 1999); FchA, méthényl-H₄F cyclohydrolase (Pomper *et al.*, 1999); FtfL, formyl-H₄F synthétase (Marx *et al.*, 2003c); Fae, « formaldehyde activating enzyme » (Vorholt *et al.*, 2000); MtdB, méthylène-H₄MPT déshydrogénase NAD(P)-dépendante (Hagemeier *et al.*, 2000); Mch, méthényl-H₄MPT cyclohydrolase (Pomper *et al.*, 1999); Fhc, complexe formyltransférase-hydrolase H₄MPT formyltransférase (Pomper et Vorholt, 2001).

Les expériences de SDS-PAGE décrites ci-dessus avaient déjà indiqué que le métabolisme du chlorométhane chez CM4 était induit par le chlorométhane, et qu'il n'était pas réprimé par le méthanol (Vannelli *et al.*, 1998). Des expériences faisant appel à des fusions transcriptionnelles et des études d'extension d'amorces spécifiques réalisées à partir d'ARN extraits de cultures sur chlorométhane, ont permis de le confirmer et aussi de localiser et de caractériser les séquences promotrices des gènes *cmu* en amont des gènes *purU*, *metF* et *cmuC-like* (Studer *et al.*, 2002; Fig. I.3). Ces travaux ont aussi mis en évidence l'induction chlorométhane-dépendante de l'expression du gène *fold*. Ce gène, situé en aval de *purU*, code une enzyme bifonctionnelle méthylène-tétrahydrofolate déshydrogénase / méthényl-tétrahydrofolate cyclohydrolase (Studer *et al.*, 2002). L'identification de l'ensemble de ces gènes a permis de valider l'existence d'une voie spécifique d'utilisation du chlorométhane chez CM4 strictement dépendante du tétrahydrofolate (Studer *et al.*, 2002), et allant du chlorométhane au formiate (Fig. I.4). Sur le papier, cette voie est similaire à la voie tétrahydrofolate-dépendante d'oxydation du formaldéhyde commune aux bactéries méthylophiles, dans laquelle les enzymes MtdA et Fch remplacent l'enzyme bifonctionnelle codée par *fold* pour la voie de la souche CM4.

Suite à ces différentes études, *M. chloromethanicum* CM4 (Fig. I.5) s'est imposé comme l'organisme modèle pour l'étude de la dégradation microbienne du chlorométhane. En raison de l'importance particulière des cofacteurs cobalamine et folate pour ce métabolisme, les gènes de biosynthèse et de régénération de ces composés sont présentés en détail ci-après.



Figure I.5. Observation microscopique d'une culture de *Methylobacterium* sp. CM4 en phase exponentielle de croissance (grossissement x 1000)

Les cellules sont mobiles, avec un flagelle polaire et présentent une forme caractéristique de bacille.

1.6. La cobalamine

La cobalamine, plus souvent appelée vitamine B₁₂, est l'un des produits naturels non polymériques de plus grande taille qui soit connu (Fig. I.6), et l'unique vitamine exclusivement produite par des procaryotes, bactéries et Archées comprises. La biosynthèse de la cobalamine représente l'une des voies métaboliques les plus complexes retrouvée dans la nature, et requiert pas moins de 30 gènes pour la synthèse complète *de novo* (cf. plus bas, Fig. I.11). Quatre prix Nobel ont été décernés pour des travaux sur la vitamine B₁₂ depuis 1934 (médecine en 1934 pour George Minot, William Murphy et George Wipple; chimie en 1964 pour Dorothy Hodgkin; chimie en 1965 pour Robert Woodward; chimie en 1981 pour Fukui et Hoffmann). Toutefois, les détails de la dernière étape de la formation du 5,6-diméthylbenzimidazole (DMB) n'ont été élucidés qu'en 2007 (Taga *et al.*, 2007).

La cobalamine est un cofacteur tétrapyrrolique macrocyclique de structure chimique proche de celle de l'hème, dans lequel l'atome central de fer est remplacé par un atome de cobalt, stabilisé par deux ligands axiaux (Fig. I.6). La nomenclature décrivant les coenzymes de type B₁₂ est complexe. Les règles d'attribution de noms aux différentes molécules complètes et précurseurs de la "Commission on Biochemical Nomenclature" (CBN) de l'International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) et révisées par l'International Union of Biochemistry (IUB) sont résumées ci-après pour une meilleure compréhension.

- Les corrinoïdes désignent des molécules contenant le tétrapyrrole cyclique portant le cobalt, appelé l'anneau corrine.
- Les corrinoïdes incomplets sont des corrinoïdes sans ligand axial inférieur (α).
- Les cobamides désignent un corrinoïde complet, c'est-à-dire contenant la boucle nucléotidique ; le nom du cobamide dépend de la nature du ligand inférieur (α).
- La cobalamine désigne le cobamide dont le ligand inférieur (α) est le DMB.

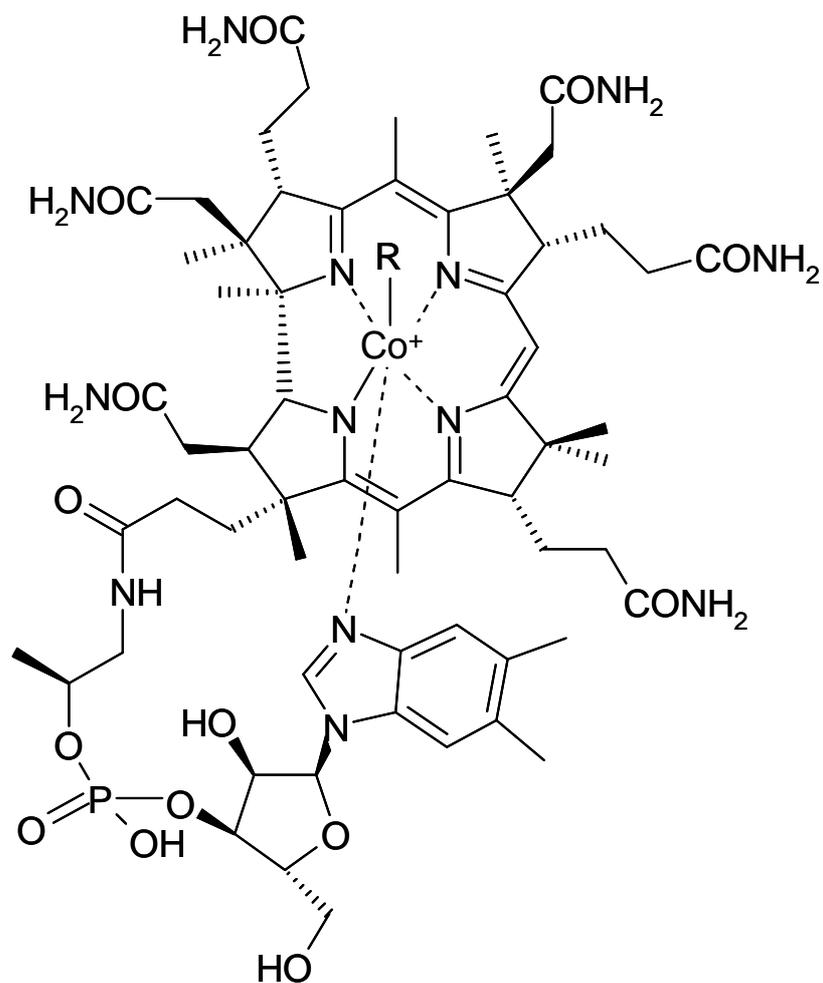


Figure I.6. Structure de la cobalamine

Le terme vitamine B₁₂ est généralement utilisé pour décrire des composés du groupe des cobalamines. La molécule de cobalamine peut être divisée en trois parties ; l'anneau corrine central contenant quatre ligands stabilisant l'ion cobalt central, un ligand axial inférieur (α) constitué du 5,6-diméthylbenzimidazole (DMB) et un ligand axial supérieur (β). Les ligands axiaux supérieurs (β) (symbolisés par la lettre «R») de l'adénosylcobalamine et de la méthylcobalamine, les formes coenzymes B₁₂, sont respectivement l'adénosine ou un groupement méthyle. La cyanocobalamine, forme commerciale de la vitamine B₁₂, possède un groupement cyanure en position axiale supérieure.

- L'adénosylcobamide correspond à la forme coenzyme d'un cobamide dont le ligand inférieur (α) n'est pas le DMB.
- La vitamine B₁₂ ou cyanocobalamine correspond à une cobalamine avec un groupement cyanure pour ligand supérieur (β) (cf. Fig. I.6).
- Le coenzyme B₁₂ ou adénosylcobalamine désigne une cobalamine ayant une 5,6-déoxyadénosine (Ado) pour ligand supérieur (β), et le DMB pour ligand inférieur (α) (cf. Fig. I.6).
- Les cobinamides correspondent à des corrinoïdes incomplets dont la boucle nucléotidique et le ligand 5,6-déoxyadénosine (Ado) sont absents.
- La pseudo-vitamine B₁₂ désigne le cobamide dont le ligand inférieur (α) est l'adénine.

Les produits finaux résultants de la voie de biosynthèse, la méthylcobalamine et l'adénosylcobalamine, constituent les formes biologiques actives de la cobalamine (ou coenzyme B₁₂). La méthylcobalamine et l'adénosylcobalamine diffèrent par la nature de leurs ligands axiaux supérieurs (β), respectivement un groupement méthyle ou adénosyle. Elles sont des dérivés de la vitamine B₁₂ produite principalement de manière industrielle sous forme de cyanocobalamine. Le ligand axial supérieur (β) cyanure de la cyanocobalamine résulte de la méthode par laquelle ce composé est extrait de cultures bactériennes lors de sa production.

Sous forme de coenzyme, la vitamine B₁₂ est un cofacteur essentiel de réactions enzymatiques de réarrangement intramoléculaire, de la réduction de ribonucléotides triphosphate, et de réactions de transméthylation (Banerjee et Ragsdale, 2003). Parmi les enzymes dépendant du coenzyme B₁₂, on compte ainsi des isomérases comme la méthylmalonyl-CoA mutase, l'isoenzyme ribonucléotide réductase NrdJ, des enzymes catalysant la fermentation anaérobie du 1,2-propanediol et de l'éthanolamine, des méthyltransférases comme la méthionine synthase MetH, et enfin des déshalogénases réductives (Banerjee et Ragsdale, 2003).

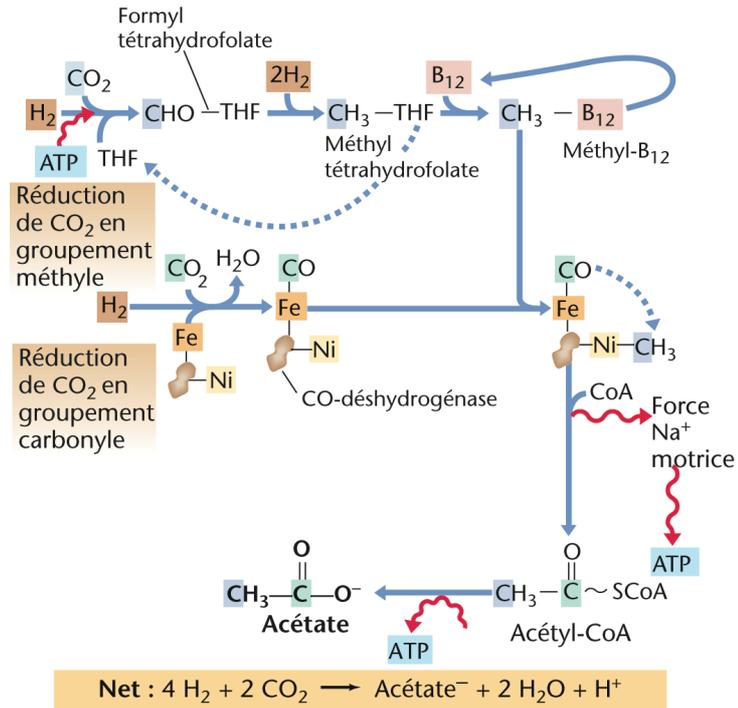


Figure I.7. L'acétogénèse (d'après Madigan *et al.*, 2007) THF, tétrahydrofolate.

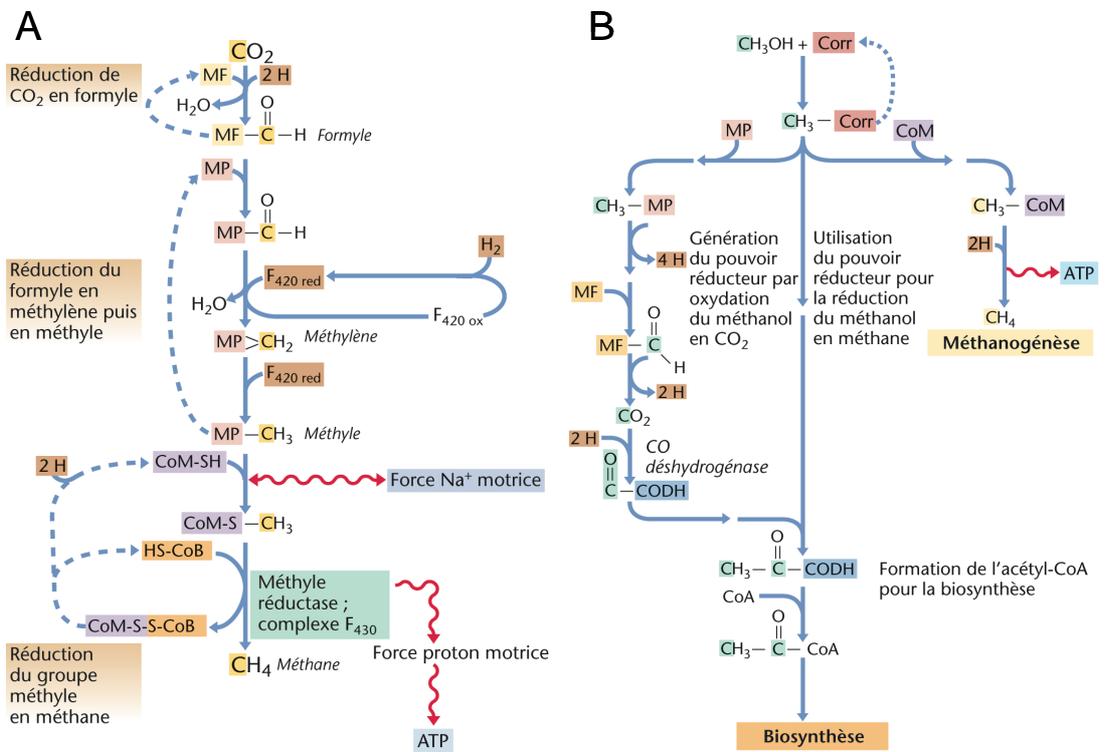


Figure I.8. La méthanogénèse (d'après Madigan *et al.*, 2007)

A, Voie de méthanogénèse à partir du CO_2 ; B, Voie de conversion du méthanol en méthane. MF, méthanofurane; MP, méthanoptérine; CoA, Coenzyme A; CoB, Coenzyme B; $\text{F}_{420\text{red}}$, $\text{F}_{420\text{ox}}$, coenzyme F_{420} réduit ou oxydé.

Chez l'homme, la vitamine B₁₂ est requise à l'état de trace (environ 1 µg/jour) pour la fonction de deux enzymes, la (R)-méthylmalonyl-CoA mutase et la méthionine synthase.

La (R)-méthylmalonyl-CoA mutase est impliquée dans le métabolisme du propionyl-CoA dérivant de la dégradation de composés comme la thymine, la valine, la méthionine ainsi que de chaînes d'acides gras. Dans cette réaction, le propionyl-CoA est carboxylé en (S)-méthylmalonyl-CoA, épimérisé en isomère (R), puis réarrangé par la (R)-méthylmalonyl-CoA mutase en succinyl-CoA. Ce composé intègre alors le cycle des acides tricarboxyliques.

Chez les microorganismes, outre les réactions enzymatiques décrites ci-dessus, on compte aussi parmi les réactions dépendantes de la vitamine B₁₂ d'importance : la synthèse d'acétyl-CoA par les bactéries acétogènes, le transfert de méthyle chez les Archées méthanogènes, la réduction de ribonucléotide et les processus de fermentation des bactéries entériques. Ces réactions associent des protéines dépendant de la cobalamine et du folate, comme c'est le cas de la chlorométhane déshalogénase de la souche CM4. Le processus de formation d'acétate, appelé voie de Wood/Ljungdahl, dans lequel l'acétyl-CoA est généré à partir de 2 molécules de CO₂, est dépendant de corrinoïdes méthylés (Fig. I.7) (Wood *et al.*, 1986; Ragsdale 1991; Stupperich, 1993). Ces derniers participent au transfert du méthyle du méthyltétrahydrofolate vers la carbone monoxide déshydrogénase CODH, une enzyme capable de lier le monoxide de carbone (CO) grâce à son site actif contenant du nickel. Ce transfert de méthyle s'opère via une protéine méthyl-corrinoïde / fer-soufre qui utilise le groupement méthyle pour synthétiser l'acétyl-CoA à partir du CO fixé au nickel et de coenzyme A. L'acétyl-CoA est transformé en acétylphosphate et le phosphate est transféré à l'ADP avec formation d'ATP et d'acide acétique (Ljungdahl et Wood, 1982; Ragsdale *et al.*, 1991).

La cobalamine joue également un rôle essentiel chez les Archées méthanogènes méthylotrophes, qui sont des organismes anaérobies stricts (Fig. I.8). Dans ce cas, les corrinoïdes méthylés sont requis pour effectuer le transfert de groupes méthyles à partir de substrats comme le méthanol (Keltjens et Vogels, 1993), les méthylamines (Burcke et Krzycki, 1995) et l'acétate (Ferry, 1992b) vers un groupe thiol du coenzyme M (Fig. I.8) (Ferry, 1992a; Stupperich 1993). Ce groupement méthyle peut également être transféré de la méthyltétrahydrométhanoptérine (méthyl-H₄MPT) vers un groupe thiol du coenzyme M via la méthylcobalamine (Weiss et Thauer, 1993). L'énergie importante disponible dans cette réaction (-30 kJ/mol) est récupérée par couplage du transfert de méthyle à l'extrusion d'ions sodium, conduisant à la génération d'un gradient de membrane exploité pour la synthèse d'ATP (Becher *et al.*, 1992; Blaut *et al.*, 1992).

La vitamine B₁₂ est également importante pour la fermentation anaérobie du 1,2-propanediol, de l'éthanolamine et du glycérol. Ces réactions redox sont catalysées respectivement par des diol déshydratases, des éthanolamine ammonia lyases ainsi que des glycérol déshydratases (Roth *et al.*, 1996). Chez certaines bactéries, le propionaldéhyde et l'acétaldéhyde générés respectivement par l'oxydation du propionyl-CoA et de l'acétyl-CoA, peuvent servir de sources de carbone et d'énergie (Obradors *et al.*, 1988). Enfin chez *Methylobacterium* même, les enzymes du cycle de régénération du glyoxylate (cf. Section 1.3 ci-dessus, et Fig. I.1), la méthylmalonyl-CoA mutase (Korotkova *et al.*, 2004), et l'éthylmalonyl-CoA mutase (Erb *et al.*, 2007) sont des enzymes dépendantes du coenzyme B₁₂.

1.6.1 L'importance de la cobalamine dans le métabolisme des méthanes chlorés

Le cobalt et la cobalamine occupent une place essentielle dans le métabolisme du chlorométhane par la souche CM4. Il a été démontré que la croissance

de *M. chloromethanicum* CM4, avec le chlorométhane pour seule et unique source de carbone et d'énergie, dépendait strictement de la présence de cobalt dans le milieu de culture (Fig. I.9). Ceci n'a en revanche pas été observé lors de la croissance sur méthylamine ou méthanol (données non montrées). En outre, des analyses HPLC des cyano-corrinoïdes extraits de *M. chloromethanicum* CM4 après croissance sur chlorométhane en présence de chlorure de cobalt radioactif marqué au [⁵⁷Co] ont montré que la fraction radioactive principale (53% de la radioactivité totale) co-chromatographie avec l'authentique vitamine B₁₂. Ceci suggère non seulement que CM4 requiert la vitamine B₁₂ pour sa croissance sur chlorométhane, mais aussi qu'elle est capable de la synthétiser *de novo* (Studer *et al.*, 2001). Le contenu en vitamine B₁₂ a été estimé à 4 nmol.g⁻¹ de poids sec (soit 6.3 µg.g⁻¹), ce qui la situe à un niveau relativement bas par comparaison aux contenus en cobalamine présents dans d'autres organismes (référéncé dans Studer *et al.*, 2001). A l'opposé, la croissance sur chlorométhane d'*Aminobacter lissarensis* CC495 est strictement dépendante de la supplémentation en cyanocobalamine, indiquant que cet organisme n'est pas capable de synthétiser la cobalamine *de novo* (Coulter *et al.*, 1999).

Des travaux sur la souche *M. dichloromethanicum* DM4 ont par ailleurs aussi montré que la production de cobalamine est supérieure lors de la croissance sur dichlorométhane ou sur méthanol (10 µg.g⁻¹ de biomasse) que sur succinate ou éthanol (7 µg.g⁻¹ de biomasse) (Danilova *et al.*, 2004). Ceci ne semble toutefois pas associé à la transformation de méthanes chlorés mais plutôt à une contrainte du métabolisme méthylo-trophe. D'autre part, l'apport exogène d'adénosylcobalamine stimule chez la souche DM4 la synthèse d'ADN en présence de quantités réduites d'oxygène, alors que celui-ci n'a aucun effet en conditions saturantes en oxygène (Danilova *et al.*, 2004). Des expériences *in vitro* ont indiqué qu'en plus d'une ribonucléotide réductase dépendante de l'adénosylcobalamine, DM4 possède une ribonucléotide réductase indépendante de l'adénosylcobalamine, et que celle-ci

est activée en présence d'oxygène (Danilova *et al.*, 2004). Ainsi, lorsque DM4 est cultivé en conditions microaérophiles, c'est la ribonucléotide réductase dépendante de l'adénosylcobalamine qui est active, alors qu'en condition de forte aération, la ribonucléotide réductase indépendante de l'adénosylcobalamine semble jouer un rôle prévalent dans la biosynthèse d'ADN (Danilova *et al.*, 2004).

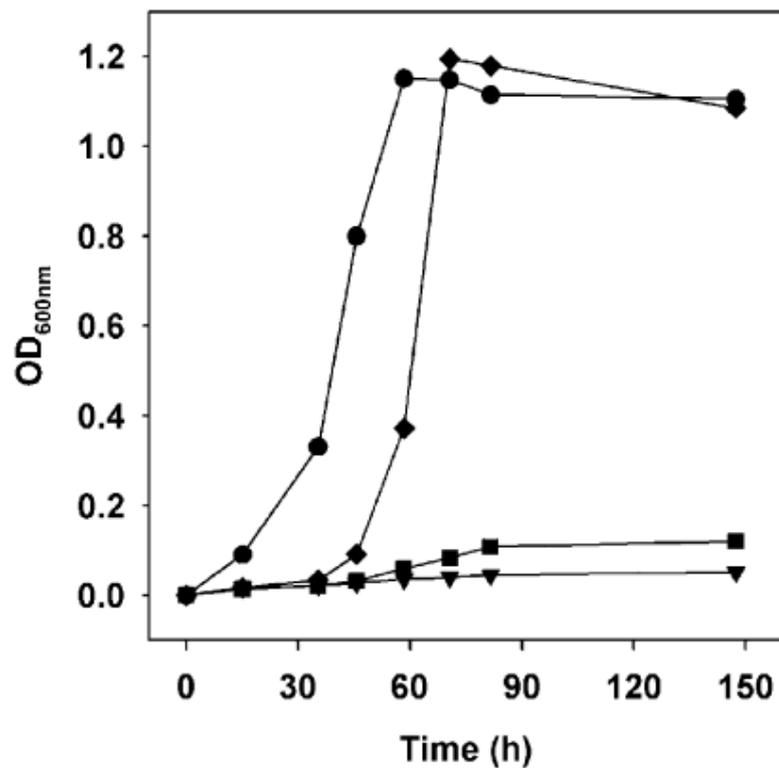


Figure I.9. La croissance sur chlorométhane requiert la présence de cobalt
(d'après Studer *et al.*, 2001)

Cultures sur chlorométhane de *M. chloromethanicum* CM4 en milieu minéral sans (triangles noirs) ou avec $\text{Co}(\text{NO}_3)_6\text{H}_2\text{O}$ à la concentration de 86 nm (losanges noirs) ou 8.6 nm (carrés noirs) et culture sur méthylamine en milieu minéral sans ajout de cobalt.

1.6.2. Les transporteurs du cobalt et de la cobalamine

Chez la plupart des bactéries, le cobalt est principalement accumulé de manière rapide et non spécifique par le système de transport CorA (Fig. I.10) (Niegowski et Eshaghi, 2007). Les systèmes CorA les mieux étudiés sont ceux d'*E. coli* et *S. enterica*. Bien que généralement associée au transport d'ions magnésium, l'activité des protéines CorA s'étend aux ions cobalt et nickel. Il a été montré que les ions cobalt inhibent le transport de magnésium chez *E. coli* (Nelson et Kennedy, 1971). L'architecture structurelle du transporteur d'*E. coli* peut être considérée comme une protéine membranaire homotétramérique à deux domaines : un domaine périplasmique en forme de pyramide et un domaine transmembranaire composé de 3 hélices alpha (Wang *et al.*, 2006) (Fig. I.10). Cette même protéine a été cristallisée chez *Thermotoga maritima* et serait sous forme homopentamérique (Lunin *et al.*, 2006; Eshaghi *et al.*, 2006). D'autres gènes, codant potentiellement des transporteurs du cobalt, ont été identifiés à travers des études de génomique comparative de la biosynthèse de la cobalamine chez les procaryotes (Rodionov *et al.*, 2003). Cette comparaison montre la présence chez les Alpha-Protéobactéries, d'au moins quatre systèmes différents de transport du cobalt (CbiMNQO, HoxN, CbtAB et CbtC). L'un de ces systèmes, retrouvé chez les Rhizobiales et notamment chez *Mesorhizobium loti* et *Agrobacterium tumefaciens*, est codé par les gènes *cbtA* et *cbtB*, décrits comme étant toujours co-localisés voire même fusionnés dans le cas de *P. aeruginosa* (*cbtAB*) (Rodionov *et al.*, 2003). Ces gènes codent une protéine transmembranaire CbtA pentamérique associée à une autre protéine transmembranaire CbtB possédant un motif de liaison aux métaux lourds à son extrémité C-terminale (Fig. I.10).

Enfin, le cobalt peut être excrété de la cellule via un mécanisme d'antiport substrat/H⁺ par des transporteurs tripartites composés d'une sous-unité de la membrane interne, appelée RND pour Resistance-Nodulation-Division (ou IMP pour Inner Membrane Protein),

d'une sous-unité périplasmique (MFP pour Membrane Fusion Protein) et d'une sous-unité de la membrane externe (OMP pour Outer Membrane Protein) (cf. Fig. I.10).

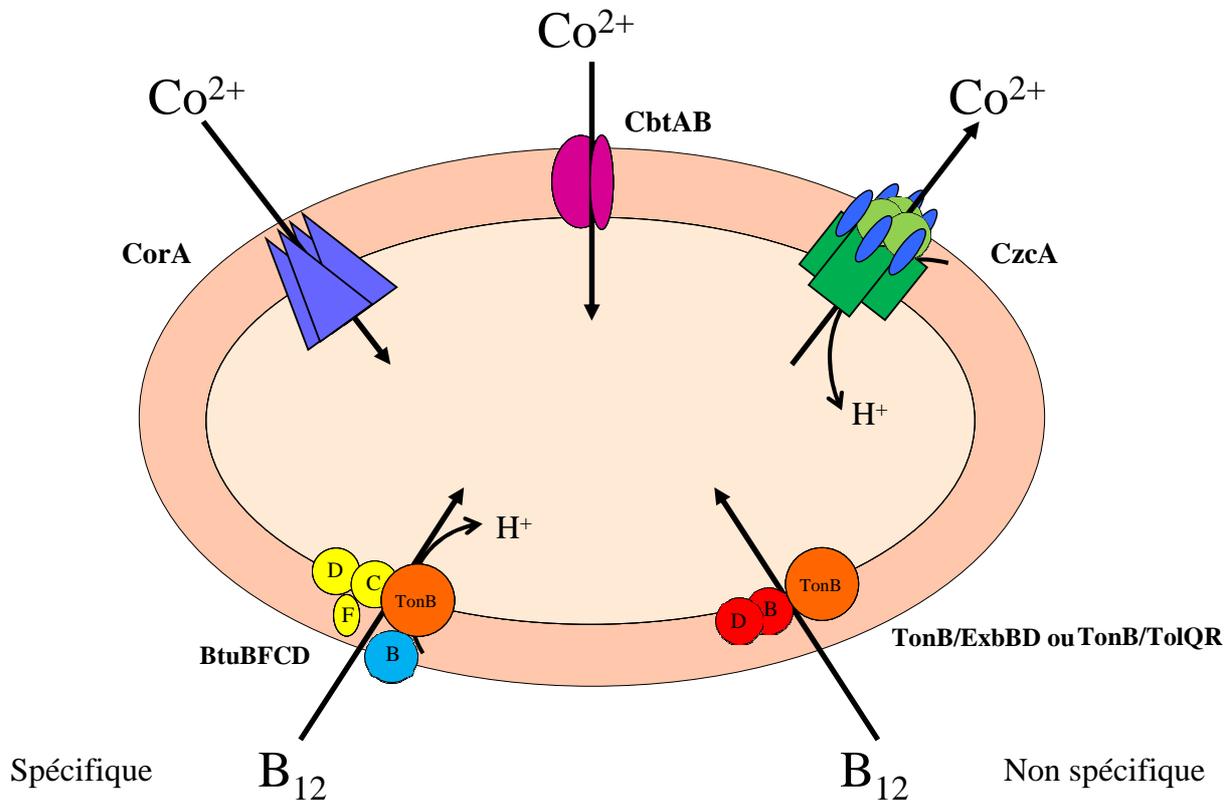


Figure I.10. Différents systèmes bactériens de transport du cobalt et de dérivés corrinoides

Le transporteur CorA d'*E. coli* est une protéine membranaire homotétramérique (en bleu) dont chaque sous-unité possède deux domaines ; un domaine périplasmique et un domaine transmembranaire composé de 3 hélices alpha. Les transporteurs de type CbtAB sont composés de cinq domaines transmembranaires (CbtA, grosse sous-unité) et d'un domaine transmembranaire supplémentaire lié à un domaine de liaison aux métaux (CbtB, petite sous-unité). Les transporteurs de type RND, dont fait partie le transporteur CzcA sont des trimères de sous-unités à 12 domaines transmembranaires (représentés en vert foncé) entrecoupés de 2 grandes boucles périplasmiques qui permettraient le contact avec le trimère d'OMP (Outer Membrane Protein, représenté en vert clair). La sous-unité MFP (représentée en bleu) serait elle probablement hexamérique (Misra et Bavro, 2009). Les RND sont subdivisés en 8 sous-familles, dont les Heavy Metal Efflux (HME) comprenant CzcA (cobalt zinc cadmium resistance protein) de *Ralstonia*, caractérisé pour l'efflux de Co^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} (Goldberg *et al.*, 1999) et CusA de *E. coli* excréant le Cu^+ et Ag^+ (Su *et al.*, 2009). Du point de vue de l'organisation génétique, les gènes codant la MFP et le RND sont co-localisés, alors que le gène de l'OMP peut soit être à la suite de ces deux gènes (exemple : *mexAB-oprM* chez *P. aeruginosa*), soit recruté ailleurs dans le génome (exemple : *acrAB-tolC*).

Outre l'ion cobalt lui-même, les bactéries et Archées peuvent transporter des précurseurs cobinamides de manière plus ou moins spécifique. Le recyclage de cobinamides préformés est en effet avantageux car il permet d'économiser les quantités substantielles d'énergie qui seront nécessaires à la synthèse *de novo* de l'anneau corrine. Chez *E. coli*, ces transporteurs sont composés de plusieurs protéines : le transporteur TonB-dépendant de la membrane externe spécifique du substrat ; la protéine de couplage énergétique transpériplasmique TonB ; les protéines de la membrane cytoplasmique ExbB et ExbD (Cadieux *et al.*, 2002 ; Fig. I.10). *E. coli* possède également des protéines TolQ et TolR, dont l'activité est similaire à celles des composantes de la membrane cytoplasmique ExbB et ExbD mais de spécificité encore peu caractérisée (Eick-Helmerich et Braun, 1989; Bradbeer, 1993; Skare *et al.*, 1993; Fig. I.10). Ces systèmes de transport non-spécifiques de la cobalamine très répandus permettent aussi le passage à travers la membrane externe de l'hème ainsi que d'ions ferriques complexés à des sidérophores (Moeck et Coulton, 1998). Pour ce qui est du transport spécifique de corrinoïdes, le système hautement spécifique BtuBFCD (Fig. I.10) trouvé chez les bactéries à Gram négatif comme *E. coli* et *S. enterica*, permet la translocation efficace et spécifique de corrinoïdes exogènes depuis le milieu extérieur à des concentrations de l'ordre du fM (10^{-15} M) (Bassford et Kadner, 1977). Ce système présente une haute affinité pour la vitamine B₁₂, et ses nombreux dérivés y compris l'adénosylcobalamine et les cobinamides. La protéine BtuB, un transporteur calcium-dépendant localisé dans la membrane externe, adresse le corrinoïde à la protéine de liaison corrinoïde périplasmique BtuF (Fig. I.10) (Heller *et al.*, 1985; Cadieux *et al.*, 2002; Cherezov *et al.*, 2006). Le fonctionnement de BtuB requiert un apport énergétique qui lui est fourni par les protéines de type TonB impliquées dans l'acquisition du fer (Ferguson *et al.*, 2007; Postle et Larsen, 2007) et ancrées dans la membrane interne (Fig. I.10). La protéine BtuF délivre ensuite le cobinamide à BtuCD, un transporteur ABC localisé dans la membrane

interne (DeVeaux et Kadner, 1985; Borths *et al.*, 2005) permettant ainsi sa translocation au prix de l'hydrolyse d'ATP (Fig. I.10).

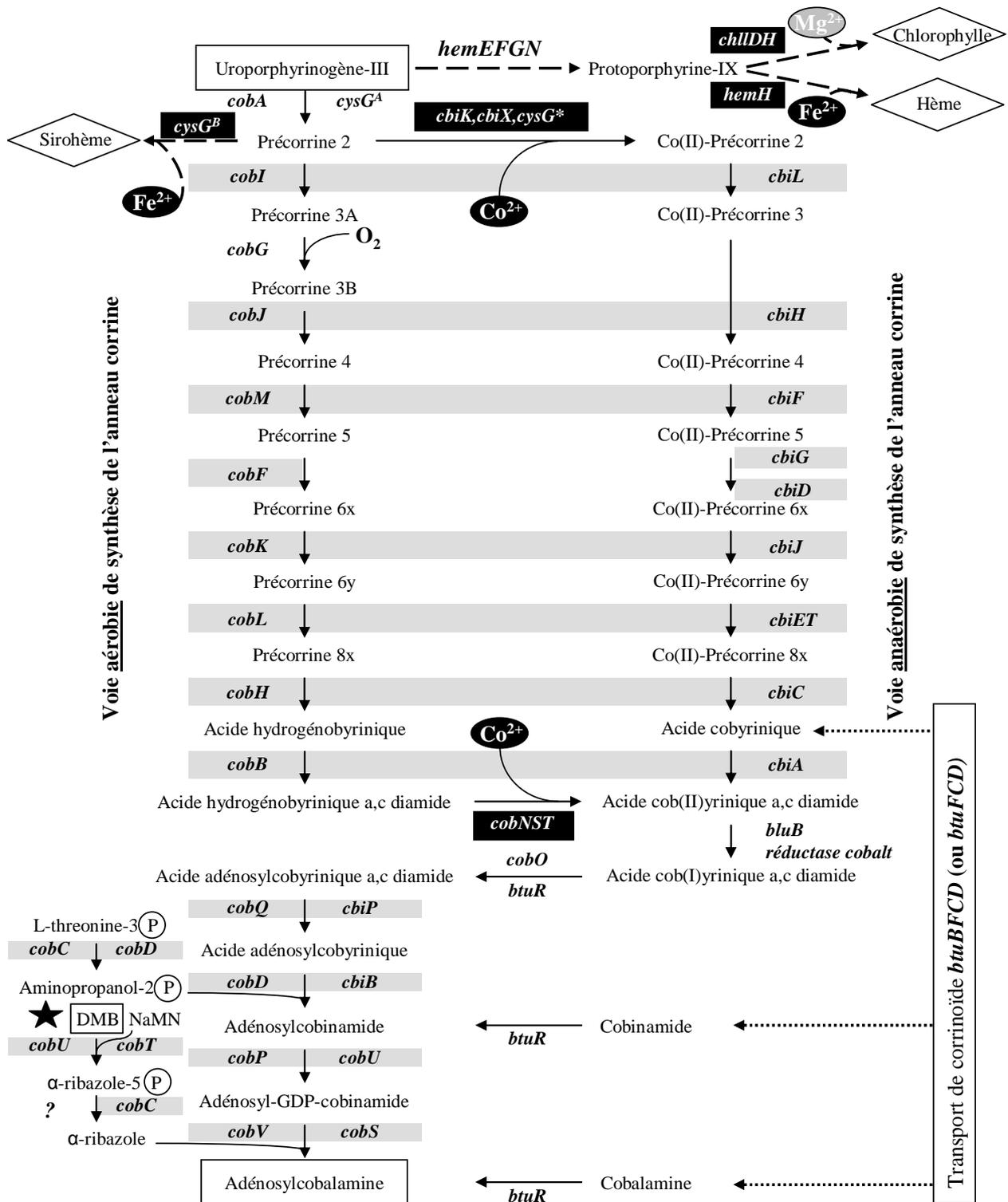


Figure I.11. Biosynthèse de l'adénosylcobalamine et autres cofacteurs tétrapyrroliques chez les bactéries (d'après Rodionov *et al.*, 2003 et Kajiwara *et al.*, 2006)

Les voies aérobie (*P. denitrificans*) et anaérobie (*S. enterica*) de biosynthèse de l'adénosylcobalamine se distinguent par une insertion précoce ou tardive du cobalt. Les gènes homologues chez *P. denitrificans* et chez *S. enterica* sont présentés sur un fond gris commun. Les différentes chélatases sont sur fond noir, *chlIDH* correspond à un ensemble de gènes codant les sous-unités de la chélatase à magnésium utilisée dans la biosynthèse de bactériochlorophylle. Les dérivés tétrapyrroliques sont encadrés d'un losange. Les voies de transport du cobalt et de la cobalamine sont illustrées par des flèches en pointillé. Les cobinamides désignent des corrinoïdes exogènes incomplets. Les composants des transporteurs spécifiques de la cobalamine sont BtuBFCD chez les bactéries à Gram négatif (BtuFCD étant suffisant chez les bactéries à Gram positif). L'étoile noire indique le point d'entrée de l'adénine en remplacement du 5,6-diméthylbenzimidazole (DMB) dans la voie de biosynthèse de la pseudo-vitamine B₁₂ (non montrée). NaMN, nicotinate mononucleotide.

1.6.3 Biosynthèse de la cobalamine chez les microorganismes

La production *de novo* de cobalamine dans l'espèce *M. extorquens* (Ivanova *et al.*, 2006) et son implication dans le métabolisme méthylotrophe (Padovani *et al.*, 2009) ont été démontrées. Deux voies différentes de biosynthèse de la cobalamine sont connues à ce jour (Fig. I.11) (Raux *et al.*, 2000). La voie requérant l'oxygène moléculaire, désignée voie aérobie, a été élucidée chez *Pseudomonas denitrificans*. Elle implique la contraction de l'anneau corrine et une étape d'insertion du cobalt tardive (Fig. I.11; Blanche *et al.*, 1995). La voie pour laquelle l'oxygène n'est pas requis, désignée voie anaérobie, est caractérisée par une insertion du cobalt dès les premières étapes de la synthèse de cobalamine. Chez *P. denitrificans*, les enzymes catalysant les réactions allant de l'uroporphyrinogène III à l'adénosylcobalamine ont été identifiées et les gènes correspondants identifiés (Blanche *et al.*, 1995). Les gènes codant pour les protéines impliquées dans la voie anaérobie de biosynthèse de la cobalamine ont quant à eux été caractérisés chez *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* (Roth *et al.*, 1993), *Bacillus megaterium* (Raux *et al.*, 1998) et *Propionibacterium shermanii* (Roessner *et al.*, 2002). Dans cette voie anaérobie, les activités enzymatiques correspondantes ont été démontrées expérimentalement pour certains gènes seulement et attribuées en général sur la base de similarités de séquences.

La voie de biosynthèse d'adénosylcobalamine à partir du précurseur commun de plusieurs cofacteurs tétrapyrroliques, l'uroporphyrinogène III, peut être divisée en deux étapes.

La première étape correspond à la synthèse de l'anneau corrine et diffère d'une voie à l'autre, la voie de biosynthèse anaérobie débute par l'insertion du cobalt dans la précorrine-2, alors que dans la voie aérobie, l'insertion ne se fait qu'après la synthèse de l'anneau corrine.

La deuxième étape est commune aux voies aérobies et anaérobies, elle implique l'adénylation de l'anneau corrine, l'attachement du groupement aminopropanol, et l'assemblage de la boucle nucléotidique qui relie le ligand inférieur diméthylbenzimidazole et l'anneau corrine.

La nomenclature utilisée pour décrire les gènes de biosynthèse de la cobalamine diffère selon la voie considérée et présente une certaine complexité (Fig. I.11). Tous les noms de gènes de biosynthèse de la cobalamine chez *P. denitrificans* portent le préfixe *cob*. Chez *S. enterica* en revanche, les gènes requis pour la biosynthèse de cobinamide sont précédés du préfixe *cbi*, tandis que ceux requis pour la conversion de cobinamide en cobalamine sont désignés par le préfixe *cob*. De ce fait, par exemple, les gènes *cobA* de *P. denitrificans* et *S. enterica* codent deux enzymes distinctes ; autre exemple, l'existence chez *S. enterica* de deux gènes *cbiE* et *cbiT*, codant respectivement une précorrine méthyltransférase et une précorrine décarboxylase, alors que chez *P. denitrificans* ces deux fonctions sont portées par un seul gène nommé *cobL*.

De fait, les deux voies présentent chacune certains gènes et enzymes spécifiques (Fig. I.11). Chez *P. denitrificans*, l'insertion du cobalt est réalisée par la chélatase ATP-dépendante aérobie du cobalt composée des sous-unités CobN, CobS et CobT (Debussche *et al.*, 1992), et par deux simples sous-unités ATP-indépendantes distinctes CbiK ou CbiX respectivement chez *S. enterica* (Raux *et al.*, 1997) et chez *Bacillus megaterium* (Raux *et al.*, 2003).

Par ailleurs, étant donné l'insertion précoce du cobalt dans la voie indépendante de l'oxygène, la plupart des intermédiaires de la voie anaérobie, contrairement à ceux de la voie aérobie, sont présents sous forme de complexes contenant le cobalt. Ces intermédiaires requièrent ainsi des enzymes dont la spécificité diffère de celles de la voie dépendante de l'oxygène. Une autre différence entre les deux voies réside dans la méthode employée pour réaliser la contraction de l'anneau corrine via l'élimination de l'atome de carbone C-20. En conditions aérobies, la précorrine 3A est oxydée par l'oxygène moléculaire, grâce à la protéine CobG qui contient un noyau Fe_4S_4 , avec l'élimination subséquente du C-20 sous forme d'acétate. En conditions anaérobies, en revanche, le processus de contraction de l'anneau corrine s'opère grâce à l'ion cobalt complexé et à sa capacité d'assumer différents états de valence (+1 à +3), permettant ainsi l'oxydation, résultant cette fois au relargage du C-20 sous forme d'acétaldéhyde. En résumé, les enzymes CobE, CobF, CobG, CobN, CobS, CobT et CobW sont spécifiques de la voie aérobie de *P. denitrificans*, tandis que CbiD, CbiG et CbiK ne sont retrouvés que dans la voie anaérobie de *S. enterica* (Fig. I.11).

1.6.4 La voie d'utilisation de corrinoïdes préformés

Les microorganismes peuvent aussi obtenir la forme active du coenzyme B₁₂ par assimilation de corrinoïdes exogènes (voir ci-dessus). Cette voie requiert l'activité cobalamine adényltransférase (ATP-dépendante) codée par les gènes *cobO* chez *P. denitrificans*, et *btuR* chez *S. enterica* (*cobA* chez *E. coli*), deux enzymes adényltransférases qui, bien que n'ayant pas la même spécificité (Fig. I.11), catalysent les mêmes réactions. Des études de génomique comparative ont montré que certains organismes possèdent plusieurs enzymes catalysant cette réaction, parmi lesquelles les adényltransférases PduO et EutT associées respectivement à la 1,3-propanediol déshydratase et à l'éthanolamine ammonia lyase chez les entérobactéries (Rodionov *et al.*, 2003). Chez *M. extorquens*, qui possède aussi *cobO*, il a été démontré que l'adényltransférase codée par le gène *meaD*

joue un double rôle, catalysant d'une part la dernière étape dans l'assimilation de corrinoïdes en adénosylcobalamine, et exerçant d'autre part, à la manière d'une chaperonne, la fonction d'escorte du cofacteur adénosylcobalamine lors de son transfert à la méthylmalonyl-CoA mutase MCM (Padovani *et al.*, 2009). L'importance de son mécanisme de transfert direct a été prouvée au niveau physiologique par des études génétiques chez *M. extorquens*, puisque les niveaux d'adénosylcobalamine diminuent d'environ 70% chez le mutant par rapport à ceux de la bactérie sauvage lorsque le gène *meaD* est muté.

1.6.5 La voie de biosynthèse du 5,6-diméthylbenzimidazole (DMB) et la voie alternative de la pseudo-vitamine B₁₂

Il existe deux voies indépendantes pour la synthèse du DMB, comme dans le cas de la synthèse de l'anneau corrine. La synthèse de DMB en présence d'oxygène survient par fragmentation du cofacteur flavine et est catalysée par l'enzyme BluB (Renz *et al.*, 1970; Taga *et al.*, 2007). Chez certains organismes anaérobies, la synthèse de DMB semble dériver de la voie de biosynthèse des purines, cependant aucune enzyme impliquée dans ce processus n'a encore été décrite (Höllriegl *et al.*, 1982). De manière surprenante, il a été observé que certains organismes synthétisant l'anneau corrine en condition anaérobie, comme *P. shermaniii* et *S. enterica*, dérivent le DMB exclusivement en présence d'oxygène (Höllriegl *et al.*, 1982; Keck et Renz, 2000). Des travaux récents font également état de la capacité de certains microorganismes à utiliser la pseudo-vitamine B₁₂ comme cofacteur pour toutes leurs enzymes B₁₂-dépendantes (Anderson *et al.*, 2008; Taga et Walker, 2008). Chez *S. enterica*, il a été démontré (Anderson *et al.*, 2008) que le DMB prenait en charge la régulation de la production et de l'incorporation d'adénine en lieu et place du ligand inférieur (α). De plus chez cette bactérie, la synthèse de coenzyme pseudo-vitamine B₁₂ requiert les mêmes enzymes pour la mise en place de l'adénine que pour celle du DMB (CobT,

CobU, CobS, CobC) (Fig. I.11). Une multitude de travaux récents font d'ailleurs état d'organismes anaérobies produisant majoritairement des pseudo-vitamines B₁₂ en guise de corrinoïdes : *Clostridium cochlearium* (Hoffmann *et al.*, 2000), *Lactobacillus reuteri* (Santos *et al.*, 2007), les cyanobactéries *Nostoc commune* (Watanabe *et al.*, 2007) et *Aphanizomenon flos-aquae* (Miyamoto *et al.*, 2006) et l'algue *Aphanothece sacrum* (Watanabe *et al.*, 2006). Il apparaît ainsi que ces composés, longtemps considérés comme des formes de remplacement, sont en fait les cofacteurs majeurs pour de nombreux organismes.

1.6.6. Régulation de l'expression génique des voies de biosynthèse de la cobalamine

Du fait du coût énergétique que représente la biosynthèse de la cobalamine, l'expression des gènes correspondants nécessite des mécanismes de contrôle. Cette régulation constitue pour les microorganismes un avantage certain voire même une nécessité. Il a été démontré chez les entérobactéries que l'adénosylcobalamine réprime l'expression des enzymes de biosynthèse de la cobalamine via un mécanisme régulateur post-transcriptionnel de type riboswitch. Cette régulation implique la liaison directe d'adénosylcobalamine à la région 5'UTR des gènes cibles, empêchant la fixation du ribosome et la traduction de ces gènes (Nahvi *et al.*, 2004; Vitreschak *et al.*, 2003). Largement répandus chez les bactéries à Gram négatif et à Gram positif, ces éléments de contrôle génétique appelés riboswitches régulent l'activité de multiples voies métaboliques fondamentales, via la modulation de l'expression de gènes en réponse à des concentrations changeantes de métabolites (Nahvi *et al.*, 2004). Ainsi chez *E. coli*, l'expression du gène *btuB* fortement réduite en condition de croissance supplémentée en vitamine B₁₂ est régulée en réponse à l'adénosylcobalamine et s'opère au niveau traductionnel (Roth *et al.*, 1996). Il a pu être démontré que les ARNm *btuB* d'*E. coli* arborent un riboswitch dépendant du coenzyme B₁₂ responsable d'une répression au niveau

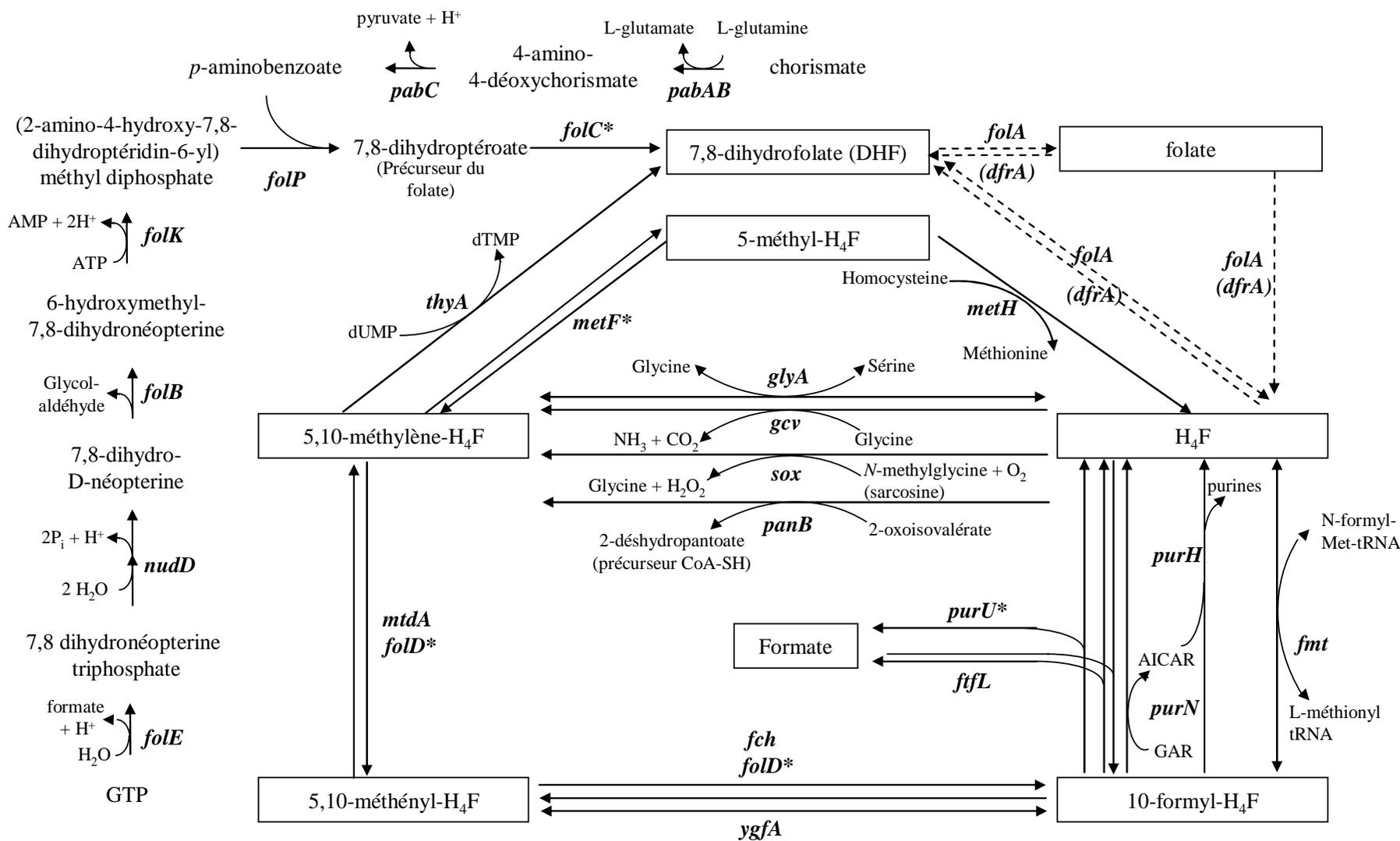


Figure I.12. Représentation schématique des voies métaboliques impliquant le tétrahydrofolate (H₄F)

Les gènes retrouvés dans la voie spécifique de l'utilisation du chlorométhane chez CM4 sont suivis d'une astérisque (cf. aussi ci-dessous, Fig. II.14).

traductionnel des protéines de transport de la cobalamine en conditions de concentrations élevées en coenzyme B₁₂.

