

Résumé de thèse de doctorat

Titre : *Génomique fonctionnelle de la dégradation microbienne du chlorométhane*

Présentée par : *Sandro ROSELLI*
Boursier du gouvernement français BGF

Discipline : *Sciences du Vivant*

Spécialité : *Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie*

Unité de recherche : *UMR 7156 Université de Strasbourg / CNRS*
Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie

Directeurs de thèse : *VUILLEUMIER Stéphane (Professeur UDS) et*
BRINGEL Françoise (Chercheure CNRS, HDR)

Mots-clés : *Bactéries méthylophiles, chlorométhane, génomique, protéomique, gènes*
cmu, phyllosphère.

ECOLES DOCTORALES :

<input type="checkbox"/> ED - Sciences de l'Homme et des sociétés	<input type="checkbox"/> ED 269 - Mathématiques, sciences de l'information et de l'ingénieur
<input type="checkbox"/> ED 99 - Humanités	<input type="checkbox"/> ED 270 - Théologie et sciences religieuses
<input type="checkbox"/> ED 101 - Droit, sciences politique et histoire	<input type="checkbox"/> ED 413 - Sciences de la terre, de l'univers et de l'environnement
<input type="checkbox"/> ED 182 - Physique et chimie physique	<input checked="" type="checkbox"/> ED 414 - Sciences de la vie et de la santé
<input type="checkbox"/> ED 221 - Augustin Cournot	
<input type="checkbox"/> ED 222 - Sciences chimiques	

Le chlorométhane est un gaz aux effets délétères sur l'environnement, puisque responsable de plus de 15 % de la dégradation de l'ozone stratosphérique causée par les composés chlorés (Harper, 2000). Avec une production annuelle de 5 millions de tonnes, il est l'halocarbone le plus abondamment émis vers l'atmosphère. Son origine est majoritairement naturelle : il est notamment produit par les plantes tropicales, les algues et champignons, les marais salants ou par combustion de biomasse (Montzka et Fraser, 2003 ; Saito et Yokouchi, 2008). Des bactéries dégradant le chlorométhane ont été isolées d'environnements variés (sols, boues, eaux de mer) (Schäfer *et al.*, 2007). Toutefois, l'inventaire des puits biotiques du chlorométhane dans le budget global du chlorométhane n'est que partiellement étudié. Notamment, l'importance des microorganismes dans le cycle du chlorométhane pourrait être sous-estimée (Keppler *et al.*, 2005).

L'Alpha-protéobactérie aérobie *Methylobacterium extorquens* CM4, capable d'utiliser le chlorométhane comme unique source de carbone et d'énergie pour sa croissance, est la première bactérie chlorométhane-dégradante à avoir été étudiée du point de vue génétique et biochimique (Vannelli *et al.*, 1998, 1999 ; Studer *et al.*, 1999, 2001, 2002). Son génome a été complètement séquencé (<http://www.jgi.doe.gov/genome-projects>). Cette bactérie représente un modèle attractif, réduit à l'essentiel (un atome de carbone et un substituant halogéné), pour l'étude de la déshalogénéation des méthane chlorés. La voie *cmu* d'utilisation du chlorométhane (chlorométhane utilization) a été découverte chez cet organisme (Vannelli *et al.*, 1998, 1999), et les enzymes correspondantes ont été caractérisées (Studer *et al.*, 1999, 2001). La protéine CmuA catalyse la déshalogénéation du chlorométhane à l'aide d'un cofacteur corrinnoïde et la méthyltransférase CmuB opère le transfert du groupement méthyle de la méthylcobalamine au tétrahydrofolate. L'analyse de mutants de CM4 et la cartographie des régions d'ADN correspondantes ont révélé la présence, à proximité des gènes *cmuA* et *cmuB*, d'autres gènes d'utilisation de composés en C₁ potentiellement impliqués dans l'utilisation du chlorométhane (Vannelli *et al.*, 1999). Ainsi les gènes *metF* et *purU*, codant respectivement une méthylène-tétrahydrofolate réductase et une formyl-tétrahydrofolate hydrolase essentielles pour l'utilisation du chlorométhane, ont été identifiés. L'ensemble de ces données a permis de définir une voie spécifique tétrahydrofolate-dépendante d'utilisation du chlorométhane chez CM4 (Studer *et al.*, 2002), différente de celles décrites pour l'utilisation d'autres composés en C₁. Cependant, de nombreuses incertitudes concernant cette voie persistent, notamment celle de la contribution du gène *cmuC*, codant pour une méthyltransférase putative (Vannelli *et al.*, 1998) et dont le rôle est essentiel pour la croissance de la souche sur chlorométhane.

Ma thèse a eu pour objectif de mieux comprendre les mécanismes adaptatifs associés à l'utilisation du chlorométhane comme substrat de croissance par les bactéries méthylophiles. Ce travail s'est articulé en plusieurs volets : (1) l'étude de l'organisation et de la diversité des gènes d'utilisation du chlorométhane par comparaison de bactéries chlorométhane-dégradantes, parmi lesquelles de nouveaux isolats issus de la phyllosphère ; (2) l'exploration génomique de l'adaptation au chlorométhane pour l'organisme modèle *M. extorquens* CM4 ; (3) l'identification de protéines impliquées dans l'utilisation du chlorométhane chez *M. extorquens* CM4 par une approche protéomique ; (4) l'étude du rôle du gène *cmuC*.

La diversité des gènes *cmu* chez les bactéries chlorométhane-dégradantes a été étudiée par comparaison de leur séquence et de leur organisation chez les souches capables d'utiliser le chlorométhane, à l'aide de nouvelles combinaisons d'amorces oligonucléotidiques permettant la détection de ces gènes dans l'environnement de manière plus exhaustive que précédemment. De nouvelles souches chlorométhane-dégradantes issues de la phyllosphère d'*Arabidopsis thaliana*, plante décrite comme possédant la capacité d'émettre du chlorométhane au niveau des feuilles (Rhew *et al.*, 2003), ont été isolées et caractérisées du point de vue de leur activité de déchloration. Ces isolats, appartenant tous à la famille des *Hyphomicrobiaceae*, représentent à notre connaissance les premières bactéries dégradant le chlorométhane isolées de la phyllosphère. Elles présentent une organisation des gènes *cmu* similaire à la plupart des souches chlorométhane-dégradantes précédemment décrites, à l'exception de la souche CM4.

Cette partie de mon travail de thèse, menée en commun avec Thierry Nadalig, maître de conférences dans l'équipe, a été rédigée sous forme de manuscrit, pour soumission à *Environmental Microbiology*.

Les séquences complètes des génomes de plusieurs bactéries du genre *Methylobacterium* (obtenues au Joint Genome Institute en 2006), et celles de *M. extorquens* AM1 (souche de référence pour l'étude du métabolisme en C₁ pour le genre *Methylobacterium*, incapable de se développer avec les méthanes chlorés), et de *M. extorquens* DM4 (capable de se développer avec le dichlorométhane) sont désormais disponibles. L'analyse comparative de ces génomes a permis de définir des ensembles de gènes communs pour le genre *Methylobacterium*, pour l'espèce *M. extorquens* ("core genome"), et aussi pour l'ensemble des gènes retrouvés dans les deux souches déchlorantes DM4 et CM4 mais absents des 6 autres souches du genre *Methylobacterium* séquencées. L'analyse du génome de CM4 a révélé l'existence d'un mégaplasmide de 380 kb spécifique de la souche et contenant les gènes *cmu* nécessaires à la croissance sur le chlorométhane. La comparaison des séquences génomiques de *Methylobacterium extorquens* a mis en évidence la présence sur le plasmide de CM4 de copies supplémentaires des gènes de biosynthèse de la cobalamine, cofacteur essentiel à la déshalogénéation du chlorométhane par la voie *cmu*. D'autres adaptations spécifiques du génome de CM4 ont été identifiées sur ce plasmide, comme la présence de copies supplémentaires de gènes codant pour des enzymes tétrahydrofolate-dépendantes pour la transformation des composés en C₁.