1.7. Le tétrahydrofolate et ses dérivés

Le tétrahydrofolate et ses dérivés (5-méthyl-H₄F, 10-formyl-H₄F, 5-méthényl-H₄F et 5,10-méthylène-H₄F), désignés sous le terme générique de folates, sont impliqués dans de nombreuses réactions de transfert de C₁. Chez l'homme comme chez la plupart des organismes, ces réactions participent à la biosynthèse de molécules fondamentales à la vie comme les purines et la thymidine monophosphate (TMP), ou à la régénération d'autres monomères essentiels comme la méthionine, obtenue à partir d'homocystéine. Le folate est synthétisé par la plupart des plantes, des eucaryotes unicellulaires et des microorganismes, chez qui, on l'a vu, il contribue de manière essentielle à la méthylotrophie, mais aussi à l'acétogénèse par exemple (Fig. I.7; Maden *et al.*, 2000). Alors que les enzymes H₄F-dépendantes connues sont généralement faiblement exprimées, de sorte à pouvoir s'adapter au flux des réactions de biosynthèse, chez les bactéries méthylotrophes au contraire, l'assimilation du carbone par le cycle de la sérine impose la présence d'enzymes H₄F-dépendantes dont l'activité spécifique et l'expression sont élevées (Marison et Attwood, 1982). On l'a vu également, les travaux récents sur *M. extorquens* AM1 ont montré que les enzymes d'interconversion des composés en C₁ liés au tétrahydrofolate sont impliqués dans l'assimilation du carbone en biomasse plutôt que dans la génération d'énergie par oxydation en CO₂ (Crowther *et al.*, 2008; Pomper *et al.*, 1999; Marx *et al.*, 2003c, 2005; Marx et Lidstrom, 2004).

La comparaison des génomes des souches DM4 et AM1 a récemment permis de mettre en évidence la conservation, de manière générale, de ces gènes chez *Methylobacterium* (Vuilleumier *et al.*, 2009). En revanche, la présence chez CM4 d'une voie additionnelle

dépendante du tétrahydrofolate pour la croissance sur le chlorométhane, et fonctionnant de surcroît dans le sens oxydatif (Studer *et al.*, 2002), revêt un intérêt particulier pour l'analyse globale des gènes associés au métabolisme du folate dans cette souche spécifique.

Il existe deux voies métaboliques pour la synthèse de tétrahydrofolate chez *E. coli* (Fig. I.12). La première de ces deux voies est la voie de biosynthèse *de novo* du tétrahydrofolate, à partir de ses précurseurs, le GTP et le chorismate. Il existe également une voie d'interconversion des dérivés du tétrahydrofolate permettant sa régénération. Ces dérivés sont les produits de réactions impliquant le tétrahydrofolate. Chez *E. coli*, la voie de biosynthèse *de novo* du tétrahydrofolate requiert la présence des gènes *folE*, *folB*, *folK*, *folP*, *folC* et *folA* (ou *dfrA* chez d'autres organismes). La synthèse d'acide para-aminobenzoïque nécessite également la présence des gènes *pabA*, *pabB* et *pabC*.

1.7.1. Voie de biosynthèse *de novo* du folate, branche de la ptérine

Des 7 étapes de cette voie de biosynthèse (Fig. I.12), seule la deuxième étape qui catalyse l'élimination d'un pyrophosphate de la dihydronéoptérine triphosphate n'a pas été clairement identifiée. Il y a même une controverse quant à la nature enzymatique de cette étape. Des travaux récents chez *B. subtilis* ont montré une conversion chimique du dihydronéoptérine triphosphate en dihydronéoptérine monophosphate à pH 8,0 et à 37°C. Cette réaction a toutefois été démontrée dans des conditions non physiologiques, en présence de concentrations élevées de Mg^{2+} et de Ca^{2+} (De Saizieu *et al.*, 1995). Parmi les arguments en faveur d'une catalyse biotique, une phosphatase alcaline (EC 3.1.3.1) catalysant cette étape a été caractérisée chez *E. coli* (Suzuki et Brown, 1974). Le gène correspondant *nudD* est resté longtemps non identifié, mais sa délétion dans *E. coli* conduit à une chute de 10% du pool de folate (Gabelli *et al.*, 2007). Chez *Lactococcus lactis*, une protéine présentant une activité

dihydroneoptérine triphosphate pyrophosphohydrolase a été détectée initialement du fait de la localisation du gène correspondant *folQ* au sein de l'opéron *folKEPQS* (Klaus *et al.*, 2005). Ces auteurs ont ensuite montré qu'une inactivation de ce gène provoquait également une baisse du pool de folate et une accumulation concomitante de dihydroneoptérine triphosphate. Toutefois, la mutation *folQ* n'a aucun effet sur la croissance. Ainsi, *E. coli* et *Lc. lactis* possèdent d'autres systèmes de déphosphorylation aspécifiques actifs sur le dihydroneoptérine triphosphate (Klaus *et al.*, 2005). Ces protéines FolQ et NudD sont membres d'une famille d'hydrolases relativement répandue, dénommée Nudix (pour « nucleoside diphosphate linked to x »), à laquelle une activité nucléoside triphosphate pyrophosphohydrolase est souvent associée (Klaus *et al.*, 2005), et dont les membres pourraient ainsi contribuer à la déphosphorylation aspécifique du dihydroneoptérine triphosphate *in vivo* chez de nombreux organismes.

1.7.2. Réactions majeures dépendantes du folate du métabolisme en C₁

La distribution des gènes impliqués dans les étapes majeures d'interconversion des composés en C₁ dépendantes du folate chez les microorganismes ont été discutées dans une revue récente (De Crécy-Lagard *et al.*, 2007). Parmi ces voies, on trouve la voie de biosynthèse du pantothénate (ou vitamine B₅), et celle du catabolisme de la sarcosine (ou N-méthylglycine), un métabolite du sol qui peut servir de source de carbone et d'énergie pour de nombreux microorganismes (Fig. I.12). La voie de synthèse *de novo* du pantothénate, du moins chez *E. coli*, est bien établie, et démarre par la condensation de l' α -ketoisovalérate avec le formaldéhyde pour produire du ketopantoate. L'activité de l'enzyme ketopantoate hydroxyméthyltransférase purifiée, codée par le gène *panB*, est dépendante du 5,10-méthylène-H₄F et du H₄F (Sugantino *et al.*, 2003). Le catabolisme de la sarcosine implique quant à lui, dans sa première étape, une enzyme hétérotrétramérique

et bifonctionnelle, la sarcosine oxydase, qui catalyse à la fois l'oxydation de la sarcosine et la synthèse de 5,10-méthylène-H₄F à partir du H₄F (Wagner et Jorns, 1997).

1.8. La révolution génomique

La comparaison des propriétés des différents organismes a toujours constitué un thème primordial de la recherche en biologie. On a tout d'abord catalogué et classifié en établissant des comparaisons au niveau morphologique et physiologique. A partir de 1780, Lavoisier initie la révolution moléculaire en biologie en montrant que les animaux consomment de l'oxygène et que le monde vivant peut être représenté comme un ensemble de réactions chimiques. Après l'avènement de l'enzymologie, de la microbiologie et de la génétique, puis de la biologie moléculaire, le développement des techniques de séquençage des protéines (insuline; Sanger et Tuppy, 1951) et de l'ADN (Sanger *et al.*, 1977, Maxam et Gilbert, 1977), suivies de la constitution de bases de données d'information biologique, a permis de voir émerger la bio-informatique (« computational biology » en anglais), avec l'analyse et la comparaison quantitatives de ces séquences. Dès 1995, les séquences complètes de génomes de nombreux organismes deviennent disponibles, et les comparaisons peuvent se faire à l'échelle de génomes entiers : en date du 19 octobre 2009, ce sont ainsi 1117 génomes complets qui ont déjà été publiés, dont 929 génomes bactériens (<http://www.genomesonline.org/gold.cgi>).

1.8.1. La génomique comparative

Ceci a conduit à l'émergence d'une nouvelle discipline, la génomique comparative, qui consiste en l'analyse comparative, structurelle et fonctionnelle, de génomes de différents organismes d'intérêt. Elle repose sur le principe de conservation des séquences dans les génomes d'organismes apparentés. Ce nouveau domaine de recherche, encouragé

par le développement de technologies de séquençage à haut débit, constitue le moteur de nombreux projets de séquençage et est devenu un mode d'exploration privilégié du monde vivant.

Les approches de génomique comparative ont notamment pour but de tirer profit de l'information de séquence pour comprendre les processus évolutifs qui agissent sur les génomes. Lorsque les contraintes de sélection sont fortes, comme pour le cas de l'exposition à un composé toxique, les génomes peuvent évoluer de façons diverses, avec la mise en place de mécanismes de résistance, voire le détournement du métabolisme pour l'utilisation de ce composé comme nutriment. Pour les microorganismes, cette adaptation métabolique peut se faire par le transfert horizontal de gènes ou d'ensembles de gènes entre différents organismes, conférant un avantage sélectif pour l'hôte. De fait, la plasticité génomique du monde microbien et l'importance des mécanismes de transfert horizontal contribuent à remettre en cause la notion même d'espèce en microbiologie (Shapiro *et al.*, 2009).

Notre équipe de recherche s'intéresse de près à ces questions, puisque les souches bactériennes méthylothropes DM4 et CM4 du genre *Methylobacterium* étudiées au laboratoire, qui sont très proches du point de vue taxonomique et métabolique, présentent une adaptation spécifique à différents polluants chlorés. Un des objectifs des travaux de l'équipe est aujourd'hui l'analyse de ces adaptations au niveau de leurs séquences génomiques par l'approche de génomique comparative. En effet, suite à deux projets antérieurs de séquençage de la souche de référence *M. extorquens* AM1 et de la souche dichlorométhane-dégradante *M. extorquens* DM4 (Vuilleumier *et al.*, 2009), le séquençage de la souche *Methylobacterium extorquens* CM4 et celui de cinq autres souches du genre *Methylobacterium* avec certaines spécialisations physiologiques caractéristiques

ont été initiées dans le cadre d'un « *Methylobacterium* Community Sequencing Program » (Joint Genome Institute / Department Of Energy).

En comparant les génomes de ces souches, on peut ainsi d'abord définir un « core genome », c'est-à-dire un ensemble de gènes orthologues communs marqueur d'un ancêtre commun au genre *Methylobacterium* et à l'espèce *M. extorquens*, mais aussi le génome dit « accessoire », constitué d'ensembles de gènes conférant une adaptation spécifique, et dans le cadre de ce travail, l'utilisation du chlorométhane.

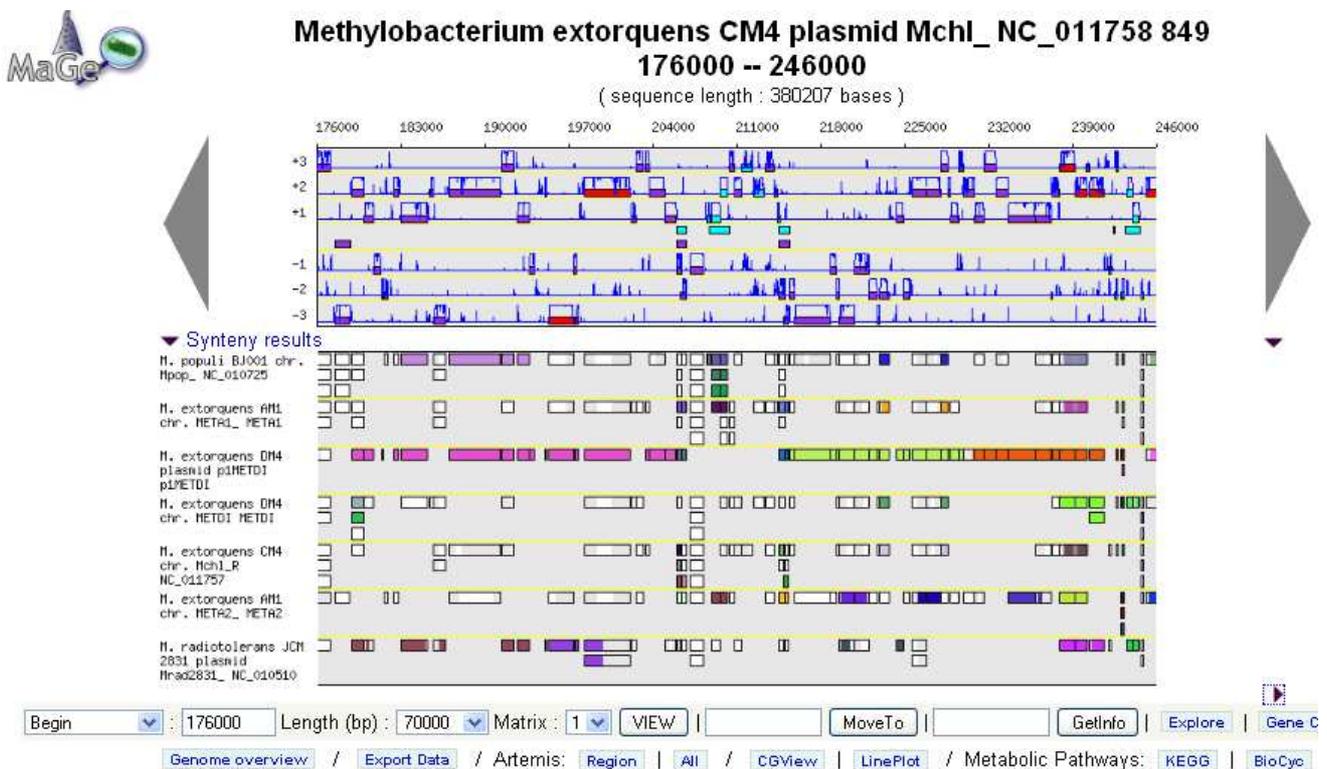


Figure I.13. La fenêtre d'analyse de l'interface MaGe

Capture d'écran de la zone du plasmide p1MCHL de *M. extorquens* CM4 (cf. ci-dessous, Chapitre II). Les CDSs annotés sont représentés dans les 6 cadres de lecture de la séquence par des rectangles de couleur violette (ou rouge, lorsque le gène a été annoté manuellement). Les courbes d'usage de codon sont superposées sur les CDS prédits automatiquement (courbes bleues). Les rectangles de couleur turquoise représentent des régions répétées ou des éléments mobiles. Les cartes de synténie, calculées sur un ensemble de génomes, sont représentées au dessous (deux génomes de *Methylobacterium* sont issus de la base de données PKGDB). Contrairement à ce qui est le cas pour le plasmide dans la partie supérieure, il n'y a pas de notion de taille dans la carte de synténie : un rectangle a la même taille que le CDS auquel il est comparé, et représente un orthologue putatif entre un CDS du génome comparé et un CDS de la séquence analysée (ici le plasmide p1MCHL). De plus, les rectangles homologues sont colorés suivant la partie de la protéine avec laquelle celle de l'objet étudié est alignée. En d'autres termes, lorsque pour plusieurs CDS co-localisés sur le plasmide de CM4 il y a plusieurs orthologues co-localisés dans l'objet génomique comparé, les rectangles auront tous la même couleur et reflèteront l'étendue de la synténie, sinon ils seront de couleur blanche.

1.8.2. Description des outils bioinformatiques de l'interface MaGe

Pour mener à bien l'annotation experte des gènes de *Methylobacterium*, nous disposons de l'interface MaGe (Magnifying Genomes) développée par le Génoscope (Evry, France) (Fig. I.13). Cet outil intègre un ensemble de méthodes d'analyses bioinformatiques, et constitue une base de données relationnelle contenant non seulement les informations relatives aux génomes microbiens (séquences et résultats fournis par les diverses méthodes d'analyses) mais également une interface web graphique prenant en compte le contexte génétique (Vallenet *et al.*, 2006).

Le système MaGe utilise une base de données relationnelle, la PkGDB (Prokaryotic Genome DataBase) pour le stockage, la modification et l'accès à de vastes ensembles de données. Les caractéristiques principales de la PkGDB sont : l'intégration de données d'annotation à partir de génomes bactériens disponibles (la séquence d'ADN étant systématiquement soumise à un processus de réannotation du gène à l'aide de modèles de gènes précis) ; l'intégration de résultats obtenus à l'aide d'un grand nombre d'outils bioinformatiques, comprenant l'exploration du contexte génétique par recherche de groupes de synténie entre les génomes comparés ; et enfin des interfaces graphiques pour affiner manuellement l'assignation automatique des produits de gènes.

L'information tirée d'une séquence génomique dépendra largement de la qualité de l'annotation, c'est-à-dire de l'identification et de la description des séquences codantes appelées CDS (CoDing Sequences), et de la prédiction de leurs fonctions. La procédure utilisée par la plateforme MaGe est d'abord basée sur l'analyse de l'utilisation des codons (codon usage), permettant la construction de modèles de gènes. Le noyau du programme de recherche de gènes de MaGe, appelé AMIGene (Annotation of Microbial Genes) (Tableau I.4), permet d'identifier automatiquement les CDS les plus ressemblantes

Tableau I.4. Outils utilisés dans la plateforme MaGe

Programmes et bases de données	Fonction	site internet
AMIGene	Annotation de gènes microbiens	http://www.genoscope.cns.fr/agc/tools/amigene
COG	Recherche de groupes de protéines orthologues	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG
HAMAP	Annotation automatique des protéines bactériennes	http://www.expasy.ch/sprot/hamap
InterPro	Localisation de domaines et de sites fonctionnels dans les protéines	http://www.ebi.ac.uk/interpro
Petrin	Recherche de sites de terminaisons de la transcription rho-indépendante	D'Aubenton <i>et al.</i> (1990)
PRIAM	Profil pour l'identification automatique du métabolisme	http://priam.prabi.fr
PsortB	Localisation cellulaire de protéines bactériennes	http://www.psort.org/psortb
RBSfinder	Recherche de site d'amarrage des ribosomes	http://www.tigr.org/softlab
Rfam	Recherche et annotation d'ARN	http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam
SignalP	Prédiction de peptide signal	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP
TMHMM	Prédiction d'hélices transmembranaires protéiques	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM
tRNAscan-SE	Recherche de tRNA	http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE

sur un large contig ou une séquence complète de génome bactérien. Les codons d'initiation (start codon) sont confirmés grâce au programme RBSfinder (Tableau I.4), qui permet la recherche de sites d'amarrage des ribosomes dans des régions extragéniques. Les gènes codants des ARNt et les riboswitches sont identifiés respectivement par tRNAscan-SE et Rfam (Tableau I.4). Enfin, le programme Petrin permet de déceler des sites de terminaison de la transcription rho-indépendante (D'Aubenton-Carafa *et al.*, 1990).

Les produits de gènes potentiels identifiés sont soumis à une analyse bioinformatique incluant une recherche d'homologies par BlastP contre la base de données de séquences protéiques non redondantes UniProt. La recherche plus fine de similarités de séquences avec des familles, motifs et domaines protéiques se fait grâce aux banques de données COG et InterPro (Tableau I.4). Une classification des gènes codant des enzymes réalisée à l'aide du logiciel PRIAM permet la reconstruction de voies métaboliques (Tableau I.4). Une annotation fonctionnelle peut être attribuée aux familles de protéines les mieux caractérisées expérimentalement grâce à HAMAP (High Quality Automated and Manual Annotation of Microbial Proteomes) (Tableau I.4). Enfin la localisation cellulaire de la protéine annotée peut être prédite par le programme PsortB. Les programmes TMHMM et SignalP permettent également l'identification de caractéristiques structurales et la localisation des protéines putatives comme la présence de régions transmembranaires ou des séquences peptidiques signal.

L'une des innovations majeures du système MaGe est le développement d'une méthode supplémentaire basée non pas sur les similarités de séquences mais prenant en compte le contexte génétique (Fig. I.13). Cette méthode repose sur le principe de synténie, c'est-à-dire la conservation de l'ordre des gènes dans des organismes différents. La méthode Syntonizer, s'appuyant sur une approche graphique, permet de visualiser les correspondances de groupes de plusieurs gènes homologues consécutifs communs à différents génomes et de prendre

en compte les réarrangements chromosomiques, les relations de paralogie et/ou de fusion de gènes, les inversions segmentales et les insertions/délétions.

1.9. Objectifs du projet de thèse

L'objectif général du projet de thèse a été de développer, en utilisant la souche CM4 comme modèle, la compréhension des bases moléculaires de la dégradation bactérienne du chlorométhane, dans une perspective de valorisation des ressources génétiques de l'environnement et de l'utilisation de ces connaissances pour la dépollution de sites contaminés par des méthanes chlorés.

Les bactéries du genre *Methylobacterium*, capables d'utiliser une variété de composés monocarbonés comme source de carbone et d'énergie pour leur croissance, offre un cadre de choix pour l'étude de la dégradation du chlorométhane, avec comme atout supplémentaire et nouveau au démarrage du projet de thèse, la mise en place d'un projet de séquençage et de génomique comparative de huit souches *Methylobacterium* au sein d'un consortium international, dont celui de la souche chlorométhane-dégradante CM4, avec comme objectif d'étudier l'évolution et l'adaptation à différentes contraintes environnementales au sein d'un même groupe taxonomique. Le génome de la souche dichlorométhane-dégradante DM4, entièrement séquencé et assemblé au Génoscope, était déjà disponible depuis mars 2006, et celui de la souche de référence *M. extorquens* AM1, disponible depuis 2003 à l'état d'ébauche, a été terminé courant 2006.

Mon premier objectif concret a été de reprendre et d'approfondir l'étude de la dégradation microbienne du chlorométhane par la souche CM4, initié à l'ETH de Zurich en 1997 dans le cadre de la thèse de Alex Studer soutenue en 2001, en profitant du contexte favorable lié au séquençage de la souche CM4 pour établir dans l'équipe les approches de génomique comparative et de génomique fonctionnelle, en particulier la protéomique.

Un volet complémentaire de mon projet de thèse a consisté à explorer la diversité des bactéries chlorométhane-dégradantes de la phyllosphère. En effet, la détermination du bilan atmosphérique global du chlorométhane, qui joue un rôle majeur dans la destruction de l'ozone stratosphérique, est rendue difficile par la méconnaissance de l'importance des sources de chlorométhane d'origine végétale au niveau de la phyllosphère, et de la capacité des bactéries associées aux plantes à le dégrader. L'objectif ici était double. D'une part, il s'agissait d'isoler de nouvelles souches chlorométhane-dégradantes à partir de feuilles de plantes, ce qui n'avait pas été tenté auparavant. D'autre part, le but était de développer au laboratoire les outils de biologie moléculaire, et de PCR en particulier, susceptibles de contribuer à la caractérisation de telles bactéries du point de vue structurel (en ciblant le gène universel de l'ARN 16S) et fonctionnel (en ciblant les gènes *cmu* connus pour leur rôle dans la dégradation du chlorométhane).

Chapitre II

Exploration génomique de l'adaptation au chlorométhane

chez *Methylobacterium*

Tableau II.1. Comparaison des caractéristiques générales de trois génomes de *Methylobacterium extorquens*

Trait génotypique	Souche CM4				Souche DM4				Souche AM1					
	Chromosome	Plasmide	Plasmide	Total	Chromosome	Plasmide	Plasmide	Total	Chromosome	Mégaplasmide	Plasmide	Plasmide	Plasmide	Total
		p1MCHL	p2MCHL			p1METDI	p2METDI				p1META1	p2META1	p3META1	
Taille (pb)	5777908	380207	22617	6180732	5943768	141504	38579	6123851	5511322	1261460	44195	37858	24943	6879778
GC (%) ^a	68.2	66.3	63.8	68.0	68.1	65.3	63.7	68	68.7	67.7	67.9	65.2	66.9	68.5
Régions répétées (%) ^b	8.7	6.8	0.6	8.6	9.3	1.6	0	9.1	8.2	8.1	0.2	4.9	0.3	8.1
Gènes	6212	423	46	6681	5857	137	41	6035	5315	1318	46	45	35	6759
Protéines	6136	423	46	6605	5769	137	41	5947	5227	1312	46	45	35	6665
Taille moyenne des CDS (bp)	850	870	456	850	890	903	822	890	905	847	823	693	537	892
Intergénique (pb)	147.5	163.1	127	148.4	180.3	312.8	202.6	183.5	178.1	167.7	163.1	229.2	160.6	176.3
Densité codante (%)	85.2	82.1	82.7	85.0	83.4	66.8	77.7	83.0	84.2	84.1	78.9	73.1	69.8	84.0
Opérons rRNA	5	0	0	5	5	0	0	5	5	0	0	0	0	5
tRNA	61	0	0	61	58	0	0	58	57	6	0	0	0	63

^a Moyenne

^b D'après l'algorithme Nosferatu (Vallenet *et al.*, 2006)

2.1 Le génome de CM4

Le génome de *Methylobacterium extorquens* CM4, d'une taille de 6,18 Mb, est constitué de trois entités génétiques. Un chromosome circulaire de 5,77 Mb comprend 6212 objets génomiques prédits par l'outil MaGe, et deux plasmides. Le premier plasmide de 380 kb, appelé p1MCHL, contient 423 objets génomiques. L'autre plasmide, de taille plus réduite (22 kb) et nommé p2MCHL, présente 46 objets génomiques (Tableau II.1). Le génome présente un contenu moyen en GC de 68%, typique des autres génomes de *Methylobacterium* (Tableau II.1). Contrairement au chromosome, les épisomes p1MCHL et p2MCHL ont un contenu moyen en GC plus faible, de 66,3 et 63,8% respectivement (Tableau II.1). Les chromosomes des souches CM4, AM1 et DM4 contiennent 5 copies de l'opéron des gènes ribosomiques (5S, 16S et 23S) de séquence essentiellement identique. Ceci confirme l'affiliation de ces trois souches à la même espèce (Fig. II.1) (Kato *et al.*, 2005). La région intergénique séparant les gènes d'ARNr 16S et 23S est de taille identique d'un opéron ribosomique à l'autre dans une même souche, mais présente une taille variable de 679, 902 et 601 pb chez les souches CM4, AM1 et DM4 respectivement. Ces variations de taille des régions intergéniques ont aussi été mises à profit pour suivre de manière culture-indépendante la structure et l'évolution des profils taxonomiques de communautés microbiennes incluant des *Methylobacterium* (cf. par exemple Knief *et al.*, 2008). Par rapport aux génomes des souches *M. extorquens* AM1 et DM4 déjà analysés (Vuilleumier *et al.*, 2009), le génome de CM4 ne présente pas de caractéristiques particulières au niveau de la taille du génome, du nombre de régions répétées, de la densité en région codantes ou au niveau de la taille moyenne des CDS et régions intergéniques (Tableau II.1). En revanche, le contenu et la distribution en IS (séquence d'insertion) diffèrent entre CM4 et les autres souches. Les génomes des souches AM1 et DM4 comportent 14 familles d'IS pour environ 42 IS répertoriées (Vuilleumier *et al.*, 2009).

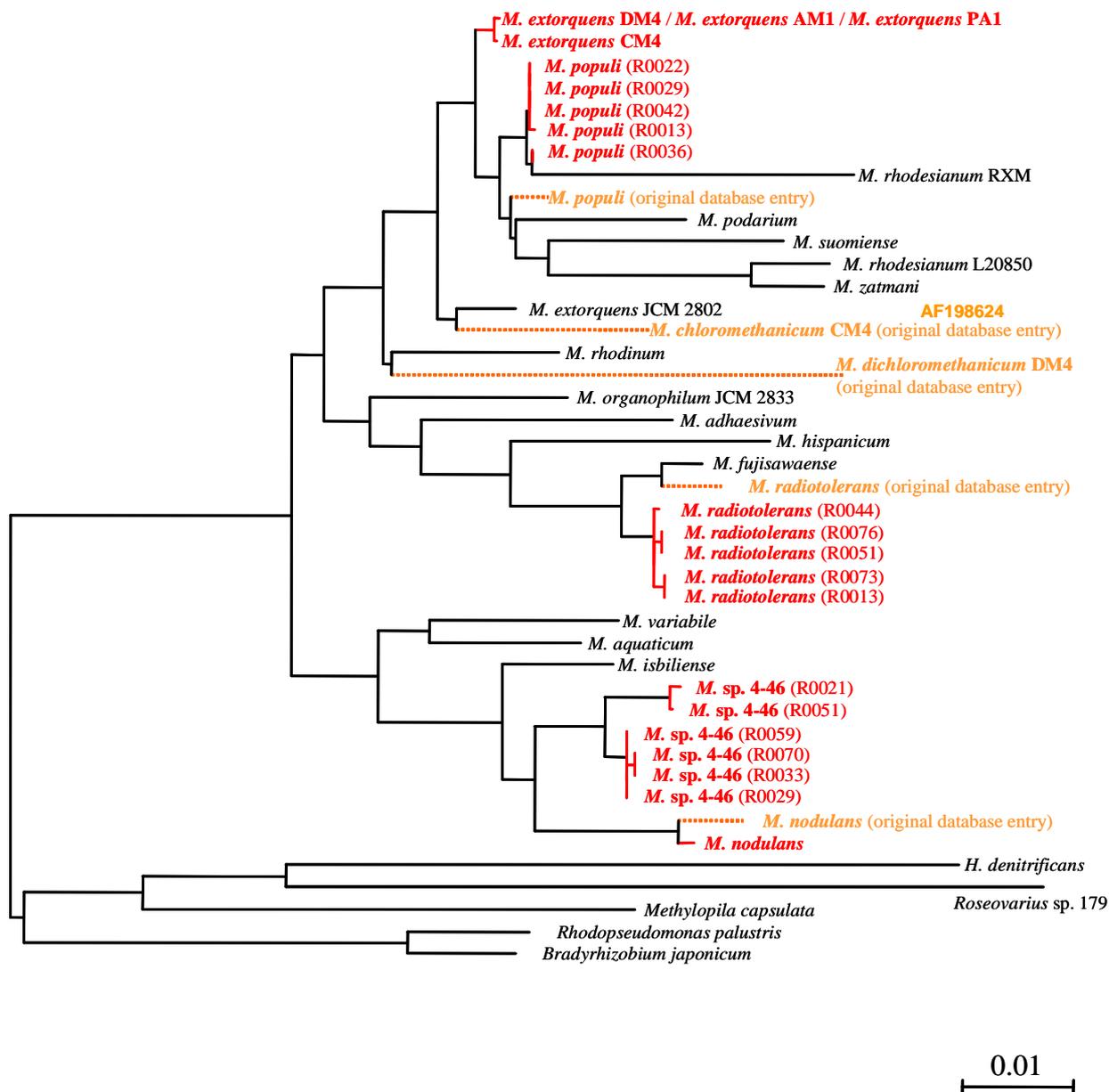


Figure II.1. Arbre phylogénétique réalisé à partir d’une analyse des séquences des gènes d’ADNr 16S d’Alpha-Protéobactéries situant les positions des représentantes du genre *Methylobacterium*

L’arbre précise également les positions des entrées des séquences des gènes d’ADNr 16S disponibles dans les bases de données avant l’obtention des séquences génomiques complètes des bactéries appartenant au genre *Methylobacterium*. Les bactéries *M. extorquens* CM4 et DM4 (nommées pour un temps dans les bases de données respectivement *M. chloromethanicum* CM4 et *M. dichloromethanicum* DM4) appartiennent toutes deux à l’espèce *M. extorquens*.

La souche CM4 porte seulement 32 IS réparties en 8 familles dont 8 IS spécifiques à la souche CM4 nommées ISMch1 à ISMch8 (16 copies), 11 IS retrouvées chez la souche AM1 (3 copies de ISMex5 ; 2 copies de ISMex3, ISMex311 et ISMex12 ; une copie de ISMex24) et 5 IS apparentées à ISMdi3 retrouvées chez la souche DM4 (données personnelles de Ming-Chun Lee et Christopher J. Marx, Harvard University, Cambridge, Etats-Unis). Par ailleurs, les génomes de ces trois souches varient quant au nombre et à la taille des épisomes. En effet, le génome de la souche AM1 totalise 6,88 Mb réparti en 5 réplicons sur lesquels 6665 objets génomiques (68,5% de GC) sont prédits : un chromosome circulaire de 5,51 Mb, un mégaplasme de 1,26 Mb et trois plasmides ; p1META1, p2META1 et p3META1, respectivement de 44, 38 et 25 kb (Tableau II.1). Le génome de DM4 (6,12 Mb) présente quant à lui un total de 5947 objets génomiques, et comme CM4 est constitué de 3 réplicons : un chromosome circulaire de 5,94 Mb, deux plasmides p1METDI de 141 kb et p2METDI de 38 kb (Tableau II.1).

Les chromosomes des trois souches sont remarquablement similaires en terme de contenu de gènes et de synténie (Fig. II.2). Les gènes du chromosome de CM4 possèdent, pour 72 et 78% d'entre eux, des homologues proches (plus de 35% d'identité) de taille équivalente sur les chromosomes des souches AM1 et DM4 respectivement. Parmi ces gènes, environ 89% présentent des homologues à plus de 95% d'identité sur les chromosomes correspondants, soulignant les relations d'orthologie de ces gènes dans les trois souches. Toutefois, une région de 130 kb du chromosome de CM4 est en synténie avec une région de taille équivalente du mégaplasme de AM1 (Fig. II.3). Cette région comporte de nombreuses protéines hypothétiques ou de fonctions inconnues, ainsi qu'un grand nombre d'intégrases et de transposases. De manière remarquable, la même région est retrouvée sur le chromosome de DM4 (Vuilleumier *et al.*, 2009) (Fig. II.3). L'association

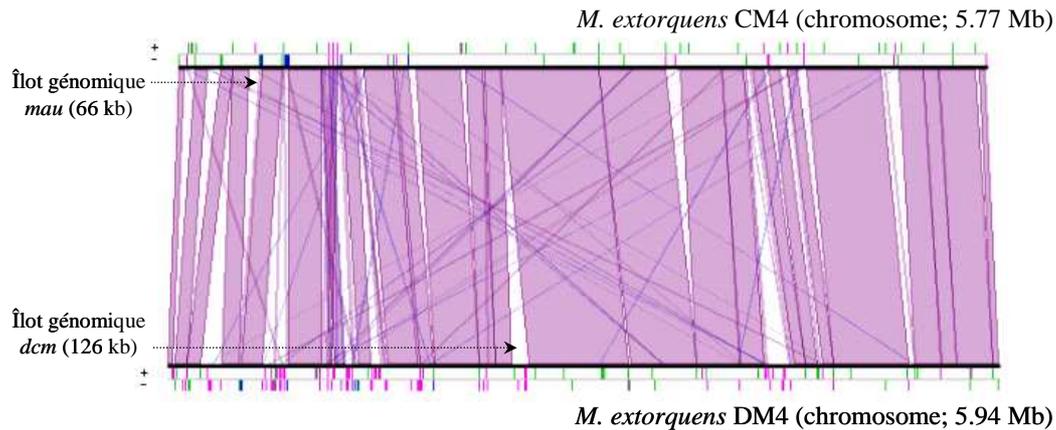


Figure II.2. Représentation schématique de l'étendue de conservation de blocs d'au moins 8 gènes entre les chromosomes des souches CM4 et DM4

Les chromosomes visualisés sous forme linéaire, sont alignés grâce à LinePlot dans MaGe. Les relations synténiques comprenant au moins 8 gènes sont représentées par des lignes pourpres si les gènes sont retrouvés sur le même brin, ou par des lignes bleues si ceux-ci sont sur des brins opposés. Les transposases et éléments d'insertion (IS), les opérons ARNr et les ARNt y sont représentés respectivement par des traits de couleur rose, bleue et verte. Parmi les segments génomiques non partagés, deux îlots génomiques ont été positionnés à l'aide de flèches en pointillé. La région *mau* d'utilisation de la méthylamine est absente du chromosome de la souche DM4 (Vuilleumier *et al.*, 2009). Le chromosome de la souche CM4 porte les gènes *mau* au niveau d'un îlot génomique de 66 kb différent de la souche AM1. Seule la souche DM4 porte l'îlot génomique *dcm* de 126 kb comportant les gènes d'utilisation du dichlorométhane (Vuilleumier *et al.*, 2009).

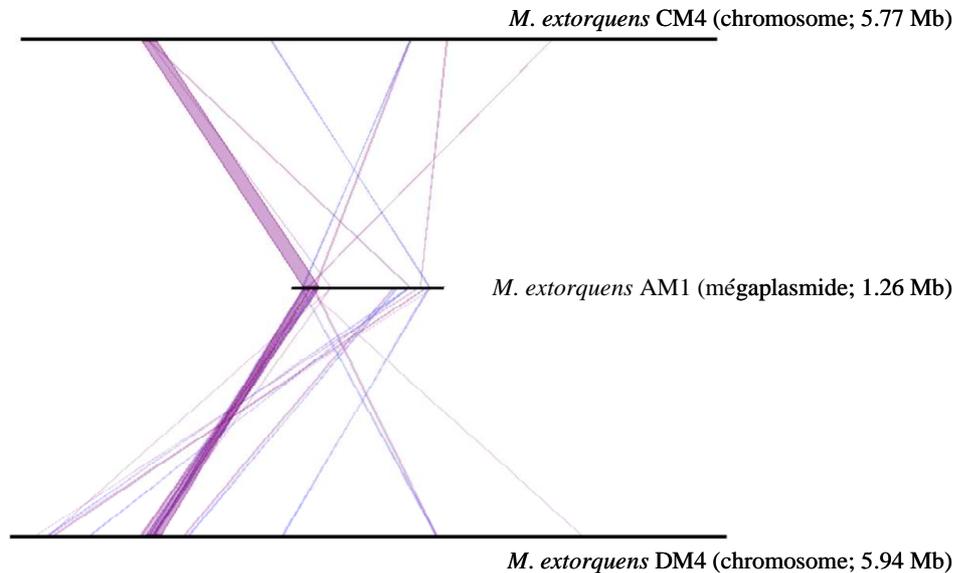


Figure II.3. Une région d'environ 130 kb du mégaplasme de AM1 figure sur le chromosome des souches déchlorantes

Les réplicons visualisés sous forme linéaire sont alignés grâce à LinePlot dans MaGe. Les relations synténiques comprenant au moins 8 gènes sont représentées par des lignes pourpres si les gènes sont retrouvés sur le même brin ou par des lignes bleues si ceux-ci sont sur des brins opposés. Cette syntenie de 140 CDS environ précédemment aussi décrite entre le mégaplasme de AM1 (milieu) et le chromosome de la souche DM4 (en bas) (Vuilleumier *et al.*, 2009), est retrouvée dans le chromosome de la souche CM4 (en haut), mais pas dans la souche *M. extorquens* PA1 (données non montrées).

de cette région à deux chromosomes (CM4 et DM4), à un plasmide (AM1) et son absence dans une des souches (PA1, donnée non montrée) de l'espèce *M. extorquens*, suggèrent une plasticité récente de ces génomes, acquise après la spéciation de l'espèce *extorquens*.

La distribution en catégories fonctionnelles d'après la classification COG (clusters de groupes orthologues) des ORFs des génomes de *M. extorquens* CM4, AM1 et DM4 ne révèle pas de différences majeures (Tableau II.2). Environ 23% des CDS du chromosome de CM4 sont impliqués dans les processus et la signalisation cellulaires, 14% dans le stockage et le traitement de l'information, 38% dans le métabolisme et le transport. La proportion de CDS chromosomiques prédits, appartenant à au moins un groupe COG est inférieure pour le chromosome de CM4 (64%) que pour les chromosomes des souches AM1 et DM4 (70 et 72%, respectivement). Cette différence reflète sans doute le fait que l'annotation manuelle n'a pas encore été finalisée pour le génome de CM4, les prédictions automatiques étant parfois douteuses pour certains CDS.

2.2 Le plasmide p1MCHL porte les gènes *cmu* d'utilisation du chlorométhane

Le petit plasmide p2MCHL de 22 kb ne contient aucun gène de fonction connue, et *a priori* ne présente pas de propriétés particulières. En revanche, l'analyse montre que l'ensemble des gènes connus pour leur association à l'utilisation du chlorométhane chez CM4 est porté par le plasmide p1MCHL.

Le plasmide p1MCHL présente un pourcentage en GC (66,3%) légèrement inférieur à la moyenne retrouvée dans le reste du génome (68%). Des 423 objets génomiques prédits automatiquement sur ce plasmide (Tableau II.1), 56% des CDS prédits appartiennent à au moins un groupe COG. Une forte proportion de ces CDS (19%) code pour des fonctions liées à la réplication, la recombinaison et la réparation d'ADN (Tableau II.2). Ce plasmide présente un nombre important d'éléments d'insertion avec 18 IS soit environ 4% des CDS

Chapitre II

Tableau II.2. Classes fonctionnelles (COG^a) des CDSs prédits des réplicons de *M. extorquens* CM4 et comparaison de la répartition des classes dans deux autres génomes de *Methylobacterium extorquens*

Processus	Description des classes ^b	CM4				AM1		DM4		
		Chromosome	p1MCHL	p2MCHL	Classe (%)	Processus (%)	Classe (%)	Processus (%)	Classe (%)	Processus (%)
Processus et signalisation cellulaires	D- Contrôle du cycle cellulaire, division cellulaire, répartition chromosome	52	6	1	0.89		0.9		0.94	
	M- Paroi cellulaire / membrane / biogénèse de l'enveloppe	319	8	nd ^c	4.95		5.01		5.28	
	N- Motilité	161	5	2	2.54		2.67		2.49	
	O- Modification posttraductionnelles, renouvellement protéines	213	9	nd	3.36		3.87		4.3	
	T- Mécanismes de transduction du signal	438	19	1	6.93	22	6.66	23	7.42	24
	U- Trafic intracellulaire, sécrétion, transport vésiculaire	94	4	1	1.50		1.83		1.53	
	V- Mécanismes de défense	126	6	2	2.03		1.98		2.42	
	W- Structures cellulaires	nd	nd	nd	nd		0.02		ND	
Z- Cytosquelette	nd	nd	nd	nd		0.02		ND		
Stockage et traitement de l'information	B- Structure et dynamique de la chromatine	3	nd	nd	0.05		0.06		0.08	
	J- Traduction, structure des ribosomes et biogénèse	232	5	nd	3.59	15	3.53	17	3.95	16
	K- Transcription	311	25	3	5.13		5.25		5.78	
	L- Réplication, recombinaison et réparation	305	81	1	5.86		7.95		6.34	
Métabolisme	C- Production et conversion d'énergie	323	5	nd	4.97		5.21		6.07	
	E- Transport et métabolisme des acides aminés	598	24	nd	9.42		9.18		10.69	
	F- Transport et métabolisme des nucleotides	113	3	nd	1.76		1.85		1.85	
	G- Transport et métabolisme des carbohydrates	300	13	nd	4.74		5.01		5.35	
	H- Transport et métabolisme des de coenzymes	176	23	nd	3.01	37	2.88	37	3.03	42
	I- Transport et métabolisme des lipides	208	6	nd	3.24		3.3		3.7	
	P- Transport et métabolisme d'ions inorganiques	437	20	nd	6.92		7.13		7.77	
Q- Biosynthèse de métabolites secondaires, transport et catabolisme	175	8	nd	2.77		2.78		3.06		
Autres	R- Prédiction de fonction générale uniquement	750	31	nd	11.82	17	11.9	18	13.23	19
	S- Fonction inconnue	343	11	1	5.37		5.66		5.99	
	CDSs ayant au moins un résultat COG	3924	237	10	4171	63	4408	66	4180	70
	CDSs totales prédites	6136	423	46	6605		6665		5947	

^a Seule la prédiction COG présentant le meilleur score est prise en compte pour chaque CDS

^b D'après Tatusov *et al.*, 2003

^c nd, non détecté

prédits, et de nombreuses transposases. L'importance de ces éléments souvent impliqués dans des remaniements génétiques explique sans doute la présence de nombreux pseudogènes au nombre de 37, qui représentent 8% du total des CDS prédits du plasmide.

De manière remarquable, les deux clusters *cmu* précédemment décrits (Vannelli *et al.*, 1999) se trouvent distants de 21 kb seulement sur des régions présentant un contenu en GC atypique mais dépourvues d'éléments mobiles (Fig. II.4). Plusieurs autres régions du plasmide présentent des variations du taux de GC, certaines d'entre elles concentrent un nombre important d'éléments mobiles à leurs extrémités respectives (Fig. II.4).

Nous avons choisi de définir la région *cmu* comme la région du plasmide, désormais plus étendue et d'un seul tenant, comprise entre deux éléments mobiles successifs, et flanquant les gènes d'utilisation du chlorométhane (Fig. II.5). Cette région *cmu* s'étend sur 138 kb environ, de part et d'autre de la coordonnée 0 du plasmide, fixée de manière arbitraire après assemblage de sa séquence. Les coordonnées du plasmide seront peut-être revues à l'occasion de l'analyse comparative approfondie des 8 génomes de *Methylobacterium* et de leurs 26 plasmides (cf. Chapitre V, Fig. V.1), récemment initiée par le laboratoire en collaboration étroite avec le groupe du Prof. Chris Marx à Harvard. Ainsi, un segment de 40 kb du plasmide p1MCHL (Fig. II.4) contient les deux clusters *cmu* décrits précédemment (Vannelli *et al.*, 1999). Le gène *paaE*-like jusqu'alors non identifié dans la souche CM4 mais co-localisé avec les gènes *cmu* dans d'autres bactéries chlorométhane-dégradantes (cf. Chapitre III, Fig. III.2) est présent sur le plasmide, entre les deux clusters *cmu* précédemment décrits pour CM4 (Vannelli *et al.*, 1998, 1999; Studer *et al.*, 2002) (Fig. II.4). De la même manière, les gènes *fmdB* et *hutI* sont localisés, dans cet ordre, en aval du gène *cmuA*. Au-delà de la confirmation de la présence des gènes *cmuABC*, *cmuC*-like, *metF2*, *purU*, *folD*, *folC2*, *paaE*-like, *fmdB* et *hutI*, cette zone étendue de 65 kb comporte aussi 15 gènes impliqués dans la biosynthèse de la cobalamine, et 8 gènes codant des transporteurs putatifs du cobalt et de la cobalamine et de ses dérivés (Fig. II.5). Cette région contient aussi 25 gènes codant pour des protéines hypothétiques de fonctions inconnues, et plusieurs gènes codant pour des protéines de transport avec comme substrats potentiels le chlorure et le cobalt, de nombreuses enzymes de modification de l'ADN, une glycérate kinase, plusieurs gènes codant pour des régulateurs ou des facteurs de régulation (Fig. II.5).

A noter que le plasmide p1MCHL présente une parenté remarquable avec le plasmide p1METDI de la souche dichlorométhane-dégradante DM4. De fait, parmi les CDS prédits

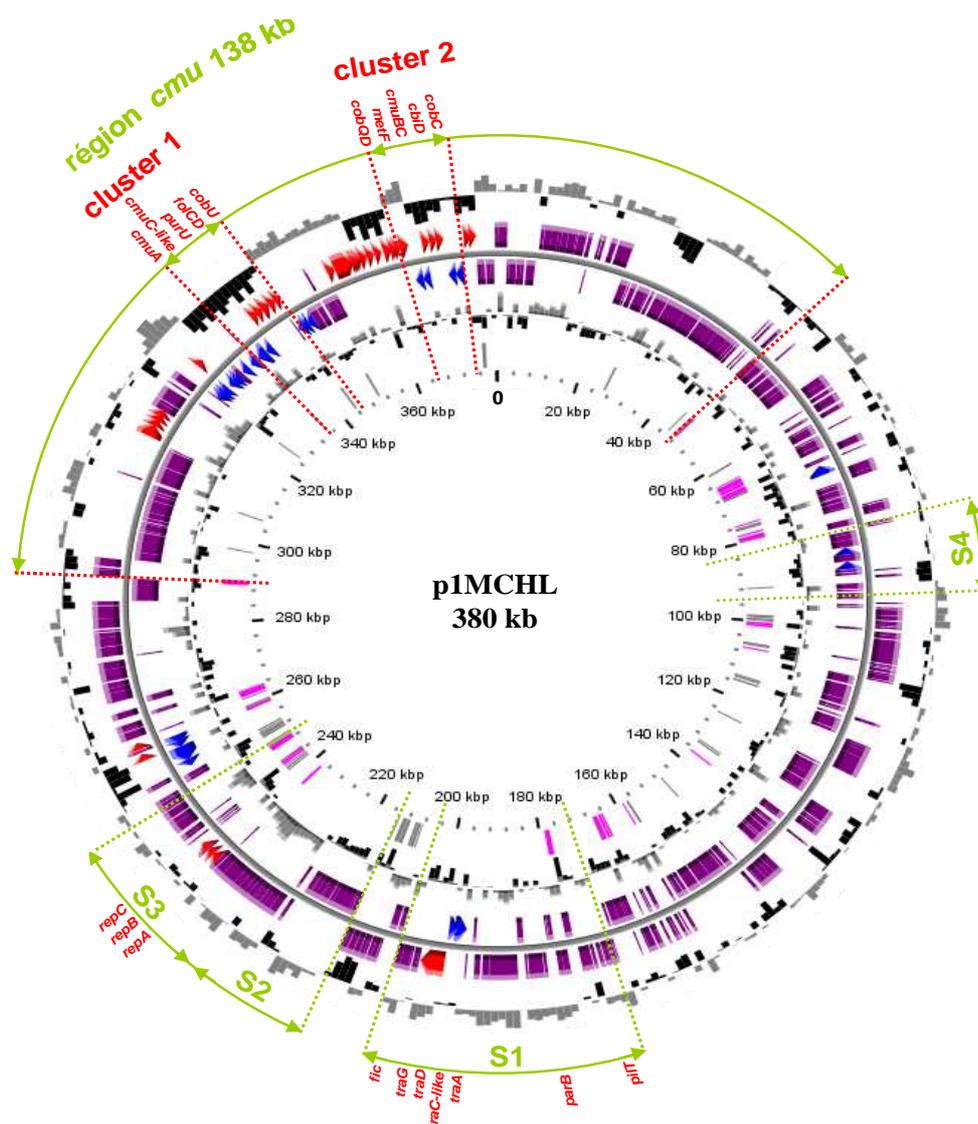


Figure II.4. Plasmide p1MCHL d'utilisation du chlorométhane chez *M. extorquens* CM4

Les clusters 1 et 2 distants de 21 kb contiennent tous les gènes essentiels d'utilisation du chlorométhane (*cmu*) répertoriés avant le séquençage du génome (Vannelli *et al.*, 1999; Studer *et al.*, 2002). L'ensemble de cette région couvre 40 kb de la région *cmu* du plasmide de 380 kb. Les zones S1, S2, S3 correspondent à une région de 69 kb conservée entre le plasmide p1MCHL et le plasmide p1METDI de *M. extorquens* DM4. Le plasmide p5Mrad de *M. radiotolerans* JCM2831 ne présente qu'une synténie au niveau de la région S3 (cf. Fig. II.1 et Tableau II.3). La région S4 présente une synténie avec une région dupliquée du chromosome de la souche dichlorométhane-dégradante DM4 (cf. Tableau II.4). Les cercles représentent depuis l'extérieur : 1, pourcentage de déviation GC (GC fenêtre – GC moyen) dans une fenêtre de 1000 pb; 2, CDS prédits transcrits dans le sens des aiguilles d'une montre; 3, CDS prédits transcrits dans le sens contraire des aiguilles d'une montre; 4, GC skew (G+C/G-C) dans une fenêtre de 1000 pb; 5, éléments transposables (rose) et pseudogènes (gris).

sur le plasmide p1METDI de DM4, 47% ont un homologue proche (plus de 50% d'identité au niveau protéique) sur le plasmide p1MCHL de CM4. En effet, trois régions du plasmide p1MCHL (S1, S2 et S3) sont retrouvées en synténie de plus de 8 gènes sur le plasmide p1METDI (Fig. II.4 et II.6). Ces trois régions, totalisant 69 kb environ, représentent 13% du total des CDS prédits du plasmide p1MCHL. Ces régions de synténie ne présentent que peu d'IS (Fig. II.4) et comprennent les gènes codant des protéines impliquées dans des fonctions de transfert (S1) et de réplication (S3), ainsi qu'un système de sécrétion (S2) et de nombreuses protéines hypothétiques (Tableau II.3). Deux de ces régions (S1 et S3) sont également partiellement retrouvées en synténie sur le plasmide p5Mrad de *M. radiotolerans* JCM2831 (Fig. II.6).