D'un point de vue expérimental, la réponse au chlorométhane chez *M. extorquens* CM4 a été étudiée par une approche protéomique, par des analyses différentielles 2D-PAGE et DIGE (differential gel electrophoresis) après croissance sur chlorométhane ou méthanol. Ainsi, 33 protéines plus abondantes lors de la croissance sur le chlorométhane ont été identifiées par spectrométrie de masse et grâce à la séquence génomique de CM4. Parmi celles-ci, les méthyltransférases CmuA et CmuB, et la formyltétrahydrofolate hydrolase PurU, enzymes essentielles de la voie d'utilisation du chlorométhane, ont été retrouvées. Une oxydoréductase putative PaaE-like, précédemment non détectée dans la souche CM4, mais dont le gène est colocalisé avec les gènes *cmu* chez d'autres bactéries chlorométhane-dégradantes, a également été détectée par protéomique. Ceci confirme son implication probable dans le métabolisme du chlorométhane. De fait, le gène *paaE*-like de la souche CM4 est localisé sur le mégaplasmide de 380 kb, entre les deux clusters de gènes *cmu* précédemment définis. D'autres protéines potentiellement impliquées dans des réactions couplées au tétrahydrofolate (un paralogue chromosomal de MetF), dans la voie de biosynthèse de la cobalamine (un paralogue plasmidique du CobH chromosomal), ainsi que dans la réponse au stress, ont également été détectées comme plus abondantes lors de la croissance sur chlorométhane. Grâce à ces données, la voie *cmu* précédemment proposée est désormais confirmée expérimentalement au niveau protéomique.

L'étude de *cmuC*, gène de fonction inconnue essentiel pour la croissance de la souche CM4 sur chlorométhane, a constitué le dernier volet de mon travail de thèse. L'inactivation de ce gène se traduit chez le mutant par un phénotype d'incapacité à utiliser le chlorométhane pour la croissance (Vannelli *et al.*, 1998, 1999). Nous avons montré que la croissance sur chlorométhane et l'activité de déshalogénéation du chlorométhane sont restaurées chez le mutant *cmuC* par complémentation avec le gène *cmuC* intact. Toutefois, la protéine CmuC n'a pas pu être détectée par approche protéomique. Par ailleurs, la comparaison des protéomes de la souche sauvage et du mutant *cmuC* n'a pas révélé de différence significative après croissance sur le méthanol, en présence ou en absence de chlorométhane.

Les résultats de l'analyse protéomique et génétique de la souche CM4 et de son mutant *cmuC*, thématique centrale de mon travail de thèse, ont été rédigés sous forme de manuscrit, où je figure en premier auteur, pour soumission à *Journal of Bacteriology*.

En conclusion, mes travaux ont confirmé le rôle essentiel de *cmuC* dans la déshalogénéation du chlorométhane, tout en corrigeant les indications obtenues précédemment, qui tendaient à indiquer

que les méthyltransférases CmuA et CmuB étaient suffisantes pour catalyser la réaction de transfert du groupe méthyle depuis le chlorométhane vers le tétrahydrofolate.

A l'avenir, il sera intéressant, par des expériences d'enzymologie et la construction de nouveaux mutants, de préciser le rôle du gène *cmuC*, et surtout de son produit protéique, non détecté dans nos expériences, dans la réaction de déchloration du chlorométhane.

Par ailleurs, le gène *paaE*-like dont le produit protéique, une oxydoréductase potentielle, a été détecté comme plus abondant lors de la croissance sur le chlorométhane, représente un candidat de choix pour des expériences d'inactivation génique, dans la perspective de mieux comprendre son rôle dans la voie de déchloration *cmu*. De manière plus générale, la disponibilité de la séquence génomique complète de la souche CM4 va désormais permettre une analyse de la réponse adaptative globale au chlorométhane de la souche CM4 par l'approche transcriptomique. Des puces ADN dessinées à cet effet sont aujourd'hui disponibles.