De manière plus détaillée, les gènes *tra* identifiés sur le plasmide p1MCHL (Mchl_5572 ; Mchl_5573 ; Mchl_5574 ; Mchl_5575) codent pour des enzymes putatives impliquées dans des fonctions de transfert par conjugaison. Celles-ci présentent un minimum de 75% d'identité au niveau protéique avec les produits des gènes *tra* du plasmide p1METDI. Les protéines Tra présentent également de fortes similarités de séquence (entre 35 et 50% d'identité) avec les protéines Tra identifiées chez les Rhizobiales. Les gènes *repABC* (Mchl_5615 ; Mchl_5616 ; Mchl_5617) codant pour des protéines impliquées dans la réplication, sont organisés en opéron. Ces gènes sont également conservés et retrouvés en synténie sur le plasmide p1METDI de DM4, ainsi que sur le plasmide p5Mrad de la souche *M. radiotolerans* JCM2831 (Fig. II.6 et Tableau II.3). Les produits protéiques des gènes *repABC* de CM4 sont essentiellement identiques (99% d'identité) avec ceux codés par les gènes du plasmide p1METDI (p1METDI0008 à p1METDI0010) (Tableau II.3). Des gènes de ce type sont aussi communément retrouvés chez les Rhizobiales (Cevallos *et al.*, 2008), et ont également été identifiés dans l'îlot *dcm* du chromosome de DM4 (données non montrées), suggérant une origine extrachromosomique de cette région

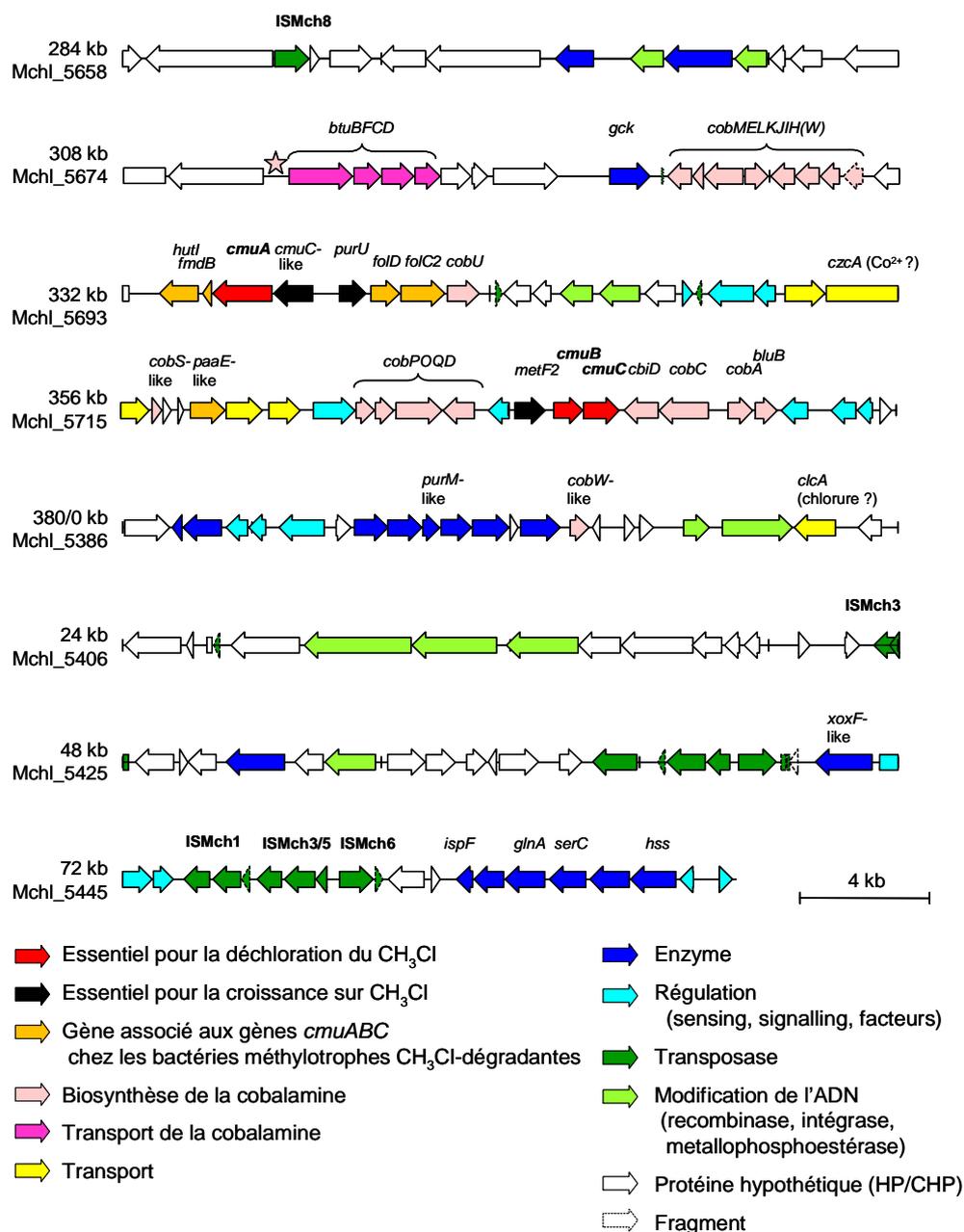


Figure II.5. Représentation de la région *cmu* du plasmide circulaire p1MCHL étendue à 138 kb

Régions de 284 à 380 kb puis de 0 à 90 kb du plasmide p1MCHL d'une taille de 380 kb. Le premier gène et la coordonnée initiale de chaque ligne sont indiqués pour faciliter l'orientation. La région des gènes de répllication putatifs, homologue à celle du plasmide p1METDI, est localisée ailleurs, aux alentours de 190 kb. Sont indiqués les gènes essentiels à la déchloration du chlorométhane (rouge), les autres gènes essentiels à la croissance sur le chlorométhane (noir), ou retrouvés dans le contexte des gènes *cmuABC* chez les bactéries méthylophiles CH₃Cl-dégradantes (orange); les gènes impliqués dans la biosynthèse de la cobalamine (rose) ou son transport (violet), les autres gènes de transport (jaune); les gènes codant pour d'autres enzymes (bleu foncé), les gènes de régulation (y compris sensing, signalling, et autres facteurs, en bleu ciel); les gènes de transposase (vert foncé) et les autres gènes de modification de l'ADN (incluant recombinaisons, intégrases, metallophosphoesterases, en vert clair). Les gènes codant pour des protéines de fonction inconnue (« hypothetical protein/conserved hypothetical protein ») sont indiqués en blanc. Les IS détectés par le logiciel Oasis (MC Lee et CJ Marx, communication personnelle) sont indiqués. Les gènes présents sous forme de fragments seulement sont indiqués en pointillé. L'étoile indique la localisation d'un riboswitch spécifique de la cobalamine (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Rfam/getacc?RF00174>).

(Vuilleumier *et al.*, 2009). Les gènes *repABC* du plasmide de CM4 présentent toutefois une similarité de séquences plus importante pour leurs homologues sur le plasmide de DM4 que pour leurs paralogues chromosomiques. En conclusion, il apparaît clairement que ces gènes *repABC* sont associés, dans les génomes des souches CM4 et DM4 respectivement, aux gènes de déchloration plasmidiques pour le chlorométhane chez CM4, et chromosomiques pour le dichlorométhane chez DM4.

Une dernière région du plasmide p1MCHL présente une synténie unique (S4) avec une région du chromosome de la souche DM4 (Fig. II.4 et Tableau II.4). De manière assez surprenante, cette région est dupliquée sur le chromosome de la souche DM4 (Tableau II.4). Cette synténie comporte des gènes codant pour une série d'enzymes bien caractérisées, notamment une homospermidine synthase impliquée dans la synthèse de polyamine, une phosphosérine aminotransférase SerC impliquée dans la biosynthèse de la sérine et du coenzyme pyridoxal 5'-phosphate chez *E. coli*, une glutamate déshydrogénase, une désaturase FAD-dépendante. De plus, l'une des CDS comprise dans cette région (Mchl_5457) code potentiellement pour une 2-C-méthyl-D-érythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase IspF, présentant une très forte identité de séquence (plus de 94% au niveau protéique) avec l'un des domaines d'une enzyme bifonctionnelle IspDF (2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate cytidyltransferase / 2-C-méthyl- D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase) dont le gène impliqué dans la synthèse d'isoprénoides, est retrouvé dans les génomes de CM4 (Mchl_3018), AM1 (META1_3018) et DM4 (METDI3585), et appartient donc au « core genome » de *M. extorquens*. Or, la souche DM4 possède comme CM4 une duplication de ce gène (METDI4485) alors qu'il est absent du génome de la souche AM1. Des travaux futurs auront à établir le lien éventuel de ces gènes avec la capacité commune d'utilisation des méthanes chlorés comme substrat de croissance des souches DM4 et CM4.

Tableau II.3. Parenté de fonctions de répllication et de transfert entre les épisomes p1MCHL, p1METDI et p5Mrad

Régions de synténie ^a	Produit	Gène de CM4	Orthologues ^b sur d'autres plasmides		
			p1MCHL	p1METDI	p5Mrad ^c
S1	protéine hypothétique	Mchl_5546		p1METDI0092	
	protéine hypothétique	Mchl_5547		p1METDI0094	
	protéine hypothétique	Mchl_5548		p1METDI0094	
	protéine hypothétique	Mchl_5549		p1METDI0095	Mrad2831_6052
	prevent-host-death family protein	Mchl_5550		p1METDI0096 ^d	
	protéine hypothétique	Mchl_5552		p1METDI0098	
	PilT protein domain protein	Mchl_5554		p1METDI0100 ^d	Mrad2831_6056 ^d
	protein of unknown function DUF736	Mchl_5555		p1METDI0102	Mrad2831_6057
	domain of unknown function DUF1738	Mchl_5558		p1METDI0104	Mrad2831_6049
	protéine hypothétique	Mchl_5559		p1METDI0105	METRAp_0325
	protéine hypothétique	Mchl_5563		p1METDI0109	
	ParB domain protein nuclease	Mchl_5564		p1METDI0110	Mrad2831_6053
	probably methylase/helicase	Mchl_5567		p1METDI0111	
	protéine hypothétique	Mchl_5568		p1METDI0112	Mrad2831_6058
	protéine hypothétique	Mchl_5569		p1METDI0113	Mrad2831_6059
	protéine hypothétique	Mchl_5570		p1METDI0114	
	protéine hypothétique	Mchl_5571		p1METDI0117	
	TraG putative (IPR003688)	Mchl_5572		p1METDI0118	Mrad2831_6100
	TraD putative de transfert par conjugaison	Mchl_5573		p1METDI0119	Mrad2831_6101
	TraC-like (IPR012930)	Mchl_5574		p1METDI0120	Mrad2831_6102 ^d
	TraA putative de transfert par conjugaison	Mchl_5575		p1METDI0121	Mrad2831_6103
	protéine hypothétique	Mchl_5578		p1METDI0122	
potéine Fic de filamentation AMPc inductible	Mchl_5579		p1METDI0123		
protéine hypothétique	Mchl_5580		p1METDI0124		
S2	protéine hypothétique	Mchl_5591		p1METDI0125	
	protéine hypothétique	Mchl_5592		p1METDI0126	
	protéine hypothétique	Mchl_5593		p1METDI0127	
	protéine hypothétique	Mchl_5594		p1METDI0128	
	protéine hypothétique	Mchl_5595		p1METDI0129	
	protéine hypothétique	Mchl_5596		p1METDI0130	
	protéine hypothétique	Mchl_5597		p1METDI0131	
	protéine hypothétique	Mchl_5598		p1METDI0132	
	protéine hypothétique	Mchl_5599		p1METDI0133	
	protéine hypothétique	Mchl_5600		p1METDI0134	
	protéine hypothétique	Mchl_5601		p1METDI0135	
	protéine hypothétique	Mchl_5602		p1METDI0136	
	protéine E, système de sécrétion de type II	Mchl_5603		p1METDI0137	
	protein de fonction inconnue DUF882	Mchl_5604		p1METDI0138	
	protéine hypothétique	Mchl_5605		p1METDI0139	
	protéine hypothétique	Mchl_5606		p1METDI0140	
	protéine hypothétique	Mchl_5607		p1METDI0141	
S3	peptidase M23	Mchl_5608		p1METDI0001	
	protéine hypothétique	Mchl_5609		p1METDI0002	
	protéine hypothétique	Mchl_5610		p1METDI0003	
	protéine hypothétique	Mchl_5611		p1METDI0004	
	protéine hypothétique	Mchl_5612		p1METDI0005	
	protéine hypothétique	Mchl_5613		p1METDI0006	
	transposase putative	Mchl_5614		p1METDI0007	
	protéine RepA de partition plasmidique	Mchl_5615		p1METDI0008	Mrad2831_5912
	protéine RepB de partition plasmidique	Mchl_5616		p1METDI0009	Mrad2831_5913
	protéine C de répllication	Mchl_5617		p1METDI0010	Mrad2831_5911 ^d
	protéine hypothétique	Mchl_5620		p1METDI0011	
	protéine putative de répllication de l'ADN	p1MCv2_0271		p1METDI0014	
transposase (fragment)	Mchl_5621		p1METDI0014		
transposase putative	Mchl_5625		p1METDI0014 ^d		
transposase	Mchl_5626		p1METDI0040 ^d		

^a Entre p1MCHL et p1METDI

^b Orthologues présents sur les plasmides p1METDI de DM4 ou p5Mrad de *M. radiotolerans* JCM2831 (Mrad2831_NC_010510) présentant sauf indication contraire un minimum de 50% d'identité au niveau protéique avec la protéine correspondante de p1MCHL

^c Gènes également retrouvés en synténie

^d Orthologues présentant entre 30 et 50% d'identité au niveau protéique avec la protéine correspondante de p1MCHL

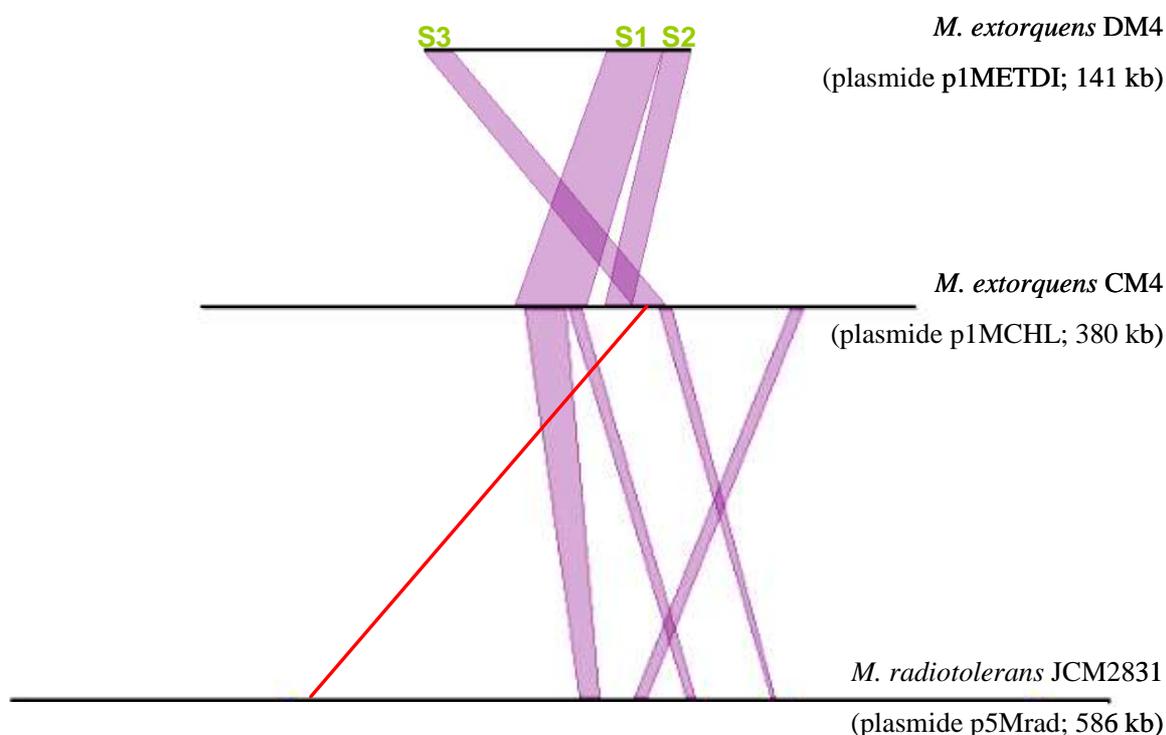


Figure II.6. Conservation de fonctions de transfert et de réplication de 3 plasmides de 3 souches du genre *Methylobacterium*

Représentation schématisée des synténies entre le plasmide p1MCHL de CM4 (au milieu) et les plasmides p1METDI de DM4 (en haut) et p5Mrad de *M. radiotolerans* JCM2831 (en bas). Les plasmides représentés sous forme linéaire, sont alignés par LinePlot dans MaGe. Les relations synténiques comprenant au moins 8 gènes sur les mêmes brins sont représentées par des lignes pourpres et sont désignées S1, S2 et S3 pour les synténies entre les plasmides p1MCHL et p1METDI. Ces régions comportent des fonctions de transfert et de réplication, détaillées dans le Tableau II.3. La région S3 est éclatée et seulement partiellement présente sur le plasmide p5Mrad : une synténie comprenant des gènes impliqués dans la réplication (S3) en orientation inversée dans les deux objets comparés, est indiquée par une ligne rouge.

Tableau II.4. Région de synténie S4 spécifique des souches déchlorantes entre le plasmide p1MCHL et une région dupliquée du chromosome de la souche déchlorante DM4

Plasmide p1MCHL	Identité protéique entre homologues chromosomiques et la copie plasmidique de CM4 (en %)				Annotation MaGe
	Souche DM4		Souche CM4	Souche AM1	
	Région R4	Autre copie			
Mchl_5455	METDI4487 (95%)	METDI2853 (82%)	Mchl_2361 (82%)	META1_2072 (82%)	Conserved hypothetical protein; putative membrane protein
Mchl_5456	METDI4486 (88%)	nd ^a	nd	nd	Hypothetical protein; putative membrane protein
Mchl_5457 ^b	METDI4485 (94%)	nd	nd	nd	2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase (MECPS, MECDP-synthase)
Mchl_5458	METDI4484 (96%)	METDI3059 (36%)	Mchl_2552 (36%)	META1_2277 (36%)	Putative pseudouridine synthase, putative 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase
Mchl_5459	METDI4483 (99%)	nd	nd	nd	Glutamate dehydrogenase (NAD(P)+) oxidoreductase protein (gène <i>gdhA</i>)
Mchl_5460	METDI4482 (97%)	METDI0640 (96%)	Mchl_0670 (96%)	META1_0485 (96%)	Phosphoserine aminotransferase (gène <i>serC</i>)
Mchl_5461	METDI4481 (96%)	METDI2704 (53%)	Mchl_2219 (52%)	META1_1817 (53%)	Squalene-associated FAD-dependent desaturase
Mchl_5462	METDI4480 (98%)	METDI2807 (96%)	Mchl_2317 (96%)	META1_2024 (96%)	Homospermidine synthase (gène <i>hss</i>)

^a nd, non détecté.

^b IspDF, enzyme bifonctionnelle du core génome de *Methylobacterium* (META1_3018; Mchl_3044 et METDI3585) partage un domaine IspF ayant 94% d'identité protéique avec Mchl_5457.

2.3 Gènes communs de *M. extorquens* et gènes spécifiques de la souche CM4

La comparaison des chromosomes des souches CM4 et DM4 révèle des différences importantes entre ces deux souches, notamment la présence de certaines régions dans un génome mais pas dans l'autre. Ces régions, désignées par le terme d'« îlot génomique » (Juhas *et al.*, 2009), sont des zones du génome possédant des caractéristiques différentes du reste du génome, comme par exemple un pourcentage en GC atypique (Tableau II.5). Ces îlots ont été probablement acquis par une souche à la faveur d'évènements de transformation, de transduction ou de conjugaison. Si certains îlots génomiques ne codent pour aucune fonction connue, en revanche beaucoup d'entre eux favorisent l'adaptation à différentes contraintes, et contiennent par exemple des gènes codant pour des enzymes de dégradation, la résistance aux métaux lourds, aux antibiotiques, ou pour des facteurs de pathogénicité (îlots de pathogénicité) (Juhas *et al.*, 2009).

Les îlots génomiques identifiés dans le génome de CM4 ont des tailles allant de quelques gènes à plus d'une centaine (Tableau II.5), et représente un total de 842 kb, soit environ 14,6% du chromosome de CM4. L'îlot génomique de 126 kb chez la souche DM4, contenant les gènes d'utilisation du dichlorométhane (Vuilleumier *et al.*, 2009), est absent du chromosome de CM4 (Fig. II.2). La plupart de ces îlots codent pour des fonctions du métabolisme central ou de la méthylothrophie. Une région de 69 kb du chromosome de CM4, absente de celui de DM4, comporte les gènes *mau* d'utilisation de la méthylamine retrouvés chez la souche AM1 (Vuilleumier *et al.*, 2009) (Tableau II.5). De fait, les génomes de *Methylobacterium* sont caractérisés par la présence de nombreux îlots génomiques, comme l'analyse comparative des génomes des souches DM4 et AM1 a déjà pu le mettre en évidence (Vuilleumier *et al.*, 2009). Un des îlots génomiques de CM4 présente une synténie avec une région spécifique de DM4 non identifiée chez AM1 (Tableau II.6).

Tableau II.5. Régions uniques du chromosome de la souche CM4 au sein de l'espèce *M. extorquens*

Début de la région		Fin de la région		Longueur	Caractéristiques	Composition ^a
(Mchl_)	(nt)	(Mchl_)	(nt)	(nt)	[borne gauche] [intérieur] [borne droite] ^b	Fonction prédite [gène remarquable]
0033	36407	0117	112818	76412	[ø][tRNA - int - tRNA - int - tRNA/int][pseudo]	Métabolisme [electron transport protein SCO1/SenC, Mchl_0037; putative isochorismatase hydrolase-like domain, Mchl_0070; putative homocysteine S-methyltransferase-like domain, Mchl_0089]
0198	197255	0208	208002	10748	[ø][ø][ø]	Métabolisme et régulation [putative redoxin containing domain, Mchl_0201; putative cysteine synthase A, Mchl_0204; arginase, Mchl_0203; RNA polymerase sigma-like factor & regulator, Mchl_0206-0207]
0230	229723	318	297117	67395	[ø][int - int - tRNA][pseudo]	Origine phagique
0504	501777	0577	570551	68775	[ø][tRNA][ø]	Métabolisme en C1, utilisation de la méthylamine [cluster <i>mau</i> ; putative sigma regulatory factors ^c , Mchl_0507-0512; <i>ppa2</i> , putative inorganic pyrophosphatase]
1568	1634790	1649	1695506	60717	[ø][tRNA - tRNA/int - tRNA - tRNA][pseudo]	Origine phagique
1943	2012017	1982	2067768	55752	[ø][tRNA - tRNA][pseudo]	Origine phagique
2065	2163102	2081	2182066	18965	[ø][ø][ø]	Métabolisme [probable 5-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine deaminase; Mchl_2068; probable sulfopyruvate decarboxylase; Mchl_2071, & probable xanthine dehydrogenase subunits, Mchl_2065-2066; probable glutathione S-transferase, Mchl_2073]
3296	3478474	3396	3580648	102175	[ø][tRNA - int - tRNA - int - int][pseudo]	[putative sigma regulatory factors ^c , Mchl_3339-3342; putative solute:hydrogen antiporters, Mchl_3347; Mchl_3351; Mchl_3355; putative oxidoreductase, Zn-dependent and NAD(P)-binding, Mchl_3368]
3823	4037279	3870	4073204	35926	[ø][int - tRNA][pseudo]	[adenosine 5'-phosphosulfate kinase CysC, Mchl_3825]
3971	4177688	4014	4222665	44978	[pseudo][tRNA][ø]	Biosynthèse et dégradation de polysaccharides et de lipopolysaccharides de surface [Mchl_3980; Mchl_3982; Mchl_3984; Mchl_3985; Mchl_4001-4003]
4073	4297924	4131	4350643	52720	[ø][tRNA - int - int][IS]	[putative sulfate transporter, Mchl_4103; putative zinc-containing alcohol dehydrogenase, Mchl_4105]
4189	4417481	4251	4480945	63465	[ø][tRNA - tRNA][pseudo]	Transport et métabolisme central [ABC-type transporter, Mchl_4200-4202; ferredoxin, Mchl_4203; ferredoxin--NADP+ reductase, Mchl_4204; succinyl-CoA ligase subunits, Mchl_4206-4207; aldehyde dehydrogenase, Mchl_4208; choline dehydrogenase, Mchl_4211; sulfoacetaldehyde acetyltransferase, Mchl_4214; sulfite oxidase-like, Mchl_4218]
4718	5003234	4748	5041134	37901	[ø][tRNA/int][ø]	[efflux transporter, Mchl_4730; chromate transporter, Mchl_4736]
4753	5046814	4836	5146187	99374	[ø][tRNA - int - int - tRNA][pseudo]	Métabolisme [putative dioxygenase, Mchl_4772; adenylyl-sulfate kinase, Mchl_4775; putative esterase, Mchl_4776]
5315	5695918	5335	5716822	20905	[ø][tRNA - int - int][pseudo]	Origine phagique
5360	5751487	5385	5777908	26422	[ø][ø][int]	Inconnue

^a Une taille minimale de 5kb des régions génomiques pour des CDS n'ayant pas d'homologues avec plus de 80% d'identité au niveau protéique/0,8 minLrap dans les chromosomes de *M. extorquens* AM1, DM4 et PA1 qui présentent respectivement 72, 78 et 75% de leur CDSs totales en synténie avec le chromosome de la souche CM4. Les régions composées d'opérons *rrm* n'ont pas été incluses dans cette liste

^b ø, pas de caractéristique détectée; int, intégrase; pseudo, pseudogène ou gène interrompu; IS, séquence d'insertion

^c Synténie de 6 gènes avec des paralogues ayant plus de 92% d'identité au niveau protéique entre les protéines Mchl_0512 à Mchl_0507 / Mchl_3335 à Mchl_3344, apparentées à des systèmes non caractérisés de régulation transcriptionnelle par phosphorylation de protéines de type facteurs sigma

Parmi les gènes présents dans cette région, on trouve notamment de nombreuses protéines hypothétiques, deux gènes codant les sous-unités de l'enzyme succinyl-CoA synthétase ainsi que deux oxydoréductases (Tableau II.6). Quatre îlots génomiques de CM4 sont proposés comme dérivant de phage dès lors qu'au moins une protéine de l'îlot présente des homologies avec des protéines de phage (Tableau II.5).

De manière plus détaillée, la recherche de gènes spécifiques de CM4 et absents des génomes de AM1 et DM4 a conduit à l'identification de 984 gènes spécifiques de la souche CM4 sur son chromosome, 147 sur le plasmide p1MCHL comportant la région *cmu*, et 21 gènes sur le plasmide p2MCHL. Cette analyse a été étendue pour inclure la souche chlorométhane-dégradante *Roseovarius* sp. 217 (Li *et al.*, 2003) (Fig. II.7). On remarque d'abord la très grande parenté de ces trois souches de *M. extorquens*, puisque chacune partage plus de trois-quarts de ses CDS avec les deux autres. En revanche, seuls 52 CDS sont communs aux trois souches déchlorantes. Toutefois, aucun des gènes correspondants n'est localisé dans la région *dcm* chez DM4, ou dans la région *cmu* chez CM4, respectivement spécifiques de la déchloration du dichlorométhane et du chlorométhane. En revanche, les 26 CDS communs aux deux souches chlorométhane-dégradantes CM4 et *Roseovarius* sp. 217 incluent les gènes qui codent pour CmuA (homologue tronqué chez *Roseovarius*), MetF2, Fold, PurU, et la protéine de transport de la cobalamine BtuB (co-localisés dans le génome de *Roseovarius* comme chez *M. extorquens* CM4 ; Tableau II.7). Trois gènes codent pour des protéines conservées de fonctions inconnues portant un domaine de fixation du FAD (Gomelsky et Klug, 2002). Cet ensemble de gènes communs aux bactéries chlorométhane-dégradantes, mais absents des autres génomes disponibles de l'espèce *M. extorquens*, représente une base importante pour l'identification expérimentale de gènes spécifiquement liés à l'utilisation du chlorométhane à l'avenir.

Tableau II.6. Synténie entre deux blocs de gènes de deux flots génomiques des souches déchlorantes

Chromosome CM4	Annotation MaGe (DM4)	% Identité	Ilot génomique chez DM4	% Identité avec copie "core genome"	Chromosome AM1 (META1_)	Chromosome PA1	Chromosome DM4	Chromosome CM4
Mchl_4204	oxidoreductase FAD/NAD(P)-binding domain protein	92 (fragment)	METDI0773	97	META1_2334	Mext_2331	METDI3113	
Mchl_4205	hypothetical protein	81	METDI0774	nd	nd	nd	nd	
Mchl_4206	sucD, succinyl-CoA synthetase, alpha subunit	91	METDI0775	43	META1_1539	Mext_1645	METDI2313	
Mchl_4207	sucC, succinyl-CoA synthetase, beta subunit	87	METDI0776	36	META1_1538	Mext_1644	METDI2312	
Mchl_4208	putative succinate-semialdehyde dehydrogenase	92	METDI0777	nd	nd	nd	nd	
Mchl_4209	putative transporter, major facilitator superfamily	95	METDI0778	60	META1_4591	Mext_4199	METDI5201	Mchl_4569
Mchl_4210	hypothetical protein; putative exported protein	63	METDI0780	nd	nd	nd	nd	nd
Mchl_4211	glucose-methanol-choline oxidoreductase	86	METDI0781	nd	nd	nd	nd	Mchl_2069 (39%)
Mchl_4212	MFS transporter membrane protein	89	METDI0782	43	META1_2452	Mext_2487	METDI3215	Mchl_2710
Mchl_4213	conserved hypothetical protein; putative membrane protein (UPF0324)	92	METDI0783	nd	META1_1220 (59%)	nd	nd	nd
Mchl_4214	xsc, sulfoacetaldehyde acetyltransferase	95	METDI0788	nd	nd	nd	nd	nd
Mchl_4215	transcriptional regulator, LysR family	91	METDI0779	nd	nd	nd	nd	nd
Mchl_4216	putative acetate kinase (ackA)	82	METDI0790	54-62	META1_3807 META1_0383 META1_1891	Mext_0563 Mext_0053	METDI0295 p2METDI0002 METDI0535 METDI1444 METDI4544	Mchl_0498 Mchl_1295
Mchl_4222	transcriptional regulator, LysR family	59	METDI0779	36-44	META1_4989	Mext_4540	METDI5591 METDI0253 (44%)	Mchl_5000

nd, pas d'homologue à plus de 30% d'identité de séquence au niveau protéique

2.4. Génomique comparative de la biosynthèse de la cobalamine chez *M. extorquens*

La croissance sur chlorométhane de la souche *M. extorquens* CM4 dépend de la présence du cobalt dans le milieu de culture (cf. Chapitre I, section 1.6.1). Les premières étapes de la voie d'utilisation du chlorométhane, soit la déshalogénéation du chlorométhane puis le transfert du groupe méthyle vers le tétrahydrofolate, sont catalysées par des enzymes dépendantes de la cobalamine.

2.4.1 Les enzymes B₁₂-dépendantes codées dans le génome de *M. extorquens* CM4

La chlorométhane déshalogénase CmuA, avec ses deux domaines méthyltransférase et de liaison corrinoïde (Mchl_5697; Vannelli *et al.*, 1999 et Studer *et al.*, 1999), appartient à la sous-famille B₁₂-dépendante des méthyltransférases, dont le prototype est la méthionine synthase MetH (Drummond *et al.*, 1993).

Parmi les enzymes B₁₂-dépendantes présentes chez toutes les souches séquencées de *M. extorquens*, on compte outre la méthionine synthase MetH (Mchl_1882), la ribonucléotide réductase Nrd (Mchl_1231) impliquée dans la biosynthèse de l'ADN, la méthylmalonyl-CoA mutase Mcm (2 sous-unités alpha et bêta codées respectivement par *mcmA* et *mcmB*: Mchl_2665/Mchl_5261) (Korotkova *et al.*, 2004), et l'éthylmalonyl-CoA mutase Ecm (Mchl_0334) (Erb *et al.*, 2007 ; 2008) impliquée dans la régénération du glyoxylate.

A l'exception de *cmuA*, tous les gènes correspondants se retrouvent de manière très conservée dans les génomes de *Methylobacterium*. En revanche, pour les parties 5' et 3' du gène *cmuA* codant les deux domaines de CmuA, aucun homologue proche de CmuA n'est détecté dans les génomes de *Methylobacterium*, soulignant la spécificité de cette protéine pour le métabolisme du chlorométhane.

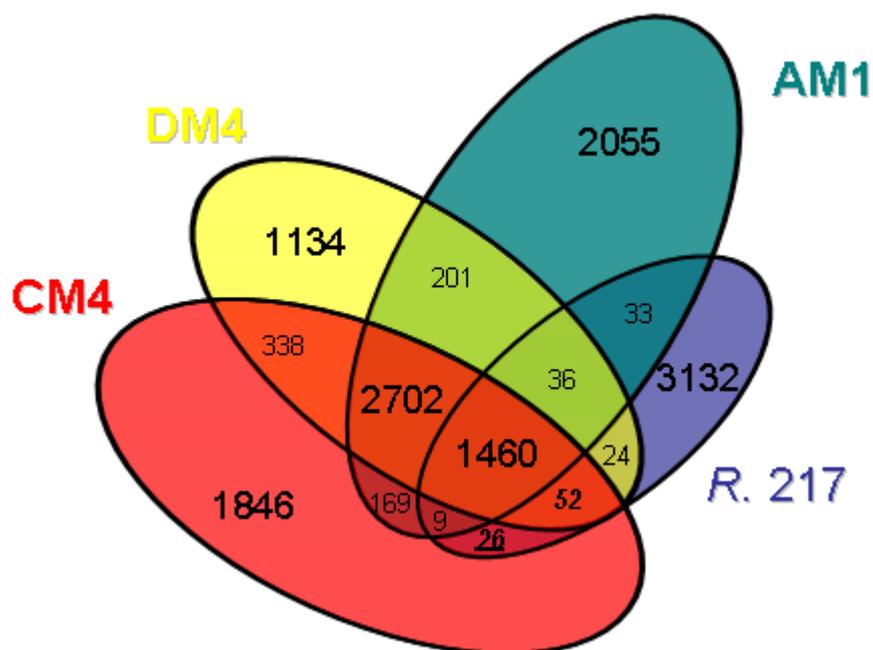


Figure II.7. Homologues et gènes orphelins dans 4 génomes de souches méthylophiles

Diagramme de Venn des CDS homologues pour les génomes séquencés des 3 souches *Methylobacterium extorquens* CM4 (chlorométhane-dégradante), DM4 (dichlorométhane-dégradante), de la souche de référence AM1, et de la souche méthylophile chlorométhane-dégradante *Roseovarius* sp. 217.

La surface des ellipses est proportionnelle à la taille totale des génomes, mais les surfaces des différents sous-ensembles du diagramme ne sont pas à la même échelle.

Le seuil de détection a été défini pour des homologues présentant plus de 30% d'identité sur plus de 80% de la longueur de la protéine la plus courte de la comparaison, en relation de BBH (« bidirectional best hit », meilleur hit réciproque), avec l'outil orthomcl (Li *et al.*, 2003). Les CDS communs aux trois souches déchlorantes sont indiqués en italiques gras, et les CDS communs aux deux souches chlorométhane-dégradantes sont indiqués en italiques gras et soulignés.

**Tableau II. 7. Ensemble de gènes communs entre deux souches déchlorantes
du chlorométhane : *M. extorquens* CM4 et *Roseovarius* sp. 217**

Protéine	Gène	Annotation MaGe
Mchl_0202		lysine exporter protein (LYSE/YGGA)
Mchl_0284		bacteriophage-like protein
Mchl_0285		bacteriophage-like protein
Mchl_0288		hypothetical protein
Mchl_0527		FAD-binding domain, BLUF domain protein
Mchl_1280		YidE/YbjL duplication
Mchl_1291		sulphate transporter
Mchl_1616		MT-A70 family protein
Mchl_2067		hypothetical protein
Mchl_2081		hypothetical protein
Mchl_3323		integrase family protein
Mchl_3364		FAD-binding domain, BLUF domain protein
Mchl_4103		sulphate transporter
Mchl_4193		Resolvase domain
Mchl_4786		FAD-binding domain, BLUF domain protein
Mchl_5436		protein of unknown function DUF1275
Mchl_5439		transposase mutator type
Mchl_5498		histidine kinase
Mchl_5499		two component, sigma54 specific, transcriptional regulator
Mchl_5523	<i>acxA</i>	acetone carboxylase beta subunit (6.4.1.6)
Mchl_5624		integrase catalytic region
Mchl_5676	<i>btuB</i>	putative vitamin B12/cobalamin outer membrane transporter
Mchl_5697	<i>cmuA</i>	methyltransferase / corrinoid binding protein
Mchl_5699	<i>purU</i>	formyltetrahydrofolate hydrolase
Mchl_5700	<i>folD</i>	bifunctional methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase
Mchl_5726	<i>metF2</i>	methylenetetrahydrofolate reductase

Tableau II.8. Transporteurs putatifs du cobalt et de la cobalamine chez *M. extorquens*

Gène	Annotation MaGe	Souche CM4			Souche DM4	Souche AM1
		p1MCHL	% ^a	chromosome ^b	chromosome ^b	chromosome ^b
<i>btuB</i>	Putative vitamin B12 outer membrane transporter BtuB	Mchl_5676	nd ^c	ND	ND	ND
<i>btuC</i>	Putative vitamin B12 import system permease protein BtuC	Mchl_5678	73.5	Mchl_3152	METDI3695	META1_3132
<i>btuD</i>	Putative vitamin B12 transport system BtuD, ATPase component	Mchl_5679	66.0	Mchl_3151	METD3694	META1_3131
<i>btuF</i>	Putative vitamin B12-binding protein BtuF	Mchl_5677	61.0	Mchl_2895	METDI3427	META1_2861
<i>czcA</i>	Cobalt-zinc-cadmium resistance protein <i>czcA</i>	Mchl_5715	43.4	Mchl_1072 ^d	METDI1396 ^d	META1_2655 ^d
<i>cbtA</i>	Putative cobalt transporter, subunit CbtA	nd	nd	Mchl_1718	METDI2104	META1_1332
<i>cbtB</i>	Putative cobalt transporter, subunit CbtB	nd	nd	Mchl_1719	METDI2105	META1_1333
<i>corA</i>	Putative cobalt transporter CorA	nd	nd	Mchl_3905	METDI4603	META1_3873
<i>exbB</i>	Transport protein ExbB	nd	nd	Mchl_1900	METDI2286	META1_1512
<i>exbD</i>	Transport protein ExbD	nd	nd	Mchl_1899	METDI2285	META1_1511
<i>tolQ</i>	Transport protein ExbB/TolQ	nd	nd	Mchl_5230 ^e	METDI5818 ^e	META1_5219 ^e
<i>tolR</i>	Transport protein ExbD/TolR	nd	nd	Mchl_5229 ^f	METDI5817 ^f	META1_5218 ^f
<i>tonB</i>	Putative TonB family C-terminal domain protein	nd	nd	Mchl_1898	METDI2284	META1_1510

^a Pourcentage d'identité au niveau protéique entre paralogues plasmidiques et chromosomiques de CM4

^b Les orthologues des chromosomes présentent sauf indication contraire un minimum de 94 % d'identité au niveau protéique

^c nd, non détecté

^d Présente plusieurs duplications dans le génome de *M. extorquens*

^e Paralogue chromosomique (44 % d'identité au niveau protéique) de la protéine de transport ExbB (Mchl_1900)

^f Paralogue chromosomique (43 % d'identité au niveau protéique) de la protéine de transport ExbD (Mchl_1899)

2.4.2. Le transport du cobalt et de la cobalamine

La présence, dans les génomes de *M. extorquens*, de différents gènes codant des transporteurs du cobalt ou de la cobalamine a été confirmée sur la base des différents systèmes de transport connus et décrits dans d'autres organismes (cf. Chapitre I section 1.6.2). Comme attendu du fait de la dépendance envers le cobalt de la souche CM4 en croissance sur chlorométhane (cf. Chapitre I, section 1.6.1), les gènes de ces différents systèmes sont présents de manière plus nombreuse dans le génome de CM4.

Le gène *corA* codant un système de transport du cobalt bien caractérisé pour différentes bactéries (Niegowski et Eshaghi, 2007 ; Fig. I.10) est conservé chez les souches *M. extorquens* séquencées (Tableau II.8). Chez ces souches, ce gène présente deux paralogues chromosomiques (Mchl_3905 et Mchl_5251 chez CM4) avec 37% d'identité au niveau protéique. Le gène Mchl_5251 est localisé à proximité du gène *mcmA* codant la sous-unité alpha de la méthylmalonyl-CoA mutase (Mchl_5261), une enzyme B₁₂-dépendante essentielle pour la régénération du glyoxylate.

Par ailleurs, un gène similaire à *czcA*, codant une protéine de type transporteur RND (Mchl_5715) impliquée dans la résistance et l'efflux de cations de type cadmium-zinc-cobalt (Goldberg *et al.*, 1999), est aussi présent dans la région *cmu* du plasmide p1MCHL de CM4. Le gène correspondant est co-localisé avec un gène codant une sous-unité MFP (cf. Chapitre I section 1.6.2). De plus, 9 paralogues chromosomiques de ce gène, présentant plus de 30% d'identité entre eux au niveau protéique sont identifiés dans le génome de CM4 (données non montrées). En revanche, ces différents paralogues sont conservés chez toutes les souches de *M. extorquens* séquencées.

Des gènes codant les protéines de transport TonB, ExbB/ExbD et TolQ/TolR, et BtuFCD sont également présents dans l'espèce *M. extorquens* (chez CM4 : Mchl_1898 ; Mchl_1900 ; Mchl_1899 ; Mchl_5230 et Mchl_5229, respectivement, Tableau II.8).

Tableau II.9. Les gènes de la biosynthèse de l'adénosylcobalamine chez *M. extorquens* : duplication partielle chez CM4

Biosynthèse	Gène ^a	Annotation MaGe	Souche CM4			Souche DM4 chromosome ^c	Souche AM1 chromosome ^c
			p1MCHL	% ^b	chromosome ^c		
Voie aérobie	<i>cobA</i>	S-adenosyl-L-methionine-dependent uroporphyrinogen III methylase (SUMT) (EC 2.1.1.107)	Mchl_5731 ^g	nd	nd ^h	nd	nd
	<i>cobI</i>	Precorrin-2 C(20)-methyltransferase (EC 2.1.1.130)	Mchl_5690	80.7	Mchl_1711	METDI2097	META1_1325
	<i>cobG</i>	Putative precorrin-3B synthase CobG (EC 1.14.13.83)	nd	nd	Mchl_1713	METDI2099	META1_1327
	<i>cobJ</i>	Precorrin-3B C(17)-methyltransferase (EC 2.1.1.131)	Mchl_5689	79.1	Mchl_1710	METDI2096	META1_1324
	<i>cobM</i>	Precorrin-4 C(11)-methyltransferase (EC 2.1.1.133)	Mchl_5685	82.7	Mchl_1166	METDI1518	META1_0804
	<i>cobF</i>	Precorrin-6A synthase (EC 2.1.1.152)	nd	nd	Mchl_3694	METDI4188	META1_3613
	<i>cobK</i>	Precorrin-6A reductase (EC 1.3.1.54)	Mchl_5688	63.4	Mchl_5189	METDI5775	META1_5173
	<i>cobL</i>	Precorrin-6Y C(5,15)-methyltransferase (EC 2.1.1.132)	Mchl_5687	76	Mchl_1161	METDI1513	META1_0799
	<i>cobH</i>	Precorrin-8X methylmutase (EC 5.4.1.2)	Mchl_5691	86.2	Mchl_1712	METDI2098	META1_1326
	<i>cobB</i>	Cobyric acid a,c-diamide synthase	nd	nd	Mchl_1167	METDI1519	META1_0805
	<i>cobN</i>	Putative cobaltochelataze, CobN-related (EC 6.6.1.2)	nd	nd	Mchl_1714	METDI2100	META1_1328
	<i>cobS</i>	Aerobic cobaltochelataze subunit CobS (EC 6.6.1.2)	nd	nd	Mchl_3554	METDI4018	META1_3441
	<i>cobT</i>	Aerobic cobaltochelataze subunit CobT (EC 6.6.1.2)	nd	nd	Mchl_3553	METDI4017	META1_3440
	<i>bluB / bluB2</i> ^e	Putative cob(II)yrinic acid a,c-diamide reductase (EC 1.16.8.1)	Mchl_5732	38.4	Mchl_2280	METDI2769	META1_1981
	<i>cobO</i>	Cob(II)yrinic acid a,c-diamide adenosyltransferase (EC 2.5.1.17)	Mchl_5722	83.5	Mchl_1723	METDI2109	META1_1337
	<i>meaD</i> ^f	Cobalamin adenosyltransferase (EC 2.5.1.17)	nd	nd	Mchl_1821	METDI2206	META1_1433
	<i>cobQ</i>	Cobyric acid synthase	Mchl_5723	75.2	Mchl_5190	METDI5776	META1_5174
	<i>cobC</i>	L-threonine-O-3-phosphate decarboxylase (EC 4.1.1.81)	Mchl_5730	51.2	Mchl_5192	METDI5778	META1_5176
	<i>cobP</i>	Bifunctional adenosylcobalamin biosynthesis protein CobP (EC 2.7.7.62)	Mchl_5721	73.6	Mchl_1722	METDI2108	META1_1336
	<i>cobU</i>	Nicotinate-nucleotide--dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.21)	Mchl_5702	54.5	Mchl_0872	METDI1054	META1_0682
	<i>cobD</i>	Cobalamin biosynthesis protein CobD	Mchl_5724	76.4	Mchl_5191	METDI5777	META1_5175
	<i>cobV</i>	Cobalamin synthase (EC 2.-.-.-)	nd	nd	Mchl_0871	METDI1053	META1_0681
	<i>cobE</i>	Cobalamin biosynthesis protein CobE	Mchl_5686	64.4	Mchl_1162	METDI1514	META1_0800
	<i>cobW</i>	Cobalamin biosynthesis protein CobW	nd	nd	Mchl_1716	METDI2102	META1_1330
	<i>cobW</i>	Putative cobalamin biosynthesis protein CobW	nd	nd	Mchl_2114	METDI2459	META1_1709
	<i>cobW</i>	Putative cobalamin biosynthesis protein CobW	nd	nd	Mchl_1380	METDI1802	META1_1002
	Voie anaérobie	<i>cysG</i>	Sirohème synthase (EC 2.1.1.107 / EC 1.3.1.76 / EC 4.99.1.4)	^c	39.3	Mchl_3547	METDI4011
<i>cbiD</i>		Putative cobalt-precorrin-6A synthase CbiD (EC 2.1.1.-)	Mchl_5729	nd	nd	nd	nd
Précurseurs ^d	<i>hemA</i>	5-aminolevulinic acid synthase (EC 2.3.1.37)	nd	nd	Mchl_2266	METDI2755	META1_1968
	<i>hemB</i>	Porphobilinogen synthase (EC 4.2.1.24)	nd	nd	Mchl_5271 ⁱ	METDI5861 ⁱ	META1_5261 ⁱ
	<i>hemC</i>	Hydroxymethylbilane synthase (EC 2.5.1.61)	nd	nd	Mchl_4608	METDI5242	META1_4633
	<i>hemD</i>	Putative uroporphyrinogen III synthase HemD (EC 4.2.1.75)	nd	nd	Mchl_5316	METDI5906	META1_5307
	<i>ribF</i>	putative riboflavin biosynthesis protein RibF (EC 2.7.1.26 / EC 2.7.7.2)	nd	nd	Mchl_0747	METDI0835	META1_0559
	<i>ssuE</i>	NADPH-dependent FMN reductase (EC 1.5.1.29)	nd	nd	Mchl_0453	METDI0490	META1_0335
			nd	nd	Mchl_2655	METDI4208	META1_3632

^a Les gènes uniques aux voies aérobie (d'après *P. denitrificans*) ou anaérobie (d'après *S. enterica*) sont en gras

^b Pourcentage d'identité en acides aminés entre paralogues plasmidique et chromosomique

^c Les orthologues localisés sur les chromosomes de CM4, DM4 et AM1 présentent un minimum de 95% d'identité au niveau protéique

^d Uroporphyrinogène III et 5,6-diméthylbenzimidazole

^e Paralogues plasmidique et chromosomique (~ 38 % d'identité au niveau protéique). BluB catalyse la dernière étape de biosynthèse du 5,6-diméthylbenzimidazole chez *S. meliloti*

^f Cofacteur de la méthylmalonyl-CoA mutase

^g Paralogue plasmidique CobA (267 aa) de taille inférieure à celle de CysG (485 aa) retrouvé uniquement chez CM4

^h nd, non détecté

ⁱ Paralogues chromosomiques (~ 62% d'identité au niveau protéique) de l'acide 5-aminolévulinique synthase (HemA)

En particulier, de nombreux gènes codant des récepteurs TonB de spécificité inconnue, ainsi que différents composants pouvant leur être associés (Postle et Kadner, 2003), sont présents dans le génome de *M. extorquens* et pourraient potentiellement transporter des dérivés de la cobalamine. Fait important, le génome de CM4 contient une copie supplémentaire du système cobalt-spécifique complet BtuBFCD sur le plasmide p1MCHL (Mchl_5676 à Mchl_5679, Tableau II.8).

A l'exception de *M. populi*, le gène *btuB* manque au sein de l'opéron chromosomique *btu* chez tous les *Methylobacterium* séquencés (donnée non montrée), alors que les bactéries à Gram-négatif, par contraste avec les bactéries à Gram-positif, contiennent habituellement ce gène (Chapitre I, section 1.6.2 et Fig. I.10).

Enfin, un gène codant potentiellement pour une sous-unité d'un transporteur chlorure est également retrouvé sur le plasmide p1MCHL (Fig. II.5). La protéine correspondante Mchl_5406 comporte trois paralogues chromosomiques chez CM4 (Mchl_3481 ; Mchl_4138 ; Mchl_3006) qui sont tous conservés, à des pourcentages d'identité variant entre 30 et 70%, dans les souches de *M. extorquens* séquencées, ainsi que chez *M. populi*. Aucun homologue de séquence plus proche n'a été détecté dans les 8 souches séquencées.

2.4.3 Voie de biosynthèse des précurseurs de la cobalamine

Les gènes de biosynthèse de l'uroporphyrinogène III et du 5,6-diméthylbenzimidazole (Fig. II.8 et II.9) ont été recherchés sur la base de similarités de séquences avec des gènes décrits dans d'autres organismes (Tableau II.9). Pour la première étape de la biosynthèse de l'uroporphyrinogène III, la recherche des gènes impliqués dans la biosynthèse d'acide 5-aminolévulinique a été réalisée en privilégiant la voie impliquant la conversion de glycine et de succinyl-CoA, spécifique des Alpha-Protéobactéries (Jordan, 1991) (Chapitre I, section 1.6.3). Cependant l'existence chez *Methylobacterium* de la voie alternative de biosynthèse

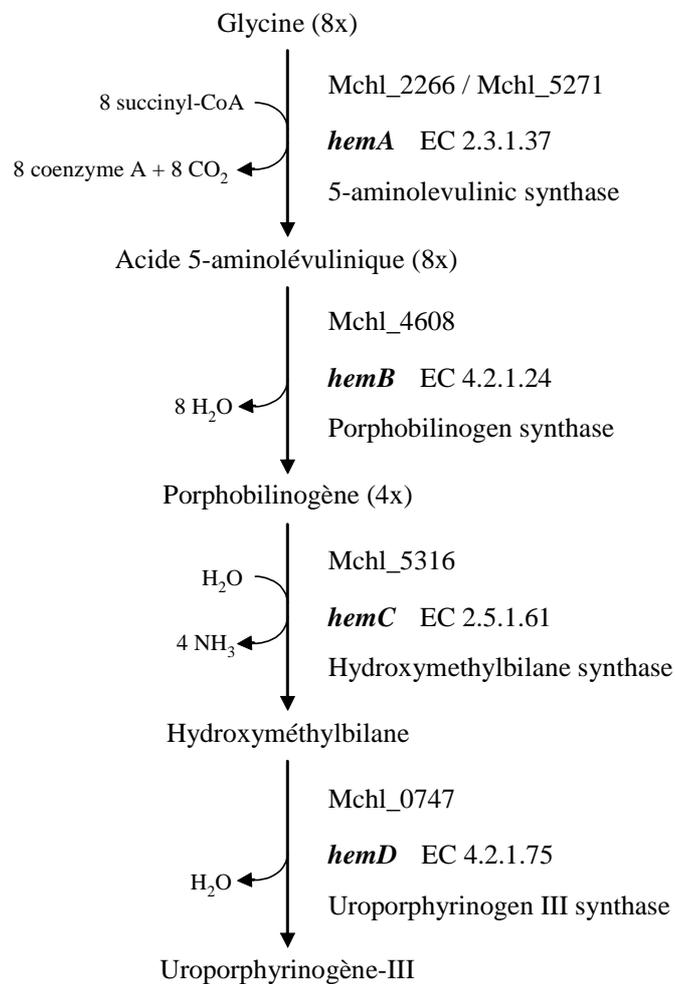


Figure II.8. Voie de biosynthèse de l'uroporphyrinogène-III chez *M. extorquens* CM4

Chez *Methylobacterium*, les gènes *hemABCD* font partie du « core genome » et sont dispersés sur le chromosome. Le gène *hemA* (Mchl_2266) possède un paralogue chromosomique (Mchl_5271) à 62% d'identité au niveau protéique.

de l'acide 5-aminolévulinique à partir de glutamate, commune à la plupart des organismes capables de synthétiser la cobalamine *de novo* (Jordan, 1991), a également été évaluée.