Il est également prévu d'utiliser la souche CM4 comme modèle au laboratoire pour étudier la capacité des bactéries chlorométhane-dégradantes à limiter les émissions de chlorométhane d'origine végétale, en étudiant les interactions de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* productrice de chlorométhane avec la souche CM4 et des mutants de la souche incapables de dégrader le chlorométhane.

Références citées

- Harper, D.B. (2000). The global chloromethane cycle: biosynthesis, biodegradation and metabolic role. *Nat Prod Rep* **17**:337-348.
- Montzka, S.A. et Fraser, P.J. (2003). Controlled substances and other source gases, in: WMO Scientific assessment of ozone depletion, Global ozone research and monitoring project, Report No. 47, Chapter 1:1.1-1.83. World Meteorological Organization, Geneva.
- Saito, T. et Yokouchi, Y. (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.
- Schäfer, H., Miller, L.G., Oremland, R.S. et Murrell, J.C. (2007). Bacterial cycling of methyl halides. *Adv. Appl. Microbiol* **61**:307-346.
- Keppler, F., Harper, D.B., Röckmann, T., Moore, R.M. et Hamilton, J.T.G. (2005). New insights into the atmospheric chloromethane budget gained using stable carbon isotope ratios. *Atmos. Chem. Phys.* **5**: 2403–2411.
- Vannelli, T., Studer, A., Kertesz, M. et Leisinger, T. (1998). Chloromethane metabolism by *Methylobacterium* sp. strain CM4. *Appl. Environ. Microbiol* **64**:1933-1936.
- Vannelli, T., Messmer, M., Studer, A., Vuilleumier, S. et Leisinger, T. (1999). A corrinoid-dependent catabolic pathway for growth of a *Methylobacterium* strain with chloromethane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **96**:4615-4620.
- Studer, A., Vuilleumier, S. et Leisinger, T. (1999). Properties of the methylcobalamin:H₄folate methyltransferase involved in chloromethane utilization by *Methylobacterium* sp. strain CM4. *Eur. J. Biochem* **264**:242-249.
- Studer, A., Stupperich, E., Vuilleumier, S. et Leisinger, T. (2001). Chloromethane: tetrahydrofolate methyl transfer by two proteins from *Methylobacterium chloromethanicum* strain CM4. *Eur. J. Biochem* **268**:2931-2938.
- Studer, A., McAnulla, C., Büchele, R., Leisinger, T. et Vuilleumier, S. (2002). Chloromethane-induced genes define a third C1 utilization pathway in *Methylobacterium chloromethanicum* CM4. *J. Bacteriol* **184**:3476-3484.

Rhew, R.C., Ostergaard, L., Saltzman, E.S. et Yanofsky, M.F. (2003). Genetic control of methyl halide production in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **13**: 1809–1813.

Communications scientifiques de Sandro Roselli

Présentations orales

Bringel, F., Hourcade, E., Lang, R., Penny, C., Roselli, S., Nadalig, T., Geoffroy, V. & Vuilleumier, S. 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. & Bringel, F. *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. & Vuilleumier, S. 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. & Bringel, F. 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.

Vuilleumier, S., Penny, C., Nadalig, T., Roselli, S., Muller, E., Gruffaz, C., Louhichi, Y., Achilles, J. & Bringel, F. 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.

Présentations de posters

Bringel, F., Hourcade, E., Lang, R., Penny, C., Roselli, S., Nadalig, T., Geoffroy, V. & Vuilleumier, S. 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. & Vuilleumier, S. *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. & Bringel, F. 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. & Vuilleumier, S. 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. & Bringel, F. 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. & Vuilleumier, S. 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.