Biosynthèse de l'uroporphyrinogène III. Les gènes de la voie de biosynthèse de l'uroporphyrinogène III (Fig. II.8) sont dispersés sur le chromosome de toutes les souches de *M. extorquens* (Tableau II.9). Les génomes de *M. extorquens* présentent deux paralogues chromosomiques du gène codant pour la 5-aminolévulinate synthase HemaA (EC 2.3.1.37) à 62% d'identité au niveau protéique (Tableau II.9). Pour l'ensemble des souches de *Methylobacterium* considérées, l'une des copies de *hemA* (Mchl_5271) chez CM4 est localisée à proximité du gène *mcmA* (Mchl_5261) codant pour la sous-unité alpha de l'enzyme B₁₂-dépendante, la méthylmalonyl-CoA mutase Mcm. L'autre copie du gène *hemA* (Mchl_2266) est localisée à côté du gène *bluB* identifié dans ces génomes (Mchl_2280). En revanche, seuls certains des gènes codant les enzymes catalysant des étapes de la voie de biosynthèse d'acide 5-aminolévulinique à partir de glutamate ont été retrouvés dans le génome de CM4. Il semble donc que la voie de synthèse utilisant la glycine comme précurseur soit effectivement préférée chez *M. extorquens*, comme c'est le cas chez le reste des Alpha-Protéobactéries étudiées à ce jour (Jordan, 1991).

Biosynthèse du 5,6-diméthylbenzimidazole (DMB). Comme pour l'uroporphyrinogène III, les gènes de la biosynthèse de DMB qui ont été identifiés chez CM4 sont dispersés sur le chromosome chez les 4 souches de *M. extorquens* séquencées (Tableau II.9). La première étape de cette voie (Fig. II.9), consistant en la conversion de riboflavine en FMN, est catalysée par une riboflavine kinase RibF (EC 2.7.1.26). Le gène *ribF* correspondant (Mchl_0453) est localisé à proximité du gène *fflL* (Mchl_0443), codant pour une formate-H₄F ligase qui participe à la voie d'utilisation des composés C₁ chez *M. extorquens* (Marx *et al.*,

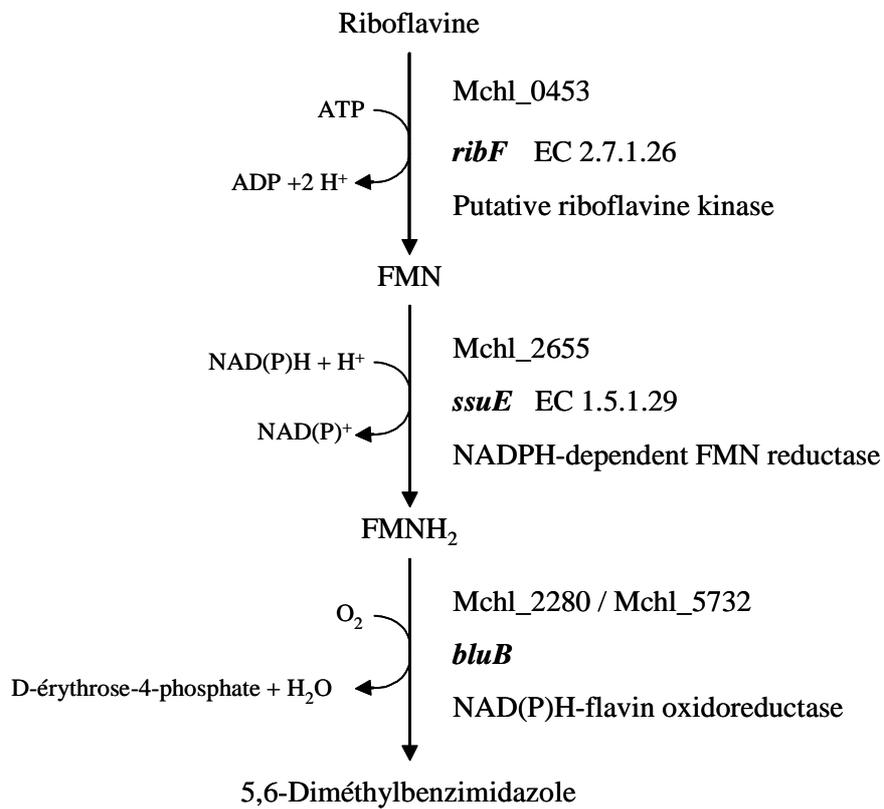


Figure II.9. Voie de biosynthèse du 5,6-diméthylbenzimidazole chez *M. extorquens* CM4

Chez *Methylobacterium*, les gènes *ribF* et *ssuE* font parties du « core gznome » et sont dispersés sur le chromosome. Le gène *bluB* (Mchl_2280) présente chez *M. extorquens* CM4 un paralogue plasmidique (Mchl_5732) à 38% d'identité au niveau protéique.

2003c). La deuxième étape de cette voie est catalysée par une réductase FMN-NADPH-dépendante (Fig. II.9). Le gène *ssuE* codant pour cette enzyme est présent dans les génomes *M. extorquens* (Mchl_2655) (Tableau II.9) ; il est localisé à proximité du gène *mcmB* (Mchl_2665) codant la sous-unité bêta de la méthylmalonyl-CoA mutase, une enzyme-clé du cycle de régénération du glyoxylate (Korotkova *et al.*, 2004; Erb *et al.*, 2007, 2008). La dernière étape de la voie de biosynthèse du DMB implique le gène *bluB*. Le produit de ce gène est responsable de deux réactions dans la voie de biosynthèse de coenzyme B₁₂. D'une part, il est responsable de la dernière étape de biosynthèse du DMB, et d'autre part, il exerce l'activité de réduction du cobalt dans la voie de biosynthèse de l'adénosylcobalamine à partir d'uroporphyrinogène III (Fig. II.9 et II.10). La première de ces deux fonctions a été proposée chez *Sinorhizobium meliloti*, une Alpha-Protéobactérie comprenant un ensemble de gènes de la voie de biosynthèse aérobie de la cobalamine (Campbell *et al.*, 2006). Il a été montré chez cet organisme que l'activité enzymatique de BluB concerne la fragmentation de la flavine mononucléotide et le clivage de la partie ribityle pour former le DMB et le D-érythrose-4-phosphate, en utilisant la flavine réduite pour piéger l'oxygène moléculaire (Taga *et al.*, 2007). Le gène chromosomique *bluB2* (Mchl_2280) est fortement conservé dans les 4 souches de *M. extorquens* (98% d'identité au niveau du produit protéique). Localisé près du gène *hemA* (Mchl_2266) responsable de la première étape de la biosynthèse de l'uroporphyrinogène III à partir de la glycine, le gène *bluB2* chez CM4 code pour une protéine présentant une identité de 40% avec BluB de *S. meliloti*. En revanche, la souche CM4 possède un homologue additionnel, *bluB* (Mchl_5732) sur le plasmide p1MCHL, qui présente seulement 38% d'identité avec la protéine correspondante du gène chromosomique *bluB2* (Tableau II.9). Le gène *bluB* est localisé dans la région *cmu* comprenant les gènes d'utilisation du chlorométhane, et la protéine correspondante

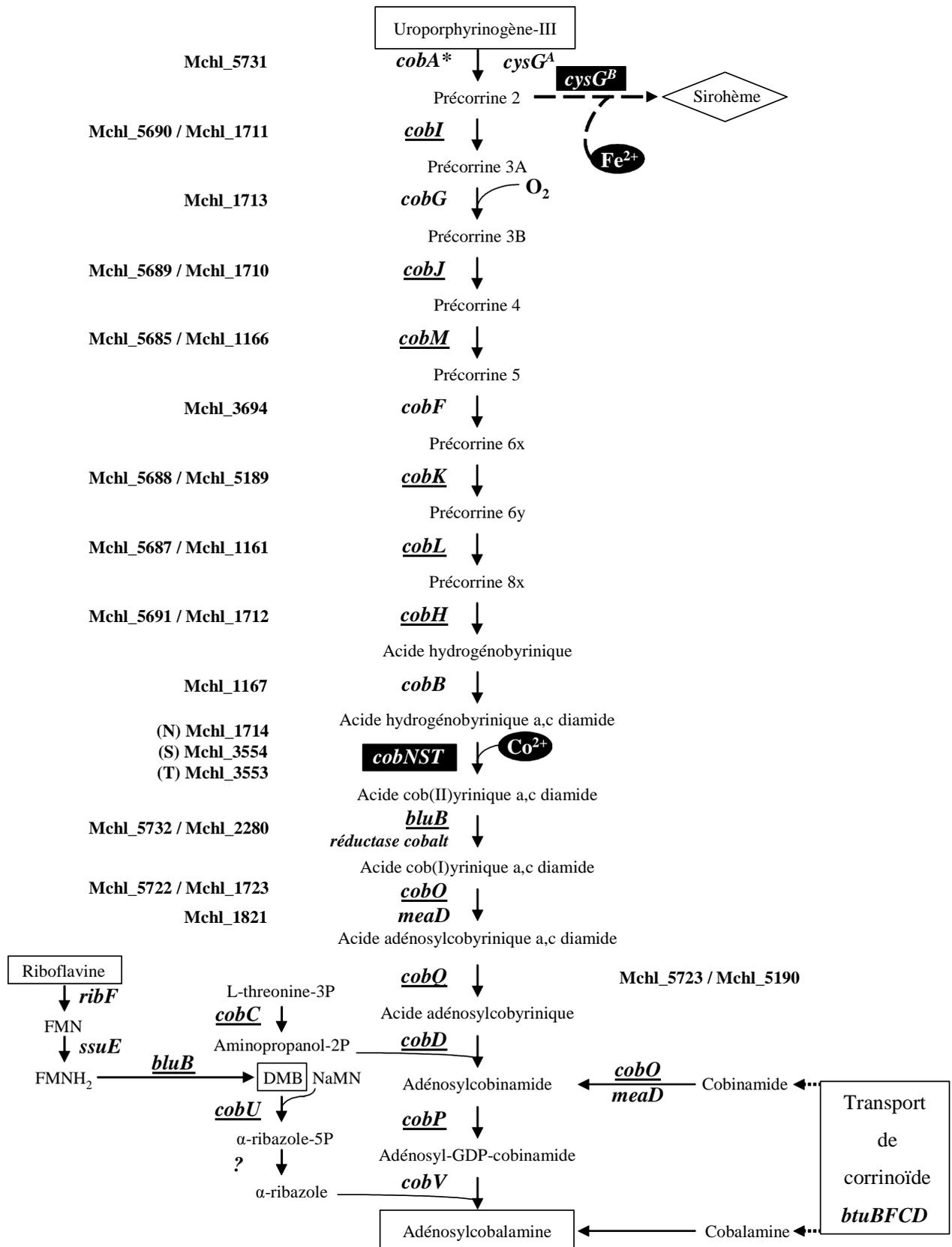


Figure II.10 (page précédente). Biosynthèse de l'adénosylcobalamine à partir des précurseurs (uroporphyrinogène III, riboflavine et DMB) chez *M. extorquens* CM4

Les gènes présentant un paralogue plasmidique chez CM4 sont soulignés. Les gènes présentant une localisation plasmidique chez *M. extorquens* CM4 et non retrouvés chez AM1 et DM4 sont suivis d'une astérisque. Les chélatases impliquées dans l'incorporation de l'ion métallique sont sur fond noir. Les flèches discontinues correspondent aux voies permettant la synthèse des tétrapyrroles dérivés de l'uroporphyrinogène III. Les voies de transport du cobalt et de la cobalamine sont illustrées par des flèches en pointillé. Seuls les numéros d'accension des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'acide adénosylcobyrinique à partir d'uroporphyrinogène III sont représentés (cf. Tableau II.9 pour les gènes codant les enzymes impliquées dans la conversion de l'acide adénosylcobyrinique en adénosylcobalamine) (D'après Rodionov *et al.*, 2003).

paraît plus proche du produit du gène *bluB* de *S. meliloti* (61% d'identité au niveau protéique) de fonction connue que le paralogue chromosomique des 4 souches de *M. extorquens*. Ces données suggèrent que le gène *bluB* joue probablement un rôle spécifique dans le métabolisme du chlorométhane.

La deuxième fonction cobalt réductase de *bluB* a été proposée sur la base de similarités de protéines BluB identifiées chez diverses bactéries avec des réductases FMN-dépendantes de la famille des nitroréductases, et catalysant le transfert d'électrons du NADH vers des accepteurs variés (Rodionov *et al.*, 2003). Un homologue de ce gène a été caractérisé expérimentalement chez *R. capsulatus* comme essentiel pour la synthèse *de novo* de cobalamine (Gaudu et Weiss, 2000), qui présente 48% et 34% d'identité au niveau protéique avec les paralogues chromosomique (Mchl_2280) et plasmidique (Mchl_5732) de CM4.

2.4.4 Voie aérobie de biosynthèse de la cobalamine chez *Methylobacterium*

La validation des gènes de biosynthèse de la cobalamine chez *Methylobacterium* (Tableau II.9 et Fig. II.10), a été effectuée sur le base de similarités de séquences avec les gènes des voies de biosynthèse aérobie et anaérobie décrites d'organismes de référence (cf. Chapitre I, section 1.6.3). Les gènes de biosynthèse de la protoporphyrine IX (*hemEFGN*) et les gènes

de chélatase permettant de produire l'hème (*hemH*) ou les bactériochlorophylles (*chlIDH*, Fig. I.11) ont également été recherchés. Toutefois, seuls les gènes *hemEFN* et *hemH* ont été identifiés dans les génomes de *Methylobacterium*. Les gènes pour la synthèse de bactériochlorophylles sont donc absents, et l'ensemble des gènes classiquement requis pour la conversion d'uroporphyrinogène III en protoporphyrine IX paraît incomplet. Sur ce dernier point, et même si à notre connaissance cette hypothèse n'a pas encore été testée dans aucun système, l'absence du gène *hemG* (codant pour une déshydrogénase) chez *Methylobacterium* pourrait toutefois être compensée par une réductase multifonctionnelle. Par exemple, la protéine codée par *cysG* semble devoir être active sur des substrats tel que l'uroporphyrinogène III (cf. ci-dessous ; Fig. I.11 ; Fig. II.10 ; Fig. II.12). Concernant les gènes de la biosynthèse de la cobalamine proprement dite, c'est sans surprise que l'on constate que la voie aérobie de biosynthèse est privilégiée chez *Methylobacterium* (Fig. II.10 et Tableau II.9). En effet, des trois gènes *cbiDGK* codant des enzymes spécifiques de la voie anaérobie de *S. enterica* (Fig. I.11), seul le gène plasmidique *Mchl_5729* codant une protéine avec seulement 36 et 55% d'identité au niveau protéique avec *CbiD* de *Salmonella enterica* et *Pseudomonas shermanii* respectivement, a été détecté (cf. section 2.4.5 ci-dessous). En revanche, des gènes codant pour les enzymes *CobE*, *CobF*, *CobG*, *CobN*, *CobS*, *CobT* et *CobW* spécifiques de la voie aérobie de *P. denitrificans* (en gras dans le Tableau II.9) ont pu être identifiés dans les génomes de *M. extorquens*. Toutefois, alors que les protéines *CobF*, *CobS* et *CobT* de CM4 présentant des identités de séquence comprises entre 54 et 88% (sur la totalité de leur longueur) avec les produits de gènes correspondants de *P. denitrificans* ont pu être identifiés sans équivoque, les protéines putatives *CobE*, *CobG* et *CobN* de *M. extorquens* présentent en revanche des similarités plus faibles (comprises entre 37 et 43% d'identité) avec leurs homologues chez *P. denitrificans*.

Dans l'ensemble, les gènes de la biosynthèse de la cobalamine identifiés sur le chromosome de CM4 possèdent des orthologues avec plus de 95% d'identité au niveau protéique sur les chromosomes des autres souches de *M. extorquens* (Tableau II.9). De plus, l'organisation de ces gènes est la même dans ces différentes souches, avec une répartition en 7 loci distincts, comprenant trois opérons regroupant plus de trois gènes (Fig. II.11). Celle-ci diffère pourtant de celle rencontrée chez *P. denitrificans*, chez qui ces gènes sont regroupés en 4 loci différents dans le génome (Raux *et al.*, 2000; Rodionov *et al.*, 2003). A noter néanmoins que chez d'autres représentantes du genre *Methylobacterium* comme *M. nodulans* ORS2060, cette organisation est résolument différente (Fig. II.11). Une plasticité importante de l'organisation de ces gènes semble donc prévaloir au niveau du genre *Methylobacterium* déjà, et qui s'accompagne de surcroît d'une plasticité fonctionnelle de certains gènes de la voie.

Le cas du gène *bluB* codant pour une protéine catalysant à la fois la réduction du cobalt et du noyau flavine de la cobalamine a déjà été évoqué. La première réaction de la voie de *M. extorquens*, soit la transformation d'uroporphyrinogène III en précorrène-2 (Fig. II.10 et II.12), apporte un autre exemple frappant d'une plasticité de ce type. En effet, cette transformation pourrait être catalysée à la fois par une S-adénosyl-L-méthionine uroporphyrinogène III méthyltransférase (SUMT) codée par *cobA*, soit par une sirohème synthase codée par un des deux domaines du gène *cysG* (Fig. II.13).

De fait, les chromosomes des génomes séquencés des souches de *M. extorquens* ne contiennent pas de gène *cobA*, mais seulement un gène *cysG* codant pour la sirohème synthase (Mchl_3547, Tableau II.9). Il semblerait que chez *Methylobacterium*, en l'absence d'un exemplaire du gène *cobA*, ce soit le produit du gène *cysG* qui catalyse la première réaction de biosynthèse de la cobalamine à partir de l'uroporphyrinogène III. En revanche, *M. extorquens* CM4 possède une copie de *cobA* (Mchl_5731) sur le plasmide p1MCHL.

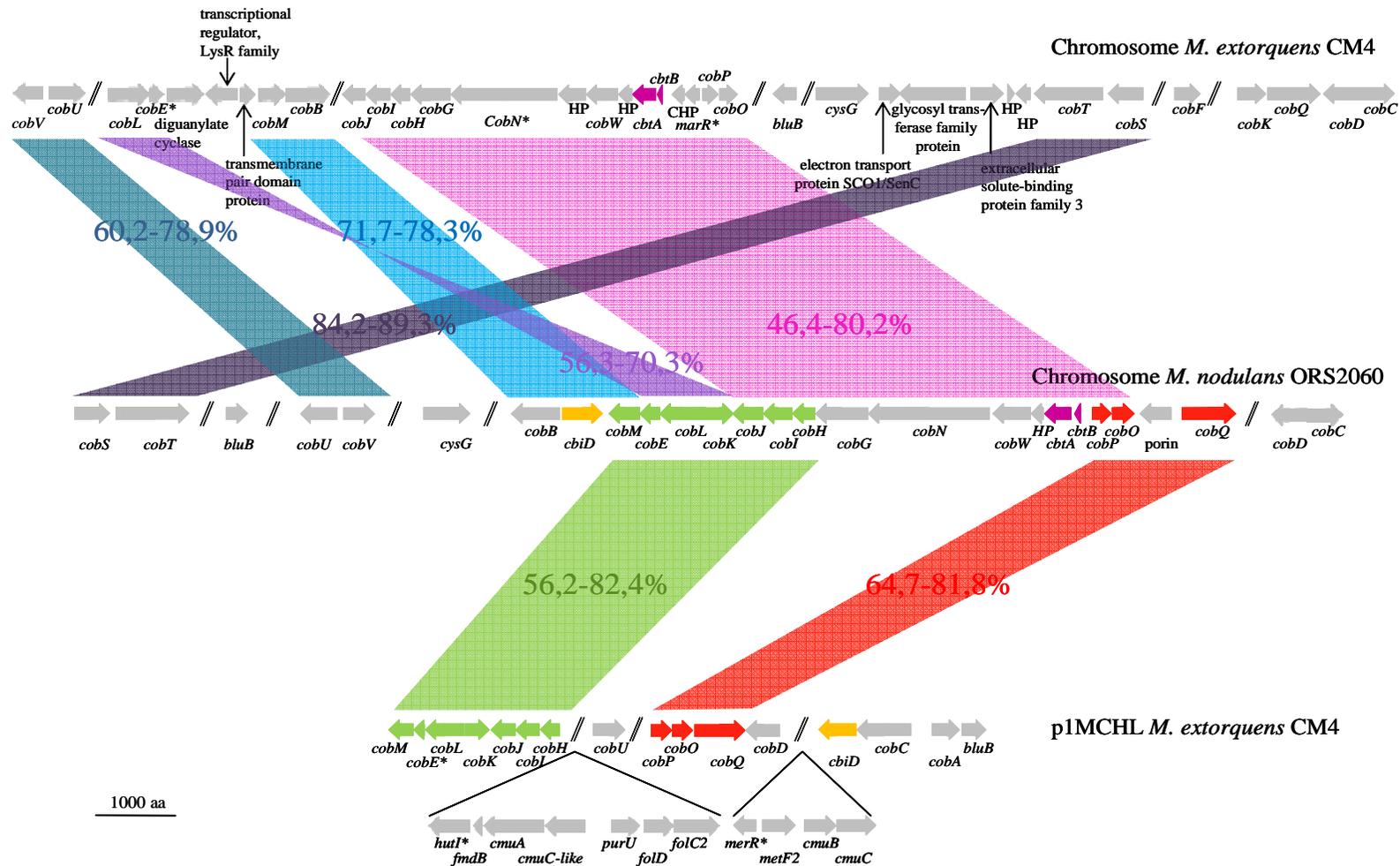


Figure II.11. Organisation et synténie des gènes de biosynthèse de la cobalamine chez *M. extorquens* et chez *M. nodulans* ORS2060

L'organisation des gènes de biosynthèse de la cobalamine identifiée sur les chromosomes de *M. extorquens* CM4, AM1 et DM4 (représentée en haut) est identique chez ces souches. Cette organisation est différente de celle du chromosome de *M. nodulans* ORS2060, mais comporte des synténies significatives. CM4 présente des paralogues plasmidiques (en bas), non retrouvés chez les souches AM1 et DM4. Ces paralogues flanquent les gènes d'utilisation du chlorométhane. Certains des gènes présents sur p1MCHL sont retrouvés en synténie avec des gènes chromosomiques de *M. nodulans* ORS2060.

Les séquences des deux protéines correspondantes CysG et de CobA sont proches (39% d'identité au niveau protéique), et des alignements basés sur la structure des enzymes correspondantes chez *S. enterica* et *P. denitrificans* ont confirmé le haut degré de conservation structurel de cette famille de protéines (Vévodová *et al.*, 2004). Ceci suggère que CobA et CysG pourraient tous deux catalyser la transformation d'un certain nombre de substrats, de type tétrapyrrole et de structure similaire. L'importance du gène *cobA* chez la souche CM4, en particulier dans le contexte de la dégradation du chlorométhane, reste de ce fait à préciser.

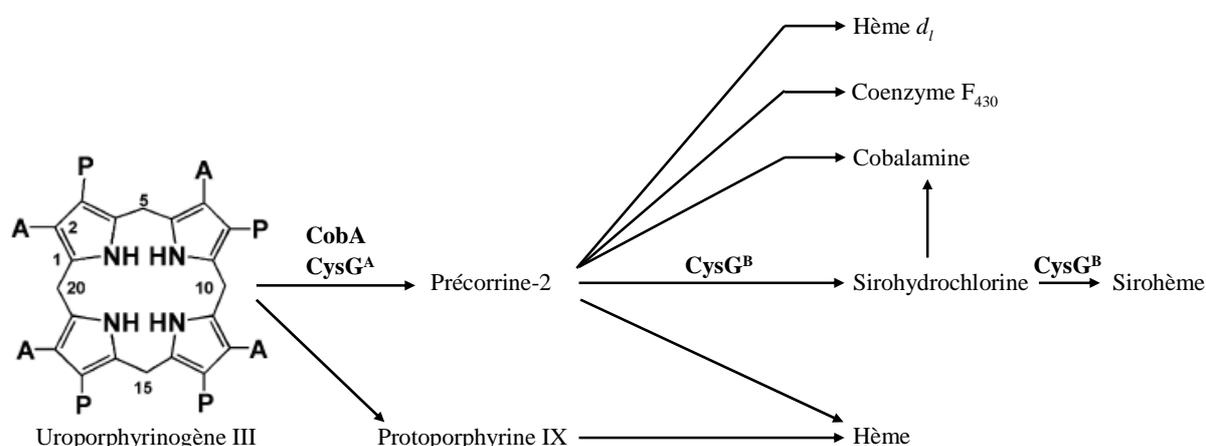


Figure II.12. Tétrapyrroles dérivant du précurseur uroporphyrinogène III

La production de précorrine-2 est essentielle pour la biosynthèse de cofacteurs comme la cobalamine, le sirohème, l'hème *dl* et l'hème. Les lettres A et P présentes sur la structure de l'uroporphyrinogène III correspondent respectivement à des groupements acétate et propionate (d'après Vévodová *et al.*, 1994).

Le sirohème est le groupe prosthétique trouvé dans les réductases à sulfites et nitrites, l'hème *dl* est utilisé dans la dénitrification de sels de nitrate. L'hème est requis dans une variété de systèmes de transport d'électrons et d'oxygène. L'hème est aussi une composante des catalases et des peroxydases. Le coenzyme F₄₃₀ est utilisé pour la réduction de coenzyme M dans la méthanogénèse. La chlorophylle agit comme un composant absorbant la lumière dans les réactions photosynthétiques. La cobalamine agit comme un coenzyme dans diverses réactions de réarrangements, de méthylations ainsi que dans des réactions d'oxydoréduction.

Chez *Methylobacterium*, la première étape de la voie de biosynthèse de la cobalamine à partir d'uroporphyrinogène III pouvant être catalysée par une activité S-adénosyl-L-méthionine uroporphyrinogène III méthyltransférase (SUMT) portée par le domaine C-terminal (CysG^A) de la sirohème synthase CysG. Cette enzyme est présente chez de nombreuses bactéries. Elle possède également une activité de déshydrogénation de la précorrine-2 pour la production de sirohydrochlorine ainsi qu'une activité de chélation du fer pour la conversion de sirohydrochlorine en sirohème (domaine N-terminal CysG^B). Contrairement aux souches AM1 et DM4, le génome de *M. extorquens* CM4 présente, en plus de *cysG*, un gène *cobA* codant une SUMT sur le plasmide.

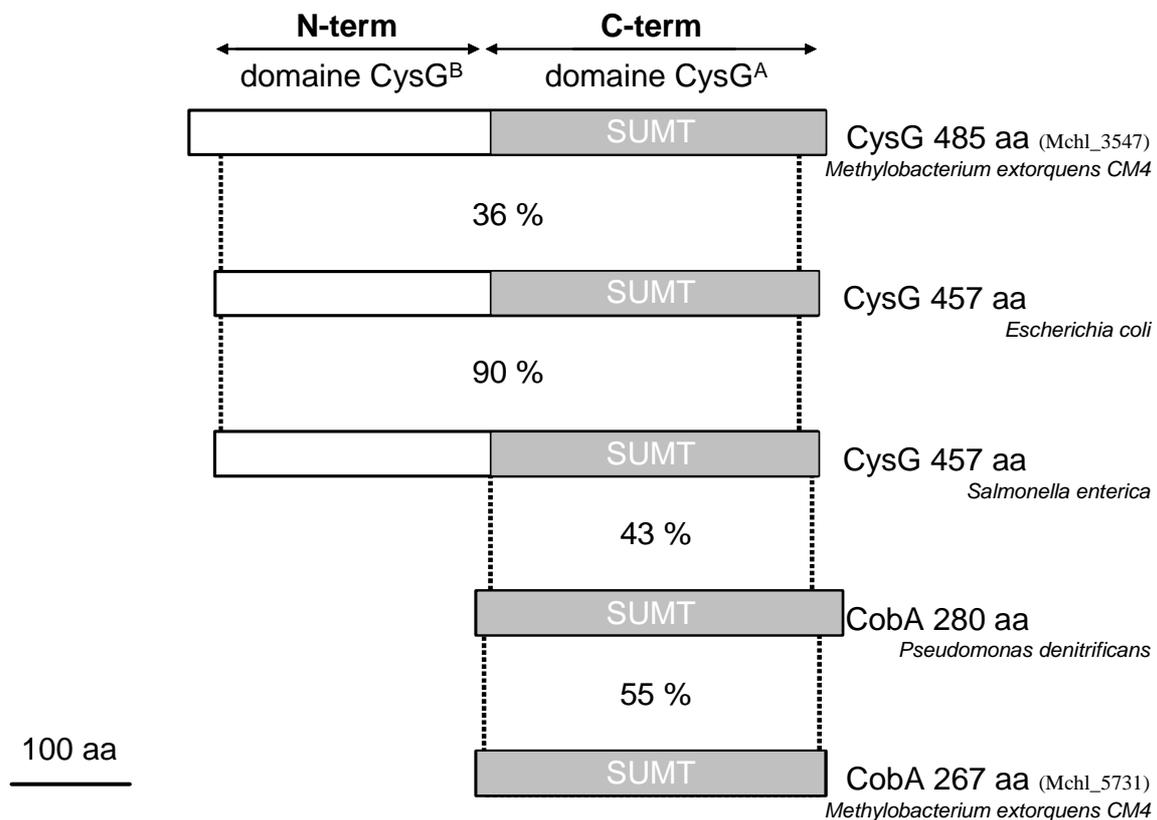


Figure II.13. Représentation schématique des protéines CysG et CobA

M. extorquens CM4 possède les gènes *cobA* et *cysG* codant chacun potentiellement des enzymes catalysant la première étape de la voie de biosynthèse de la cobalamine. La protéine CysG possède deux domaines conservés chez *S. enterica* (P25924) et *E. coli* (P0AEA8). Le domaine C-terminal CysG^A (Mchl_3547A) contient l'activité S-adénosyl-L-méthionine uroporphyrinogène III méthyltransférase ou SUMT (EC 2.1.1.107) (en gris). Ce domaine présente une forte similarité avec la protéine CobA de *P. denitrificans* (P21621) et plus de 39% d'identité avec celle de *M. extorquens* CM4. Le domaine CysG^B (Mchl_3547B) contient des activités précorrine-2 déshydrogénase (EC 1.3.1.76) et ferrochélatase (EC 4.99.1.4).

2.4.5. Duplication plasmidique de gènes de biosynthèse de la cobalamine chez CM4

On notera d'abord que les gènes de biosynthèse de la cobalamine présents sur le plasmide de 380 kb de CM4 et flanquant les gènes d'utilisation du chlorométhane (Tableau II.9) ne suffiront pas seuls à cette tâche, puisque les gènes *cobB*, *cobF*, *cobG*, *cobN*, *cobS*, *cobT* et *cobV*, ainsi que les gènes *cobE* et *cobW*, de fonctions inconnues mais essentiels à la biosynthèse de la cobalamine chez *P. denitrificans* (Heldt *et al.*, 2005), en sont absents. Les paralogues plasmidiques des gènes *cob* sont regroupés en deux clusters distants d'environ 15 kb, dans une région du plasmide de pourcentage en GC atypique (Fig. II.4), flanquant les régions comprenant d'une part les gènes *cmuA*, *cmuC-like*, *purU*, *folD*, *folC2* et d'autre part les gènes *metF2*, *cmuB* et *cmuC*. Le premier de ces deux clusters comporte les gènes *cobMELKJIH* et *cobU*, le deuxième les gènes *cobPOQD* et *cbiD-cobCA* et *bluB*. Ces gènes sont également en synténie chez *R. capsulatus* (Raux *et al.*, 2000), et pour partie chez *M. nodulans* ORS2060 (Fig. II.11), mais pas chez les autres souches de *M. extorquens* séquencées. Par ailleurs, *M. nodulans* ne présente pas de duplication des gènes de biosynthèse de la cobalamine. Il semblerait donc que les gènes *cobMELKJIH* et *cobPOQ* aient été acquis par transfert horizontal dans au moins deux des 8 génomes de *Methylobacterium* connus, d'une part dans l'espèce *extorquens*, et d'autre part dans l'espèce *nodulans*.

Une autre particularité des gènes de biosynthèse de la cobalamine chez CM4 est la présence d'un gène (Mchl_5729) sur le plasmide p1MCHL annoté comme *cbiD*. Ce gène ne présente pas de paralogue chez CM4, ni d'homologue dans les génomes séquencés des souches de *M. extorquens*, mais il est retrouvé sous une forme quasi identique chez *M. nodulans*, *M. radiotolerans* et *M. sp.* 4-46. Le produit de ce gène exerce une activité équivalente à celle de CobF de *P. denitrificans* (Roessner *et al.*, 2005). Chez *E. coli*, l'activité de la protéine CbiD requiert toutefois la présence de deux autres gènes de la voie anaérobie, *cbiA* et *cbiP* (Roessner *et al.*, 2005), qui semblent absents chez *Methylobacterium* (Tableau II.9).

La fonction du gène *cbiD* chez *Methylobacterium* reste donc à préciser. La présence simultanée de gènes des deux voies oxygène-dépendante et oxygène-indépendante connues de biosynthèse de la cobalamine n'est toutefois pas inédite, et se retrouve chez de nombreuses bactéries. Ainsi, *Pseudomonas aeruginosa* possède les gènes *cobG* et *cobN*, ainsi que les gènes *cbiD* et *cbiG*, présentant donc à la fois les spécificités des deux voies. Comme *R. capsulatus*, cette bactérie peut effectuer la biosynthèse *de novo* de la cobalamine en présence ou en absence d'oxygène (Raux *et al.*, 2000).

2.4.6 Riboswitch cobalamine chez CM4

Quatre éléments ARN de régulation riboswitch associés à la cobalamine ont été identifiés par analyse Rfam dans le génome de CM4 (Tableau I.4 ; <http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Rfam/getacc?RF00174>). Trois d'entre eux sont localisés dans des régions très conservées entre les souches CM4, AM1 et DM4. Il n'est donc pas surprenant que, de ce fait, les éléments riboswitch soient également conservés. Un de ces éléments est situé entre les gènes *cbtA* et *cbtB* codant les transporteurs du cobalt (Tableau II.8 et Fig. II.11). Les deux autres sont situés en amont de récepteurs TonB potentiellement impliqués dans le transport du cobalt. Le quatrième riboswitch a également été identifié dans le génome de la souche DM4, il est localisé en amont d'un récepteur TonB. Chez CM4, en revanche ce quatrième riboswitch est trouvé sur le plasmide p1MCHL, et se localise dans la région *cmu*, juste en amont du gène *btuB* codant un transporteur spécifique de dérivés corrinoïdes (Mchl_5676) (Chapitre I section 1.6.2, Tableau II.8 et Fig. II.5).

2.5. Gènes de biosynthèse du tétrahydrofolate (H₄F) chez CM4

Le H₄F et ses dérivés occupent une place importante dans le métabolisme méthylotrophe en général. Son rôle est primordial dans l'utilisation par la souche *M. extorquens* CM4 du chlorométhane comme substrat de croissance (Studer *et al.*, 2002) (cf. Chapitre I). La voie catabolique H₄F-dépendante spécifique du chlorométhane est aussi atypique dans la mesure où les travaux récents tendent à montrer que les enzymes dépendantes du H₄F chez *Methylobacterium* ont plutôt un rôle dans l'anabolisme, avec un fléchage du carbone lié au H₄F dans les réactions de biosynthèse et la formation de biomasse (Marx, 2005; Crowther *et al.*, 2008). La disponibilité de séquences génomiques de *Methylobacterium* a ainsi permis d'évaluer dans quelle mesure les gènes de biosynthèse du H₄F et d'enzymes H₄F-dépendantes étaient conservés, dupliqués ou diversifiés chez la souche CM4 par rapport aux autres souches de *M. extorquens*.

2.5.1 La biosynthèse du chorismate à partir du D-érythrose-4-phosphate : un pont entre la biosynthèse de la cobalamine et du folate.

Le D-érythrose-4-phosphate est transformé en chorismate en 7 étapes classiques conservées chez *M. extorquens* (Fig. II.14; Tableau II.10). Le D-érythrose-4-phosphate est produit soit par le métabolisme glucidique, soit lors de la biosynthèse de la cobalamine, au niveau de la synthèse du 5,6-diméthylbenzimidazole, précurseur intervenant dans une des dernières étapes de biosynthèse de la cobalamine. La réaction catalysée par BluB relargue en plus du 5,6-diméthylbenzimidazole utilisé pour la biosynthèse de la cobalamine, du D-érythrose-4-phosphate (Taga *et al.*, 2007). Chez CM4, les protéines Mchl_5732 et Mchl_2280 présentent 61 et 41% d'identité avec l'enzyme cob(II)yrinic acid a,c-diamide reductase BluB de *Sinorhizobium meliloti* (Campbell *et al.*, 2006). Ces deux orthologues sont codés d'une part par le gène *bluB* localisé au cœur de la région *cmu* du plasmide, et d'autre part

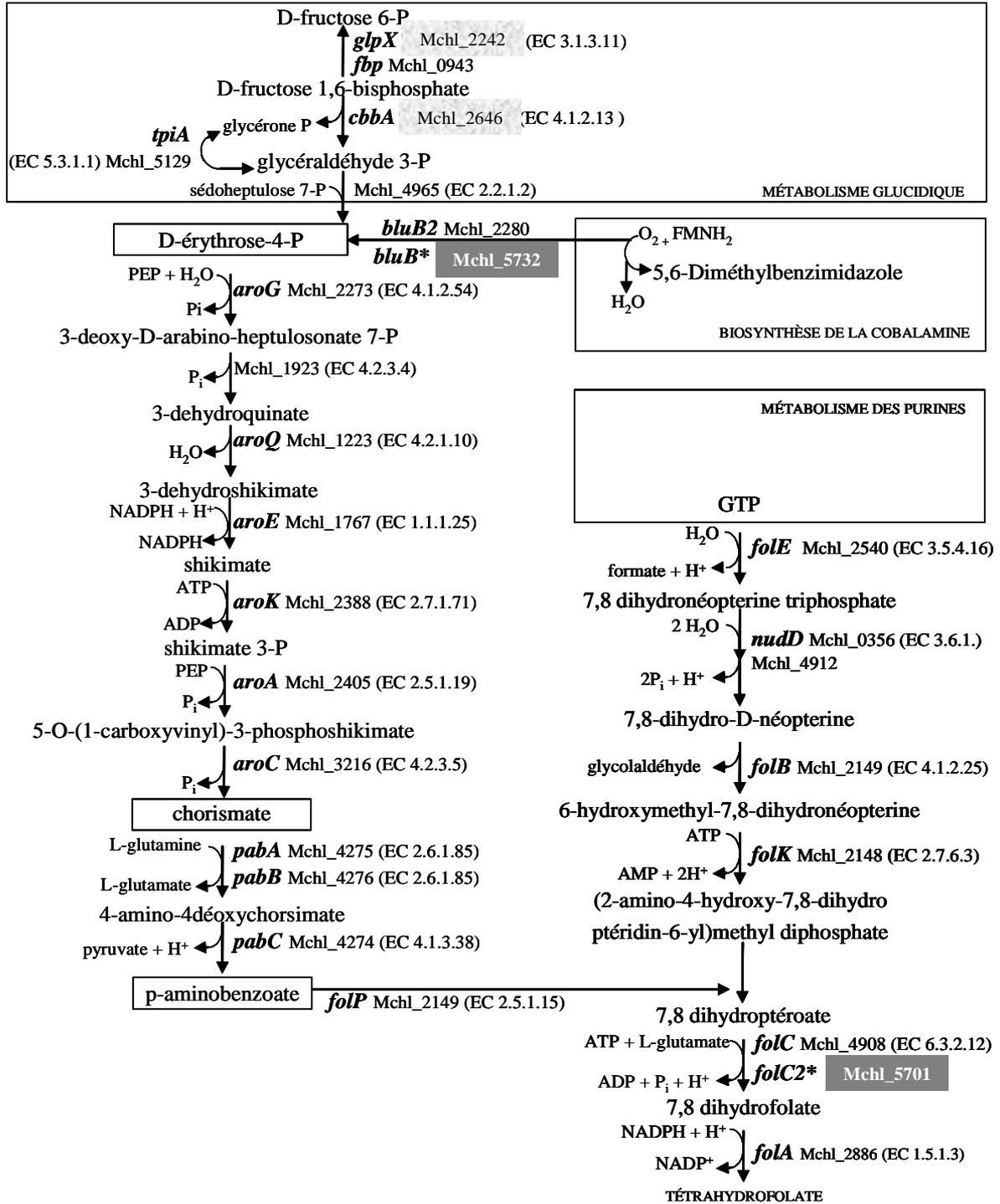


Figure II.14. Voie de biosynthèse du tétrahydrofolate chez CM4

Les cadres grisés clairs et foncés marquent les protéines plus abondantes en conditions de culture en chlorométhane (Chapitre IV) ou uniques à CM4, respectivement. L'astérisque indique les enzymes qui sont codées par des gènes présents sur le plasmide p1MCHL.

par le gène chromosomique *bluB2* qui est conservé dans l'ensemble des génomes de *M. extorquens*. Les gènes *bluB* et *bluB2* semblent au cœur d'une adaptation de la souche CM4 à la déchloration du chlorométhane, qui implique l'association de voies folate-dépendantes (Studer *et al.*, 2002) et requiert la cobalamine pour l'activité d'enzyme clé du catabolisme du chlorométhane.

2.5.2 Voie de biosynthèse *de novo* du H₄F

Les étapes de cette voie sont conservées chez les plantes et les bactéries et consistent en deux branches. Les gènes de la branche ptérine comme celle de la branche du p-aminobenzoate sont conservés et font partie du « core genome » de *M. extorquens* (Tableau II.10). Les gènes impliqués dans la biosynthèse du précurseur p-aminobenzoate à partir du D-érythrose-4-phosphate sont également conservés. Etant donné la conservation de ces gènes au sein du monde bactérien et chez *M. extorquens*, le paragraphe ci-dessous développera surtout les étapes qui présentent des singularités de duplications de gènes ou de gènes orphelins, voire des étapes pour lesquelles l'identification *in silico* d'un gène candidat était délicate chez *M. extorquens*.

Une branche de biosynthèse classique de la partie ptérine. Les gènes de biosynthèse *de novo* du H₄F à partir du GTP et du p-aminobenzoate ont été identifiés dans le génome de CM4 sur la base de similarités de séquences avec les gènes *folE*, *folB*, *folK*, *folP*, *folC* et *folA* caractérisés expérimentalement, notamment chez *E. coli* (De Crécy-Lagard *et al.*, 2007).

Pour la deuxième étape, on a recherché dans le génome de *M. extorquens*, des gènes identifiés automatiquement comme membres de la famille d'hydrolase Nudix dont une activité nucléoside triphosphate pyrophosphohydrolase est souvent associée (NudD, Gabelli *et al.*, 2007; Fold, Klaus *et al.*, 2005). Ces hydrolases ont typiquement des petites tailles comprises

Chapitre II

Tableau II. 10 - Biosynthèse du tétrahydrofolate chez *M. extorquens* : gènes uniques chez la souche CM4

Gène	Produit	Homologues ^a				
		plasmide p1MCHL	chromosome CM4	chromosome DM4	chromosome AM1	chromosome PA1
Voie de biosynthèse de novo du tétrahydrofolate						
<i>dmrA</i>	Dihydrémethanoptérine réductase, putative dihydrofolate réductase	nd ^d	Mchl_4298	METDI4922	META1_4312 META2_0242 ^e	Mext_3930
<i>folA</i>	Dihydrofolate réductase (autre nom <i>dfrA</i>) (EC 1.5.1.3)	nd	Mchl_2886	METDI3418	META1_2852	Mext_2659
<i>folB</i>	Dihydrémoptérine aldolase (EC 4.1.2.25)	nd	Mchl_2149	METDI2496	META1_1744	Mext_1813
<i>folC₂ / folC</i> ^b	Bifonctionnel folylpolyglutamate synthase (EC 6.3.2.17) / dihydrofolate synthase (EC 6.3.2.12)	Mchl_5701 ^b	Mchl_4908	METDI5480	META1_4888	Mext_4444
<i>folE</i>	GTP cyclohydrolase I (EC 3.5.4.16)	nd	Mchl_2540	METDI3046	META1_2264	Mext_2265
<i>folK</i>	2-amino-4-hydroxy-6-hydroxyméthyl-dihydroptéridine pyrophosphokinase (EC 2.7.6.3)	nd	Mchl_2148	METDI2495	META1_1743	Mext_1812
<i>folP</i>	Dihydroptéroate synthase (EC 2.5.1.15)	nd	Mchl_2150	METDI2497	META1_1745	Mext_1814
<i>pabA</i>	Aminodeoxychorismate synthase subunit II, p-aminobenzoate synthase component (EC 2.6.1.85)	nd	Mchl_4275	METDI4894	META1_4283	Mext_3906
<i>pabB</i>	Para-aminobenzoate synthase component I (ADC synthase) (EC 2.6.1.85)	nd	Mchl_4276	METDI4895	META1_4284	Mext_3907
<i>pabC</i>	Putative 4-amino-4-deoxychorismate lyase component of para-aminobenzoate synthase multienzyme complex (EC 4.1.3.38)	nd	Mchl_4274	METDI4893	META1_4282	Mext_3905
<i>nudG</i>	dihydréoptérine triphosphate pyrophosphohydrolase (EC 3.6.1.)	nd	Mchl_0356	METDI0186	META1_0202	Mext_0312
	NUDX hydrolase (EC 3.6.1.)	nd	Mchl_4911	METDI5483	META1_4891	Mext_4447
Du D-érythrose-4-phosphate à la biosynthèse du chorismate						
<i>aroG</i>	2-dehydro-3-deoxyphosphoheptonate aldolase (EC 4.1.2.54)	nd	Mchl_2273	METDI2762	META1_1974	Mext_1996
	Bifonctionnel shikimate kinase (N-terminal, <i>aroK</i>) / dehydroquininate synthase (C-terminal, <i>aroB</i>) enzyme (EC 4.2.3.4)	nd	Mchl_1923	METDI2309	META1_1535 META2_0462 ^f	Mext_1641
<i>aroQ</i>	3-dehydroquininate déshydratase, type II (EC 4.2.1.10)	nd	Mchl_1223	METDI1576	META1_0864	Mext_1094
<i>aroE</i>	Putative shikimate 5-déhydrogénase (EC 1.1.1.25)	nd	Mchl_1767	METDI2150	META1_1380	Mext_1489
<i>aroK</i>	Putative transcriptional régulateur (N-terminal) / shikimate kinase (C-terminal) (EC 2.7.1.71)	nd	Mchl_2388	METDI2881	META1_2101	Mext_2112
<i>aroA</i>	3-enolpyruvylshikimate-5-phosphate synthetase (EC 2.5.1.19)	nd	Mchl_2405	METDI2900	META1_2118	Mext_2128
<i>aroC</i>	Chorismate synthase (EC 4.2.3.5)	nd	Mchl_3216	METDI3761	META1_3197	Mext_2990
D-érythrose-4-phosphate produit par le métabolisme glucidique						
<i>cbbA</i>	Fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13)	nd	Mchl_2646	METDI3150	META1_2370	Mext_2369
<i>fbp</i>	Fructose-1,6-bisphosphatase I (EC 3.1.3.11)	nd	Mchl_0943	METDI1126	META1_0757	Mext_0979
<i>glpX</i>	Fructose 1,6-bisphosphatase II (EC 3.1.3.11)	nd	Mchl_2242	METDI2729	META1_1940	Mext_1966
<i>tpiA</i>	Triosephosphate isomérase (EC 5.3.1.1)	nd	Mchl_5129	METDI5716	META1_5115	Mext_4666
D-érythrose-4-phosphate produit par la biosynthèse de la cobalamine						
<i>bluB / bluB₂</i> ^c	Putative cob(II)yrinic acid a,c-diamide réductase (EC 1.16.8.1)	Mchl_5732	Mchl_2280	METDI2769	META1_1981	Mext_2003

^a Les orthologues localisés sur les chromosomes de CM4, DM4, AM1 et PA1 présentent un minimum de 95 % d'identité au niveau protéique

^b FolC2 présente 32 % d'identité de séquence protéique avec les homologues chromosomiques

^c Catalyse la dernière étape de biosynthèse du 5,6-diméthylbenzimidazole

^d nd, non détecté

^e DfrB (META2_0242) est une dihydrofolate réductase putative qui présente 34 et 28 % d'identité au niveau protéique avec les protéines DmrA et DfrA, respectivement

^f META2_0462, 33 % d'identité protéique avec le domaine N-terminal de Mchl_1923

entre 15 à 25 kDa. Parmi les 14 gènes chez CM4 identifiés par l'annotation automatique comme portant le motif Nudix, un gène code une protéine Mchl_4912 de taille prédite à 33 kDa, qui est localisé dans un opéron putatif incluant le gène *folC* (Mchl_4908). D'autre part, des paralogues des protéines NudD d'*E. coli* et de FOLD de *Lc. lactis* présentant une activité dihydronéoptérine triphosphate pyrophosphohydrolase *in vivo*, ont été recherchés chez *M. extorquens*. Une protéine du « core genome » de *M. extorquens*, Mchl_0356, porte un domaine Nudix et partage 42% d'identité avec NudD (30% avec FOLD). Par conséquent, ce gène codant la protéine Mchl_0356 a été annoté *nudD*. A ce stade, il est nécessaire de valider ou non l'implication des protéines NudD et Mchl_4912 dans le flux du pool folate chez *Methylobacterium* par une analyse génétique et biochimique de mutants. La dernière étape de biosynthèse du folate conduit à la réduction du 7,8-dihydrofolate en tétrahydrofolate par la dihydrofolate réductase (EC 1.5.1.3). Dans la souche AM1, trois gènes présentent des domaines « dihydrofolate réductase », à savoir *dfrA* (appelé aussi *folA*), *dmrA* et *dfrB*. Le gène *dfrB* est localisé sur un mégaplasmide spécifique de la souche AM1, alors que *dfrA* et *dmrA* sont présents sur le chromosome de toutes les souches étudiées de *M. extorquens* (Tableau II.10). Chez CM4, Mchl_2886 avec 44% d'identité avec la protéine Fola d'*E. coli* a été désignée Fola (équivalent de DfrA). La séquence de la protéine Mchl_4298 est identique à la protéine DmrA de AM1, et présente seulement 23% d'identité avec Fola d'*E. coli*. Mchl_4298 a été désignée DmrA, et pourrait avoir, en plus d'une activité dihydrofolate réductase générique, une activité spécifique de tétrahydrométhanoptérine réductase comme suggéré dans le contexte de la souche AM1 (Marx *et al.*, 2003b).

L'opéron *pabBAC* regroupe les gènes de la branche de biosynthèse du p-aminobenzoate.

A partir du chorismate, la synthèse de l'acide p-aminobenzoïque implique trois gènes *pab* bien caractérisés chez *E. coli* (Green *et al.*, 1992) (Fig. II.14). Contrairement aux protéines

PabA et PabB présentant des identités de 55 et 40% avec les protéines correspondantes des entérobactéries, Mchl_4274 ne partage que 29,5% d'identité avec la protéine PabC d'*E. coli*. Mais du fait d'une organisation opéronique des trois gènes dans l'ordre *pabBAC* conservée chez les quatre souches de *M. extorquens* séquencées, la protéine Mchl_4274 a été annotée comme PabC putative (Tableau II.10).

Gène orphelin plasmidique *folC2*. Mchl_5701 est unique à CM4. Il est porté par le plasmide p1MCHL. Son homologue chromosomique *folC* (Mchl_4908) est quant à lui un gène présent dans une région très conservée de *M. extorquens* incluant 130 gènes en synténie et contigu au gène *accD* codant pour une enzyme de transcarboxylation, l'acétyl-CoA carboxylase. Le gène dupliqué plasmidique, qui code pour un homologue avec 46% d'identité avec FolC au niveau protéique a été nommé *folC2*. Chez CM4, le gène *folC2* est situé immédiatement en aval de *purU* et de *fold*; il est donc lui aussi potentiellement co-transcrit à partir du promoteur expérimentalement caractérisé en amont de *purU* (Studer *et al.*, 2002). FolC2 et FolC présentent 33 et 36% d'identité avec FolC de *Pseudomonas aeruginosa*, respectivement. Chez *Pseudomonas*, l'enzyme a été démontrée comme étant bifonctionnelle avec une activité dihydrofolate synthase (EC 6.3.2.12) et folate polyglutamate synthase (FPGS, appelée aussi tétrahydrofolate synthase ; EC 6.3.2.17) (Murata *et al.*, 2000). Comme le gène FolC du « core genome » de *M. extorquens*, le gène *folC* chez *Pseudomonas* est contigu au gène *accD*. Les protéines FolC sont soit monofonctionnelles avec l'activité FPGS seulement ou portent les deux activités, FPGS et dihydrofolate synthase. Cependant, aucun motif de séquence ne permet de les distinguer sur la base de l'analyse de leur séquence (De Crécy-Lagard *et al.*, 2007). Aucun mutant du gène *folC* et *folC2* n'a été construit à ce jour dans le contexte de *M. extorquens* (Table S1 de Vuilleumier *et al.*, 2009), de sorte que, dans le doute, ces enzymes ont été annotées comme étant bifonctionnelles.

2.6. Réactions d'interconversion du H₄F chez CM4

De la cobalamine au folate : la méthyltransferase CmuB. Un exemple d'enzyme dépendante du H₄F spécifique du chlorométhane est la méthylcobalamine:H₄F méthyltransférase CmuB de CM4. Cette enzyme a été caractérisée expérimentalement et démontrée comme essentielle à ce métabolisme (Studer *et al.*, 1999, 2001). Cette protéine comporte un motif de séquence suggérant une association au H₄F. Elle est aussi identifiée comme une méthyltransférase par homologie avec de très nombreuses protéines de bactéries et d'Archaea sur l'ensemble de sa séquence. Sa fonction a été confirmée expérimentalement par la formation de méthyl-H₄F à partir de méthylcobalamine, et à partir de chlorométhane en présence de cobalamine et de protéine CmuA (Studer *et al.*, 1999, 2001). En revanche, la séquence de cette méthyltransférase ne fournit pas d'indication pour un site de liaison éventuel pour la cobalamine. De fait, le K_m du folate est de 240 μ M, alors que celui de la cobalamine est très élevé et ne peut être déterminé pour cette protéine dans les conditions étudiées (Studer *et al.*, 1999). Les protéines les plus similaires à CmuB chez *Methylobacterium*, toutes des méthyltransférases, ne présentent qu'une similarité modeste avec CmuB. Cette protéine semble donc être spécifique de la voie de dégradation du chlorométhane, tant par la localisation génomique du gène correspondant que par sa conservation chez les bactéries chlorométhane-dégradantes (cf. Chapitre III ci-après).

Voie commune d'interconversion du H₄F chez *M. extorquens*. Le « core genome » de *M. extorquens* comprend au moins une copie des gènes classiques des voies d'interconversion impliquant des dérivés du H₄F (Tableau II.10 et Fig. I.12). Sur le chromosome des 4 souches de *M. extorquens*, des gènes codant pour deux sarcosine oxydases seraient présents sous forme de deux opérons distincts *soxGADB* et *soxG₂A₂D₂B₂* avec au minimum 46% d'identité au niveau des séquences protéiques de leurs sous-unités correspondantes. L'opéron *soxG₂A₂D₂B₂* serait transcrit de façon divergente à un opéron

Tableau II.11. Voies de conversion des dérivés du tétrahydrofolate chez *M. extorquens* : des gènes uniques au plasmide p1MCHL

Gène	Produit	Paralogue ^a				
		p1MCHL	chromosome CM4	chromosome DM4	chromosome AM1	chromosome PA1
<i>fch</i>	Methenyl-H ₄ F cyclohydrolase (EC 3.5.4.9)	nd ^c	Mchl_2134	METDI2481	META1_1729	Mext_1798
<i>fnt</i>	10-formyl-H ₄ F:L-methionyl-tRNA(fMet) N-formyltransferase (EC 2.1.2.9)	nd	Mchl_1917	METDI2303	META1_1529	Mext_1635
<i>folD</i>	Bifunctional methylene-H ₄ F dehydrogenase (EC 1.5.1.5) / methenyl-H ₄ F cyclohydrolase (EC 3.5.4.9)	Mchl_5700	nd	nd	nd	nd
<i>ftfL</i>	Formate-H ₄ F ligase (EC 6.3.4.3)	nd	Mchl_0447	METDI0483	META1_0329	Mext_0414
<i>gcvH</i>	Glycine cleavage complex protein H	nd	Mchl_0813	METDI0991	META1_0621	Mext_0854
<i>gcvH (lpd)</i>	Glycine-cleavage complex protein L (EC 1.8.1.4)	nd	Mchl_1930	METDI2316	META1_1542	Mext_1648
<i>gcvH2</i>	Glycine-cleavage complex protein L (EC 1.8.1.4)	nd	Mchl_3018 ^f	METDI3557	META1_2990	Mext_2790
<i>gcvP</i>	Glycine cleavage complex protein P, PLP-dependent glycine dehydrogenase (EC 1.4.4.2)	nd	Mchl_0812	METDI0990	META1_0620	Mext_0853
<i>gcvT</i>	Glycine cleavage complex protein T, H ₄ F-dependent aminomethyltransferase (EC 2.1.2.10)	nd	Mchl_0814	METDI0992	META1_0622	Mext_0855
<i>glyA</i> ^b	Serine hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1)	nd	Mchl_3495	METDI3959	META1_3384	Mext_3171
<i>metF2</i> ^c / <i>metF</i>	5,10-methylene-H ₄ F reductase (EC 1.5.1.20)	Mchl_5726 ^c	Mchl_1881	METDI2266	META1_1493	Mext_1600
<i>metH</i>	B12-dependent homocysteine-N5-methyl-H ₄ F transmethylase (EC2.1.1.13)	nd	Mchl_1882	METDI2267	META1_1494	Mext_1601
<i>mtaA</i>	NADP-dependent methylene-H ₄ MPT dehydrogenase, methylene-H ₄ F dehydrogenase (EC 1.5.1.5)	nd	Mchl_2133	METDI2480	META1_1728	Mext_1797
<i>panB</i>	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase, pantothenate biosynthetic process (EC 2.1.2.11)	nd	Mchl_2108	METDI2451	META1_1701	Mext_1772
<i>purH</i>	Bifunctional IMP cyclohydrolase (EC 3.5.4.10) / phosphoribosyl-aminoimidazolecarboxamide formyltransferase (EC 2.1.2.3)	nd	Mchl_2789	METDI3299	META1_2535	Mext_2566
<i>purU</i> ^c / <i>purN</i>	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase 1 (EC 2.1.2.2)	Mchl_5699 ^c	Mchl_2337	METDI2828	META1_2044	Mext_2062
<i>soxA</i> ^d	Sarcosine oxidase, alpha subunit (EC 1.5.3.1)	nd	Mchl_4033	METDI4702	META1_4110	Mext_3738
<i>soxA2</i> ^d	Putative sarcosine oxidase, alpha subunit (EC 1.5.3.1)	nd	Mchl_1934	METDI2320	META1_1546	Mext_1652
<i>soxB</i> ^d	Sarcosine oxidase, beta subunit (EC 1.5.3.1)	nd	Mchl_4031	METDI4700	META1_4108	Mext_3736
<i>soxB2</i> ^d	Putative sarcosine oxidase, beta subunit (EC 1.5.3.1)	nd	Mchl_1936	METDI2322	META1_1548	Mext_1654
<i>soxD</i> ^d	Sarcosine oxidase, delta subunit (EC 1.5.3.1)	nd	Mchl_4032	METDI4701	META1_4109	Mext_3737
<i>soxD2</i> ^d	Putative sarcosine oxidase, delta subunit (EC 1.5.3.1)	nd	Mchl_1935	METDI2321	META1_1547	Mext_1653
<i>soxG</i> ^d	Sarcosine oxidase, gamma subunit	nd	Mchl_4039	METDI4703	META1_4111	Mext_3739
<i>soxG2</i> ^d	Putative sarcosine oxidase, gamma subunit	nd	Mchl_1933	METDI2319	META1_1545	Mext_1651
<i>thyA</i>	Thymidylate synthetase (EC 2.1.1.45)	nd	Mchl_2887	METDI3419	META1_2853	Mext_2660
<i>ygfA</i>	Putative 5-formyl-H ₄ F cyclo-ligase (EC 6.3.3.2)	nd	Mchl_2640	METDI3144	META1_2364	Mext_2363

^a Les orthologues localisés sur les chromosomes de CM4, DM4, AM1 et PA1 présentent un minimum de 95% d'identité au niveau protéique

^b *M. nodulans* ORS 2060 porte 5 orthologues de GlyA avec plus de 50% d'identité au niveau protéique

^c Les identités de séquence protéique entre les paralogues chromosomiques et plasmidiques MetF2, PurU sont de 26 et 32%, respectivement. La taille diffère entre PurU (287 aa) et Pur N (219 aa).

^d Les sous-unités des deux opérons *sox* ont plus de 46% d'identité au niveau protéique

^e nd, non détecté

^f Paralogue chromosomique (41% d'identité au niveau protéique) de la protéine L du complexe de clivage de la glycine (Lpd)

comprenant un autre gène impliqué dans l'interconversion entre le H₄F et le 5,10-méthylène-H₄F, le gène *lpd* codant pour la protéine L du complexe de clivage de la glycine (Mchl_1930) (Tableau II.10).

Particularités chez CM4 : gènes orphelins et dupliqués dans les voies d'interconversion du H₄F. Trois cas seront abordés et concernent des gènes portés par le plasmide p1MCHL : *metF2*, *purU*, et *fold* unique à la souche CM4 dans le contexte de *M. extorquens*.

i) Gène *metF2*. Le gène *metF2* (Mchl_5726) codant pour une 5,10-méthylène-H₄F réductase induite en présence de chlorométhane (Studer *et al.*, 2002) a été mis en évidence pour son rôle essentiel dans la croissance de la souche CM4 avec le chlorométhane comme substrat de croissance (Vannelli *et al.*, 1999; cf. Chapitre I). Conformément à la voie *cmu* qui a été définie (Fig. I.4), on s'attend ainsi à ce que cette réductase favorise plutôt la conversion de méthyl-H₄F en méthylène-H₄F, contrairement à MetF chez *E. coli*, dont le rôle est de favoriser la réaction dans la direction opposée, afin de fournir des précurseurs en C₁ pour la synthèse de méthionine. L'analyse génomique montre désormais que le génome de CM4 présente un autre gène *metF* (Mchl_1881). Cette protéine montre beaucoup plus de similarité avec MetF d'*E. coli* (56% au niveau protéique) qu'avec MetF2 (26%, Tableau II.11).

ii) Gène *fold*. Chez la plupart des bactéries les activités méthylène-H₄F déshydrogénase et méthényl-H₄F cyclohydrolase sont portées par une enzyme bifonctionnelle Fold (Maden, 2000). La souche CM4 possède un gène *fold* sur le plasmide p1MCHL, à proximité immédiate des gènes *cmu* (Fig. II.5).

Le gène codant pour cette enzyme n'est cependant pas retrouvé chez *M. extorquens* AM1, DM4 ou PA1, ni sur le chromosome de la souche CM4. Les souches *Methylobacterium*, comme les bactéries méthylothropes en général, possèdent deux enzymes distinctes catalysant les mêmes réactions : une méthylène-H₄MPT / méthylène-H₄F déshydrogénase MtdA NADP-dépendante (Vorholt *et al.*, 1998; Marx et Lidstrom, 2004) et une méthényl-H₄F cyclohydrolase Fch (Pomper *et al.*, 1999) (cf. Chapitre I). L'impossibilité d'obtenir des mutants *mtdA* et *fch* a suggéré que ces enzymes étaient essentielles pour le métabolisme méthylotrrophe (Chistoserdova et Lidstrom, 1994; Pomper *et al.*, 1999). Des expériences de complémentation de mutants *mtdA* ont également démontré que la protéine FOLD ne parvient pas à restaurer la croissance sur méthanol d'un mutant *mtdA* (Marx et Lidstrom, 2004), il semblerait donc que ces protéines présentent des activités et des spécificités différentes chez les bactéries méthylothropes.

iii) Gène *purU*. De la même manière, la formyl-H₄F hydrolase PurU (EC 3.5.1.10), tout comme FOLD, est présente chez CM4, et le gène correspondant est localisé immédiatement en amont du gène *fold*, suggérant que ces deux gènes sont sous le contrôle du même promoteur chlorométhane-régulé (Studer *et al.*, 2002). PurN, le paralogue chromosomique de PurU (287 résidus), d'une longueur plus réduite de 219 acides aminés, fait partie du « core genome » de *M. extorquens*. Le produit du gène *purU* présente seulement 32% d'identité avec le produit du gène *purN*, une phosphoribosylglycinamide formyltransférase (Tableau II.11) impliquée dans la biosynthèse de purines. Le gène *purU* est essentiel pour la croissance de la souche CM4 sur le chlorométhane, mais pas pour la croissance sur d'autres composés en C₁ comme le méthanol (Studer *et al.*, 2002).

Le génome de *M. extorquens* CM4 présente des gènes non retrouvés dans les autres souches de *M. extorquens* (*folD*, *purU*) ainsi que des duplications de certains de ces gènes (*metF2*, *folC2*) (Tableau II.11). Ces quatre gènes sont tous localisés sur le plasmide p1MCHL, soulignant leur association à la voie folate-dépendante d'utilisation du chlorométhane.

Chapitre III

Diversité microbienne des gènes d'utilisation du chlorométhane

Diversité et organisation des gènes d'utilisation du chlorométhane de souches bactériennes isolées de la phyllosphère

Résumé

Le chlorométhane est un gaz impliqué dans la destruction de l'ozone, et dont le bilan des émissions et des puits dans l'environnement reste à l'heure actuelle très incertain. Les études récentes ont montré qu'il était produit de façon naturelle en grande quantité, et principalement au niveau de la phyllosphère. Dans cette étude, trois souches bactériennes dégradant le chlorométhane, affiliées au genre *Hyphomicrobium*, ont été isolées de feuilles d'*A. thaliana* après enrichissement en présence de chlorométhane comme unique source de carbone et d'énergie. En utilisant des amorces PCR nouvellement dessinées, les gènes *cmu* de ces isolats ont été séquencés. Leur organisation et leur diversité ont été comparées à celles des gènes correspondants des bactéries aérobies chlorométhane-dégradantes précédemment décrites, parmi lesquelles *Methylobacterium extorquens* CM4 dont le génome complet est disponible. L'organisation des gènes *cmu* des trois isolats est similaire à celles des autres souches bactériennes connues, à l'exception de *M. extorquens* CM4, avec un enchaînement consécutif des gènes *cmuBCA*. Le gène *cmuA*, codant une méthyltransférase, présente l'identité de séquence la plus élevée parmi les souches dégradant le chlorométhane aujourd'hui caractérisées, alors que le gène *cmuC* essentiel à la croissance sur chlorométhane mais de fonction encore inconnue, montre l'identité de séquence la plus faible. A l'avenir, les nouvelles amorces PCR dégénérées conçues dans cette étude contribueront à faciliter l'analyse de la diversité et de l'organisation des gènes *cmu* de souches bactériennes chlorométhane-dégradantes isolées, et aussi à détecter les gènes *cmu* dans l'ADN extrait directement d'échantillons de l'environnement.

Diversity and organisation of chloromethane utilisation genes in bacterial strains isolated from the phyllosphere

Abstract

Chloromethane is an ozone-depleting gas which is produced naturally in large amounts in the phyllosphere. Three chloromethane-degrading bacterial strains affiliated to the genus *Hyphomicrobium* were isolated from leaves of *A. thaliana* after enrichment with chloromethane as sole carbon and energy source. By using newly designed PCR primers, *cmu* genes of these isolates were sequenced and their organisation and diversity were compared to previously reported aerobic chloromethane-degrading strains, including *Methylobacterium extorquens* CM4, whose complete genome is now known. With the exception of *M. extorquens* CM4, all strains including the three new isolates featured a similar organisation of known chloromethane-degrading genes, as a consecutive and colinear *cmuBCA* gene arrangement, although some of the previously characterised strains appeared to lack *cmuB*. Overall, sequence identity was highest for the *cmuA* gene encoding a two-domain methyltransferase corrinoid protein, and lowest for the *cmuC* gene of still unknown function but essential for growth with chloromethane. The new degenerate primer pairs for PCR that were developed may serve in future studies for the comprehensive analysis of *cmu* gene diversity and organisation in isolated strains and environmental samples.

Introduction

Halocarbons are known for their important ozone depletion properties (Harper, 2000). Chloromethane, the most abundant volatile halocarbon in the atmosphere (600 ppt), is responsible for at least 15% of catalysed ozone destruction in the stratosphere (Montzka *et al.*, 1996; Harper, 2000). The largest sources of chloromethane emissions to the atmosphere are of natural origin, in particular from vegetation, and include higher plants (Yokouchi *et al.*, 2002; Saito and Yokouchi, 2006; Yokouchi *et al.*, 2007; Gebhardt *et al.*, 2008), grasslands (Rhew and Abel, 2007; Teh *et al.*, 2008), salt marshes (Rhew *et al.*, 2000; Rhew *et al.*, 2002), peatlands (Dimmer *et al.*, 2001), wood-rotting fungi (Watling and Harper, 1998; Saxena *et al.*, 1998), senescent leaves (Myneni, 2002; Hamilton *et al.*, 2003; Keppler *et al.*, 2004), biomass burning (Lobert *et al.*, 1999), and oceans (Moore *et al.*, 1996; Scarratt and Moore, 1998; Khalil and Rasmussen, 1999). Natural production of chloromethane was estimated to represent $2.1 \text{ Tg Cl yr}^{-1}$, with industrial sources contributing less than 10% additional emissions (approximately $165 \text{ Gg Cl yr}^{-1}$) (Yoshida *et al.*, 2004). The dominant sink for chloromethane, via reaction with hydroxyl radicals in the troposphere, represents 84% of total sinks, estimated at $4.1 \text{ Tg Cl yr}^{-1}$ (Koppmann *et al.*, 1993). The striking discrepancy between sinks and sources of atmospheric chloromethane suggests that natural emissions of chloromethane, in particular from tropical vegetation, may amount to as much as $1.8 \text{ Tg Cl yr}^{-1}$ (Lee-Taylor *et al.*, 2001; Yokouchi *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2006). Indeed, emissions by plants were recently estimated to account for 30-50% of global emissions of chloromethane (Saito and Yokouchi, 2008; Saito *et al.*, 2008). The first report of chloromethane production by higher plants in the laboratory was for potato tubers (Varns, 1982; Harper *et al.*, 1999), and chloromethane was shown to be formed from the decay of plant biomass and humus formation in soil (Myneni, 2002). However, emissions of volatile compounds, including methanol and chloromethane, are from the phyllosphere,

which refers to the above-ground parts of plants, and to leaves in particular (Galbally and Kirstine, 2002; Niinemets *et al.*, 2004). Indeed, measurements of chloromethane concentrations above tropical rainforests in Southeast Asia (Yokouchi *et al.*, 2000, 2002) and in South America (Moore *et al.*, 2005) recently demonstrated significant concentrations of these compounds in the corresponding environments (1500 and 800 ppt, respectively). The vegetation types contributing to chloromethane emissions have begun to be analysed (Yokouchi *et al.*, 2002). So far, ferns and halophilous plants from tropical forests are the strongest emitters of chloromethane identified, with emissions exceeding $1 \mu\text{g (g dry wt)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Yokouchi *et al.*, 2007). The molecular basis for chloromethane production by plants has also been investigated. A methyltransferase responsible for chloromethane production was purified from leaves of *Brassica oleracea* (Attieh *et al.*, 1995, 2000), and the gene *Hol* (Harmless to ozone layer), encoding a protein capable of catalysing the S-adenosyl-L-methionine-dependent methylation of chloride, was identified in the model plant *Arabidopsis thaliana* (Rhew *et al.*, 2003; Nagatoshi and Nagamura, 2009).

With respect to the sinks identified for chloromethane, degradation by bacteria represents a major factor, whose importance remains to be thoroughly evaluated. Some microorganisms, such as methanotrophs, are capable to co-oxidise chloromethane using methane monooxygenase, but not to use it as a carbon source for growth and energy production (Stirling and Dalton, 1979; Han and Semrau, 2000). Perhaps more importantly, certain methylotrophic bacteria are able to use chloromethane as the sole carbon and energy source (McDonald *et al.*, 2002; Trotsenko and Doronina, 2003; Schäfer *et al.*, 2007). Chloromethane-degrading bacteria appear to be quite widespread, with representatives affiliated to the genera *Aminobacter*, *Hyphomicrobium*, *Leisingera*, *Methylobacterium*, *Roseovarius* (*Alphaproteobacteria*), *Pseudomonas* (*Gammaproteobacteria*) and *Acetobacterium* (*Actinobacteria*), and isolated from diverse environments such as soils

(Doronina *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 1997; Coulter *et al.*, 1999; McAnulla *et al.*, 2001a), activated sludge (Hartmans *et al.*, 1986; Traunecker *et al.*, 1991; Freedman *et al.*, 2004), freshwaters (McAnulla *et al.*, 2001a), and seawater (Schäfer *et al.*, 2005).

The only known pathway for chloromethane catabolism by aerobic bacteria was investigated in detail for strain *Methylobacterium* sp. CM4 (Doronina *et al.*, 1996). The entire genome sequence of this strain has recently become available (<http://www.genoscope.cns.fr/agc/mage>), allowing its affiliation to the species *Methylobacterium extorquens*. Transposon mutagenesis of strain CM4 allowed to identify a set of genes that are essential for growth on chloromethane (Vannelli *et al.*, 1998, 1999), which were termed *cmu* genes for chloromethane utilisation, and were subsequently reported in several other strains (reviewed in Schäfer *et al.*, 2007). The chloromethane dehalogenase encoded by *cmuA* and *cmuB* genes was purified and characterised (Studer *et al.*, 1999, 2001), and chloromethane-dependent regulation of expression of *cmu* genes was also investigated in this strain (Studer *et al.*, 2002). In addition, the *cmuA* gene has been used as a biomarker of chloromethane metabolism in molecular studies of microbial diversity of chloromethane-degrading bacteria in various environments (McAnulla *et al.*, 2001a; Miller *et al.*, 2004; Borodina *et al.*, 2005; Schäfer *et al.*, 2005).

Some of the genera featuring representatives of chloromethane-degrading bacteria, *Hyphomicrobium*, *Methylobacterium* and *Pseudomonas* particular, are known to be efficient colonisers of the phyllosphere (Kinkel, 1997; Andrews and Harris, 2000; Trotsenko *et al.*, 2001; Raja *et al.*, 2008; Delmotte *et al.*, 2009). To date, however, no chloromethane-degrading strains isolated from leaf surfaces have been reported. The primary aims of this study were to isolate chloromethane-degrading bacterial strains from *A. thaliana* leaves, to detect and characterise *cmu* genes in these strains, and to compare their organisation and diversity.

Experimental procedures

DNA and bacterial strains. Strains *Methylobacterium extorquens* CM4 and *Hyphomicrobium chloromethanicum* CM2 were original laboratory stocks conserved at -80°C . Genomic DNA extraction of bacterial strains was performed using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). Total DNA of *Aminobacter lissarensis* CC495, *Aminobacter ciceronei* IMB-1, *Rhodobacteraceae* sp. 179 and sp. 198 was kindly provided by H. Schäfer (Univ. of Warwick, UK).

Growth media. Liquid cultures for enrichment and growth were performed in mineral medium for methylotrophic bacteria (M3) containing (per liter of distilled water): KH_2PO_4 (6.8 g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.2 g), NaOH 5 M (5.85 ml), yielding a final pH of 7.2. After autoclaving, 1 ml/L medium each of calcium nitrate solution (25 g/l), and of trace elements solution containing (in mg/l) $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (100), $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ (100), ZnSO_4 (29.5), $\text{Co}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (25), $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (25), $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (25), NH_4VO_3 (14.4), $\text{NiSO}_4\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10), H_3BO_3 (10) and 0.5 ml/l of H_2SO_4 (95%) were added.

Bacterial strains were cultivated and isolated on solid medium containing (in g per liter of distilled water): K_2HPO_4 (1.04), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.2), $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.65), $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.1), bromothymol blue (0.1), agar (15) at a pH of 7.2. Calcium nitrate and trace elements were added after autoclaving as described for liquid M3 medium.

Enrichment culture and strain isolation from plant leaves. For each enrichment culture, one *A. thaliana* leaf (~ 40 mg) was immersed in a 300 ml vial containing 50 ml of medium M3 and fitted with a sealed mininert valve cap (Sigma). Following addition of 10 mM of chloromethane (approx. 12 ml) to the headspace. Enrichment cultures were incubated under shaking (100 rpm) at 30°C . After 24 h, the leaf was removed and 10 mM

of chloromethane were again added. After three successive subcultures, enrichments were spread onto plates and incubated in sealed, gas-tight jars containing 1.3% chloromethane (v/v). Utilisation of chloromethane was indicated by development of yellow color on a green background around dehalogenating colonies, which were selected and purified on fresh solid medium.

Dehalogenation activity. Whole-cell suspensions were prepared from exponential phase cultures (50 ml, $OD_{600} < 0.3$), obtained with chloromethane as the sole carbon source, by centrifugation at 6000 rpm for 10 min, washing cells twice in 50 mM chloride-free phosphate buffer pH 7.0, and resuspending the cell pellet in the same buffer (final volume 6 ml). Protein determination was performed with 1 ml of cell suspension, using the bicinchoninic acid assay and a commercial kit (Pierce). For activity measurements, 5 ml of cell suspension were added to 17 ml Hungate vials capped with a gas-tight mininert valve (Sigma). Chloromethane gas (10 ml) was added in excess, and the vial incubated at 30°C. At different times, aliquots (0.5 ml) of the cell suspension were sampled through the valve with a 1 ml syringe, transferred to Eppendorf tubes on ice, centrifuged immediately, and the resulting supernatants transferred to fresh Eppendorf tubes and kept frozen until further use.

Chloride concentration was determined spectrophotometrically by the method of Jörg and Bertau (2004), as $[FeCl]^{2+}$ ($\lambda_{max} = 340$ nm) formed in highly acidic medium. Chloride concentration was determined by comparison to a calibration curve (0 – 5 mM) obtained with sodium chloride solution in the same buffer, and dehalogenase activity expressed as nmol/min/mg protein.

Polymerase chain reaction (PCR). Primers used in this study are listed in Table III.2. Reactions were performed in 0.2 ml microcentrifuge tubes using a thermal cycling system

(Mastercycler Personal, Eppendorf, Germany). Each PCR reaction mixture consisted of 2.5 µl of PCR buffer (New England Biolabs, USA), 0.25 µl of dNTPs (200 µM), 1 µl of each forward and reverse primers (20 µM), 17.9 µl of distilled water, 0.3 µl of *Taq* polymerase (5U/New England Biolabs, USA), 0.05 µl of *pfu* polymerase (3U/Promega, Madison, USA) and 2 µl of template DNA solution (25 ng). After initial denaturation (94°C, 3 min), DNA amplification was performed by 30 cycles of 45 s denaturation at 94°C, annealing for 1 min (at 52°C for the 16S rRNA gene, and between 61°C and 67°C for *cmu* genes), extension for 1 - 4.5 min (depending of fragment length) at 72°C, and a final extension step of 7 min at 72°C.

A two-step semi-degenerate PCR strategy (Jacobs *et al.*, 2003) was used to access the 5'-upstream region of obtained *cmuB* gene fragments. In the first step, primer *cmuBrev* was used in PCR with a mix of three semi-degenerate primers with a defined 5' tail (*cek2A*: GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNAGAG; *cek2B*: GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNACGCC; *cek2C*: GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNGATAT). The second step involved using reverse primer *cmuBrev2* and a primer targeting the tail of semi-degenerate primers (*cek4*: GGCCACGCGTCGACTAGTAC).

Sequencing. After treatment of PCR products with ExoSAP-IT reagent (USB Corporation, USA) according to the manufacturer's recommendations, DNA sequences were obtained from PCR products with appropriate primers (Table III.2) on an ABI Prism 3130 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, UK). The obtained sequences were deposited in the EMBL database under accession numbers XYZ.

Phylogenetic analysis. DNA sequences were compared to databases by online Blast searches (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/blast>). DNA and protein sequences of interest were analysed using Emboss (<http://bips.u-strasbg.fr/EMBOSS>) and Mobylye (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi->

bin/portal.py) online platforms. Multiple alignments were obtained using CLUSTALW, and manually adjusted using Jalview, as implemented on the Myhits online portal (<http://myhits.isb-sib.ch>). Multiple alignments were analysed with the PHYLIP suite of programs, and in particular the DNADIST, NEIGHBOR, SEQBOOT and CONSENSE, as implemented on the Mobylye platform. Bootstrap analysis was done with 100 replicate datasets.

Table III.1. Growth of chloromethane-degrading strains and activities of resting cells with chloromethane

Strains	doubling time (h)	specific activity [$\mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg protein})^{-1}$]
<i>Methylobacterium extorquens</i> CM4	7.3 ± 1.1	26.1 ± 5.8
<i>Hyphomicrobium chloromethanicum</i> CM2	4.9 ± 0.3	24.8 ± 2.2
<i>Hyphomicrobium</i> sp. strain MC1	5.1 ± 0.3	29.5 ± 4.0
<i>Hyphomicrobium</i> sp. strain TN2	5.9 ± 0.7	28.0 ± 0.3
<i>Hyphomicrobium</i> sp. strain SR3	18.1 ± 0.5	22.8 ± 2.0
<i>Hyphomicrobium</i> sp. strain SR4	19.8 ± 0.5	21.6 ± 0.2

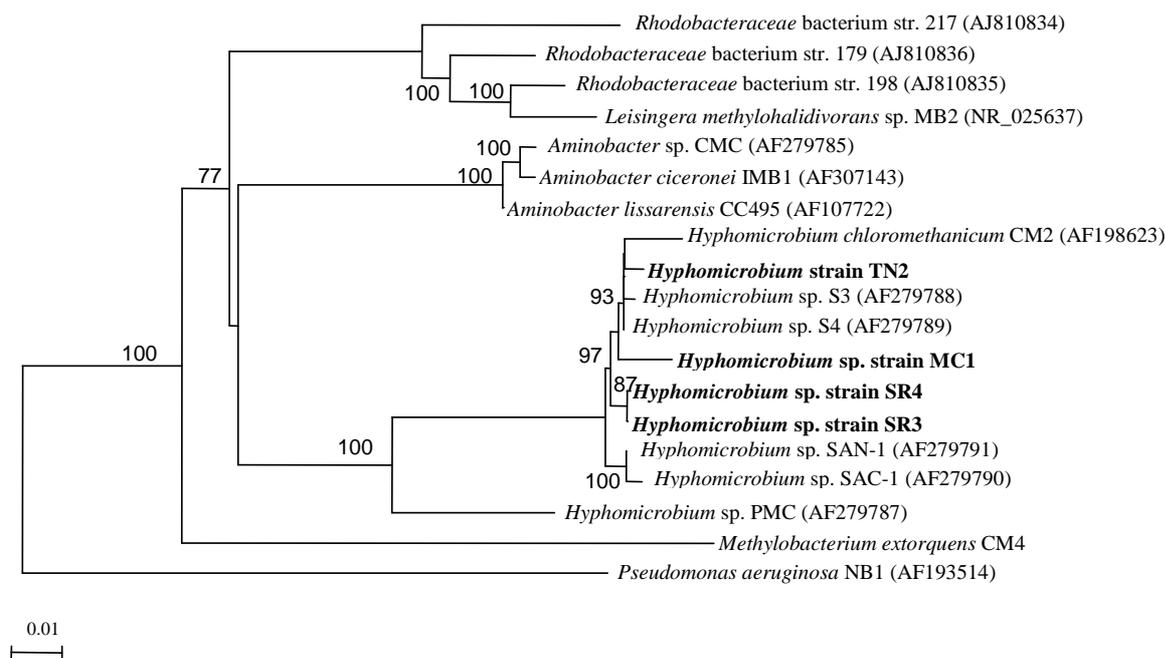


Figure III.1. Phylogenetic affiliation of chloromethane-degrading bacteria based on obtained partial 16S rRNA gene sequences

Strains isolated in this study are shown in bold. The Gamma-Proteobacterium *Pseudomonas aeruginosa*, which is unable to degrade chloromethane, was used as outgroup. Multiple sequence alignments (total length 1400 bp) obtained with CLUSTALW were analysed with PHYLIP (see Materials and Methods). Bootstrap values below 75 are not shown. Scale bar, 1% sequence divergence.

Results

Isolation, characterisation and identification of chloromethane-utilising bacteria. Several aerobic chloromethane-degrading strains have been described over the years (reviewed in Schäfer *et al.*, 2007), but the first one, strain MC1 isolated from industrial sewage sludge, was not thoroughly characterised (Hartmans *et al.*, 1986), and was thought to be lost. However, a stock of the chloromethane-degrading strain *Hyphomicrobium* MC1 was recently found and successfully cultivated on solid medium with chloromethane as the sole carbon and energy source. In this work, enrichment cultures, using *A. thaliana* leaves as the inoculum, were setup with chloromethane as sole carbon and energy sources (1.3%, v/v), and led to the isolation of three chloromethane-degrading bacterial strains (TN2, SR3 and SR4). As for the observed originally strain MC1 (Hartmans *et al.*, 1986), the morphology of these strains, with characteristic hyphae, was indicative of the genus *Hyphomicrobium*. Purity of the newly isolated strains was confirmed by plating on mineral medium with methanol as the sole carbon and energy source, and chloromethane degradation during growth was demonstrated by gas chromatography coupled to flame ionisation detection, and by measurements of chloride in supernatants of cultures grown in chloride-free mineral medium. Doubling times during growth with chloromethane as sole carbon and energy source were measured and compared with the values obtained for *M. extorquens* CM4 and *H. chloromethanicum* CM2 under the same conditions (Table III.1). Strains CM2, MC1 and TN2 had similar doubling times ($t_d \sim 5$ hours), whereas growth of *M. extorquens* CM4 was slightly slower (t_d 7.3 hours), and strains SR3 and SR4 grew more slowly. In contrast, specific activities of dehalogenation derived from measurements of chloride concentration in supernatants of cell suspensions were similar for all strains investigated (Table III.1).

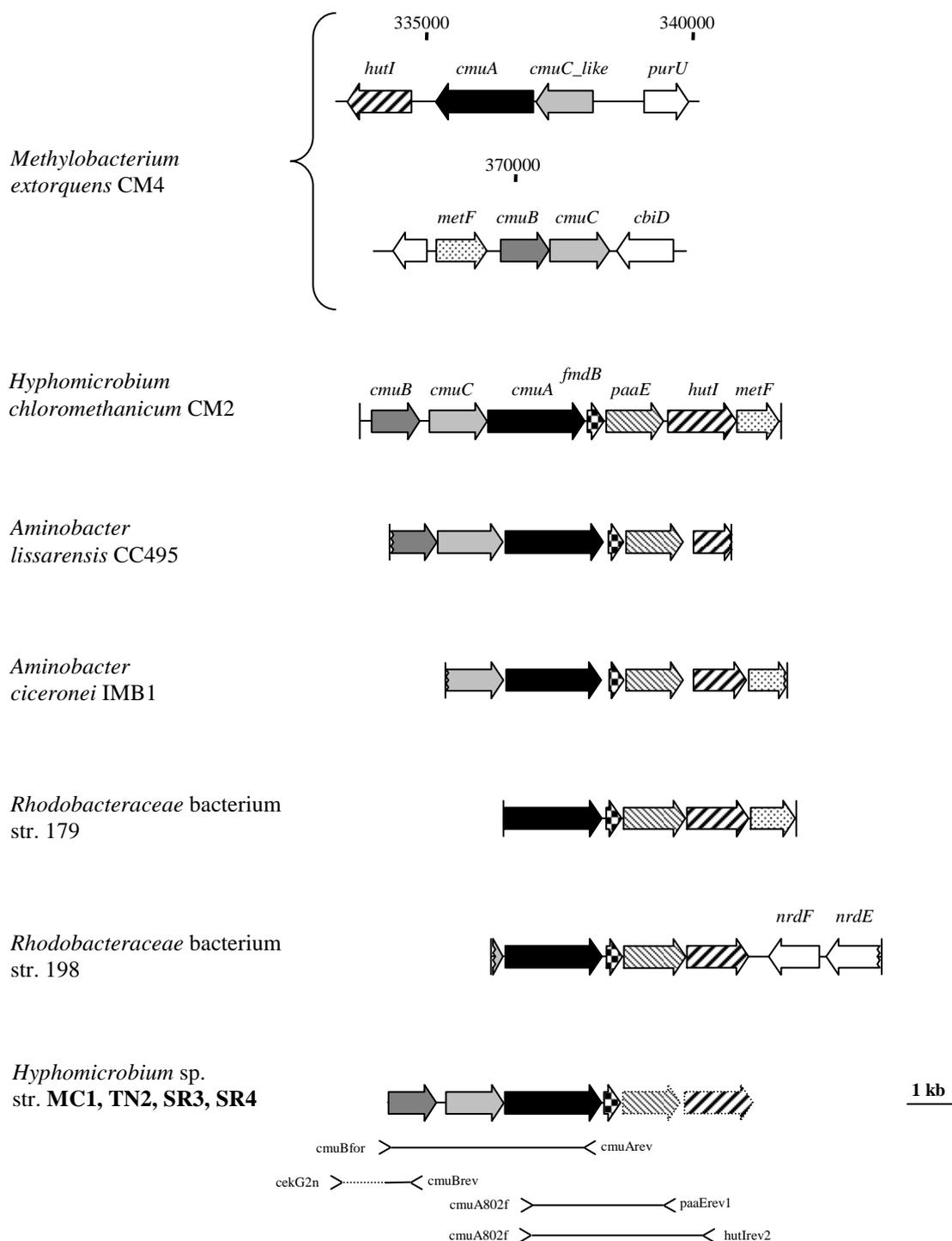


Figure III.2. Comparison of *cmu* gene organisation in chloromethane-degrading bacteria

Gene clusters are drawn to scale. Arrows represent protein-coding genes, and homologous genes are given with identical shading. Annotations above arrows indicate the name of gene. Chloromethane degradation genes are part of two different clusters in *M. extorquens* CM4. Amplified PCR products used to characterise the new isolates (highlighted in bold) are indicated below the gene arrangement in these strains, together with the names of the used primers. The dotted lines refer to products obtained by two steps PCR performed with degenerate primers cekG2a, b, c, and to products obtained with primers *cmuBrev* and *cmuBrev2* (3' end of the *cmu* gene cluster of the isolates).

Partial 16S rRNA genes (1400 bp) were amplified by PCR from DNA of the investigated isolates and then sequenced (Fig. III.1). The newly isolated strains showed over 96% DNA sequence identity with the 16S gene of *H. chloromethanicum* CM2, and were assigned to cluster II of the genus *Hyphomicrobium* Alpha-Proteobacteria (Rainey *et al.*, 1998). The 16S genes of strains SR3 and SR4 were most closely related to each other (99.8% identity), whereas that of strain TN2 was closely related to that of strain MC1 (98.4%) and of *H. chloromethanicum* CM2 (97.9%) (Fig. III.1).

Organisation and diversity of *cmu* genes in chloromethane-degrading strains.

Genes *cmuA*, *cmuB* and *cmuC* were originally identified in *M. extorquens* CM4 (Studer *et al.*, 1999, 2001). The gene *cmuA* encodes two distinct protein domains, an N-terminal methyltransferase domain and a C-terminal corrinoid-binding domain. The gene *cmuB* encodes a methylcobalamine:tetrahydrofolate methyltransferase, and proteins CmuA and CmuB in combination catalyse the transfer of the methyl group of chloromethane to tetrahydrofolate (Studer *et al.*, 2001). The role of the *cmuC* gene, known to be essential for growth with chloromethane (Vannelli *et al.*, 1999), remains to be elucidated. In the CM4 genome, these three *cmu* genes are found in close association with genes encoding other tetrahydrofolate-associated functions, and localised on two distinct DNA regions (Vannelli *et al.*, 1999; Fig. III.2). DNA fragments containing *cmu* genes were sequenced from five other chloromethane-degrading strains, *Hyphomicrobium chloromethanicum* CM2 (McAnulla *et al.*, 2001b), *Aminobacter ciceronei* IMB-1 (Woodall *et al.*, 2001), *Aminobacter lissarensis* CC495 (Warner *et al.*, 2005) and two *Rhodobacteraceae* strains 179 and 198 (Schäfer *et al.*, 2005). In contrast to what was observed for *M. extorquens* CM4, *cmu* and associated genes in these strains all appear to be localised in immediate proximity to each other (Fig. III.2), with a conserved arrangement of *cmuC*, *cmuA*, *fmdB* (encoding a putative transcriptional regulator), *paaE*-like (encoding a putative oxidoreductase)

Table III.2. Primers used in this study

Target gene	Primer	Sequence (5' to 3') ^a	Position ^b	Reference
<i>cmuA</i>	cmuA802f	TTCAACGGCGATATGTATCCCGG	7404-7426	Miller <i>et al.</i> , 2004
	cmuAfor2 ^c	CAAGAACGTAAAGCCTGAGCA	8180-8200	this study
	cmuA1609R	GGCATGTTCGGTGATGACAAATTC	8263-8241	McAnulla <i>et al.</i> , 2001b
	cmuArev	GARTTKGTCATCACCGACATGCC	8270-8247	this study
	cmuArev2 ^c	ATGCACGGATGGACGACGGA	7519-7500	this study
	cmuArev3 ^c	TACGGNMTYGAYGCNAA	8404-8388	this study
<i>cmuB</i>	cmuBfor	GGCRTGCARATGGCGTTCGACG	4630-4651	this study
	cmuBfor3 ^c	TTCCCCAAGTGGACGG	5094-5109	this study
	cmuBfor4 ^c	GCGAATGGGTCA	5128-5139	this study
	cmuBrev	CTACGCTTCGCTGCGCAGGAACT	5273-5252	this study
	cmuBrev2 ^c	ATGATCAACGCATCAGAGGC	4742-4723	this study
<i>cmuC</i>	cmuCfor ^c	GGCGACGACCTTGGCTTTCAG	5954-5974	this study
	cmuCfor2 ^c	TCCGAAATTGATTTTC	5980-5995	this study
	cmuCfor3 ^c	GCATGTTCGTGTCCGAAAT	5969-5987	this study
	cmuCfor4 ^c	GCGCCGATGGACAATATTTTC	6313-6332	this study
	cmuCrev2 ^c	ACGCCGGACGATGT	6401-6388	this study
<i>paaE</i>	paaErev1	TSTCGTCTGAARTCGAT	9865-9850	this study
<i>hutI</i>	hutIrev2	TCVTCRCARHAVRCYTCDAC	10655-10635	this study

^a IUPAC-code (M=A/C, R=A/G, W=A/T, Y=C/T, S=C/G, K=G/T, H=A/C/T, V=A/C/G, D=A/G/T, B=C/G/T, N=A/C/G/T)

^b Positions correspond to the chloromethane utilization cluster of *H. chloromethanicum* strain CM2 (AF281259)

^c Only used for sequencing

and *hutI* (encoding a putative imidazolone hydrolase), and in some cases also *metF* (encoding a putative 5-10 methylene tetrahydrofolate reductase). The *cmuB* gene, however, remained undetected in *A. ciceronei* IMB-1 (Woodall *et al.*, 2001) as well as in *Rhodobacteraceae* strains 179 and 198 (Schäfer *et al.*, 2005).

Genes *cmuA*, *cmuB* and *cmuC* of *Hyphomicrobium* strains MC1, TN2, SR3 and SR4 were amplified and sequenced from total DNA, using previously described primers (McAnulla *et al.*, 2001b; Miller *et al.*, 2004), as well as primers designed from the more conserved parts of previously reported *cmu* gene clusters (Table III.2). In addition, a two-step PCR strategy (Jacobs *et al.*, 2003) afforded access to the unknown 5'-upstream region of *cmuB* gene fragments, and allowed to obtain complete sequences of the *cmuB* gene for the new phyllosphere isolates.

The organisation of *cmu* gene clusters for strains isolated from *A. thaliana* leaves and from strain MC1, with a simple *cmuBCA* gene cluster, was similar to that found previously for *H. chloromethanicum* CM2, and thus different from that of *M. extorquens* CM4, as noted above (Fig. III.2). Moreover, successful PCR reactions with *cmuA802f-paaErev1* and *cmuA802f-hutIrev* primer pairs (Table III.2), yielding PCR products of 2.5 kb and 3.2 kb respectively, provided evidence that genes *paaE* and *hutI* were also present in the new isolates, and in the same arrangement as in strain *Hyphomicrobium chloromethanicum* CM2 (data not shown).

The *cmuA* gene was used previously as a marker to investigate the diversity of chloromethane-degrading bacteria in various environments (McAnulla *et al.*, 2001a; Miller *et al.*, 2004; Borodina *et al.*, 2005; Schäfer *et al.*, 2005), through application of the primer pair *cmuA802f-cmuA1609R* in PCR amplification. As a consequence, a large number of partial (765 nt) *cmuA* sequences retrieved from total DNA from different relevant environments are available in sequence databases today. A phylogenetic tree including the corresponding

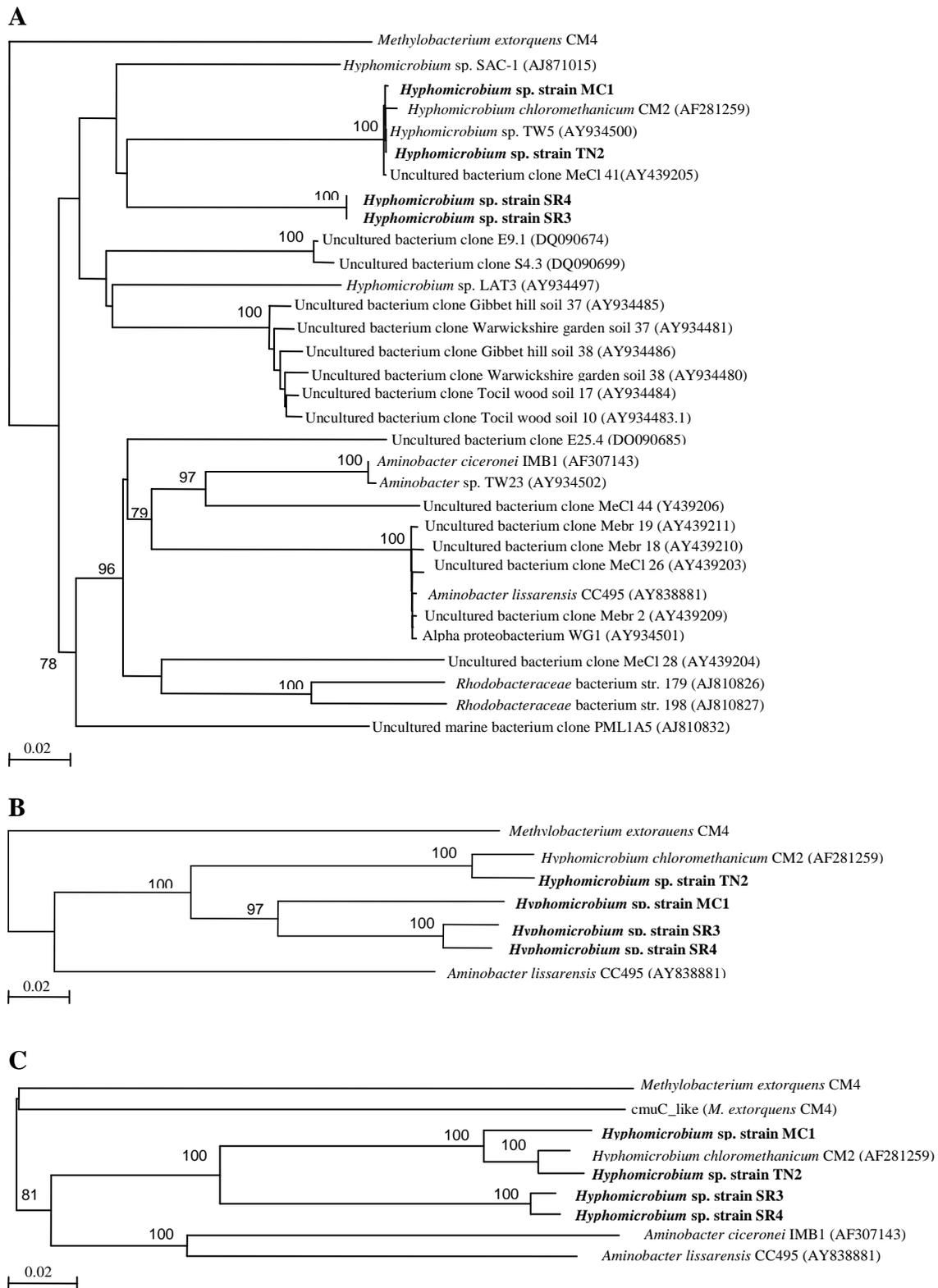


Figure III.3. Phylogenetic analysis of characterised *cmu* genes in chloromethane degrading strains

Strains characterised in this study are shown in bold. Phylogenetic trees were constructed from multiple alignments of *cmuA* (A, 765 nt total alignment length), *cmuB* (B, 683 nt), and *cmuC* (C, 957 nt) as described in the Materials and Methods section. Bootstrap values of nodes recovered in more than 75% of cases are shown. Scale bars, 2% sequence divergence.

partial *cmuA* sequences from our isolates, from reported chloromethane-degrading strains including selected partial fragments of the *cmuA* gene in sequence databases (Fig. III.3a), suggests that the novel *Hyphomicrobium* isolates as well as strain MC1 belong to a clade which includes sequences from woodland soil covered with leaf-litter and garden soils (Borodina *et al.*, 2005). Sequence identity levels between *cmuA* gene fragments were 75%-80% between newly isolated *Hyphomicrobium* strains and *M. extorquens* CM4 and *Aminobacter* strains. Strains SR3 and SR4 showed identical sequences in the aligned *cmuA* gene fragment, whereas strains TN2, CM2 and MC1, with over 99% pairwise identity, clustered tightly together, highlighting the limitations of working with partial gene sequences (Fig. III.3A). It is likely that the primer pair originally proposed for retrieval and analysis of *cmuA* gene fragments (yielding a PCR product size of usually 808 bp) was designed to accommodate the shorter (1704 nt) *cmuA* sequence reported for *Aminobacter ciceronei* IMB1 (AF307143), which also features a very divergent 3'-terminal end of the gene. In the course of this work, a frameshift in this sequence was detected, and a corrected sequence of 1851 nt was defined for the *cmuA* gene of that strain. We propose that primer pair *cmuA802f-cmuArev3*, yielding a longer PCR product size of approximately 1 kb, newly designed in this work (Table III.2), be used in future studies for retrieval of *cmuA* gene sequences from environmental DNA. Indeed, the additional amplified region of *cmuA* gene (141 bp) is less conserved than the region between primers *cmuA802f* and *cmuArev* (865 bp) (see Suppl. Table III.S1), and could allow better discrimination of *cmuA* sequences retrieved from the environment.

In contrast to the situation with *cmuA*, only few partial or full *cmuB* and *cmuC* sequences are yet available and were all obtained from cultivated and isolated strains. In this work, several new degenerate primer pairs were developed which allow the detection and retrieval of *cmuB* and *cmuC* gene sequences from all chloromethane-degrading strains isolated so far,

as well as from newly isolated strains (Table III.2). In the case of *cmuB* gene fragments (Fig. III.3B), analysis showed high identity between *cmuB* genes of strains SR3 and SR4 (97.2%) on the one hand, and between strains TN2 and CM2 (96.2%) on the other hand. In contrast, overall identity of *cmuB* sequences between *Hyphomicrobium* strains and *M. extorquens* CM4 was only about 60%.

Phylogenetic analysis of *cmuC* gene diversity showed the same topology as was observed for *cmuA* (Fig. III.3C). Sequences from SR3 and SR4 were most closely related (97.9% identity), and sequences from strains MC1, TN2 and CM2 were closely clustered (> 91% identity). The analysis, included an intriguing *cmuC*-like gene of unknown function from strain CM4 (*orf414*, 54% identity to *cmuC*), located immediately upstream of *cmuA* in this strain and most likely cotranscribed with *cmuA* (Studer *et al.*, 2002). The *cmuC* sequences of *Hyphomicrobium* and *Aminobacter* strains were as similar to the *cmuC*-like gene as to the *cmuC* gene (~ 47%) of strain CM4, highlighting the lesser degree of conservation of the *cmuC* gene despite its essential character for bacterial growth with chloromethane by the *cmu* pathway.

Discussion

Enrichment cultures from *A. thaliana* leaves with chloromethane as sole carbon and energy sources allowed to isolate three new chloromethane-degrading *Hyphomicrobium* strains. *Methylobacterium* strains were shown to be efficient colonisers of leaf surfaces and predominant in the *A. thaliana* phyllosphere (Delmotte *et al.*, 2009). Although such strains were specifically looked for, however, none were obtained here. It is possible that our medium or enrichment conditions favour the isolation of *Hyphomicrobium* strains, as previously hypothesised by Borodina and colleagues (2005). Alternatively, *Hyphomicrobium* physiology may be more adapted to growth with chloromethane in a yet unknown way.

Previous studies featured the use of a relatively short (approximately 0.8 kb) *cmuA* gene fragment for the characterisation of microbial chloromethane degradation in environmental samples. The strategy developed here for the analysis of *cmu* genes in new isolates, with several new degenerate primer pairs for PCR amplification (Table III.2), may potentially allow a more detailed analysis of *cmu* gene diversity in the environment. Moreover, the strategy may allow to differentiate alternative *cmu* gene arrangements by using different combinations of the primers developed in this study. For instance, primers *cmuBfor-cmuArev* will yield a 3.6 kb PCR product for the most common one-cluster arrangement of *cmu* genes, for which *Hyphomicrobium chloromethanicum* CM2 is the prototype, while no PCR product will be obtained for the two-cluster arrangement featured by *Methylobacterium extorquens* CM4 (Fig. III.2).

Our results also confirm that three separate groups of chloromethane-degrading bacteria can be identified, basing on nucleotide identity for genes *cmuABC*, determined so far. One group brings together *Hyphomicrobium* strains, the second features *Aminobacter* strains, with *M. extorquens* CM4, the only chloromethane-degrading bacterium sequenced so far,

being an outlier representation. Furthermore, and despite the fact that all three genes *cmuA*, *cmuB* and *cmuC* are essential for growth with chloromethane by the *cmu* pathway, fine differences in gene conservation are observed for these three genes taken individually, with *cmuA* the most conserved gene, followed by *cmuB* (when present), and *cmuC* the least conserved gene.

In conclusion, coupling the use of different *cmu* gene primers for PCR to generate longer DNA fragments containing *cmu* genes with the utilisation of primers reporting on *cmu* gene organisation, as reported here, appears as a promising PCR strategy to uncover the diversity of chloromethane-degrading bacteria in the environment. More generally, and to the best of our knowledge, this report may be the first on the isolation of chloromethane-degrading bacteria from plant leaves. Considering current estimates for chloromethane emissions above plant areas ($\sim 1.8 \text{ Tg Cl yr}^{-1}$) (Lee-Taylor *et al.*, 2001; Yokouchi *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2006), the demonstration of the existence of chloromethane-degrading bacteria on leaf surfaces is potentially relevant for the total budget of chloromethane in the environment. If indeed, as suggested from this work, phyllosphere microorganisms function as a filter for plant emissions of chloromethane, then measurements and estimates of chloromethane emissions above plant areas will actually reflect the residual difference between total chloromethane emissions by leaves and bacterial *in situ* degradation of chloromethane in the phyllosphere. Clearly therefore, the importance of chloromethane degradation by methylotrophic bacteria in the phyllosphere requires further work, especially considering that methanol is emitted by plant leaves in quantities larger than those for chloromethane by several orders of magnitude. Open questions on the metabolism of chloromethane-degrading bacteria in the phyllosphere include their ability to degrade chloromethane produced by plants.

Table III.S1. Sequence identity for two regions of the amplified *cmuA* gene fragments

strain n ^o	species or strain	sequence identity (%) ^a									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	<i>Hyphomicrobium chloromethanicum</i> CM2		76	78	80	76	77	99	99	84	84
2	<i>Methylobacterium extorquens</i> CM4	71		75	76	74	75	76	76	79	79
3	<i>Aminobacter lissarensis</i> CC495	67	75		85	79	79	78	78	80	80
4	<i>Aminobacter ciceronei</i> IMB1	71	73	82		82	81	81	81	81	81
5	<i>Rhodobacteraceae</i> bacterium strain 179	67	68	77	75		91	77	77	78	78
6	<i>Rhodobacteraceae</i> bacterium strain 198	68	65	71	73	91		77	77	77	77
7	<i>Hyphomicrobium</i> sp. strain TN2	100	71	67	71	67	68		99	84	84
8	<i>Hyphomicrobium</i> sp. strain MC1	100	71	67	71	67	68	100		84	84
9	<i>Hyphomicrobium</i> sp. strain SR3	82	71	70	73	63	62	82	82		100
10	<i>Hyphomicrobium</i> sp. strain SR4	82	71	70	73	63	62	82	82	100	

^a The values in the upper right panel are percent sequence identity of *cmuA* gene fragment between *cmuA802f* and *cmuArev* primers (865 bp), and the values in the lower left panel are percent sequence identity of *cmuA* gene fragment between *cmuArev* and the newly defined PCR primer *cmuArev3* (141 bp).

Chapitre IV

Génomique fonctionnelle de l'utilisation du chlorométhane chez *M. extorquens* CM4

Analyse protéomique de l'utilisation du chlorométhane

par *Methylobacterium extorquens* CM4 et exploration du rôle du gène *cmuC*

Résumé

L'analyse protéomique différentielle de cultures de *M. extorquens* CM4 se développant sur le chlorométhane ou sur le méthanol a confirmé la voie *cmu* d'utilisation du chlorométhane précédemment définie sur la base d'études mutationnelles et d'enzymologie. Un ensemble de 33 protéines plus abondantes au cours de la croissance de la souche sur le chlorométhane ont été identifiées par spectrométrie de masse et grâce à la disponibilité de la séquence génomique de cette souche. Les méthyltransférases corrinnoïde-dépendante CmuA et tétrahydrofolate-dépendante CmuB responsables de la déchloration du chlorométhane ont été retrouvées dans cette analyse, de même qu'une formyltétrahydrofolate hydrolase codée par le gène *purU* elle aussi essentielle à la croissance de la souche CM4 sur le chlorométhane. De même, une oxydoréductase putative PaaE-like jusqu'alors non-identifiée dans la souche CM4 mais dont l'association au métabolisme du chlorométhane était suspectée de par sa présence au voisinage des gènes *cmu* d'autres bactéries chlorométhane-dégradantes précédemment décrites est également plus abondante sur le chlorométhane que sur le méthanol chez CM4. D'autres protéines associées au tétrahydrofolate (un paralogue additionnel de la méthylène tétrahydrofolate réductase MetF) et à la cobalamine (protéine de biosynthèse CobH) ont été identifiés dans les mêmes conditions, confirmant par là l'importance de ces deux cofacteurs pour l'utilisation du chlorométhane par la voie *cmu*. Des protéines impliquées dans le métabolisme du NADH (NuoE, NuoF), dans les voies d'interconversion du tétrahydrofolate (GcvT), du métabolisme central (HisA, HisD; CysK; AcsA; GlpX; CbbA), et dans la réponse au stress (KatA; SurE; SufS; UspA; MdoG et RfbC) ont également été identifiées.

En revanche, le produit protéique du gène essentiel *cmuC* codant pour une méthyltransférase potentielle n'a pas pu être détecté par l'approche protéomique. De fait, les protéomes de la souche sauvage et du mutant *cmuC* se développant sur le méthanol n'ont pas montré de différence remarquable, que ce soit en présence ou en absence de chlorométhane. Toutefois, la capacité de déchloration du chlorométhane et de croissance sur ce composé comme seule source de carbone et d'énergie sont toutes deux restaurées après complémentation du mutant *cmuC* avec un plasmide porteur du seul gène *cmuC*, confirmant ainsi que *cmuC* est essentiel au métabolisme du chlorométhane chez CM4.

**Probing the *cmu* pathway for chloromethane utilization
in *Methylobacterium extorquens* CM4 by proteomic analysis
and the elusive role of *cmuC***

Abstract

Experimental evidence for the specific *cmu* pathway for chloromethane utilization previously defined by mutational studies and sequence analysis in the aerobic methylotrophic bacterium *Methylobacterium extorquens* CM4 was obtained by differential proteomic analysis of cultures grown with either chloromethane or with methanol. A total of 33 proteins more abundant in chloromethane-grown cultures were identified by mass spectrometry basing on the available genome sequence of the strain. These included, beyond the previously characterised corrinoid-dependent methyltransferase CmuA involved in the initial dehalogenation step of chloromethane and the tetrahydrofolate-dependent methyltransferase CmuB, a predicted formyltetrahydrofolate hydrolase, whose corresponding gene *purU* had been shown previously to be essential for growth of strain CM4 with chloromethane, and a PaaE-like putative oxidoreductase, hitherto undetected in strain CM4 but suggested to be involved in chloromethane metabolism due to its presence in *cmu* gene clusters of other chloromethane-degrading strains. Other proteins associated with tetrahydrofolate-dependent transformations (e.g. a MetF homolog) and cobalamin biosynthesis (e.g. CobH) were also detected as more abundant during growth with chloromethane, confirming the main features of the *cmu* pathway. In addition, among other proteins more abundant in the chloromethane proteome, proteins involved in NADH metabolism (NuoE, NuoF), conversion of tetrahydrofolate intermediates (GcvT), central metabolism (HisA, HisD; CysK; AcsA; GlpX; CbbA), and possibly stress responses (KatA; SurE; SufS; UspA; MdoG and RfbC) were identified.

In contrast, the putative methyltransferase product of *cmuC* whose function was previously shown to be essential for growth of strain CM4 with chloromethane was not detected. The proteomes of wild-type strain CM4 and of a mutant disrupted in the *cmuC* gene showed no significant difference upon growth on methanol, in the presence or absence of chloromethane. Dehalogenation of chloromethane and growth with chloromethane in the mutant were restored by complementation with a plasmid-encoded copy of *cmuC*, confirming that this gene is required for chloromethane metabolism.

Introduction

Chloromethane (CH₃Cl) is the most abundant halocarbon emitted in the atmosphere. This volatile organic compound is of some environmental concern, as it accounts for at least 15% of chlorine-catalyzed ozone degradation (Harper 2000). Major known sources are natural, and include biomass burning, oceans, tropical plants, wood-rotting fungi, salt marshes, wetlands, rice with a total annual estimated production reaching 5 million tons (Montzka *et al.*, 2003). Chloromethane-utilizing bacteria from diverse microbial phyla have been isolated from varied sources (soil, sludge, seawater) and in various environments, hence representing a potential important sink for chloromethane (reviewed by Schäfer *et al.*, 2007). The mechanism of chloromethane degradation was first analyzed in detail in *Methylobacterium extorquens* CM4 using miniTn5 random mutagenesis (Vannelli *et al.*, 1998). The methylotrophic Alpha-Proteobacterium *M. extorquens* CM4, formerly designated as *M. chloromethanicum* CM4 (Doronina *et al.*, 1996), is a facultative methylotroph (Quayle 1963; Anthony 1982; Wood *et al.*, 1998) capable of aerobic growth on single-carbon compounds such as chloromethane, methanol, methylamine, formaldehyde as well as on multicarbon substrates (succinate, pyruvate). Chloromethane utilization represents an exception among C₁ oxidation pathways as it does not proceed through formaldehyde as an intermediate (Vannelli *et al.*, 1999; Studer *et al.*, 2002). Moreover, growth on chloromethane depends on the presence of cobalt in the medium, unlike growth on other C₁ compounds such as methylamine or methanol (Studer *et al.*, 2001). When grown with radiolabelled [⁵⁷Co]-cobalt chloride, 53% of the total radioactivity co-chromatographed with authentic vitamin B₁₂, suggesting that strain CM4 uses vitamin B₁₂ (cobalamin) for growth with chloromethane and that it can synthesize it *de novo* by a pathway that has not yet been experimentally validated. Strain CM4 is the model organism in which the only aerobic utilization pathway for chloromethane known so far, including key enzymes

of the pathway, has been characterized (Studer *et al.*, 1999, 2001). The two domain methyltransferase/corrinoid-binding protein CmuA (chloromethane utilization) catalyzes the methyl transfer from chloromethane to a corrinoid cofactor (Vannelli *et al.*, 1999; Studer *et al.*, 2001) and the methylcobalamin:H₄F methyltransferase CmuB is responsible for transfer of the methyl group to tetrahydrofolate (H₄F) (Studer *et al.*, 1999). Mutant analyses, as well as sequence analysis of the corresponding DNA regions, revealed the presence of other C₁ utilization genes potentially involved in chloromethane utilization (Vannelli *et al.*, 1999). Among those, genes *metF* and *purU* with essential functions in growth with chloromethane allowed to define a H₄F-dependent chloromethane utilization pathway in CM4 (Studer *et al.*, 2002). The H₄F-bound C₁ moiety of chloromethane is oxidized to carbon dioxide via formate or funnelled into the serine pathway for synthesis of biomass (Fig. IV.2). Transcriptional studies in strain CM4, revealed chloromethane-induced transcription of *cmu* genes (Studer *et al.*, 2002). Genes *cmuABC* and *metF* were also detected in other chloromethane degraders such as *Hyphomicrobium chloromethanicum* CM2, where they were demonstrated to be cotranscribed as an operon in a chloromethane-inducible manner (Borodina *et al.*, 2004). In both organisms, chloromethane induction was not repressed by the alternative C₁ substrate methanol (Studer *et al.*, 2001; Borodina *et al.*, 2004). Among the uncertainties that remain in this pathway, the role of *cmuC*, shown by mutagenesis to be essential for growth with chloromethane, remains elusive.

In order to further characterize the response to chloromethane in *Methylobacterium*, we performed proteomic analysis of wild-type strain CM4 to compare differential expression of proteins under methylotrophic grown conditions with chloromethane or methanol as the sole carbon and energy source, by two-dimensional gel electrophoresis (2D-PAGE), and by two-dimensional fluorescence differential gel electrophoresis (2D-DIGE). Further, we investigated the relevance of the yet unknown function of the essential *cmuC*

gene in chloromethane metabolism by both proteomic and genetic methods.

Experimental procedures

Biological materials, media and growth conditions. Bacterial strains and plasmids used in this work are described in Table IV.1. Minimal mineral medium composition (M3) was adapted from Vannelli *et al.*, (1998) with 0.2 g.L⁻¹ (NH₄)₂SO₄ final concentration and substitution of ZnCl₂ by ZnSO₄ in the trace element solution.

M. extorquens was grown aerobically at 30°C on a rotary shaker (140 rpm) in 1.2-liter Erlenmeyer flasks closed with gas-tight mininert stoppers (Precision Sampling Corp., USA) containing 200 mL M3. Methanol (sterile filtered) was added to a final concentration of 10 or 40 mM. Chloromethane gas was added to a final concentration of 15 mM ± 5 in the liquid phase assuming a Henry constant of 0.0106 m³.atm.mol⁻¹ at 30°C (Gosset 1987), as previously described (Studer *et al.*, 2002). *Escherichia coli* strains were grown in Luria-Bertani medium at 37°C. Kanamycin and tetracyclin (sterile filtered) were used at 25 µg.mL⁻¹ and 10 µg.mL⁻¹ respectively.

Culture monitoring, measurements of growth yield and chloride. Bacterial growth was monitored by OD_{600nm}. For biomass determination, stationary phase cultures were centrifuged for 10 min at 10,000 g, the resulting pellet was freeze-dried overnight in a Christ Alpha1-2 lyophilizer (Germany) at 0.5 mBar and weighed. The supernatant was kept at - 20°C for subsequent chloride measurements. Chloromethane utilization was quantified by measuring the amount of chloride released by cells in the medium by a colorimetric assay adapted from Jörg and Bertau (2004). Culture supernatant (80 µL) was mixed to a solution consisting of (per 120 µL final volume): 5 µL ultrapure water, 95 µL HClO₄ (12 M) and 20 µL Fe(NO₃)₃.9H₂O (0.2 M) in a microplate well.

Table IV.1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Relevant characteristics	Source or reference
<i>Escherichia coli</i> MC1022	<i>araD139 Δ(ara leu)7697 Δ(lacZ) M15 galU galK strA</i>	Casadaban and Cohen, 1980
<i>Escherichia coli</i> S17-1	<i>hsdR</i> RP4-2 Kan ^r ::Tn5 Tet::MU chromosomally integrated	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>Methylobacterium extorquens</i> CM4	wild-type utilizes chloromethane as carbon and energy source	Doronina <i>et al.</i> , 1996
<i>Methylobacterium extorquens</i> 36D3	<i>cmuC</i> ::miniTn5 -Kan ^r , derivative of CM4 unable to grow on chloromethane	Vannelli <i>et al.</i> , 1999
pBLS KS II+	Amp ^r ; cloning vector	Stratagene
pCM62	Tet ^r ; <i>M. extorquens</i> / <i>E. coli</i> shuttle cloning vector (P _{lac}) 6.9 kb	Marx <i>et al.</i> , 2001
pCM80	Tet ^r ; <i>M. extorquens</i> / <i>E. coli</i> shuttle expression vector (P _{lac} -P _{mxαF}) 7.2 kb	Marx <i>et al.</i> , 2001
pME1761	Amp ^r ; wild type <i>cmuC</i> cloned in <i>Eco</i> RV pBLS KS II+	Studer, 2001
pME8254	Tc ^R ; 1.1 kb <i>Hind</i> III / <i>Xba</i> I fragment from pME1761 in pCM62; <i>cmuC</i>	This study
pME8254	Tet ^r ; 1.1 kb <i>Hind</i> III / <i>Xba</i> I fragment from pME1761 in pCM62; <i>cmuC</i>	This study
pME8255	Tet ^r ; 1.1 kb <i>Hind</i> III / <i>Xba</i> I fragment from pME1761 in pCM80; <i>cmuC</i>	This study

Chloride concentration (0.1 – 25 mM [Cl⁻]) was estimated by comparing OD_{340nm} of the formed [FeCl]²⁺ complex with a calibration curve.

Cloning of the *cmuC* gene. The wild-type *cmuC* gene present on a 1.1 kb *HindIII/XbaI* fragment from plasmid pME1761 (Studer, 2001) was cloned into *HindIII/XbaI* linearized shuttle *E. coli/Methylobacterium* vectors pCM62 and pCM80 (Marx and Lidstrom, 2004), resulting in plasmids pME8254 and pME8255, respectively. These plasmids were transferred into *Methylobacterium* strains either by direct electroporation of *Methylobacterium* competent cells (Figueira *et al.*, 2000) or by bi-parental conjugation using *E. coli* S17-1 (Simon *et al.*, 1983) as the donor strain.

Protein extraction. Cell cultures were harvested by centrifugation (10 min at 10,000 g) in mid-exponential growth phase. Cell pellets were resuspended in 10 mM Tris, 1 mM EDTA (TE) pH 7.6, washed once and resuspended in 400 µL of the same buffer in the presence of benzonase (250 U) and 4 µL of protease inhibitor mix 100x (GE Healthcare). Cells were disrupted using glass beads (0.1 mm in diameter, 1 g per 0.4 mL extract) in a MM2 mixer mill (Retsh Haan, Germany) at maximal speed for 6 cycles of 30 sec, and placed on ice for one hour. Cells debris and beads were removed by centrifugation at 14,000 g for 15 min at 4°C and the supernatant was centrifuged again at 14000 g for an hour at 4°C. Protein concentration in the supernatant was assayed using the method of Bradford and a commercial kit (Biorad) with bovine serum albumin as a standard, and subsequently adjusted to 1 mg/mL with TE.

Two-dimensional gel electrophoresis (2D-PAGE). Protein extracts (100 µg) were precipitated overnight with 9 vol of acetone at 4°C, centrifuged at 10,000 g for 10 min

at 4°C, and washed three times with 80% acetone and resuspended in rehydration buffer (RB) (7 M urea, 2 M thiourea) purified by mixing for 1 hour with 10 g.L⁻¹ Amberlite IRN-150L (GE Healthcare), 2.5% wt/vol CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate), 0.6% immobilized pH gradient (IPG) (pH range 4-7 or 3-10, respectively), 65 mM dithiothreitol (DTT), and 0.002% wt/vol bromophenol blue. Protein concentration in the resulting solution was quantified using a slightly modified Bradford method (with addition of 2 mM HCl per assay and a volume of RB equivalent to that of tested samples) standardized with known concentrations of bovine serum albumin, and adjusted to 1 mg/mL with RB. Proteins (80 µg) in a total volume of 350 µL RB were loaded on 18-cm IPG strips (linear gradient pH 4-7 and 3-10) with the IPGphor 3 isoelectric focusing (IEF) system as recommended by the manufacturer (GE Healthcare). Rehydration (6h at 0V and 6h at 30V) was followed stepwise voltage increase in four 2-h increments to 150 V, 500 V, 1,000 V, and 3,000 V. Finally, separation was obtained using 8,000 V until at least 45,000 V.h. Strips were stored at - 80°C. Before use, strips were thawed at room temperature, and placed in equilibration solution (50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, and 0.002% bromophenol blue) twice for 15 min, first with 10 mg/mL DTT and then with 25 mg/mL iodoacetamide. The second dimension of electrophoretic separation was performed by 11.5% SDS-PAGE using the Ettan DALT II system (GE Healthcare). Gels were fixed during 1 h in a 40% ethanol, 7% acetic acid solutions. Proteins were stained overnight with Brilliant Blue G-colloidal (Sigma). Scanning of gels was performed on an Image Scanner (GE Healthcare) with LabScan software (GE Healthcare).

Two-dimensional fluorescence differential gel electrophoresis (2D-DIGE). Samples were labelled with CyDye DIGE Fluor minimal dyes (Cy2, Cy3 or Cy5, GE Healthcare)

according to the manufacturer's instructions. After acetone precipitation, the resulting protein pellet was resuspended in DIGE rehydration buffer (DRB) (7 M urea, 2 M thiourea, 4% wt/vol CHAPS, Tris 20 mM, pH 8.5). The protein concentration was quantified using a slightly modified Bradford method (as described above except for use of DRB) standardized with known concentrations of bovine serum albumin and adjusted to 2 mg/mL using DRB. For each DIGE experiment, 8 samples were labelled, corresponding to four replicates (four independent cultures for each condition). Labelling was performed by mixing 50 µg proteins from each of the four samples with either Cy3 (two samples) or Cy5 (two other samples) DIGE minimal dye (400 pmol) (GE Healthcare), to prevent bias resulting from different labelling efficiency. A pooled set of internal standards, comprising 25 µg aliquots from each of the 8 samples (200 µg total), was labelled with Cy2 DIGE minimal dye (1600 pmol total). Labelling was performed for a 30-minute period on ice and in the dark, and quenched by addition of 10 mM lysine (1 µL for Cy3- or Cy5-labeled extracts and 4 µL for Cy2-labeled ones). Samples were incubated for 10 min on ice in the dark. Finally, the protein samples that were separated on the same gel were mixed (one Cy3- and one Cy5- labelled sample and one-fourth volume of the pooled set of internal standards) and supplemented with 0.6% IPG pH 3-10 NL and 65 mM DTT. RB was added to each mix to final volume of 350 µL before IEF separation. Proteins were loaded on 18-cm IPG strips (non linear gradient pH 3-10) and submitted to separation steps as described above. Scanning of gels was performed on an Ettan DIGE Imager (GE Healthcare). Gels were fixed and proteins stained as described above.

Proteome image analysis. Differential analysis was performed using the ImageMaster 2D Platinum software (v. 6.0, GE Healthcare). 6 gels were grouped in two classes depending on the two compared conditions and each class contained 3 independent gels.

Gels were matched with one reference gel (master gel) following spot detection. For each spot, the relative volume corresponded to the normalized volume of the spot compared to the normalized volume of the entire gel. Statistical analysis was performed by calculating the Student *t* value for each spot as well as a ratio value defined as the mean of the relative volume of the spot obtained in the different replicates in chloromethane growth divided by the mean of the relative volumes obtained upon methanol growth. Spots with a Student *t* value higher than 1.9 (corresponding to a *p*-value of < 0.1) and ratios ≥ 2.0 or ≤ -2.0 were analyzed by mass spectrometry.

DIGE images were analyzed with DeCyder software (v. 7.0, GE Healthcare). A total of twelve images obtained from 4 gels (three images each) were analyzed. Student's *t* test was used to determine differential expression of proteins. In this procedure, the *p*-values were corrected for a false discovery rate according to the procedure of Benjamini and Hochberg (2000). Spots with a *p*-value < 0.01 and ratios ≥ 2.0 or ≤ -2.0 were considered to be differentially expressed.

Protein identification. Protein spots cut from the gel were digested in-gel as described by Rabilloud *et al.* (2001). Preparation of the gel pieces before trypsin digestion was performed by a liquid handler robot (QuadZ215, Gilson International, France). Briefly, gel bands were washed alternately with 100 μ l of 25 mM NH_4HCO_3 and then 100 μ l of acetonitrile (ACN) (3 min wash under shaking and the liquid was discarded before addition of the next solvent). This hydrating / dehydrating cycle was repeated twice and the pieces of gel were dried for 20 min before reduction (10 mM DTT / 25 mM NH_4HCO_3 buffer at 56°C for 45 min) and alkylation (25 mM iodoacetamide / 25 mM NH_4HCO_3 buffer for 45 min, room temperature). Afterwards, gel spots were again washed with 3 cycles of 25 mM NH_4HCO_3 / ACN alternately. Following a 20-minute drying step, the gel pieces

were rehydrated by three volumes of trypsin (Promega, V5111), 12.5 ng/μl / in 25 mM NH₄HCO₃ buffer (freshly diluted) and incubated overnight at room temperature. Tryptic peptides were extracted from gel by vigorous shaking for 30 min in adapted volume of 35% H₂O / 60% ACN / 5% HCOOH and ready for MALDI mass spectrometry analysis. MALDI mass measurement was carried out on two different generations of mass spectrometer, first on a Biflex III (Bruker-Daltonik GmbH, Bremen, Germany) matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometer (MALDI-TOF TOF) then on an Autoflex III Smartbeam (Bruker-Daltonik GmbH, Bremen, Germany) matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometer (MALDI-TOF TOF) used both in reflector positive mode. For MALDI mass measurement on the Biflex III, a saturated solution of α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% water/50% acetonitrile was used as a matrix. For MALDI mass measurement on the Autoflex III Smartbeam, a prespotted anchorchip target (PAC system from Bruker Daltonik, technical note TN011) with HCCA matrix was used to analyse tryptic digests. The resulting peptide mass fingerprinting data (PMF) and peptide fragment fingerprinting data (PFF) were combined by Biotools 3 software (Bruker Daltonik) and transferred to the search engine MASCOT (Matrix Science, London, UK). Variable modifications (methionine oxidation and cysteine carbamidomethylation) and one tryptic missed cleavage were taken into account. The peptide mass error was limited to 100 ppm for the Biflex III and to 50 ppm for the Autoflex III Smartbeam. Proteins were identified by searching data against NCBI non-redundant protein sequence database. The genome of strain CM4 has been fully sequenced (GenBank accession no. CP001298, CP001299, CP001300).

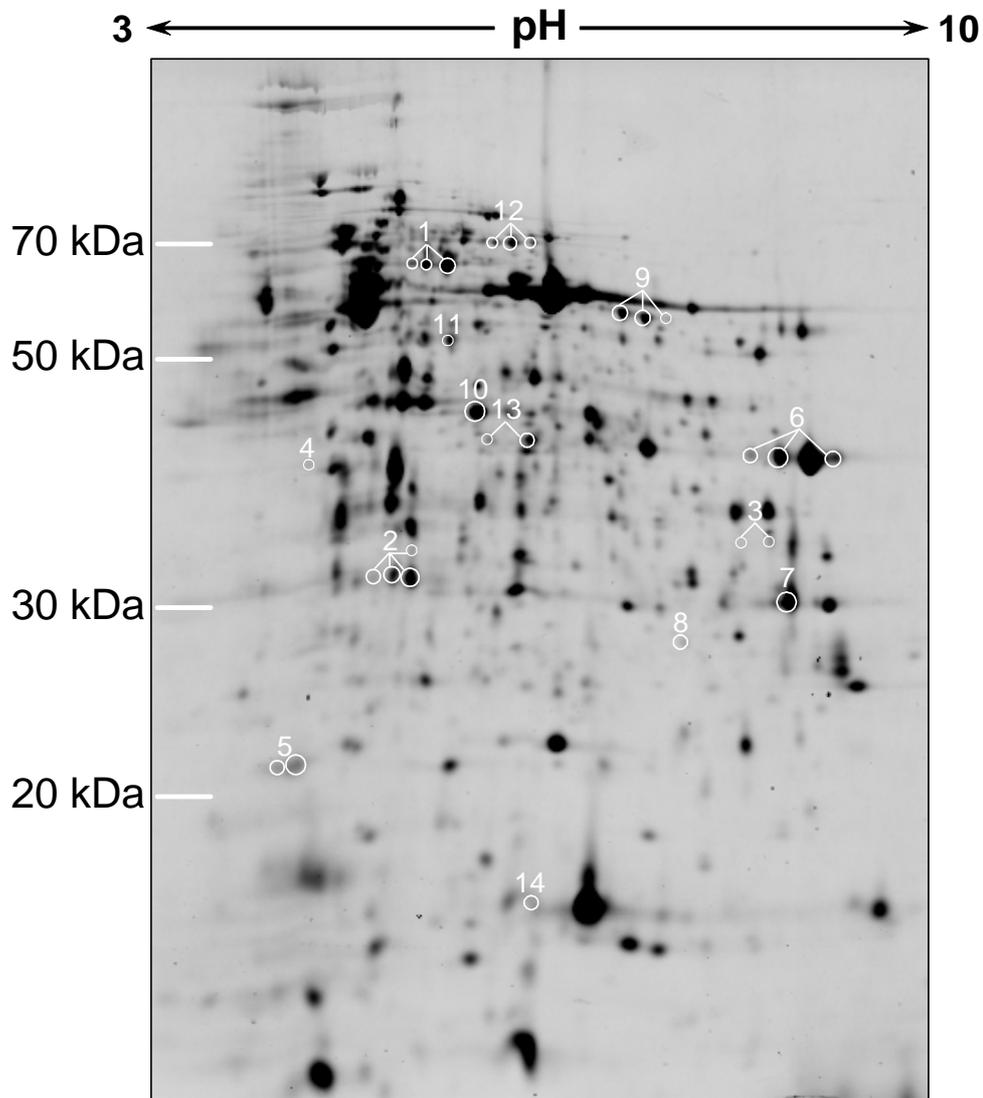


Figure IV.1. Image of the 2D-DIGE master gel of total protein extracts from chloromethane- and methanol-grown *M. extorquens* CM4 labelled with Cy2 (internal standard)

Highlighted spots (circles) showed differential abundance between chloromethane and methanol conditions and were identified by MS. 1, CmuA; 2, CmuB; 3, PurU; 4, PaaE-like oxidoreductase; 5, Fch; 6, Sga; 7, MtdA; 8, putative UspA-like protein; 9, KatA; 10, MetK; 11, Hss; 12, Acs; 13, PntAA; 14, putative endoribonuclease (Mchl_4437) (See Table IV.2 and Fig. IV.2 legend).

Results

Proteomic analysis of chloromethane- and methanol-grown *M. extorquens* CM4.

Differential analyses of proteins extracted from chloromethane- and methanol-grown cultures of wild-type strain CM4 were performed using 2D-PAGE and 2D-DIGE covering two different pH ranges (Fig. IV.1 and data not shown). Overall, 88 protein spots with differences in abundance between the two conditions were detected, resulting in the identification of 49 different proteins (Table IV.2). A good correlation was found between experimentally observed and calculated pI and M_r values (Fig. IV.1, Table IV.2). 33 proteins were only present or significantly increased in abundance (more than 5-fold) in chloromethane-grown cultures, while 16 proteins were more abundant in methanol-grown cultures. The identified proteins were assigned in six different classes according to their predicted function (Table IV.2).

Proteins more abundant during growth with chloromethane confirm the previously identified tetrahydrofolate-dependent chloromethane utilization pathway. As expected, many proteins with differential abundance had known or suspected roles in chloromethane utilization and methylotrophy (Fig. IV.2). The two-domain methyltransferase / corrinoid binding protein CmuA and the methylcobalamin:H₄F methyltransferase CmuB shown to be essential for chloromethane metabolism in strain CM4, and for which expression was demonstrated to be chloromethane-inducible (Vannelli *et al.*, 1999; Studer *et al.*, 2001) were identified by multiple spots. Despite the fact that the expected CmuC protein is in the range of the 2D-gel analysis with a calculated pI of 4.9 and M_r of 41.2 kDa, the *cmuC* gene product was not detected in differential analyses of chloromethane- and methanol-grown cultures.

Table IV.2. Proteomic analysis of *M. extorquens* CM4 differentially expressed proteins in chloromethane- and methanol-grown cultures

Functional class	Protein	Accession no. ^a	Gene	Protein parameters			Mass spectrometry identification data ^b of different <i>pI</i> ranges tested								
				Ratio, ^c CH ₃ Cl/CH ₃ OH	<i>M_r</i> (kDa)	<i>pI</i>	4-7			3-10			3-10 NL ^d		
							Score	Error (ppm)	Coverage (%)	Score	Error (ppm)	Coverage (%)	Score	Error (ppm)	Coverage (%)
Chloromethane utilization	CmuA, two-domain methyltransferase / corrinoid binding protein	Mchl_5697	<i>cmuA</i> ^e	CH ₃ Cl ^f	67.0	5.5	223	54	33	203	37	50	224	47	48
	CmuB, methylcobalamin:H ₄ F methyltransferase (EC 2.1.1.86)	Mchl_5727	<i>cmuB</i> ^e	CH ₃ Cl ^f	33.3	5.1	203	21	57	142	27	47	130	33	49
	CobH, precorrin-8X methylmutase (EC 5.4.1.2)	Mchl_5691 ^g	<i>cobH</i> ^e	CH ₃ Cl	22.0	5.1	203	28	85	n.d. ^h	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	MetF, 5,10-methylene-H ₄ F reductase (EC 1.5.1.20)	Mchl_1881	<i>metF</i>	CH ₃ Cl	34.1	6.6	n.d.	n.d.	n.d.	170	63	47	n.d.	n.d.	n.d.
	PaaE-like, oxidoreductase FAD/NAD(P)-binding domain protein	Mchl_5717	<i>paaE</i> ^e	CH ₃ Cl / +++ ^f	40.2	4.7	258	27	66	271	51	64	216	10	65
	PurU, formyl-H ₄ F hydrolase (EC 3.5.1.10)	Mchl_5699	<i>purU</i> ^e	CH ₃ Cl ^f	32.8	6.6	n.d.	n.d.	n.d.	238	40	66	147	13	61
Methylotrophy	Fae, formaldehyde-activating enzyme (EC 4.3.-.-)	Mchl_2169	<i>fae</i>	--	18.1	5.7	108	47	42	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Fch, methenyl-H ₄ Fcyclohydrolase (EC 3.5.4.9)	Mchl_2134	<i>fch</i>	-- ^f	21.7	4.8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	116	18	55
	FtlL, formate-H ₄ Fligase (EC 6.3.4.3)	Mchl_0447	<i>ftlL</i>	+++	59.5	6.8	n.d.	n.d.	n.d.	348	46	58	n.d.	n.d.	n.d.
	Hpr, hydroxypyruvate reductase, NAD(P)H-dependent (EC 1.1.1.29)	Mchl_2132	<i>hprA</i>	--	34.2	5.2	152	46	39	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	MauB, methylamine dehydrogenase (EC 1.4.99.3) large subunit	Mchl_0565	<i>mauB</i>	CH ₃ Cl / +++	44.7	7.2	n.d.	n.d.	n.d.	270	49	66	168	11	49
	MtdA, bifunctional protein [NADP-dependent methylene-H ₄ MPT/methylene-H ₄ Fdehydrogenase] (EC 1.5.1.- / EC 1.5.1.5)	Mchl_2133	<i>mtdA</i>	--	29.7	7.0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	121	43	34
	MtkA, malate thiokinase large subunit (EC 6.2.1.9)	Mchl_2135	<i>mtkA</i>	--	42.0	5.8	n.d.	n.d.	n.d.	278	51	75	n.d.	n.d.	n.d.
	MxaF, methanol dehydrogenase (EC 1.1.99.8) large subunit	Mchl_4518	<i>mxoF</i>	CH ₃ Cl / +++ ^f	68.4	5.9	129	16	19	364	63	54	82	8	20
	Sga, serine glyoxylate aminotransferase (EC 2.6.1.45)	Mchl_2131	<i>sga</i>	-- ^f	43.2	6.9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	283	24	78
	Central metabolism	AcsA, acetyl-CoA synthetase (EC 6.2.1.1)	Mchl_2785	<i>acsA</i>	CH ₃ Cl / +++ ^f	72.2	5.6	413	38	53	374	53	55	231	16
CbbA, fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13)		Mchl_2646	<i>cbbA</i>	CH ₃ Cl	38.6	5.5	92	37	28	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CysK, cysteine synthase A and O-acetylserine sulfhydrylase A subunit (EC 2.5.1.47)		Mchl_0937	<i>cysK</i>	CH ₃ Cl	34.5	5.9	186	37	64	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
EtfA, electron transfer flavoprotein, NAD/FAD-binding domain and ETFP adenine nucleotide-binding domain-like		Mchl_1823	<i>etfA</i>	--	32.4	5.0	n.d.	n.d.	n.d.	190	57	76	n.d.	n.d.	n.d.
EtfB, electron transfer flavoprotein subunit beta		Mchl_1822	<i>etfB</i>	--	26.7	7.9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	90	7	37
FumC, fumarase C (EC 4.2.1.2)		Mchl_2891	<i>fumC</i>	CH ₃ Cl	49.8	5.6	129	81	51	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GcvT, H ₄ F-dependent aminomethyltransferase, glycine cleavage complex subunit (T protein) (EC 2.1.2.10)		Mchl_0814	<i>gcvT</i>	CH ₃ Cl	40.3	6.0	n.d.	n.d.	n.d.	189	42	55	n.d.	n.d.	n.d.
GlpX, fructose 1,6-bisphosphatase, class II (EC 3.1.3.11)		Mchl_2242	<i>glpX</i>	+++	34.6	5.4	146	44	41	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
HisA, phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole carboxamide ribotide isomerase		Mchl_2774	<i>hisA</i>	CH ₃ Cl	26.7	5.4	183	27	42	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
HisD, histidinol dehydrogenase (EC 1.1.1.23)		Mchl_2261	<i>hisD</i>	CH ₃ Cl	45.4	5.0	n.d.	n.d.	n.d.	200	34	58	n.d.	n.d.	n.d.
Hss, homospermidine synthase (EC 2.5.1.44)		Mchl_5462 ⁱ	<i>hss</i>	--	53.2	5.3	246	37	40	n.d.	n.d.	n.d.	103	9	25
Lpd, dihydrolipoamide dehydrogenase (EC 1.8.1.4), glycine cleavage complex		Mchl_1930	<i>lpd</i>	---	49.0	5.7	81	26	20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
MetK, S-adenosylmethionine synthetase (EC 2.5.1.6)		Mchl_3629	<i>metK</i>	--	41.8	5.4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	227	19	76
NuoE, NADH-quinone oxidoreductase, chain E (EC 1.6.5.3)		Mchl_1210	<i>nuoE</i>	++	44.6	4.8	n.d.	n.d.	n.d.	139	57	65	n.d.	n.d.	n.d.
NuoF, NADH-quinone oxidoreductase, chain F (EC 1.6.5.3)		Mchl_1209	<i>nuoF</i>	CH ₃ Cl	47.4	6.4	n.d.	n.d.	n.d.	217	30	49	n.d.	n.d.	n.d.
PntAA, NAD(P)+ transhydrogenase, subunit alpha (EC 1.6.1.2)		Mchl_2986	<i>pntAA</i>	CH ₃ Cl / +++ ^f	39.6	5.6	177	35	45	n.d.	n.d.	n.d.	256	18	83

Table IV.2. Continued

Functional class	Protein	Accession no. ^a	Gene	Protein parameters			Mass spectrometry identification data ^c of different <i>pI</i> ranges tested								
				Ratio, ^b CH ₃ Cl/CH ₃ OH	<i>M_r</i> (kDa)	<i>pI</i>	4-7			3-10			3-10 NL ^d		
							Score	Error (ppm)	Coverage (%)	Score	Error (ppm)	Coverage (%)	Score	Error (ppm)	Coverage (%)
Adaptation to stress	KatA, catalase (hydroperoxidase II) (EC 1.11.1.6)	Mchl_3534	<i>kata</i>	CH ₃ Cl / +++ ^f	60.0	5.9	394	23	63	324	35	57	256	6	56
	MdoG, periplasmic glucan biosynthesis protein	Mchl_2321	<i>mdoG</i>	CH ₃ Cl	58.7	5.6	n.d.	n.d.	n.d.	323	47	56	n.d.	n.d.	n.d.
	SufS, selenocysteine lyase (EC 4.4.1.16)	Mchl_4348	<i>sufS</i>	+++	45.6	5.9	223	33	65	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	SurE, 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5)	Mchl_4603	<i>surE</i>	CH ₃ Cl	27.3	5.4	112	27	46	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	UspA-like, putative universal stress protein	Mchl_1555	<i>uspA</i>	+++	29.3	6.1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	79	10	32
	putative non-haem manganese-containing catalase (EC 1.11.1.6) or peroxidase (EC 1.11.1.7)	Mchl_3002	^j	CH ₃ Cl	31.0	4.9	144	36	42	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Protein biosynthesis and modification	AspS, aspartyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.12)	Mchl_4374	<i>aspS</i>	CH ₃ Cl	67.2	5.5	n.d.	n.d.	n.d.	245	16	48	n.d.	n.d.	n.d.
	ClpP, ATP-dependent Clp protease, proteolytic subunit (EC 3.4.21.92)	Mchl_2679	<i>clpP</i>	--	23.1	5.8	n.d.	n.d.	n.d.	181	40	71	n.d.	n.d.	n.d.
	EF-Ts, protein chain elongation factor	Mchl_2348	<i>tsf</i>	--	32.3	5.5	n.d.	n.d.	n.d.	214	27	70	n.d.	n.d.	n.d.
	EF-Tu, protein chain elongation factor, GTP-binding factor	Mchl_2438	<i>tufB</i>	-- ^f	43.1	5.4	n.d.	n.d.	n.d.	86	32	28	n.d.	n.d.	n.d.
Other	ABC transporter periplasmic protein, putative sulfate / thiosulfate transporter	Mchl_4391	<i>cysP</i>	CH ₃ Cl	30.9	5.1	n.d.	n.d.	n.d.	254	31	63	n.d.	n.d.	n.d.
	NAD(P)H:quinone oxidoreductase, putative triphenylmethane reductase (EC 1.-.-.-)	Mchl_0592	<i>ytfG</i>	CH ₃ Cl	38.2	7.8	254	31	63	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	RfbC, dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase (EC 5.1.3.13)	Mchl_2669 ^k Mchl_4004	<i>rfbC</i>	+++	19.8	5.5	102	25	50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	putative ABC transporter, periplasmic protein precursor	Mchl_0388	^j	CH ₃ Cl	69.0	6.7	288	45	52	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	putative ABC transporter, substrate-binding protein, aliphatic sulphonates	Mchl_0381	^j	--	34.3	8.1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	120	8	47
	putative endoribonuclease	Mchl_4437	^j	--	16.1	5.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	234 ^l	21 ^l	26 ^l
	putative enzyme; fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein	Mchl_4377	^j	CH ₃ Cl	31.4	5.3	70 ^l	24 ^l	25 ^l	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	putative hydrolase (EC 2.3.1.31)	Mchl_4434	^j	++	42.1	5.9	n.d.	n.d.	n.d.	279	27	66	n.d.	n.d.	n.d.

^a MaGe database (<http://www.genoscope.cns.fr/age/mage/>)

^b Score is the probability-based mowse score calculated using MASCOT software (Matrix Science, London, UK); error refers to mass accuracy; coverage refers to the percentage of the protein sequence covered by the matched peptides

^c Spots indicated as "CH₃Cl" were only detected in the proteome of *M. extorquens* CM4 grown with chloromethane. Spots indicated as "+" were more abundant in chloromethane-grown cultures (or less abundant in methanol-grown cultures). Spots indicated as "--" were more abundant in methanol-grown cultures (or less abundant in chloromethane-grown cultures). Factors of differential abundance were defined as follows: ++ (--)-2- to 5-fold; +++ (---) more than 5-fold

^d NL, non linear *pI* range used in 2D-DIGE experiment

^e Only found in strain CM4 (among the 8 *Methylobacterium* strains for which the genome sequence is known) and localised in the 55 kb genomic region featuring chloromethane utilization pathway related genes shown in Figure 3

^f Multiple spots detected

^g Mass spectrometry allowed the discrimination with the ortholog Mchl_1712 that displays 86.2% sequence identity at the protein level

^h n.d., not detected

ⁱ Mass spectrometry allowed the discrimination with the ortholog Mchl_2317 that displays 96.4% sequence identity at the protein level

^j No assigned gene name

^k Mass spectrometry data did not allow to discriminate between two orthologs with 99.4% sequence identity

^l MSMS identification

The precorrin-8X methylmutase CobH, encoded by the *cobH* gene (Mchl_5691) located immediately downstream of *cmuA* (Fig. IV.3), also showed higher abundance during growth with chloromethane. The *cobH* gene is involved in the oxygen-dependant cobalamin (vitamin B₁₂) biosynthetic pathway in other organisms (reviewed in Raux *et al.*, 2000). The genome of *M. extorquens* CM4 genome is unique among the eight available *Methylobacterium* fully sequenced genomes, in that it contains multiple copies for some of the genes required for the aerobic cobalamin biosynthetic pathway, including *cobH*. The presence of two copies of *cobH* genes, one of which was only detected in the chloromethane proteome, as well as its vicinity to *cmuA*, demonstrates the importance of cobalamin for chloromethane metabolism. Among chloromethane utilization candidate proteins based on genetic linkage to *cmu* genes, a PaaE-like oxidoreductase protein with FAD/NAD(P)-binding domain was identified as more abundant during growth with chloromethane. Although it was suggested to be involved in chloromethane metabolism in other chloromethane-utilizing bacteria, no corresponding gene had hitherto been detected in strain CM4. The PaaE-like protein of CM4 shares 32% identity with the phenylacetic acid degradation NADH oxidoreductase PaaE from *E. coli* (Ferrández *et al.*, 1998), an enzyme mediating transfer between NADP(H) and the PaaACD oxygenase component during phenylacetic acid degradation. These reductases have significant homology to the class 1A of dioxygenase family (Coulter *et al.*, 1999; Warner *et al.*, 2005). The corresponding ORF (Mchl_5717) encodes a 369 aa polypeptide with 42, 41 and 39% identity to PaaE-like proteins from *Aminobacter lissarensis* strain CC495, *Hyphomicrobium chloromethanicum* CM2 and *Aminobacter ciceronei* strain IMB-1 respectively, and ~38% with the PaaE-like homologs from *Rhodobacteraceae* bacteria 179 and 198. In strain CM4, the genes involved or potentially participating in the chloromethane utilization pathway, are clustered differently, on a unique genomic region that spans about 55 kb (Fig. IV.3) which is absent

from the genomes of other *Methylobacterium* strains which have been sequenced. The genes previously described to be present in *cmu* gene clusters in other chloromethane-utilizing bacteria (Schäfer *et al.*, 2007) were all found in this region of genome CM4.

Enzymes linked to H₄F were also detected as more abundant during growth with chloromethane, further confirming the key role of H₄F-linked reactions in the pathway for chloromethane utilization. The formyl-H₄F hydrolase PurU essential for chloromethane growth (Fig. IV.3) (Studer *et al.*, 2002) was only detected in cultures grown with chloromethane (Table IV.2). The *purU* gene is also located in the *cmu* genomic region (Fig. IV.3), downstream of a fragment containing chloromethane-inducible promoters (Studer *et al.*, 2002). In contrast, the gene encoding formate-H₄F ligase FtfL (also called formyl-H₄F synthetase), also detected as more abundant during growth with chloromethane and involve in the conversion of C₁ units via formate (Fig. IV.2), is found elsewhere on the CM4 genome. Further, the 5,10-methylene-H₄F reductase identified as more abundant in chloromethane-grown cultures (Mchl_1881) is not the previously identified *metF* (Mchl_5726) demonstrated as essential for chloromethane utilization (Studer *et al.*, 2002) and located on the *cmu* region (Fig. IV.3), but rather a paralog that shares 26% identity with MetF (Mchl_5726) and 56% with MetF from *E. coli* respectively. The previously identified *metF* gene (Mchl_5726), encoding a protein with 26% sequence identity with only half of the *E. coli* MetF, is more distantly related to the MetF paradigm than its paralog (Mchl_1881). Therefore, the name “MetF2” has now been attributed to Mchl_5726 in order to distinguish the two paralogs (Fig. IV.2). The expression product of the *metF2* gene in strain CM4 has a calculated pI of 9.5, at the limit of the studied pH range in our experiments, which may explain why it was not detected here.

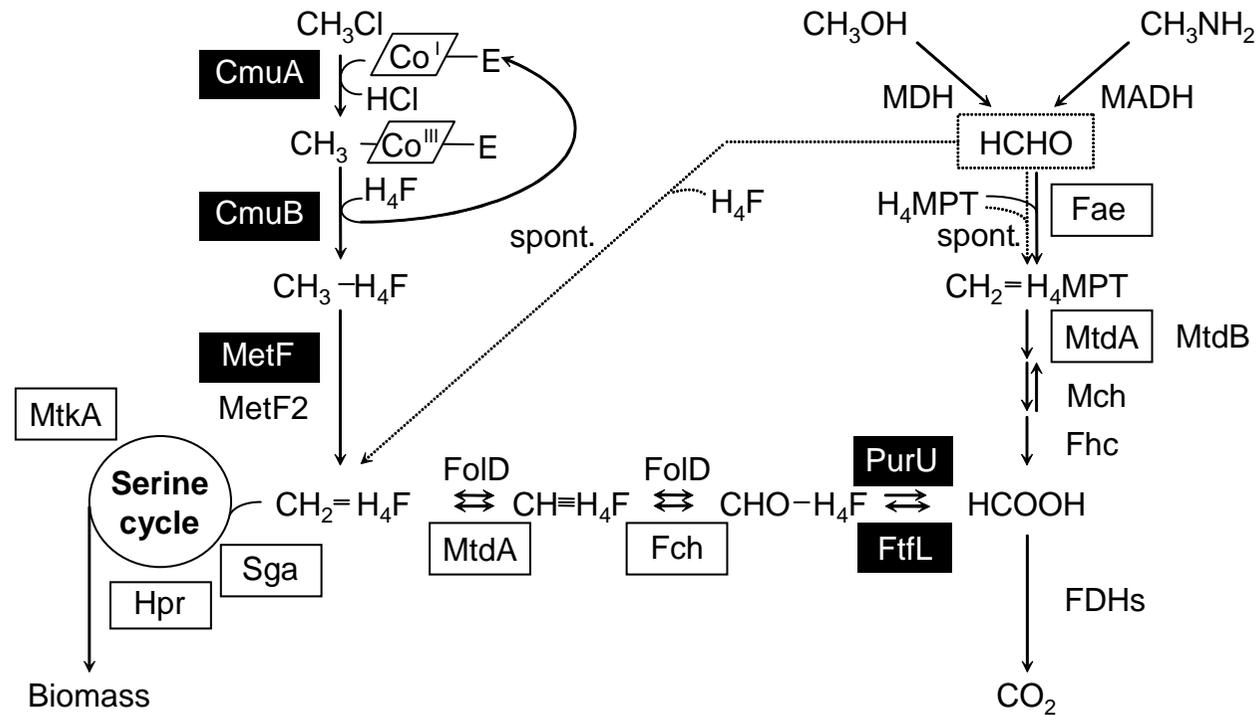


Figure IV.2. Methylotrophic metabolism and chloromethane utilization pathway in *Methylobacterium extorquens* CM4

Proteins more abundant in chloromethane grown-cultures are shown in black boxes, and proteins more abundant in methanol grown-cultures are shown in white boxes. MDH, methanol dehydrogenase; MADH, methylamine dehydrogenase; Fae, formaldehyde activating enzyme; MtdA, bifunctional NAD(P)-dependant methylene-H₄F and methylene-H₄MPT dehydrogenase; MtdB, NAD(P)-dependant methylene-H₄MPT dehydrogenase; Mch, methenyl-H₄MPT cyclohydrolase; Fch, formyltransferase-hydrolase complex; FDHs, formate dehydrogenases; FtlL, formate-H₄F ligase; Fch, methenyl-H₄F cyclohydrolase; CmuA, two domain methyltransferase/corrinoid binding protein; CmuB methylcobalamin:H₄F methyltransferase; MetF and MetF2, methylene-H₄F reductase; FoID, bifunctional methylene-H₄F dehydrogenase/cyclohydrolase; PurU, 10-formyl-H₄F hydrolase. Spontaneous condensation of formaldehyde with H₄F or H₄MPT and formaldehyde oxidation to methylene-H₄MPT are in principle also reversible (Marx *et al.*, 2005) and are shown in broken lines.

Enzymes involved in central metabolic reactions and aminoacid metabolism, performing mainly house-keeping functions were detected as more abundant in cultures grown with chloromethane, indicating that regulation of central metabolism differs when chloromethane or methanol are provided as growth substrates. Among those, HisA and HisD related to histidine metabolism were only found in chloromethane-grown cells (Table IV.2). With regard to central metabolism, the acetyl-CoA synthetase Acs mediating the ATP-dependent conversion of acetate and coenzymeA to acetyl-CoA was also identified as more abundant on chloromethane (Table IV.2). Acetyl-CoA participates in the ethylmalonyl-CoA pathway, and is required as a crucial intermediate in glyoxylate regeneration, an essential step in serine cycle methylotrophs (Kiefer *et al.*, 2008; Peyraud *et al.*, 2009). Acetyl-CoA is the precursor for the synthesis of the reserve material poly- β -hydroxybutyrate (PHB) (Anderson *et al.*, 1990). A putative hydrolase (EC 2.3.1.31), whose presumptive function may be the conversion of L-homoserine and acetyl-CoA to O-acetyl-L-homoserine and coenzyme A, also displayed higher abundance in chloromethane cultures, probably as a result of increased levels of acetyl-CoA. The transhydrogenase PntAA which acts in complex couples the transfer of reducing equivalents between NAD(H) and NADP(H) to the translocation of protons across the membrane. The latter was up-regulated in AM1 succinate- vs methanol-grown cultures transcriptomic and proteomic studies (Okubo *et al.*, 2007; Laukel *et al.*, 2004), reflecting possible differences in energy and reducing equivalents production occurring through growth substrate-specific utilization mode. In addition, GcvT, a protein which together with GcvH, GcvP and Lpd (GcvL) forms the glycine cleavage complex (Kikuchi *et al.*, 2008) was also detected as more abundant upon growth with chloromethane (Table IV.2). This complex converts H₄F and glycine into 5,10-methylene-H₄F, the crucial C₁ intermediate for serine cycle entry.

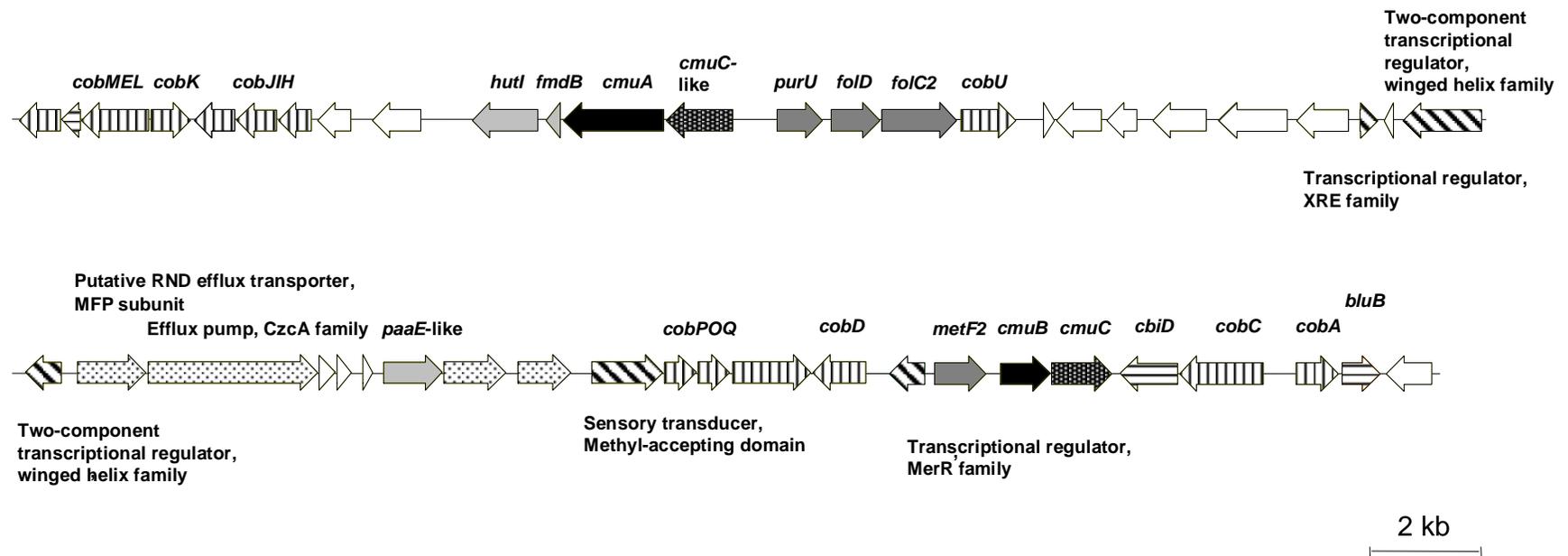


Figure IV.3. Representation of the *cmu* region of strain CM4 (Mchl_5685-Mchl_5733)

Genes for chloromethane dehalogenase (black), putative methyltransferases (black with white dots), H₄folate-associated genes (dark grey), regulatory genes (oblique hatching), transporter genes (white with black dots), genes for proteins involved in (vertical hatching) or putatively associated with (horizontal hatching) cobalamin biosynthesis, and genes found in the vicinity of *cmu* genes in other chloromethane-utilizing bacteria (light grey). Genes for hypothetical and conserved hypothetical proteins were left in white.

Several other proteins presumably not directly related to chloromethane metabolism were also identified as more abundant in chloromethane-grown cultures (Table IV.2), most of them suggesting a role in adaptation to stress, presumably in response to chloromethane exposure (UspA-like, a putative non-haem catalase or peroxidase, KatA, MdoG, SufS and SurE). In particular, MdoG was only detected in cultures exposed to chloromethane, had been shown previously to be involved in the metabolism of osmoregulated periplasmic glucans (Lequette *et al.*, 2004). In addition, the dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase RfbC enzyme was more abundant in the chloromethane proteome and had been demonstrated to be involved in the synthesis of surface polysaccharides and betaine in Gram-negative bacteria (Touzé *et al.*, 2004). These data suggest that specific cellular components necessary for osmoprotection may be produced during growth on chloromethane. Interestingly, the *rfb* cluster is conserved and closely colocalised with the *gcv* glycine cleavage gene cluster in the genome of the *M. extorquens* strains which have been sequenced.

Proteins more abundant during growth with methanol. Most of the proteins identified as more abundant during growth on methanol were enzymes involved in methylotrophic metabolism (Table IV.2), most prominently the formaldehyde-activating protein Fae responsible for detoxification of formaldehyde resulting from methanol oxidation. Fae is involved in the condensation of formaldehyde and tetrahydromethanopterin (H₄MPT) to methylene-H₄MPT, a reaction which can also proceed spontaneously but at lower rate (Vorholt *et al.*, 2000). Proteins Fch and MtdA were also detected as more abundant in methanol grown cultures, and are involved respectively in the reduction of formyl-H₄F to methenyl-H₄F, and of methenyl-H₄F to methylene-H₄F. In *M. extorquens* CM4, these reactions can be catalysed by the bifunctional NADP-dependant methylene-H₄F dehydrogenase/methenyl-H₄F cyclohydrolase FOLD (Marx et Lidstrom, 2004)

whose gene is absent in the other sequenced *M. extorquens* strains. Serine cycle enzymes Sga, HprA and MtkA, responsible for assimilation of C₁ units into multicarbon compounds were also more abundant. The corresponding genes are clustered together with *mtdA* and *fch* in a genome region involved in methylotrophic metabolism which is highly conserved among *Methylobacterium* species (Vuilleumier *et al.*, 2009). Acetyl-CoA, glyoxylate and NADP⁺ have been demonstrated to decrease binding of QscR, a key regulator of C₁ metabolism (Kalyuzhnaya *et al.*, 2005), to the *sga* promoter (Kalyuzhnaya and Lidstrom, 2003), thereby inhibiting transcription of a major serine cycle gene operon. The higher level of Acetyl-CoA synthase in chloromethane-grown cultures (Table IV.2) may thus explain the observed lower abundance of Sga, other serine cycle gene products and both MtdA and Fch compared to methanol-grown cultures.

Several enzymes whose functions are linked to central metabolism were also identified as more abundant during methanol growth. Among these, the GcvL protein (Lpd) of the glycine cleavage complex was identified, suggesting that this complex might be under control of different signals, as another component of this complex (GcvT) was more abundant during growth with chloromethane (Table IV.2). The S-adenosylmethionine (SAM) synthetase MetK which catalyzes the ATP-dependant conversion of L-methionine to SAM is another example of central metabolism enzymes identified, as well as Hss involved in NAD(+)-dependent synthesis of polyamine homospermidine from putrescine (Table IV.2). Other proteins, identified as electron transfer flavoproteins EtfAB and whose genes appear to be cotranscribed, were also more abundant during growth with methanol, and may be potentially involved in energy metabolism in a yet unknown fashion.

Investigation of the function of *cmuC* essential for dehalogenation of chloromethane: wild-type and *cmuC* mutant strains show highly similar proteomes. The *cmuC* gene (Mchl_5728), essential for growth with chloromethane and presumably cotranscribed with *cmuB* (Vannelli *et al.*, 1999; Studer *et al.*, 2002; Fig. IV.3) encodes a putative methyltransferase-like protein with significant homology with corrinoid-dependent methyltransferases found in methanogenic Archaea (Vannelli *et al.*, 1999) or in Eubacteria, e.g. the vanillate:corrinoid methyltransferase OdmB from *Acetobacterium dehalogenans* (12% identity). Interestingly, the putative *cmuC* gene product also displays homology with the N-terminal domain of CmuA methyltransferase (13% identity with CmuA from *Aminobacter lissarensis* CC495) and with uroporphyrinogen decarboxylase UroD (HemE) involved in heme biosynthesis (14% identity with HemE from *Desulfitobacterium hafniense* strain DCB-2).

As mentioned above, CmuC was not identified as a protein with differential abundance between chloromethane and methanol cultures in wild-type CM4. Differential proteomic analysis of wild-type CM4 and *cmuC* mutant strains was thus performed to investigate difference in protein expression resulting from *cmuC* deletion (Vannelli *et al.*, 1998, 1999). The *cmuC* gene product was not detected in the wild-type proteome by comparison with the mutant proteome, suggesting that it is synthesized at a level below the limit of detection (estimated at $4.6 \cdot 10^{-3}$ % of total protein from analysis of all detected protein spots).

Both wild-type and mutant strains had similar growth rates when methanol was the only carbon source for growth (Table IV.3), but growth of the *cmuC* mutant was significantly poorer than wild type in terms of growth rates and yields when chloromethane was also present, as expected (Table IV.3). Comparisons of wild-type CM4 and *cmuC* mutant

cultures grown on a mix of chloromethane and methanol (10 and 15 mM \pm 5 respectively) or on methanol (40 mM) alone with 2D-DIGE yielded only few protein spots, corresponding to only 5 proteins, with differential abundance in the *cmuC* mutant or in the wild-type CM4 during growth in the presence or absence of chloromethane (Table IV.S1). As expected, the antibiotic resistance gene-encoded protein AphA was detected only in the mutant harbouring the miniTn5 transposon carrying this gene. The other proteins which were identified (ribosomal 30S, GroL; MxaF; putative glutamine synthetase Mchl_2653) did not suggest a marked alteration in methylotrophic metabolism of the *cmuC* mutant. This comparison of wild-type and *cmuC* mutant proteomes thus failed to help elucidate the rule of the putative CmuC protein in chloromethane utilization.

Table IV.3. Growth characteristics and chloride production of *M. extorquens* CM4 and its *cmuC* mutant

CM4 derivative strain	Added carbon sources (mM)		Doubling time ^a (h)	Parameters in stationary phase ^a		
	CH ₃ Cl	CH ₃ OH		OD _{600nm}	pH ^b	Extracellular chloride (mM)
wild-type	15	0	5.4 \pm 0.4	0.38 \pm 0.07	6.6 \pm 0.2	14.8 \pm 1.6
<i>cmuC</i>	15	0	na ^c	<0.01	n.a.	n.a.
wild-type	0	40	3.0 \pm 0.2 ^d	1.30 \pm 0.04	6.8 \pm 0.1	n.d. ^e
<i>cmuC</i>	0	40	3.0 \pm 0.2 ^d	1.17 \pm 0.05	6.7 \pm 0.1	n.d. ^e
wild-type	15	10	4.0 \pm 0.2	0.78 \pm 0.04	6.4 \pm 0.1	17.9 \pm 2.0
<i>cmuC</i>	15	10	4.7 \pm 0.1	0.32 \pm 0.02	6.8 \pm 0.1	2.3 \pm 1.3

^a Average of three independent cultures

^b Initial pH medium 7.05

^c n.a., not available

^d Growth rates were the same with 10 mM methanol (data not shown)

^e n.d., not detected

In order to clarify the contribution of *cmuC* in chloromethane metabolism, complementation with an intact copy of *cmuC* gene was performed. Complemented strains were able to utilize chloromethane as the sole carbon and energy source (Table IV.4), and the transformants displayed wild-type growth yield when grown on chloromethane. Wild-type chloromethane dehalogenase activities were restored in the *cmuC* mutant with both constructs (Table IV.4). No significant changes in growth were observed in the wild-type strain upon chloromethane growth with the gene expressed either from a strong (pCM80) or weak (pCM62) promoter (Marx and Lidstrom, 2001) (Table IV.4). This suggests that expression of *cmuC* does not provide a growth advantage to the strain, nor does it have a toxic effect on CM4 cell physiology.

Table IV.4. Complementation with a functional *cmuC* gene restores growth and chloromethane dehalogenation in *M. extorquens cmuC* mutant

CM4 derivative strain (plasmid)	Genotype	Added CH ₃ OH ^a (mM)	Growth yield ^b (g [dry weight] .mol C ⁻¹)	Extracellular chloride ^b (mM)
wild-type (pCM80)	wt	0	8.1 ± 0.4	12 ± 1
<i>cmuC</i> (pCM80)	(<i>cmuC</i> ::Tn5)	0	n.d. ^c	n.d.
wild-type (pCM80)	wt	10	6.6 ± 0.6	12 ± 1
<i>cmuC</i> (pCM80)	(<i>cmuC</i> ::Tn5)	10	4.9	n.d.
wild-type (pME8255)	(<i>cmuC</i> +)	0	8 ± 1	12 ± 1
<i>cmuC</i> (pME8255)	(<i>cmuC</i> ::Tn5)(<i>cmuC</i> +)	0	8.0 ± 0.5	12 ± 1
wild-type (pME8255)	(<i>cmuC</i> +)	10	7.0 ± 0.2	12 ± 1
<i>cmuC</i> (pME8255)	(<i>cmuC</i> ::Tn5)(<i>cmuC</i> +)	10	7.0 ± 0.5	12 ± 1

^a Growth either with only 15 mM (± 5) chloromethane or supplemented with 10 mM methanol

^b Average of three independent cultures

^c n.d., not detected

The *cmuC* mutant was previously reported to display wild-type levels of both dehalogenase and methyltransferase II activity respectively catalyzed by CmuA and CmuB (Vannelli *et al.*, 1999), but the results obtained here indicate otherwise. Measurements of chloride released during growth showed that the *cmuC* disruptive mutant is defective in dehalogenation of chloromethane (Table IV.3 and Fig. IV.2). *cmuC* mutant cultures only released a small fraction of the chloride amount produced by CM4 wild-type cells when grown on a mixture of chloromethane and methanol as carbon sources. Final values OD_{600nm} of wild-type and mutant cultures also confirmed that the *cmuC* mutant was unable to utilise carbon derived from chloromethane for biomass formation (Table IV.3).

Discussion

Utilization of chloromethane as a growth substrate by *Methylobacterium* differs markedly from other C₁ compounds, including methanol. *M. extorquens* CM4 is the only *Methylobacterium* strain known to possess three distinctive C₁ compound utilization pathways, involving different branches of methylotrophic metabolism and their corresponding intermediates (Studer *et al.*, 2002). Indeed, while methanol oxidation results in formaldehyde production, chloromethane utilization pathway funnels chloromethane-derived methyl group via methylene-H₄F either directly in serine cycle for carbon assimilation, or in the H₄F oxidation pathway to produce energy (Fig. IV.2).

The differential proteomic analysis of chloromethane- and methanol-grown cultures of strain CM4 reported here provides evidence in support of the previously defined pathway for chloromethane dehalogenation, involving the corrinoid-dependant transfer of chloromethane carbon to H₄F mediated by the two methyltransferases CmuA and CmuB (Studer *et al.*, 2001). Genetic evidence had previously shown that expression of these genes was chloromethane-inducible (Studer *et al.*, 2002), and the corresponding proteins were found here to be more abundant during growth with chloromethane. Moreover, PurU, whose function was previously shown to be essential for chloromethane (Studer *et al.*, 2002), was also only detected at the protein level during growth with chloromethane.

Regarding the contribution of *cmuC* to chloromethane utilization, complementation experiments of the *cmuC* mutant with an intact copy of the gene confirmed the specific role of this gene in chloromethane utilization. Moreover, comparative measurements showed that the *cmuC* mutant is unable to release chloride at wild-type levels, suggesting a role

Table IV.S1. Proteome comparison of *cmuC* mutant and wild type (wt) strains grown with or without chloromethane

Growth substrate	Protein		Gene	2D-DIGE proteomic data					
	Function	Accession no. ^a		Ratio ^b , <i>cmuC</i> /wt	Protein parameters ^c		Mass spectrometry parameters ^d		
					<i>M_r</i> (kDa)	<i>pI</i>	Score Mascot	Error (ppm)	Coverage (%)
methanol	30S ribosomal protein S4	Mchl_5204	<i>rpsD</i>	+	23.7	10.3	106	7	48
	GroL chaperonin protein	Mchl_5249	<i>groL</i>	+	57.5	5.1	123	18	31
	Aminoglycoside-phosphotransferase (kanamycin resistance)	AAA85506	<i>aphA</i>	++	29.3	4.7	203	37	50
methanol and chloromethane	MxαF, methanol dehydrogenase large subunit (EC 1.1.99.8)	Mchl_4518	<i>mxαF</i>	+	68.4	5.9	234	19	40
	GSII, glutamine synthetase type II (EC 6.3.1.2)	Mchl_2653	<i>glnII</i>	+ ^e	38.9	5.6	195	26	29
	Aminoglycoside-phosphotransferase (kanamycin resistance)	AAA85506	<i>aphA</i>	++ / + ^e	29.3	4.7	203	37	50

^b Spots indicated as "+" were more abundant in *cmuC* mutant (or less abundant in wt). The factors of differential abundance were defined as follows ++ or + for more than 5-fold increase, and 2- to 5-fold increase, respectively.

^c Mr, molecular mass; pI, isoelectric point.

^d Score is the probability-based mowse score calculated using MASCOT software; Error refers to mass accuracy; Coverage refers to the percentage of the protein sequence covered by the matched peptide.

^e Multiple spots detected

for a *cmuC* gene product in chloromethane dehalogenation. Alternatively, the likely cotranscription of the immediately adjacent *cmuB* and *cmuC* genes in *M. extorquens* CM4 (Fig. IV.3), with stop codon of *cmuB* overlapping the start codon of *cmuC*, would be that *cmuC* disruption by miniTn5 might destabilize the *cmuB* transcript. However, expression of the CmuB protein was not altered in the *cmuC* mutant when compared with the wild type, so this explanation can be ruled out. Moreover, given the essential role of the *cmuC* gene in growth of strain CM4 with chloromethane as well as in dehalogenation of chloromethane with production of hydrochloric acid, deletion of the *cmuC* gene had been expected to have clearly detectable effects on the CM4 proteome. However, differences between wild-type and mutant proteomes were insignificant (Table IV.S1). It is possible that the presence of methanol in all cultures investigated in proteomic comparisons of wild type and mutant may have had a dominant effect on the observed proteomes. However, the fact that a CmuC protein not detected in the wild-type proteome clearly suggests that further experiments using methods other than proteomics require to be performed in order to clarify the essential role of *cmuC* in growth of strain CM4 with chloromethane.

Nevertheless, differential proteomic analysis of cultures of the wild-type strain growing with chloromethane and methanol provided both confirmatory as well as new evidence for the *cmu* chloromethane-degrading pathway of strain CM4. First of all, participation of cobalamin (vitamin B₁₂) in chloromethane utilization was confirmed by the observed higher abundance of the CobH protein during growth with chloromethane. Somewhat surprisingly, however, this is the only one of 30 gene products required for *de novo* biosynthesis of cobalamin found to be more abundant in chloromethane growth. A possible explanation for this observation is that vitamin B₁₂ is also required during growth

with methanol, as the essential cofactor for MeaA (ethylmalonyl-CoA mutase) activity in the ethylmalonyl-CoA pathway for glyoxylate regeneration.

The proteomic approach also provides hints for other enzymes and genes previously undetected in strain CM4 and potentially involved in chloromethane utilization. In particular, evidence of the importance of the *paaE*-like gene previously found to be colocalised with *cmu* genes in chloromethane-degrading bacteria other than CM4 was obtained here through the detection of the corresponding CM4 protein as more abundant during growth with chloromethane. This PaaE-like protein harbours a ferredoxin reductase-type FAD binding domain and a 2Fe-2S ferredoxin-type iron-sulfur binding domain, and was suggested previously to be responsible for the methanethiol oxidase activity observed in *A. lissarensis* CC495 (Doronina *et al.*, 1996; Warner *et al.*, 2005). It is also conceivable that the PaaE-like protein will act as an electron transfer protein, as an electron donor in reactivation of the corrinoid subunit of CmuA from the inactive Co(II) form to the Co(I) form. Indeed, corrinoid-dependent methyltransferases are well-known to be prone to inactivation by oxidation, and bacteria require often unidentified efficient reactivation systems to maintain such proteins in an active form. Specific reductive reactivation mechanisms have been identified for some cobalamin-dependent methyltransferases, e.g. the methionine synthase MetH from *E. coli* which requires electron transfer from a reduced flavodoxin (Jarrett *et al.*, 1998). Another example is RamA (reductive activation of methyltransfer, amines) from the methanogenic archaeon *Methanosarcina barkeri*, a C-terminal ferredoxin-like domain containing protein which mediates the ATP-dependent activation of methylamine:coenzyme M methyltransferase (Ferguson *et al.*, 2009).

Similarly, the fact that the product of a previously undetected *metF* gene, more closely related to the canonical MetF of *E. coli*, unlike its previously characterised MetF2 paralog (Fig. IV.3), showed increased abundance upon chloromethane growth is remarkable. MetF2, encoded by the essential *metF2* gene (Vannelli *et al.*, 1999), is thought to convert methyl-H₄F to methylene-H₄F. From the classical work performed with *E. coli*, MetF is thought to favour the reverse reaction, and to help provide one-carbon precursors for methionine synthesis. The enzymatic properties of the two MetF paralogs are not known. However, if both share the same metabolites as substrates and products, regulatory processes in the expression of the corresponding genes, arising from differences in availability of metabolites, may explain the observed increased abundance of MetF. Thus, further experiments are required to clarify to what extent the observed increased synthesis of MetF (Mchl_1881) reflects its effective participation in chloromethane metabolism.

Other redox processes within the more general context of energy metabolism appear to be relevant to chloromethane utilisation. The specific expression of cysteine synthase CysK during growth with chloromethane perhaps affords another indication for the probable importance of reactivation systems to guarantee chloromethane dehalogenase activity under aerobic conditions. Cysteine is involved in maintaining the catalytic activity and structure of many proteins with iron-sulfur (Fe-S) clusters including ferredoxins (Kiley *et al.*, 2003). *E. coli* mutant strains lacking the [Fe-S] cluster assembly SUF machinery are hypersensitive to cobalt at high concentrations of 200µM (Ranquet *et al.*, 2007). In this study, cobalt concentrations of 0.9 µM were present in culture medium. Two proteins of the SUF machinery, SufE and SufS were found more abundant under growth on chloromethane, suggesting the occurrence of cobalt stress or of another uncharacterized oxidative stress under chloromethane conditions.

Similarly, with regard to NAD metabolism, NuoE and NuoF, two proteins of the NADH-ubiquinone oxidoreductase complex, were more abundant in chloromethane-grown cells. Mutants in genes of this complex had no effect on methanol grown phenotype in *M. extorquens* AM1 (Strovas *et al.*, 2006), but *nuo* mutants have not yet been tested with respect to growth with chloromethane.

Proteomic analysis also provided clues on the place of chloromethane utilization within the larger context of methylotrophic metabolism. Several enzymes involved in the common C₁ oxidation pathway of *Methylobacterium* strains involving formaldehyde as an intermediate with differences in abundance during growth with methanol or chloromethane were detected in our analysis (Table IV.2; Table IV.S1). Identification of MxaF as more abundant in chloromethane growth could be due to proteolysis as described previously in the methanotroph *Methylococcus capsulatus* Bath (Berven *et al.*, 2003) (Fig. IV.1). A similar explanation may hold true for the increased abundance observed for MauB when chloromethane is the growth substrate (see Fig. IV.2). Another possibility, already hinted at above for MetF and MetF2, is that the observed expression pattern of such proteins depends on complex regulatory effects, and possibly levels of H₄F-linked C₁ intermediates which are altered in an unusual way in chloromethane utilisation. Indeed, most proteins with higher abundance during growth with chloromethane are associated with H₄F- but not with H₄MPT-coupled reactions, and significantly, the H₄F pathway is suggested to usually function in the reductive direction in AM1 during methanol growth, with formate being converted to methylene-H₄F mainly for assimilation purposes (Pomper *et al.*, 2002; Vorholt *et al.*, 2002) whereas in contrast, methylene-H₄F needs to be oxidized in order to produce energy during growth with chloromethane. Clearly, the details

of regulation of key C₁ interconversion enzymes of both H₄MPT- and H₄F-dependent pathways remain to be further investigated.

On a related note, the observed differential abundance of GcvT and L proteins, which was higher during growth with chloromethane and methanol respectively, may represent another potentially growth-dependent regulation mechanism under methylene-H₄F control. Interestingly, another component (GcvP) of this complex was shown to be associated with dichloromethane metabolism in *Methylobacterium extorquens* DM4 mutant strain (E. Muller, personal communication). Since *Methylobacterium* strains CM4 and DM4 share the particularity to dehalogenate chlorinated methanes intracellularly, the Gcv complex may be involved in adaptation to dehalogenation in *Methylobacterium*. Of interest in this context, the small RNA (encoded by *gcvB*) was recently shown to act as a positive regulator of acid resistance in *E. coli* (Jin *et al.*, 2009).

In conclusion, the utilisation of C₁ compounds by aerobic bacteria represents a highly interactive and complex metabolism, whose analysis will benefit enormously from the eight genome sequences of *Methylobacterium* strains which have recently become available. Global integrated approaches linking proteomics, transcriptomics and metabolomics will be key experimental strategies towards this goal. In the precise context of chloromethane metabolism, the elucidation of the function of the *cmuC* gene and its protein product in dehalogenation and growth appear as a key priority for future studies.

Chapitre V

Conclusions et perspectives

Ce travail a permis d'obtenir un certain nombre de résultats nouveaux concernant la voie d'utilisation aérobie impliquant les gènes *cmu* du chlorométhane chez les bactéries méthylophiles (gènes *cmu*, voie cobalamine et folate-dépendante). Il ouvre également de nouvelles perspectives de recherche, dont les plus pertinentes sont présentées brièvement ci-dessous. Les pistes évoquées ne prétendent pas à l'exhaustivité, mais à illustrer les nombreuses pistes ouvertes par l'analyse génomique fonctionnelle, outil puissant que j'ai eu la chance de pouvoir mettre en œuvre au laboratoire dans le cadre de mon projet.

5.1. Exploration génomique de l'adaptation au chlorométhane chez *Methylobacterium*

Les travaux effectués ici se sont concentrés sur la comparaison intra-espèce du génome de la souche CM4 avec celui des génomes des souches *M. extorquens* AM1 et DM4 dont l'analyse a été récemment publiée (Vuilleumier *et al.*, 2009). Par contraste avec ces deux derniers génomes, qui contiennent chacun plusieurs plasmides, celui de la souche CM4 a ceci de particulier que son plasmide p1MCHL a une fonction physiologique clairement identifiée. Par ailleurs, l'analyse du plasmide et la comparaison entre souches *M. extorquens* a permis d'identifier des spécificités dans le génome de *M. extorquens* CM4, comme la présence au niveau de son plasmide p1MCHL, de copies de gènes de la biosynthèse de la cobalamine (*cob*; *bluB*), le cofacteur essentiel requis pour l'utilisation du chlorométhane. En particulier, l'analyse a également révélé, par comparaison de l'organisation des gènes *cob* et de la similarité entre orthologues identifiés dans le genre *Methylobacterium*, l'origine vraisemblablement différente des gènes plasmidiques et chromosomiques de biosynthèse de la cobalamine. Ceci pourrait contribuer à expliquer l'organisation singulière des gènes *cmu* chez CM4, qui sont localisées sur deux régions proches, interrompues par des blocs de gènes *cob*, contrairement à l'organisation en un seul cluster observée chez l'ensemble des autres souches déchlorantes

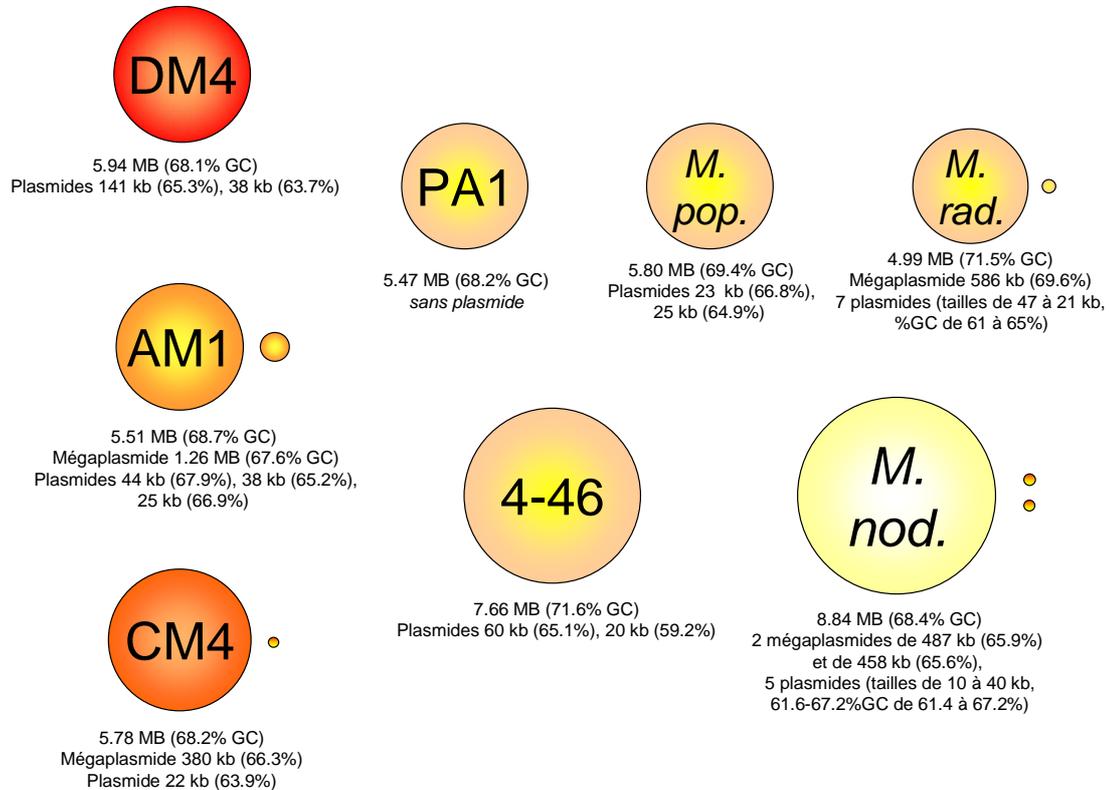


Figure V.1. Les 8 souches de *Methylobacterium* dont les séquences génomiques sont aujourd'hui disponibles

Les chromosomes et mégaplastides sont représentés à l'échelle. DM4, *Methylobacterium extorquens* DM4, capable d'utiliser le dichlorométhane comme seule source de carbone et d'énergie (séquence finalisée au Génoscope en mars 2006); AM1, *Methylobacterium extorquens* AM1, souche de référence pour l'étude de la méthylotrophie (finalisée à l'Université de Washington en août 2006); CM4, *Methylobacterium extorquens* CM4, capable d'utiliser le chlorométhane comme seule source de carbone et d'énergie (JGI, août 2008); PA1, *Methylobacterium extorquens* PA1, colonisateur compétitif de la phyllosphère d'*A. thaliana* (JGI, août 2007); *M. pop.*, *Methylobacterium populi* BJ001, un endophyte du peuplier (JGI, décembre 2007); *M. rad.*, *Methylobacterium radiotolerans* JCM 2831, résistant aux radiations (JGI, novembre 2007); 4-46, *Methylobacterium* sp. 4-46, capable de photosynthèse, fixe l'azote et nodule *Lotononis* (JGI, novembre 2007); *M. nod.*, *Methylobacterium nodulans* ORS 2060, capable de fixer l'azote, souche nodulante non pigmentée (JGI, août 2008).

étudiées à ce jour. De toute évidence, une comparaison complémentaire, inter-espèce entre génomes entièrement séquencés de souches dégradant des méthanes chlorés dont le chlorométhane, permettrait de cibler un ensemble de gènes associés à la croissance sur chlorométhane. Dans ce cadre, l'une des souches considérées dans l'étude comparative des gènes de bactéries chlorométhane-dégradantes, *Hyphomicrobium* sp. MC1 (cf. Chapitre III), que l'on croyait perdue, a été remise en culture à l'occasion de cette étude. Un projet de séquençage du génome de cette souche a été retenu, et pourrait être entrepris dans un avenir proche, par les nouvelles méthodes de séquençage à haut débit (Pandey *et al.*, 2008; Lakdawalla et Vansteenhout, 2008; MacLean *et al.*, 2009). La disponibilité du génome de cette souche permettrait de mieux évaluer, par comparaison avec celles de *M. extorquens* CM4, l'étendue des différences existant dans leur utilisation du chlorométhane en tant que substrat de croissance.

Le séquençage de la souche CM4, aujourd'hui terminé, et l'analyse de sa séquence génomique, qui sera affinée dans le contexte d'un projet d'analyse détaillée de génomique comparative des 8 génomes de *Methylobacterium* qui vient d'être initié (Fig. V.1), contribueront à renforcer le positionnement de la souche *M. extorquens* CM4 comme souche chlorométhane-dégradante de référence.

5.2. Transmission horizontale de la capacité d'utilisation du chlorométhane

Le plasmide p1MCHL inféodé au moins en partie à l'utilisation du chlorométhane n'a pas été détecté à ce jour chez d'autres microorganismes. La question se pose dès lors de savoir si sa présence seule peut conférer à d'autres bactéries méthylophiles (qui en sont dépourvues) la capacité d'utiliser le chlorométhane comme source de carbone et d'énergie. La présence sur ce plasmide de gènes *tra* et *rep* suggère en effet un potentiel de transfert horizontal à d'autres microorganismes. Des expériences de transfert du plasmide

par conjugaison ou transformation à des souches receveuses permettront de déterminer si les éléments génétiques portés par p1MCHL sont suffisants pour permettre à une autre souche de *Methylobacterium* d'acquérir, par ce biais, la capacité d'utiliser le chlorométhane pour sa croissance. Les souches séquencées de la même espèce (souches AM1, PA1 ou DM4) pourraient dans un premier temps être testées comme souches receveuses potentielles. Toutefois, un des résultats importants de notre analyse est que les éléments impliqués dans le transfert et la réplication de p1MCHL (région S1, S3), ainsi que certains gènes potentiellement impliqués dans le métabolisme en C₁ (région S4) sont communs avec le plasmide p1METDI de DM4. Ces régions de synténie laissent ainsi présager des problèmes d'incompatibilité entre les plasmides p1MCHL et p1METDI, qui ne permettront pas l'établissement du plasmide p1MCHL dans la souche DM4 pour le cas où le plasmide p1METDI, de fonction encore inconnue, s'avèrerait en fait essentiel à la croissance de la souche DM4. Il est ainsi possible que le transfert du plasmide p1MCHL, bien que paraissant de prime abord plus facile pour une bactérie déchlorante comme DM4, soit en fait incompatible avec la présence simultanée de p1METDI chez DM4. La souche PA1, dépourvue d'épisomes contrairement aux autres souches de *M. extorquens* séquencées, permettrait de toute évidence d'éviter ces difficultés potentielles d'incompatibilité plasmidique.

5.3. Diversité des bactéries chlorométhane-dégradantes dans le contexte phyllosphérique

L'étude de l'association entre plantes émettrices de chlorométhane et microorganismes capables d'utiliser le chlorométhane a permis d'isoler des bactéries présentant cette capacité, sans doute pour la première fois, directement à partir de feuilles de plantes. Ces isollements à partir de feuilles d'*A. thaliana*, décrite dans la littérature comme émettant du chlorométhane (Rhew *et al.*, 2003; Nagatoshi & Nakamura, 2009), ont prouvé que ce type de bactéries

peut coloniser cette niche écologique. Il est toutefois étonnant que seules des souches du genre *Hyphomicrobium* aient ainsi été isolées, des études récentes ayant montré que *Methylobacterium*, mais pas *Hyphomicrobium*, représente un colonisateur majeur de la phyllosphère (Delmotte *et al.*, 2009), notamment pour *A. thaliana*, et que la capacité d'utilisation du méthanol de *Methylobacterium* lui confère un avantage sélectif lors de la colonisation de plantes émettrices de méthanol (Sy *et al.*, 2005). A noter ici que l'approche de génomique comparative des 8 souches de *Methylobacterium* séquencées permettra sans doute de définir un ensemble de gènes impliqués dans les interactions plantes/bactéries, puisque la moitié des souches séquencées sont étroitement associées aux plantes.

Cette thématique sera aussi abordée d'une manière expérimentale et si possible quantitative au laboratoire, à l'aide d'un couple plante-bactérie bien défini, composé de la souche chlorométhane-dégradante CM4 et de la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Des mutants de la souche CM4 incapables de dégrader le chlorométhane, et des lignées d'*A. thaliana* dans lesquelles l'expression du gène *HOL* responsable de la production de chlorométhane (Rhew *et al.*, 2003; Nagatoshi et Nagamura, 2009) est modulée à la hausse ou à la baisse, sont en cours de construction dans le cadre d'une nouvelle thèse qui démarre cet automne au laboratoire, qui impliquera des approches complémentaires de chimie analytique, de microbiologie, de physiologie végétale et de biologie moléculaire. Dans un premier temps, on tentera d'évaluer s'il existe un rapport quantitatif entre la production de chlorométhane par *A. thaliana* et la biomasse de bactéries chlorométhane-dégradantes présentes sur les feuilles de la plante, et aussi de déterminer si la capacité d'une souche bactérienne à dégrader le chlorométhane représente un avantage sélectif pour la colonisation de feuilles d'*A. thaliana*. Des expériences d'inoculation d'*A. thaliana* sauvage et mutant par différentes souches de *Methylobacterium*, seules ou en combinaison, seront également mises en place,

et l'efficacité de ces différentes souches à coloniser les tissus végétaux, en particulier les feuilles, sera évaluée.

Etant donné l'ampleur des émissions de chlorométhane par les feuilles de plantes (cf. Chapitre I) et le potentiel de colonisation de la phyllosphère par les bactéries méthylophiles, il paraît vraisemblable que des bactéries de ce type participent de manière significative à la dégradation de ce composé. La prise en compte de l'importance de cette activité dans le budget global du chlorométhane pourrait contribuer à fournir de meilleures estimations du puits microbien du chlorométhane.

5.4. Rôle de *cmuC* et études biochimiques de l'activité de la chlorométhane déshalogénase

Un point critique à l'issue de ce travail concerne la question non résolue de la fonction du gène *cmuC* dans l'utilisation du chlorométhane. CmuC n'ayant pas été identifié dans l'analyse protéomique différentielle, il semble primordial d'étudier spécifiquement l'expression de ce gène, par RT-PCR de l'ARN messager, mais aussi par des essais d'expression de CmuC sous forme protéique chez *Methylobacterium* ou un autre hôte comme *Escherichia coli*. L'obtention de la protéine CmuC permettrait aussi d'évaluer son implication dans la réaction de déchloration proprement dite, avec les tests enzymatiques de l'activité chlorométhane déshalogénase mis au point pour les protéines purifiées CmuA et CmuB (Studer *et al.*, 2001). Ces tests pourraient également être mis à profit pour évaluer le rôle de deux oxydoréductases potentielles détectées par l'analyse protéomique et par l'approche de génomique comparative, les protéines PaaE-like et BluB, dans l'activité de chlorométhane déshalogénase (cf. aussi Section 5.5 ci-dessous). En effet, les méthyltransférases dépendantes du cobalt Co^+ , comme CmuA, sont bien connues pour être facilement inactivées par oxydation, et elles requièrent la présence de systèmes efficaces pour être maintenues

dans leur forme active. Ainsi, l'activité de déshalogénéation du chlorométhane par les méthyltransférases CmuAB *in vitro* est jusqu'ici détectable uniquement en conditions anaérobies, grâce au citrate de titane, un donneur artificiel d'électrons. Les systèmes connus de réactivation de ces enzymes sont variés, et les protéines BluB ou PaaE-like pourraient peut-être assumer ce rôle. Pour valider ces hypothèses, des études génétiques (délétion ; transcription) seront également nécessaires, et pourront être effectuées selon la stratégie présentée dans la section suivante.

5.5. Etude de gènes nouvellement identifiés comme potentiellement impliqués dans l'utilisation du chlorométhane

L'axe principal de ce travail de thèse, l'étude fonctionnelle de l'adaptation au chlorométhane par analyse différentielle protéomique, a permis de confirmer la voie d'utilisation du chlorométhane proposée par Studer *et al.* (2002). Outre l'enzyme chlorométhane déshalogénase (CmuAB), d'autres protéines comme PaaE-like et PurU ont également pu être identifiées comme plus abondantes chez la souche CM4 se développant sur le chlorométhane. Le rôle et l'importance des gènes correspondants, comme ceux d'autres gènes candidats de la voie d'utilisation du chlorométhane identifiés précédemment par séquençage (Vannelli *et al.*, 1999), pourront être abordés par l'étude de mutants de délétion. Les mutants de la souche CM4 actuellement disponibles sont des mutants d'insertion mini-transposon, avec le risque d'effets polaires sur les gènes voisins du gène muté. La construction de mutants de délétion non marqués qui ne souffrent pas de ce handicap a récemment été affinée chez *Methylobacterium* avec le développement d'un outil de remplacement génique facilement utilisable, basé sur l'incapacité de croissance sur saccharose lors de l'expression du gène *sacB* porté par le vecteur pCM433 utilisé pour opérer le remplacement allélique gène sauvage/gène muté (Marx, 2008). Cette méthode a d'ores et déjà été utilisée avec succès

dans le cas de la souche DCM-dégradante DM4 (E. Muller, thèse en cours). Il semblerait en particulier judicieux de construire des mutants de délétion non marqués pour les gènes *cmuC* et *cmuC*-like, d'une part pour clarifier l'absence d'éventuels effets polaires associés au mutant *cmuC* disponible, et d'autre part pour évaluer si le gène *cmuC*-like ne complémente pas partiellement une mutation dans le gène *cmuC*, ce qui pourrait expliquer l'absence de différences marquées entre le protéome de la souche *cmuC*::miniTn5 et celui de la souche sauvage. Une mutagenèse de délétion de ce type serait également indiquée pour les gènes localisés dans la région *cmu* du plasmide p1MCHL, à savoir les gènes *cmuA* et *cmuB*, mais aussi *metF2*, *purU*, *folD*, *folC2*, *paaE*-like et *bluB*.

En particulier, le gène *bluB*, impliqué dans la biosynthèse de 5,6-diméthylbenzimidazole (DMB) chez *S. meliloti*, présente une duplication dans le génome de CM4, l'un des paralogues étant localisé dans la région *cmu*. Chez *S. meliloti*, l'activité de l'enzyme BluB consiste à la transformation de flavine mononucléotide réduite en DMB dans une réaction au cours de laquelle la flavine réduite est utilisée pour piéger l'oxygène moléculaire (Campbell *et al.*, 2006; Taga *et al.*, 2007). L'activité de l'enzyme BluB génère aussi le D-érythrose-4-phosphate, un précurseur de la synthèse *de novo* du tétrahydrofolate. Ainsi, l'activité de l'enzyme BluB pourrait jouer un rôle clé à trois niveaux pour le métabolisme du chlorométhane : la biosynthèse de la cobalamine, la biosynthèse du H₄F voire dans le maintien de CmuA sous forme réduite active. Pour valider cette hypothèse, l'étude phénotypique devra inclure, outre un mutant du gène *bluB*, un mutant de son orthologue chromosomique *bluB2*, en conditions de croissance sur différentes sources de carbone, chlorométhane et méthanol.

De même, l'inactivation par mutagenèse de certains des gènes plasmidiques de biosynthèse de la cobalamine et de ses précurseurs, notamment le DMB, pourra également être entreprise. Le gène *cobH*, dont le produit protéique est le seul parmi les protéines de biosynthèse

de la cobalamine à avoir été détecté comme plus abondant en condition d'utilisation du chlorométhane, est dupliqué dans le génome de CM4. L'inactivation de ce gène permettrait de savoir s'il confère un avantage potentiel dans le métabolisme du chlorométhane. Enfin, parmi d'autres gènes rencontrés sur le plasmide p1MCHL mais dont l'importance pour le métabolisme du chlorométhane reste à définir, on mentionnera ici un gène potentiellement impliqué dans le transport du chlorure, un gène *xoxF*-like potentiellement impliqué dans l'oxydation de composés en C₁, et un paralogue proche du gène *gck* codant pour la glycérate kinase.

5.6. Vers l'utilisation de nouvelles approches globales de génomique fonctionnelle chez CM4

La disponibilité de la séquence génomique complète de la souche CM4 permet désormais, de concert avec l'analyse protéomique, de poursuivre l'étude de la réponse adaptative globale au chlorométhane de la souche CM4, en particulier au niveau transcriptomique. Des puces ADN couvrant l'ensemble des génomes des 4 souches *M. extorquens* séquencées ont été dessinées à cet effet, et sont aujourd'hui disponibles à façon pour les membres du consortium d'analyse des génomes de *Methylobacterium*. L'utilité de ces puces à l'âge des nouvelles techniques de séquençage à haut débit, qui sont devenues applicables à l'approche transcriptomique (Pariset *et al.*, 2009), reste cependant à évaluer.

Les résultats majeurs récemment proposés au travers d'analyses métabolomiques globales chez *Methylobacterium* (Kiefer *et al.*, 2008; Peyraud *et al.*, 2009) soulignent un peu plus encore la question de la régulation des flux de carbone dans le contexte du métabolisme méthylotrophe chez *Methylobacterium*. Cette question est particulièrement intéressante pour ce qui concerne la souche CM4, dont la voie d'utilisation du chlorométhane implique majoritairement le tétrahydrofolate, alors que les deux cofacteurs tétrahydrofolate

et tétrahydrométhanoptérine sont requis pour la croissance sur le méthanol. Une approche de type métabolomique pourrait ainsi potentiellement permettre de quantifier les différents dérivés (méthyl-, méthylène-, méthényl-, formyl-) des deux cofacteurs dans les différentes conditions de croissance, et de discriminer de manière à la fois élégante et définitive l'importance relative de ces voies dans les différentes conditions d'utilisation de substrats en C₁ chez les différentes souches.

Bibliographie

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (1998) *Toxicological Profile for Chloromethane (Update)* U.S. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA.

Anderson, AJ et EA Dawes (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol Rev*, **54**, 450-472.

Anderson, PJ, Lango, J, Carkeet, C, Britten, A, Kräutler, B, Hammock, BD et JR Roth (2008) One pathway can incorporate either adenine or dimethylbenzimidazole as an alpha-axial ligand of B12 cofactors in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol*, **190**, 1160-1171.

Andrews, JH et RF Harris (2000) The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annu Rev Phytopathol*, **38**, 145-180.

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

Anthony, C (2000) Methanol dehydrogenase, a PQQ-containing quinoprotein dehydrogenase. *Subcell Biochem*, **35**, 73-117.

Attieh, JM, Hanson, AD et HS Saini (1995) Purification and characterization of a novel methyltransferase responsible for biosynthesis of halomethanes and methanethiol in *Brassica oleracea*. *J Biol Chem*, **270**, 9250-9257.

Attieh, JM, Sparace, S et HS Saini (2000) Purification and properties of multiple isoforms of a novel thiol methyltransferase involved in the production of volatile sulfur compounds from *Brassica oleracea*. *Arch Biochem Biophys*, **380**, 257-266.

Attwood, M et J Quayle (1984) Formaldehyde as a central intermediary metabolite of methylotrophic metabolism. Dans, "*Microbial growth on C1 compounds*". American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp 315-323.

Banerjee, R et SW Ragsdale (2003) The many faces of vitamin B12: catalysis by cobalamin-dependent enzymes. *Annu Rev Biochem*, **72**, 209-247.

Bassford, PJ et RJ Kadner (1977) Genetic analysis of components involved in vitamin B12 uptake in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **132**, 796-805.

Becher, B, Müller, V et G Gottschalk (1992) N5-methyl-tetrahydromethanopterin: coenzyme M methyltransferase of *Methanosarcina* strain Gö1 is an Na(+)-translocating membrane protein. *J Bacteriol*, **174**, 7656-7660.

Benjamini, Y et Y Hochberg (2000) On the adaptive control of the false discovery rate in multiple testing with independent statistics. *J Educ Behav Stat*, **25**, 60.

Berven, FS, Karlsen, OA, Murrell, JC et HB Jensen (2003) Multiple polypeptide forms observed in two-dimensional gels of *Methylococcus capsulatus* (Bath) polypeptides are generated during the separation procedure. *Electrophoresis*, **24**, 757-761.

Bibliographie

Blanche, F, Cameron, B, Crouzet, J, Debussche, L, Thibaut, D, Vuilhorgne, M, Leeper, FJ et AR Battersby (1995) Vitamin B12: how the problem of its biosynthesis was solved. *AngewChem Int Edit*, **34**, 383–411.

Blaut, M, Müller, V et G Gottschalk (1992) Energetics of methanogenesis studied in vesicular systems. *J Bioenerg Biomembr*, **24**, 529-546.

Borodina, E, Cox, M, McDonald, IR et JC Murrell (2005) Use of DNA-stable isotope probing and functional gene probes to investigate the diversity of methyl chloride-utilizing bacteria in soil. *Environ Microbiol*, **7**, 1318-1328.

Borths, EL, Poolman, B, Hvorup, RN, Locher, KP et DC Rees (2005) *In vitro* functional characterization of BtuCD-F, the *Escherichia coli* ABC transporter for vitamin B12 uptake. *Biochemistry*, **44**, 16301-16309.

Bosch, G, Skovran, E, Xia, Q, Wang, T, Taub, F, Miller, JA, Lidstrom, ME et M Hackett (2008) Comprehensive proteomics of *Methylobacterium extorquens* AM1 metabolism under single carbon and nonmethylotrophic conditions. *Proteomics*, **8**, 3494-3505.

Bradbeer, C (1993) The proton motive force drives the outer membrane transport of cobalamin in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **175**, 3146-3150.

Burke, SA et JA Krzycki (1995) Involvement of the "A" isozyme of methyltransferase II and the 29-kilodalton corrinoid protein in methanogenesis from monomethylamine. *J Bacteriol*, **177**, 4410-4416.

Cadieux, N, Bradbeer, C, Reeger-Schneider, E, Köster, W, Mohanty, AK, Wiener, MC et RJ Kadner (2002) Identification of the periplasmic cobalamin-binding protein BtuF of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **184**, 706-717.

Campbell, GRO, Taga, ME, Mistry, K, Lloret, J, Anderson, PJ, Roth, JR et GC Walker (2006) *Sinorhizobium meliloti* *bluB* is necessary for production of 5,6-dimethylbenzimidazole, the lower ligand of B12. *P Natl Acad Sci USA*, **103**, 4634-4639.

Casadaban, MJ et SN Cohen (1980) Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, **138**, 179–207.

Cevallos, M, Cervantes-Rivera, R et R Gutierrez-Rios (2008) The *repABC* plasmid family. *Plasmid*, **60**, 19-37.

Cherezov, V, Yamashita, E, Liu, W, Zhahnina, M, Cramer, WA et M Caffrey (2006) *In meso* structure of the cobalamin transporter, BtuB, at 1.95 Å resolution. *J Mol Biol*, **364**, 716-734.

Chistoserdov, AY, Chistoserdova, LV, McIntire, WS et ME Lidstrom (1994) Genetic organization of the *mau* gene cluster in *Methylobacterium extorquens* AM1: complete nucleotide sequence and generation and characteristics of *mau* mutants. *J Bacteriol*, **176**, 4052-4065.

Chistoserdova, LV et ME Lidstrom (1994) Genetics of the serine cycle in *Methylobacterium extorquens* AM1: cloning, sequence, mutation, and physiological effect of *glyA*, the gene for serine hydroxymethyltransferase. *J Bacteriol*, **176**, 6759-6762.

Chistoserdova, LV et ME Lidstrom (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, JA, Thauer, RK et ME Lidstrom (1998) C1 transfer enzymes and coenzymes linking methylotrophic bacteria and methanogenic *Archaea*. *Science*, **281**, 99-102.

Chistoserdova, L, Chen, SW et A Lapidus (2003) Methylotrophy in *Methylobacterium extorquens* AM1 from a genomic point of view. *J Bacteriol*, **185**, 2980-2987.

Chistoserdova, L, Kalyuzhnaya, MG et ME Lidstrom (2005) C1 transfer modules: from genomics to ecology. *ASM News*, **71**, 521-528.

Chistoserdova, L, Kalyuzhnaya, MG et ME Lidstrom (2009) The expanding world of methylotrophic metabolism. *Annu Rev Microbiol*, **63**, 477-499.

Coulter, C, Hamilton, JTG, McRoberts, WC, Kulakov, L, Larkin, MJ et DB Harper (1999) Halomethane:bisulfide/halide ion methyltransferase, an unusual corrinoid enzyme of environmental significance isolated from an aerobic methylotroph using chloromethane as the sole carbon source. *Appl Environ Microbiol*, **65**, 4301-4312.

Crowther, GJ, Kosaly, G et ME Lidstrom (2008) Formate as the main branch point for methylotrophic metabolism in *Methylobacterium extorquens* AM1. *J Bacteriol*, **190**, 5057-5062.

D'Aubenton-Carafa, Y, Brody, E et C Thermes (1990) Prediction of rho-independent *Escherichia coli* transcription terminators. A statistical analysis of their RNA stem-loop structures. *J Mol Biol*, **216**, 835-58.

Danilova, IV, Doronina, NV, Trotsenko, YA, Netrusov, AI et EP Ryzhkova (2004) The aeration-dependent effect of vitamin B-12 on DNA biosynthesis in *Methylobacterium dichloromethanicum*. *Microbiology*, **73**, 134-138.

De Crécy-Lagard, V, El Yacoubi, B, de la Garza, RD, Noiriel, A et AD Hanson (2007) Comparative genomics of bacterial and plant folate synthesis and salvage: predictions and validations. *BMC Genomics*, **8**, 245.

De Marco, P (2004) Methylotrophy versus heterotrophy: a misconception. *Microbiology*, **150**, 1606-1607.

De Saizieu, A, Vankan, P et AP van Loon (1995) Enzymic characterization of *Bacillus subtilis* GTP cyclohydrolase I. Evidence for a chemical dephosphorylation of dihydroneopterin triphosphate. *Biochem J*, **306**, 371-377.

Bibliographie

- Debussche, L, Couder, M, Thibaut, D, Cameron, B, Crouzet, J et F Blanche (1992) Assay, purification, and characterization of cobaltochelatase, a unique complex enzyme catalyzing cobalt insertion in hydrogenobyrinic acid a,c-diamide during coenzyme B12 biosynthesis in *Pseudomonas denitrificans*. *J Bacteriol*, **174**, 7445-7451.
- Delmotte, N, Knief, C, Chaffron, S, Innerebner, G, Roschitzki, B, Schlapbach, R, von Mering, C et JA Vorholt (2009) Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. *P Natl Acad Sci USA*, **106**, 16428-16433.
- DeVeaux, LC et RJ Kadner (1985) Transport of vitamin B12 in *Escherichia coli*: cloning of the btuCD region. *J Bacteriol*, **162**, 888-896.
- Dimmer, CH, Simmonds, PG, Nickless, G et MR Bassford (2001) Biogenic fluxes of halomethanes from Irish peatland ecosystems. *Atmos Environ*, **35**, 321-330.
- Doronina, NV, Sokolov, A et YA Trotsenko (1996) Isolation and initial characterization of aerobic chloromethane-utilizing bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, **142**, 179-183.
- Drummond, JT, Huang, S, Blumenthal, RM et RG Matthews (1993) Assignment of enzymatic function to specific protein regions of cobalamin-dependent methionine synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **32**, 9290-9295.
- Eick-Helmerich, K et V Braun (1989) Import of biopolymers into *Escherichia coli*: nucleotide sequences of the *exbB* and *exbD* genes are homologous to those of the *tolQ* and *tolR* genes, respectively. *J Bacteriol*, **171**, 5117-5126.
- Ensign, SA (2006) Revisiting the glyoxylate cycle: alternate pathways for microbial acetate assimilation. *Mol Microbiol*, **61**, 274-276.
- Erb, TJ, Berg, IA, Brecht, V, Müller, M, Fuchs, G et BE Alber (2007) Synthesis of C5-dicarboxylic acids from C2-units involving crotonyl-CoA carboxylase/reductase: the ethylmalonyl-CoA pathway. *P Natl Acad Sci USA*, **104**, 10631-10636.
- Erb, TJ, Rétey, J, Fuchs, G et BE Alber (2008) Ethylmalonyl-CoA mutase from *Rhodobacter sphaeroides* defines a new subclade of coenzyme B12-dependent acyl-CoA mutases. *J Biol Chem*, **283**, 32283-32293.
- Eshaghi, S, Niegowski, D, Kohl, A, Martinez Molina, D, Lesley, SA et P Nordlund (2006) Crystal structure of a divalent metal ion transporter CorA at 2.9 angstrom resolution. *Science*, **5785**, 354-357.
- Feldman, MY (1973) Reactions of nucleic acids and nucleoproteins with formaldehyde. *Prog Nucleic Acid Re*, **13**, 1-49.
- Ferguson, AD, Amezcua, CA, Halabi, NM, Chelliah, Y, Rosen, MK, Ranganathan, R et J Deisenhofer (2007) Signal transduction pathway of TonB-dependent transporters. *P Natl Acad Sci USA*, **104**, 513-518.

- Ferguson, T, Soares, JA, Lienard, T, Gottschalk, G et JA Krzycki (2009) RamA, a protein required for reductive activation of corrinoid-dependent methylamine methyltransferase reactions in methanogenic Archaea. *J Biol Chem*, **284**, 2285-2295.
- Ferrández, A, Miñambres, B, García, B, Olivera, ER, Luengo, JM, García, JL et E Díaz (1998) Catabolism of phenylacetic acid in *Escherichia coli*. Characterization of a new aerobic hybrid pathway. *J Biol Chem*, **273**, 25974-25986.
- Ferry, JG (1992a) Biochemistry of methanogenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **27**, 473-503.
- Ferry, JG (1992b) Methane from acetate. *J Bacteriol*, **174**, 5489-5495.
- Figueira, MM, Laramée, L, Murrell, JC, Groleau, D et CB Miguez (2000) Production of green fluorescent protein by the methylotrophic bacterium *Methylobacterium extorquens*. *FEMS Microbiol Lett*, **193**, 195-200.
- Freedman, D, Swamy, M, Bell, N et M Verce (2004) Biodegradation of chloromethane by *Pseudomonas aeruginosa* strain NB1 under nitrate-reducing and aerobic conditions. *Appl Environ Microbiol*, **70**, 4629-4634.
- Gabelli, SB, Bianchet, MA, Xu, W, Dunn, CA, Niu, Z, Amzel, LM et MJ Bessman (2007) Structure and function of the *E. coli* dihydroneopterin triphosphate pyrophosphatase: a nudix enzyme involved in folate biosynthesis. *Structure*, **15**, 1014-1022.
- Galbally, IE et W Kirstine (2002) The production of methanol by flowering plants and the global cycle of methanol. *J Atmos Chem*, **43**, 195-229.
- Gaudu, P et D Weiss (2000) Flavodoxin Mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, **182**, 1788-1793.
- Gebhardt, S, Colomb, A, Hofmann, R, Williams, J et J Lelieveld (2008) Halogenated organic species over the tropical rainforest. *Atmos chem phys*, **8**, 3185-3197.
- Goldberg, M, Pribyl, T, Juhnke, S et DH Nies (1999) Energetics and topology of CzcA, a cation/proton antiporter of the resistance-nodulation-cell division protein family. *J Biol Chem*, **274**, 26065-26070.
- Gomelsky, M et G Klug (2002) BLUF: a novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms. *Trends Biochem Sci*, **27**, 497-500.
- Goodwin, K, Lidstrom, ME et RS Oremland (1997) Marine bacterial degradation of brominated methanes. *Environ Sci Technol*, **31**, 3188-3192.
- Gossett, JM (1987) Measurement of Henry's law constants for C1 and C2 chlorinated hydrocarbons. *Environ Sci Technol*, **21**, 202-208.
- Grafstrom, RC, Fornace, AJ, Autrup, H, Lechner, JF et CC Harris (1983) Formaldehyde damage to DNA and inhibition of DNA repair in human bronchial cells. *Science*, **220**, 216-218.

Bibliographie

- Green, JM, Merkel, WK et BP Nichols (1992) Characterization and sequence of *Escherichia coli pabC*, the gene encoding aminodeoxychorismate lyase, a pyridoxal phosphate-containing enzyme. *J Bacteriol*, **174**, 5317-5323.
- Gribble, G (2003) The diversity of naturally produced organohalogens. *Chemosphere*, **52**, 289-297.
- Grossman, AS, Grant, KE et DJ Wuebbles (1994) *Radiative forcing calculations for CH₃Cl*. Livermore, CA, Lawrence Livermore National Laboratory (UCLR-ID-118065).
- Guo, X et ME Lidstrom (2008) Metabolite profiling analysis of *Methylobacterium extorquens* AM1 by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. *Biotechnol Bioeng*, **99**, 929-940.
- Hagemeyer, C, Chistoserdova, L, Lidstrom, ME, Thauer, RK et JA Vorholt (2000) Characterization of a second methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* AM1. *Eur J Biochem*, **267**, 3762-3769.
- Hakemian, AS et AC Rosenzweig (2007) The biochemistry of methane oxidation. *Annu Rev Biochem*, **73**, 223-241.
- Hamilton, J, McRoberts, W, Keppler, F, Kalin, R et DB Harper (2003) Chloride methylation by plant pectin: An efficient environmentally significant process. *Science*, **301**, 206-209.
- Han, JI et JD Semrau (2000) Chloromethane stimulates growth of *Methylobacterium album* BG8 on methanol. *FEMS Microbiol Lett*, **187**, 77-81.
- Hanson, RS et TE Hanson (1996) Methanotrophic bacteria. *Microbiol Rev*, **60**, 439-471.
- Harper, DB, Harvey, B, Jeffers, M et J Kennedy (1999) Emissions, biogenesis and metabolic utilization of chloromethane by tubers of the potato (*Solanum tuberosum*). *New Phytol*, **142**, 5-17.
- Harper, DB (2000) The global chloromethane cycle: biosynthesis, biodegradation and metabolic role. *Nat Prod Rep*, **17**, 337-348.
- Hartmans, S, Schmucke, A, Cook, AM et T Leisinger (1986) Methyl chloride: naturally occurring toxicant and C-1 growth substrate. *Microbiology*, **132**, 1139-1142.
- Heldt, D, Lawrence, AD, Lindenmeyer, M, Deery, E, Heathcote, P, Rigby, SE et MJ Warren (2005) Aerobic synthesis of vitamin B12: ring contraction and cobalt chelation. *Biochem Soc Trans*, **33**, 815-819.
- Heller, K, Mann, BJ et RJ Kadner (1985) Cloning and expression of the gene for the vitamin B12 receptor protein in the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **161**, 896-903.
- Hoffmann, B, Oberhuber, M, Stupperich, E, Bothe, H, Buckel, W, Konrat, R et B Kräutler (2000) Native corrinoids from *Clostridium cochlearium* are adeninylcobamides: spectroscopic analysis and identification of pseudovitamin B(12) and factor A. *J Bacteriol*, **182**, 4773-4782.

Höllriegel, V, Lamm, L, Rowold, J, Hörig, J et P Renz (1982) Biosynthesis of vitamin B12. Different pathways in some aerobic and anaerobic microorganisms. *Arch Microbiol*, **132**, 155-158.

Ivanova, E, Doronina, NV, Shepelyakovskaya, A, Laman, A, Brovko, F et YA Trotsenko (2000) Facultative and obligate aerobic methylobacteria synthesize cytokinins. *Microbiology*, **69**, 646-651.

Ivanova, E, Doronina, NV et YA Trotsenko (2001) Aerobic methylobacteria are capable of synthesizing auxins. *Microbiology*, **70**, 392-397.

Ivanova, EG, Fedorov, DN, Doronina, NV et YA Trotsenko (2006) [Production of vitamin B12 in aerobic methylotrophic bacteria]. *Mikrobiologiya*, **75**, 570-572.

Jacobs, MA, Alwood, A, Thaipisuttikul, I, Spencer, D, Haugen, E, Ernst, S, Will, O, Kaul, R, Raymond, C, Levy, R, Chun-Rong, L, Guenther, D, Bovee, D, Olson, MV et C Manoil (2003) Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *P Natl Acad Sci USA*, **100**, 14339-14344.

Jarrett, JT, Hoover, DM, Ludwig, ML et RG Matthews (1998) The mechanism of adenosylmethionine-dependent activation of methionine synthase: a rapid kinetic analysis of intermediates in reductive methylation of Cob(II)alamin enzyme. *Biochemistry*, **37**, 12649-12658.

Jin, Y, Watt, RM, Danchin, A et J Huang (2009) Small noncoding RNA GcvB is a novel regulator of acid resistance in *Escherichia coli*. *BMC Genomics*, **10**, 165.

Jordan, PM (1991) Chapter 1 The biosynthesis of 5-aminolaevulinic acid and its transformation into uroporphyrinogen III. Dans, "*Biosynthesis of Tetrapyrroles*". Elsevier, pp. 1-66.

Jörg, G et M Bertau (2004) Thiol-tolerant assay for quantitative colorimetric determination of chloride released from whole-cell biodehalogenations. *Anal Biochem*, **328**, 22-28.

Juhas, M, van der Meer, J, Gaillard, M, Harding, R, Hood, D et D Crook (2009) Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol Rev*, **33**, 376-393.

Kalyuzhnaya, MG et ME Lidstrom (2003) QscR, a LysR-type transcriptional regulator and CbbR homolog, is involved in regulation of the serine cycle genes in *Methylobacterium extorquens* AM1. *J Bacteriol*, **185**, 1229-1235.

Kalyuzhnaya, MG et ME Lidstrom (2005) QscR-mediated transcriptional activation of serine cycle genes in *Methylobacterium extorquens* AM1. *J Bacteriol*, **187**, 7511-7517.

Kato, Y, Asahara, M, Arai, D, Goto, K et A Yokota (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*. *J Gen Appl Microbiol*, **51**, 287-299.

Bibliographie

- Kayser, MF, Ucurum, Z et S Vuilleumier (2002) Dichloromethane metabolism and C1 utilization genes in *Methylobacterium* strains. *Microbiology*, **148**, 1915-1922.
- Keck, B et P Renz (2000) *Salmonella typhimurium* forms adenylobamide and 2-methyladenylobamide, but no detectable cobalamin during strictly anaerobic growth. *Arch Microbiol*, **173**, 76-77.
- Keltjens, JT et GD Vogels (1993) Conversion of methanol and methylamines to methane and carbon dioxide. Dans, "*Methanogenesis-Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics*", Chapman & Hall, New-York, pp 253-303.
- Keppler, F, Kalin, RM, Harper, DB, McRoberts, WC et J Hamilton (2004) Carbon isotope anomaly in the major plant C1 pool and its global biogeochemical implications. *Biogeosciences*, **1**, 123-131.
- Khalil, M et R Rasmussen (1999) Atmospheric methyl chloride. *Atmos Environ*, **33**, 1305-1321.
- Kiefer, P, Portais, J et JA Vorholt (2008) Quantitative metabolome analysis using liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Anal Biochem*, **382**, 94-100.
- Kikuchi, G, Motokawa, Y, Yoshida, T et K Hiraga (2008) Glycine cleavage system: reaction mechanism, physiological significance, and hyperglycinemia. *P Jpn Acad B-Phys*, **84**, 246-263.
- Kiley, PJ et H Beinert (2003) The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol*, **6**, 181-185.
- Kinkel, L (1997) Microbial population dynamics on leaves. *Ann Rev Phytopathol*, **35**, 327-347.
- Klaus, SMJ, Wegkamp, A, Sybesma, W, Hugenholtz, J, Gregory, JF et AD Hanson (2005) A nudix enzyme removes pyrophosphate from dihydroneopterin triphosphate in the folate synthesis pathway of bacteria and plants. *J Biol Chem*, **280**, 5274-5280.
- Knief, C, Frances, L, Cantet, F et JA Vorholt (2008) Cultivation-independent characterization of *Methylobacterium* populations in the plant phyllosphere by automated ribosomal intergenic spacer analysis. *Appl Environ Microbiol*, **74**, 2218-2228.
- Kolb, S (2009) Aerobic methanol-oxidizing bacteria in soil. *FEMS Microbiol Lett*, **300**, 1-10.
- Koppmann, R, Johnen, FJ, Plass-Dülmer, C et J Rudolph (1993) Distribution of methylchloride, dichloromethane, trichloroethene and tetrachloroethene over the North and South Atlantic. *J Geophys Res-Atmos*, **98**(D11), 517-526.
- Korotkova, N, Chistoserdova, L, Kuksa, V et ME Lidstrom (2002a) Glyoxylate regeneration pathway in the methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1. *J Bacteriol*, **184**, 1750-1758.

- Korotkova, N, Chistoserdova, L et ME Lidstrom (2002b) Poly-beta-hydroxybutyrate biosynthesis in the facultative methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1: identification and mutation of *gap11*, *gap20*, and *phaR*. *J Bacteriol*, **184**, 6174-6181.
- Korotkova, N et ME Lidstrom (2004) MeaB is a component of the methylmalonyl-CoA mutase complex required for protection of the enzyme from inactivation. *J Biol Chem*, **279**, 13652-13658.
- Krzycki, JA (2004) Function of genetically encoded pyrrolysine in corrinoid-dependent methylamine methyltransferases. *Curr Opin Chem Biol*, **8**, 484-491.
- Kurylo, MJ et J Rodríguez (1999) Short-lived ozone-related compounds. Chapter 2 in *Scientific Assessment of Ozone Depletion: 1998, Global Ozone Research and Monitoring Project—Report No. 44*, World Meteorological Organization, Geneva.
- Lakdawalla, A et H Vansteenuwe (2008) Chapter 2, Illumina Genome Analyzer II System. Dans "Next Generation Genome Sequencing", M. Janitz ed., pp. 13-28.
- Large, PJ, Peel, D et JR Quayle (1961) Microbial growth on C1 compounds. II. Synthesis of cell constituents by methanol- and formate-grown *Pseudomonas* AM1, and methanol-grown *Hyphomicrobium vulgare*. *Biochem J*, **81**, 470-480.
- Laukel, M, Rossignol, M, Borderies, G, Völker, U et JA Vorholt (2004) Comparison of the proteome of *Methylobacterium extorquens* AM1 grown under methylotrophic and nonmethylotrophic conditions. *Proteomics*, **4**, 1247-1264.
- Lee-Taylor, JM, Brasseur, GP et Y Yokouchi (2001) A preliminary three-dimensional global model study of atmospheric methyl chloride distributions. *J Geophys Res-Atmos*, **106**(D24), 221-233.
- Lequette, Y, Odberg-Ferragut, C, Bohin, J et J Lacroix (2004) Identification of *mdoD*, an *mdoG* paralog which encodes a twin-arginine-dependent periplasmic protein that controls osmoregulated periplasmic glucan backbone structures. *J Bacteriol*, **186**, 3695-3702.
- Li, L, Stoeckert, CJ Jr et DS Roos. (2003) OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Res*, **13**, 2178-89.
- Lidstrom, ME et L Chistoserdova (2002) Plants in the pink: Cytokinin production by *Methylobacterium*. *J Bacteriol*, **184**, 1818-1818
- Lidstrom, ME (2006) Aerobic methylotrophic prokaryotes. *The Prokaryotes*, **2**, 618-634.
- Lindow, S et M Brandl (2003) Microbiology of the phyllosphere. *Appl Environ Microbiol*, **69**, 1875-1883.
- Ljungdahl, L et H Wood (1982) Acetate biosynthesis. Dans, "B12". ed. D Dolphin, New-York: Wiley, pp 165-202.

- Lobert, JM, Keene, WC, Logan, JA et R Yevich (1999) Global chlorine emissions from biomass burning: Reactive chlorine emissions inventory. *J Geophys Res-Atmos*, **104**(D7), 8373-8389.
- Lunin, VV, Dobrovetsky, E, Khutoreskaya, G, Zhang, R, Joachimiak, A, Doyle, DA, Bochkarev, A, Maguire, ME, Edwards, AM et CM Koth (2006) Crystal structure of the CorA Mg²⁺ transporter. *Nature*, **440**, 833-837.
- MacLean, D, Jones, J et D Studholme (2009) Application of "next-generation" sequencing technologies to microbial genetics. *Nature Rev Microbiol*, **7**, 287-296.
- Maden, BE (2000) Tetrahydrofolate and tetrahydromethanopterin compared: functionally distinct carriers in C1 metabolism. *Biochem J*, **350**, 609-629.
- Madhaiyan, M, Poonguzhali, S, Kwon, S-W et T-M Sa (2009) *Methylobacterium phyllosphaerae* sp. nov., a pink-pigmented, facultative methylotroph from the phyllosphere of rice. *Int J Syst Evol Microbiol*, **59**, 22-27.
- Madigan, M et J Martinko (2007) Brock, Biologie des micro-organismes (11e éd., trad. Prieur D.), Pearson Education France, Paris, France, pp 1200.
- Marison, IW et MM Attwood (1982) A possible alternative mechanism of the oxidation of formaldehyde to formate. *J Gen Microbiol*, **128**, 1441-1446
- Marx, CJ et ME Lidstrom (2001) Development of improved versatile broad-host-range vectors for use in methylotrophs and other Gram-negative bacteria. *Microbiology*, **147**, 2065-2075.
- Marx, CJ, Chistoserdova, L et ME Lidstrom (2003a) Formaldehyde-detoxifying role of the tetrahydromethanopterin-linked pathway in *Methylobacterium extorquens* AM1. *J Bacteriol*, **185**, 7160-7168.
- Marx, CJ, O'Brien, B, Breezee, J et ME Lidstrom (2003b) Novel methylotrophy genes of *Methylobacterium extorquens* AM1 identified by using transposon mutagenesis including a putative dihydromethanopterin reductase. *J Bacteriol*, **185**, 669-673.
- Marx, CJ, Laukel, M, Vorholt, JA et ME Lidstrom (2003c) Purification of the Formate-tetrahydrofolate ligase from *Methylobacterium extorquens* AM1 and demonstration of its requirement for methylotrophic growth. *J Bacteriol*, **185**, 7160-7168.
- Marx, CJ et ME Lidstrom (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, CJ, Van Dien, SJ et ME Lidstrom (2005) Flux analysis uncovers key role of functional redundancy in formaldehyde metabolism. *PLoS Biol*, **3**, e16.
- Marx, CJ (2008) Development of a broad-host-range *sacB*-based vector for unmarked allelic exchange. *BMC Res Notes*, **1**, 1.

- Matthews, RG (2001) Cobalamin-dependent methyltransferases. *Acc Chem Res*, **34**, 681-689.
- Maxam, AM et W Gilbert (1977) A new method for sequencing DNA. *P Natl Acad Sci USA*, **74**, 560.
- McAnulla, C, McDonald, IR et JC Murrell (2001a) Methyl chloride utilising bacteria are ubiquitous in the natural environment. *FEMS Microbiol Lett*, **201**, 151-155.
- McAnulla, C, Woodall, C, McDonald, IR, Studer, A, Vuilleumier, S, Leisinger, T et JC Murrell (2001b) Chloromethane utilization gene cluster from *Hyphomicrobium chloromethanicum* strain CM2 and development of functional gene probes to detect halomethane-degrading bacteria. *Appl Environ Microbiol*, **67**, 307-316.
- McCulloch, A (2003) Chloroform in the environment: occurrence, sources, sinks and effects. *Chemosphere*, **50**, 1291-1308.
- McDonald, IR, Doronina, NV, Trotsenko, YA, McAnulla, C et JC Murrell (2001) *Hyphomicrobium chloromethanicum* sp. nov. and *Methylobacterium chloromethanicum* sp. nov., chloromethane-utilizing bacteria isolated from a polluted environment. *Int J Syst Evol Microbiol*, **51**, 119.
- McDonald, IR, Warner, K, McAnulla, C, Woodall, C, Oremland, RS et JC Murrell (2002) A review of bacterial methyl halide degradation: biochemistry, genetics and molecular ecology. *Environ Microbiol*, **4**, 193-203.
- Messmer, M, Wohlfarth, G et G Diekert (1993) Methyl chloride metabolism of the strictly anaerobic, methyl chloride-utilizing homoacetogen strain MC. *Arch Microbiol*, **160**, 383-387.
- Miller, L, Connell, G, Guidetti, J et RS Oremland (1997) Bacterial oxidation of methyl bromide in fumigated agricultural soils. *Appl Environ Microbiol*, **63**, 4346-4354.
- Miller, L, Warner, G, Baesman, S, Oremland, RS, McDonald, IR, Radajewski, S et JC Murrell (2004) Degradation of methyl bromide and methyl chloride in soil microcosms: use of stable C isotope fractionation and stable isotope probing to identify reactions and the responsible microorganisms. *Geochim Cosmochim Acta*, **68**, 3271-3283.
- Misra, R et VN Bavro (2009) Assembly and transport mechanism of tripartite drug efflux systems. *Biochim Biophys Acta*, **1794**, 817-825.
- Miyamoto, E, Tanioka, Y, Nakao, T, Barla, F, Inui, H, Fujita, T, Watanabe, F et Y Nakano (2006) Purification and characterization of a corrinoid-compound in an edible cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* as a nutritional supplementary food. *J Agric Food Chem*, **54**, 9604-9607.
- Moeck, GS et JW Coulton (1998) TonB-dependent iron acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport. *Mol Microbiol*, **28**, 675-681.
- Montzka, SA, Butler, JH, Myers, RC, Thompson, TM, Swanson, TH, Clarke, AD, Lock, LT et JW Elkins (1996) Decline in the tropospheric abundance of halogen from halocarbons: implications for stratospheric ozone depletion. *Science*, **272**, 1318-1322.

Bibliographie

- Montzka, SA et LP Fraser (2003) Controlled substances and other source gases, Dans "*Scientific assessment of ozone depletion: 2002*", Chap. 1, 1.1-1.83, World Meteorol. Org.
- Moore, RM, Groszko, W et SJ Niven (1996) Ocean-atmosphere exchange of methyl chloride: results from NW Atlantic and Pacific Ocean studies. *J Geophys Res-Oc*, **101**(C12), 529-538.
- Moore, RM, Gut, A et MO Andreae (2005) A pilot study of methyl chloride emissions from tropical woodrot fungi. *Chemosphere*, **58**, 221-225.
- Murata, T, Bognar, AL, Hayashi, T, Ohnishi, M, Nakayama, K et Y Terawaki (2000) Molecular analysis of the *folC* gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Immunol*, **44**, 879-86.
- Myneni, SCB (2002) Formation of stable chlorinated hydrocarbons in weathering plant material. *Science*, **295**, 1039-1041.
- Nagatoshi, Y et T Nakamura (2009) *Arabidopsis* harmless to ozone layer protein methylates a glucosinolate breakdown product and functions in resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*. *J Biol Chem*, **284**, 19301-19309.
- Nahvi, A, Barrick, JE et RR Breaker (2004) Coenzyme B12 riboswitches are widespread genetic control elements in prokaryotes. *Nucleic Acids Res*, **32**, 143-150.
- Nelson, DL et EP Kennedy (1971) Magnesium transport in *Escherichia coli*. Inhibition by cobaltous ion. *J Biol Chem*, **246**, 3042-3049.
- Nemecek-Marshall, M, MacDonald, RC, Franzen, JJ, Wojciechowski, CL et R Fall (1995) Methanol emission from leaves (enzymatic detection of gas-phase and relation of methanol fluxes to stomatal conductance and leaf development). *Plant Physiol*, **108**, 1359-1368.
- Niegowski, D et S Eshaghi (2007) The *CorA* family: structure and function revisited. *Cell Mol Life Sci*, **64**, 2564-2574.
- Niinemets, U, Loreto, F et M Reichstein (2004) Physiological and physicochemical controls on foliar volatile organic compound emissions. *Trends Plant Sci*, **9**, 180-186.
- O'Doherty, S, Simmonds, PG, Cunnold, DM, Wang, HJ, Sturrock, GA, Fraser, PJ, Ryall, D, Derwent, RG, Weiss, RF, Salameh, P, Miller, BR et RG Prinn (2001) *In situ* chloroform measurements at Advanced Global Atmospheric Gases Experiment atmospheric research stations from 1994 to 1998. *J Geophys Res-Atmos*, **106**, 20429-20444.
- Obradors, N, Badia, J, Baldoma, L et J Aguilar (1988) Anaerobic metabolism of the L-rhamnose fermentation product 1, 2-propanediol in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, **170**, 2159-2162.
- Okubo, Y, Skovran, E, Guo, X, Sivam, D et ME Lidstrom (2007) Implementation of microarrays for *Methylobacterium extorquens* AM1. *OMICS*, **11**, 325-340.

- Omer, ZS, Tombolini, R et B Gerhardson (2004) Plant colonization by pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria (PPFMs). *FEMS Microbiol Ecol*, **47**, 319-326.
- Padovani, D et R Banerjee (2009) A rotary mechanism for coenzyme B12 synthesis by adenosyltransferase. *Biochemistry*, **48**, 5350-5357.
- Pandey, V, Nutter RC et E Prediger (2008) Chapter 3, Applied Biosystems SOLiDTM System: Ligation-Based Sequencing. Dans “*Next Generation Genome Sequencing*” M. Janitz ed., pp. 29-42.
- Pariset, L, Chillemi, G, Bongiorno, S, Spica, VR et A Valentini (2009) Microarrays and high-throughput transcriptomic analysis in species with incomplete availability of genomic sequences. *N Biotechnol*, **25**, 272-279.
- Peyraud, R, Kiefer, P, Christen, P, Massou, S, Portais, J et JA Vorholt (2009) Demonstration of the ethylmalonyl-CoA pathway by using ¹³C metabolomics. *P Natl Acad Sci USA*, **106**, 4846-4851.
- Pirttilä, A, Laukkanen, H, Pospiech, H, Myllylä, R et A Hohtola (2000) Detection of intracellular bacteria in the buds of Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) by *in situ* hybridization. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 3073-3077.
- Pomper, B, Vorholt, JA, Chistoserdova, L, Lidstrom, ME et RK Thauer (1999) A methenyl tetrahydromethanopterin cyclohydrolase and a methenyl tetrahydrofolate cyclohydrolase in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Eur J Biochem*, **261**, 475-480.
- Pomper, B et JA Vorholt (2001) Characterization of the formyltransferase from *Methylobacterium extorquens* AM1. *Eur J Biochem*, **268**, 4769-4775.
- Pomper, BK, Saurel, O, Milon, A et JA Vorholt (2002) Generation of formate by the formyltransferase/hydrolase complex (Fhc) from *Methylobacterium extorquens* AM1. *FEBS Lett*, **523**, 133-137.
- Postle, K et RJ Kadner (2003) Touch and go: tying TonB to transport. *Mol Microbiol*, **49**, 869-882.
- Postle, K et RA Larsen (2007) TonB-dependent energy transduction between outer and cytoplasmic membranes. *Biometals*, **20**, 453-465.
- Prinn, RG, Weiss, RF, Fraser, PJ, Simmonds, PG, Cunnold, DM, Alyea, FN, O’Doherty, S, Salameh, P, Miller, BR, Huang, J, Wang, RHJ, Hartley, DE, Harth, C, Steele, LP, Sturrock, G, Midgley, PM et A McCulloch (2000) A history of chemically and radiatively important gases in air deduced from ALE/GAGE/AGAGE. *J Geophys Res*, **105**, 17751-17792.
- Quayle, JR (1963) The assimilation of 1-C compounds. *J Gen Microbiol*, **32**, 163-166.
- Rabilloud, T, Strub, JM, Luche, S, van Dorselaer, A et J Lunardi (2001) A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics*, **1**, 699-704.

Bibliographie

- Ragsdale, SW (1991) Enzymology of the acetyl-CoA pathway of CO₂ fixation. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **26**, 261-300.
- Rainey, FA, Ward-Rainey, N, Gliesche, CG et E Stackebrandt (1998) Phylogenetic analysis and intrageneric structure of the genus *Hyphomicrobium* and the related genus *Filomicrobium*. *Int J Syst Bacteriol*, **48**, 635-639.
- Raja, P, Balachandar, D et S Sundaram (2008) Genetic diversity and phylogeny of pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria isolated from the phyllosphere of tropical crop plants. *Biol Fert Soils*, **45**, 45-53.
- Ranquet, C, Ollagnier-de-Choudens, S, Loiseau, L, Barras, F et M Fontecave (2007) Cobalt stress in *Escherichia coli*. The effect on the iron-sulfur proteins. *J Biol Chem*, **282**, 30442-30451.
- Raux, E, Thermes, C, Heathcote, P, Rambach, A et MJ Warren (1997) A role for *Salmonella typhimurium* *cbiK* in cobalamin (Vitamin B-12) and siroheme biosynthesis. *J Bacteriol*, **10**, 3202-3210.
- Raux, E, Lanois, A, Warren, MJ, Rambach, A et C Thermes (1998) Cobalamin (vitamin B12) biosynthesis: identification and characterization of a *Bacillus megaterium* *cobI* operon. *Biochem J*, **335**, 159-166.
- Raux, E, Schubert, HL et MJ Warren (2000) Biosynthesis of cobalamin (vitamin B12): a bacterial conundrum. *Cell Mol Life Sci*, **57**, 1880-1893.
- Raux, E, Leech, HK, Beck, R, Schubert, HL, Santander, PJ, Roessner, CA, Scott, AI, Martens, JH, Jahn, D, Thermes, C, Rambach, A et MJ Warren (2003) Identification and functional analysis of enzymes required for precorrin-2 dehydrogenation and metal ion insertion in the biosynthesis of sirohaem and cobalamin in *Bacillus megaterium*. *Biochem J*, **370**, 505-516.
- Renz, P (1970) Riboflavin as precursor in the biosynthesis of the 5,6-dimethylbenzimidazole-moiety of vitamin B(12). *FEBS Lett*, **6**, 187-189.
- Rhew, RC, Miller, B et R Weiss (2000) Natural methyl bromide and methyl chloride emissions from coastal salt marshes. *Nature*, **403**, 292-295.
- Rhew, RC, Miller, B, Bill, M, Goldstein, A et R Weiss (2002) Environmental and biological controls on methyl halide emissions from southern California coastal salt marshes. *Biogeochemistry*, **60**, 141-161.
- Rhew, RC, Ostergaard, L, Saltzman, E et M Yanofsky (2003) Genetic control of methyl halide production in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, **13**, 1809-1813.
- Rhew, RC et T Abel (2007) Measuring simultaneous production and consumption fluxes of methyl chloride and methyl bromide in annual temperate grasslands. *Environ Sci Technol*, **41**, 7837-7843.

Robbins, DE (1976) Photodissociation of methyl chloride and methyl bromide in the atmosphere. *Geophys Res Lett*, **3**, 213–216.

Rodionov, DA, Vitreschak, A, Mironov, AA et MS Gelfand (2003) Comparative genomics of the vitamin B12 metabolism and regulation in prokaryotes. *J Biol Chem*, **278**, 41148-41159.

Roessner, CA, Huang, K-X, Warren, MJ, Raux, E et AI Scott (2002) Isolation and characterization of 14 additional genes specifying the anaerobic biosynthesis of cobalamin (vitamin B12) in *Propionibacterium freudenreichii* (*P. shermanii*). *Microbiology*, **148**, 1845-1853.

Roessner, CA, Williams, HJ et AI Scott (2005) Genetically engineered production of 1-desmethylcobyrinic acid, 1-desmethylcobyrinic acid a,c-diamide, and cobyrinic acid a,c-diamide in *Escherichia coli* implies a role for CbiD in C-1 methylation in the anaerobic pathway to cobalamin. *J Biol Chem*, **280**, 16748-16753.

Roth, JR, Lawrence, JG, Rubenfield, M, Kieffer-Higgins, S et GM Church (1993) Characterization of the cobalamin (vitamin B12) biosynthetic genes of *Salmonella typhimurium*. *J bacteriol*, **175**, 3303.

Roth, JR, Lawrence, JG et TA Bobik (1996) Cobalamin (coenzyme B12): synthesis and biological significance. *Annu Rev Microbiol*, **50**, 137-181.

Saito, T et Y Yokouchi (2006) Diurnal variation in methyl halide emission rates from tropical ferns. *Atmos Environ*, **40**, 2806–2811.

Saito, T et Y Yokouchi (2008) Stable carbon isotope ratio of methyl chloride emitted from glasshouse-grown tropical plants and its implication for the global methyl chloride budget. *Geophys Res Lett*, **35**, L08807.

Saito, T, Yokouchi, Y, Kosugi, Y, Tani, M, Philip, E et T Okuda (2008) Methyl chloride and isoprene emissions from tropical rain forest in Southeast Asia. *Geophys Res Lett*, **35**, L19812.

Sanger, F et H Tuppy (1951) The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. 1. The identification of lower peptides from partial hydrolysates. *Biochem J*, **49**, 463-481.

Sanger, F, Nicklen, S et AR Coulson (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *P Natl Acad Sci USA*, **74**, 5463.

Santos, F, Vera, JL, Lamosa, P, de Valdez, G, de Vos, WM, Santos, H, Sesma, F et J Hugenholtz (2007) Pseudovitamin B(12) is the corrinoid produced by *Lactobacillus reuteri* CRL1098 under anaerobic conditions. *FEBS Lett*, **581**, 4865-4870.

Saxena, D, Aouad, S, Attieh, JM et HS Saini (1998) Biochemical characterization of chloromethane emission from the wood-rotting fungus *Phellinus pomaceus*. *Appl Environ Microbiol*, **64**, 2831-2835.

Scarratt, MG et RM Moore (1998) Production of methyl bromide and methyl chloride in laboratory cultures of marine phytoplankton II. *Mar Chem*, **59**, 311-320.

Bibliographie

Schäfer, H, McDonald, IR, Nightingale, P et JC Murrell (2005) Evidence for the presence of a CmuA methyltransferase pathway in novel marine methyl halide-oxidizing bacteria. *Environ Microbiol*, **7**, 839-852.

Schäfer, H, Miller, L, Oremland, RS et JC Murrell (2007) Bacterial cycling of methyl halides. *Adv Appl Microbiol*, **61**, 307-346.

Schauffler, SM, Atlas, EL, Donnelly, SG, Andrews, A, Montzka, SA, Elkins, JW, Hurst, DF, Romashkin, PA, Dutton, GS et V Stroud (2003) Chlorine budget and partitioning during the Stratospheric Aerosol and Gas Experiment (SAGE) III Ozone Loss and Validation Experiment (SOLVE). *J Geophys Res*, **108**(D5), 4173.

Shapiro, BJ et E Alm (2009) The slow:fast substitution ratio reveals changing patterns of natural selection in gamma-proteobacterial genomes. *ISME J*, **3**, 1180-1192.

Simon, R, Priefer, U et A Pühler (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Nat Biotechnol*, **1**, 784-791.

Skare, JT, Ahmer, BM, Seachord, CL, Darveau, RP et K Postle (1993) Energy transduction between membranes TonB, a cytoplasmic membrane protein, can be chemically cross-linked *in vivo* to the outer membrane receptor FepA. *J Biol Chem*, **268**, 16302-16308.

Stirling, DI et H Dalton (1979) Properties of the methane mono-oxygenase from extracts of *Methylosinus trichosporium* OB3b and evidence for its similarity to the enzyme from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Eur J Biochem*, **96**, 205-212.

Strovas, TJ, Dragavon, JM, Hankins, TJ, Callis, JB, Burgess, LW et ME Lidstrom (2006) Measurement of respiration rates of *Methylobacterium extorquens* AM1 cultures by use of a phosphorescence-based sensor. *Appl Environ Microbiol*, **72**, 1692-1695.

Studer, A, Vuilleumier, S et T Leisinger (1999) Properties of the methylcobalamin:H₄folate methyltransferase involved in chloromethane utilization by *Methylobacterium* sp. strain CM4. *Eur J Biochem*, **264**, 242-249.

Studer, A (2001) Aerobic microbial degradation of chloromethane. *Thèse de l'Ecole Polytechnique Fédérale de Zurich*, n°14294.

Studer, A, Stupperich, E, Vuilleumier, S et T Leisinger (2001) Chloromethane:tetrahydrofolate methyl transfer by two proteins from *Methylobacterium chloromethanicum* strain CM4. *Eur J Biochem*, **268**, 2931-2938.

Studer, A, McAnulla, C, Buchele, R, Leisinger, T et S Vuilleumier (2002) Chloromethane-induced genes define a third C1 utilization pathway in *Methylobacterium chloromethanicum* CM4. *J Bacteriol*, **184**, 3476-3484.

Stupperich, E (1993) Recent advances in elucidation of biological corrinoid functions. *FEMS Microbiol Rev*, **12**, 349-365.

Su, C, Yang, F, Long, F, Reyon, D, Routh, MD, Kuo, DW, Mokhtari, AK, van Ornam, J, Rabe, KL, Hoy, JA, Lee, YJ, Rajashandar, K et EW Yu (2009) Crystal structure of the membrane fusion protein CusB from *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, **393**, 342-355.

Sugantino, M, Zheng, R, Yu, M et JS Blanchard (2003) *Mycobacterium tuberculosis* ketopantoate hydroxymethyltransferase: tetrahydrofolate-independent hydroxymethyltransferase and enolization reactions with alpha-keto acids. *Biochemistry*, **42**, 191-199.

Suzuki, Y et GM Brown (1974) The biosynthesis of folic acid. XII. Purification and properties of dihydroneopterin triphosphate pyrophosphohydrolase. *J Biol Chem*, **249**, 2405-2410.

Sy, A, Giraud, E, Jourand, P, Garcia, N, Willems, A, de Lajudie, P, Prin, Y, Neyra, M, Gillis, M, Boivin-Masson, C et B Dreyfus (2001) Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J Bacteriol*, **183**, 214–220.

Sy, A, Timmers, ACJ, Knief, C et JA Vorholt (2005) Methylophilic metabolism is advantageous for *Methylobacterium extorquens* during colonization of *Medicago truncatula* under competitive conditions. *Appl Environ Microbiol*, **71**, 7245-7252.

Taga, ME, Larsen, NA, Howard-Jones, A, Walsh, C et GC Walker (2007) BluB cannibalizes flavin to form the lower ligand of vitamin B12. *Nature*, **446**, 449-453.

Taga, ME et GC Walker (2008) Pseudo-B12 joins the cofactor family. *J Bacteriol*, **190**, 1157-1159.

Teh, YA, Rhew, RC, Atwood, A et T Abel (2008) Water, temperature, and vegetation regulation of methyl chloride and methyl bromide fluxes from a shortgrass steppe ecosystem. *Global Change Biol*, **14**, 77-91.

Touzé, T, Goude, R, Georgeault, S, Blanco, C et S Bonnassie (2004) *Erwinia chrysanthemi* O antigen is required for betaine osmoprotection in high-salt media. *J Bacteriol*, **186**, 5547-5550.

Traunecker, J, Preuss, A et G Diekert (1991) Isolation and characterization of a methyl chloride utilizing strictly anaerobic bacterium. *Arch Microbiol*, **156**, 416–421.

Trotsenko, YA, Ivanova, E et NV Doronina (2001) Aerobic methylophilic bacteria as phytosymbionts. *Microbiology*, **70**, 623-632.

Trotsenko, YA et NV Doronina (2003) The biology of methylobacteria capable of degrading halomethanes. *Microbiology*, **72**, 121-131.

United Nations Environment Programm (UNEP) (2005) Production and consumption of ozone depleting substances under the Montreal Protocol: 1986-2004. <http://www.unep.org/ozone>.

U.S. Environmental Protection Agency (EPA) (1997) *Health Effects Assessment Summary Tables. FY 1997 Update*. Solid Waste and Emergency Response, Office of Emergency and Remedial Response, Cincinnati, OH. EPA/540/R-97-036.

Vallenet, D, Labarre, L, Rouy, Z, Barbe, V, Bocs, S, Cruveiller, S, Lajus, A, Pascal, G, Scarpelli, C et C Médigue (2006) MaGe: a microbial genome annotation system supported by synteny results. *Nucleic Acids Res*, **34**, 53-65.

Vannelli, T, Studer, A, Kertesz, M et T Leisinger (1998) Chloromethane metabolism by *Methylobacterium* sp. strain CM4. *Appl Environ Microbiol*, **64**, 1933-1936.

Vannelli, T, Messmer, M, Studer, A, Vuilleumier, S et T Leisinger (1999) A corrinoid-dependent catabolic pathway for growth of a *Methylobacterium* strain with chloromethane. *P Natl Acad Sci USA*, **96**, 4615-4620.

Varns, JL (1982) The release of methyl chloride from potato tubers. *Am J Potato Res*, **59**, 593-604.

Vetter, W et GW Gribble (2007) Anthropogenic persistent organic pollutants-lessons to learn from halogenated natural products. *Environ Toxicol Chem*, **26**, 2249-2252.

Vévodová, J, Graham, RM, Raux, E, Schubert, HL, Roper, DI, Brindley, A, Scott, AI, Roessner, C, Stamford, NP, Stroupe, E, Getzoff, E, Warren, MJ et KS Wilson (2004) Structure/function studies on a S-adenosyl-L-methionine-dependent uroporphyrinogen III C methyltransferase (SUMT), a key regulatory enzyme of tetrapyrrole biosynthesis. *J Mol Biol*, **344**, 419-433.

Vitreschak, AG, Rodionov, DA, Mironov, AA et MS Gelfand (2003) Regulation of the vitamin B-12 metabolism and transport in bacteria by a conserved RNA structural element. *RNA*, **9**, 1084-1097.

Vorholt, JA, Chistoserdova, L, Lidstrom, ME et RK Thauer (1998) The NADP-dependent methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* AM1. *J Bacteriol*, **180**, 5351-5356.

Vorholt, JA, Chistoserdova, L, Stolyar, S, Thauer, RK et ME Lidstrom (1999) Distribution of tetrahydromethanopterin-dependent enzymes in methylotrophic bacteria and phylogeny of methenyl tetrahydromethanopterin cyclohydrolases. *J Bacteriol*, **181**, 5750-5757.

Vorholt, JA, Marx, CJ, Lidstrom, ME et RK Thauer (2000) Novel formaldehyde-activating enzyme in *Methylobacterium extorquens* AM1 required for growth on methanol. *J Bacteriol*, **182**, 6645-6650.

Vorholt, JA (2002) Cofactor-dependent pathways of formaldehyde oxidation in methylotrophic bacteria. *Arch Microbiol*, **178**, 239-249.

Vuilleumier, S et T Leisinger (1996) Protein engineering studies of dichloromethane dehalogenase / glutathione S-transferase from *Methylophilus* sp. strain DM11 Ser12 but not Tyr6 is required for enzyme activity. *Eur J Biochem*, **239**, 410-417.

Vuilleumier, S, Ucurum, Z, Oelhafen, S, Leisinger, T, Armengaud, J, Wittich, R et K Timmis (2001) The glutathione S-transferase of the dioxin-degrading bacterium *Sphingomonas* sp. RW1 displays maleylpyruvate isomerase activity. *Chem Biol Int*, **133**, 265-267.

Vuilleumier, S (2002) Coping with a halogenated one-carbon diet: aerobic dichloromethane-mineralising bacteria. Dans, "*Biotechnology for the environment, Focus on Biotechnology Series*", Focus on Biotechnology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 105-131.

Vuilleumier, S et M Pagni (2002) The elusive roles of bacterial glutathione S-transferases: new lessons from genomes. *App Microbiol Biotechnol*, **58**, 138-146.

Vuilleumier, S, Chistoserdova, L, Lee, M, Bringel, F, Lajus, A, Zhou, Y, Gourion, B, Barbe, V, Chang, J, Cruveiller, S, Dossat, C, Gillett, W, Gruffaz, C, Haugen, E, Hourcade, E, Levy, R, Mangenot, S, Muller, E, Nadalig, T, Pagni, M, Penny, C, Peyraud, R, Robinson, DG, Roche, D, Rouy, Z, Saenampechek, C, Salvignol, G, Vallenet, D, Wu, Z, Marx, CJ, Vorholt, JA, Olson, MV, Kaul, R, Weissenbach, J, Médigue, C et ME Lidstrom (2009) *Methylobacterium* genome sequences: a reference blueprint to investigate microbial metabolism of C1 compounds from natural and industrial sources. *PLoS ONE*, **4**, e5584.

Wagner, MA et MS Jorns (1997) Folate utilization by monomeric versus heterotetrameric sarcosine oxidases. *Arch Biochem Biophys*, **342**, 176-81.

Wang, S, Cheng, Y, Sun, Z-H, Zhou, Q et S-F Sui (2006) *Escherichia coli* CorA periplasmic domain functions as a homotetramer to bind substrate. *J Biol Chem*, **281**, 26813-26820.

Warner, K, Larkin, M, Harper, DB, Murrell, JC et IR McDonald (2005) Analysis of genes involved in methyl halide degradation in *Aminobacter lissarensis* CC495. *FEMS Microbiol Lett*, **251**, 45-51.

Watanabe, F, Miyamoto, E, Fujita, T, Tanioka, Y et Y Nakano (2006) Characterization of a corrinoid compound in the edible (blue-green) alga, *Suizenji-nori*. *Biosci Biotechnol Biochem*, **70**, 3066-3068.

Watanabe, F, Tanioka, Y, Miyamoto, E, Fujita, T, Takenaka, H et Y Nakano (2007) Purification and characterization of corrinoid-compounds from the dried powder of an edible cyanobacterium, *Nostoc commune* (*Ishikurage*). *J Nutr Sci Vitaminol*, **53**, 183-186.

Watling, R et DB Harper (1998) Chloromethane production by wood-rotting fungi and an estimate of the global flux to the atmosphere. *Mycol Res*, **102**, 769-787.

Weiss, DS et RK Thauer (1993) Methanogenesis and the unity of biochemistry. *Cell*, **72**, 819-822.

Williams, PA, Coates, L, Mohammed, F, Gill, R, Erskine, PT, Coker, A, Wood, SP, Anthony, C et JB Cooper (2005) The atomic resolution structure of methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens*. *Acta Crystallogr D*, **61**, 75-79.

Wood, HG, Ragsdale, SW et E Pezacka (1986) A new pathway of autotrophic growth utilizing carbon monoxide or carbon dioxide and hydrogen. *Biochem Int*, **12**, 421-440.

Bibliographie

- Wood, AP, Kelly, DP, McDonald, IR, Jordan, SL, Morgan, TD, Khan, S, Murrell, JC et E Borodina (1998) A novel pink-pigmented facultative methylotroph, *Methylobacterium thiocyanatum* sp. nov., capable of growth on thiocyanate or cyanate as sole nitrogen sources. *Arch Microbiol*, **169**, 148-158.
- Woodall, CA, Warner, KL, Oremland, RS, Murrell, JC et IR McDonald (2001) Identification of methyl halide-utilizing genes in the methyl bromide-utilizing bacterial strain IMB-1 suggests a high degree of conservation of methyl halide-specific genes in gram-negative bacteria. *Appl Environ Microbiol*, **67**, 1959–1963.
- Yokouchi, Y, Nojjiri, Y, Barrie, L, Toom-Saunty, D, Machida, T, Inuzuka, Y, Akimoto, H, Li, H, Fujinuma, Y et S Aoki (2000) A strong source of methyl chloride to the atmosphere from tropical coastal land. *Nature*, **403**, 295-298.
- Yokouchi, Y, Ikeda, M, Inuzuka, Y et T Yukawa (2002) Strong emission of methyl chloride from tropical plants. *Nature*, **416**, 163-165.
- Yokouchi, Y, Saito, T, Ishigaki, C et M Aramoto (2007) Identification of methyl chloride-emitting plants and atmospheric measurements on a subtropical island. *Chemosphere*, **69**, 549-553.
- Yoshida, Y, Wang, Y, Zeng, T et R Yantosca (2004) A three-dimensional global model study of atmospheric methyl chloride budget and distributions. *J Geophys Res*, **109**, (D24309).
- Yoshida, Y, Wang, Y, Shim, C, Cunnold, D, Blake, DR et GS Dutton (2006) Inverse model of the global methyl chloride sources. *J Geophys Res*, **111**, (D16307).
- Zabetakis, I (1997) Enhancement of flavour biosynthesis from strawberry (*Fragaria x ananassa*) callus cultures by *Methylobacterium* species. *Plant cell tiss org*, **50**, 179-183.

Communications scientifiques

Présentations orales

Bringel, F, Hourcade, E, Lang, R, Penny, C, Roselli, S, Nadalig, T, Geoffroy, V et S Vuilleumier. Functional genomics of methylotrophic proteobacteria growing with chlorinated C1 pollutants. *Conférence Jacques-Monod, Génomique environnementale : des génomes individuels aux génomes de communautés complexes d'organismes*. Roscoff (France), 9-13 juin 2007.

Vuilleumier, S, Nadalig, T, Penny, C, Roselli, S, Muller, E et F Bringel. *Methylobacterium* genome sequences: A blueprint for tracing physiological adaptation, ecology and evolution in the context of C1 metabolism. *Molecular basis of microbial one carbon metabolism, Gordon Conference*. Lewiston (Maine, USA), 20-25 juillet 2008.

Nadalig, T, Roselli, S, Bringel, F et S Vuilleumier. Diversity and organisation of *cmu* genes in chloromethane-degrading bacterial strains isolated from the phyllosphere. *First international Methylobacterium meeting "From ecosystems to protein functions"*. *ETH Institute of Microbiology*. Zurich (Suisse), 28-30 septembre 2009.

Roselli, S, Nadalig, T, Vuilleumier, S et F Bringel. Investigations of the role of *cmuC* methyltransferase essential for chloromethane utilisation in *Methylobacterium extorquens* CM4. *First international Methylobacterium meeting "From ecosystems to protein functions"*. *ETH Institute of Microbiology*. Zurich (Suisse), 28-30 septembre 2009.

Présentations de posters

Bringel, F, Hourcade, E, Lang, R, Penny, C, Roselli, S, Nadalig, T, Geoffroy, V et S Vuilleumier. Functional genomics of methylotrophic proteobacteria growing with chlorinated C1 pollutants. *Conférence Jacques-Monod : Génomique environnementale*. Roscoff (France), 9-13 juin 2007.

Roselli, S, Nadalig, T, Bringel F, Penny, C, Muller, E et S Vuilleumier. *4^{ème} Salon Européen de la Recherche et de l'Innovation (SERI) ; Thème : Développement Durable, Energie et Environnement*. Paris (France), 5-7 juin 2008.

Roselli, S, Nadalig, T, Vuilleumier, S et F Bringel. Functional genomics of chloromethane degradation by *Methylobacterium chloromethanicum* CM4. *2^{èmes} Rencontres de Chimie et Biologie Moléculaires*. Strasbourg (France), 23 juin 2008.

Nadalig, T, Roselli, S, Schnell, D, Bringel, F et S Vuilleumier. Isolation and characterisation of chloromethane-degrading bacteria from the phyllosphere. *Molecular basis of microbial one carbon metabolism, Gordon Conference*. Lewiston (Maine, USA), 20-25 juillet 2008.

Roselli, S, Nadalig, T, Kugler, V, Vuilleumier, S et F Bringel. Proteomic analysis of chloromethane utilization in *Methylobacterium*. *Molecular basis of microbial one carbon metabolism, Gordon Conference*. Lewiston (Maine, USA), 20-25 juillet 2008.

Nadalig, T, Roselli, S, Schnell, D, Bringel, F et S Vuilleumier. Analysis of *cmu* genes in chloromethane degrading bacteria isolated from the phyllosphere. *10th international symposium on Bacterial Genetics and Ecology (Bageco)*. Uppsala (Suède), 15-19 juin 2009.

Vuilleumier, S, Penny, C, Nadalig, T, Roselli, S, Muller, E, Gruffaz, C, Louhichi, Y, Achilles, J et F Bringel. Dégradation microbienne des méthanes chlorés : voies métaboliques, génomique, suivi de populations sur site contaminé, et perspectives pour la dépollution. *Deuxièmes rencontres nationales de la Recherche sur les sites et sols pollués*. Paris (France), 20-21 octobre 2009.

