

Summary

Chloromethane is the most abundant halocarbon in the environment, and responsible for substantial ozone destruction in the stratosphere. Sources and sinks of chloromethane are still poorly constrained. Although synthesized and used industrially, chloromethane is mainly produced naturally, with major emissions from vegetation and especially the phyllosphere, i.e. the aerial parts of plants. Some phyllosphere epiphytes are methylotrophic bacteria which can use single carbon compounds such as methanol and chloromethane as the sole source of carbon and energy for growth. Most chloromethane-degrading strains isolated so far utilize the *cmu* pathway for growth with chloromethane which was characterized by the team.

The main objective of this work was to investigate whether epiphytes may act as filters for plant emissions of chloromethane, by using a laboratory bipartite system consisting of the model plant *Arabidopsis thaliana*, known to produce chloromethane mainly by way of the *HOLI* gene, and the reference chloromethane-degrading bacterial strain *Methylobacterium extorquens* CM4, possessing the *cmu* pathway and of known genome sequence.

Three *A. thaliana* Col-0 variants with different levels of expression of *HOLI*, i.e. the wild-type strain, its homozygous *HOLI* knockout mutant *hol1-1* and an *HOLI*-OX6 *HOLI* overexpressor, were selected using PCR and qRT-PCR. Chloromethane-degrading strains were isolated from the *A. thaliana* phyllosphere, and shown to contain the *cmu* pathway. A plasmid-based bacterial bioreporter for chloromethane was constructed which exploits the promoter region of the conserved chloromethane dehalogenase gene *cmuA* of strain CM4. It yields rapid, highly sensitive, specific and methyl halide concentration-dependent fluorescence. Application of the bioreporter to the three *A. thaliana* variants differing in expression of *HOLI* investigated in this work suggested that they indeed synthesize different levels of chloromethane. Analysis by qPCR and qRT-PCR of metagenomic DNA from the leaf surface of these variants showed that the relative proportion and expression of *cmuA* in this environment paralleled *HOLI* gene expression.

Taken together, the results obtained indicate that even minor amounts of chloromethane produced by *A. thaliana* in the face of large emissions of methanol may provide a selective advantage for chloromethane-degrading methylotrophic bacteria in the phyllosphere environment. This suggests that chloromethane-degrading epiphytes may indeed act as filters for emissions of chloromethane from plants.

Further experiments are envisaged to further assess the adaptation mechanisms of chloromethane-degrading bacteria in the phyllosphere, building upon the comparative genomic analysis of chloromethane-degrading strains which was also performed in this work, and on the preliminary investigations using high-throughput sequencing that were initiated.

Keywords: chloromethane, methylotrophic bacteria, *Methylobacterium extorquens*, *Arabidopsis thaliana*, bacterial genomics, bioreporter, *HOLI*, *cmuA*

Résumé

Le chlorométhane est le plus abondant des composés organo-halogénés dans l'atmosphère et il est impliqué dans la destruction de l'ozone dans la stratosphère. Les sources et les puits de chlorométhane restent mal évalués. Bien que synthétisé et utilisé de manière industrielle, il est principalement produit naturellement, avec comme sources majeures les émissions provenant des végétaux et plus particulièrement de la phyllosphère, qui correspond aux parties aériennes des plantes. Certaines bactéries épiphytes de la phyllosphère sont des méthylotrophes capables d'utiliser des composés organiques sans liaison carbone-carbone comme le méthanol et le chlorométhane comme unique source de carbone et d'énergie pour leur croissance. La plupart des bactéries chlorométhane-dégradantes isolées jusqu'à présent utilisent une voie métabolique pour leur croissance sur chlorométhane appelée voie *cmu* (pour chlorométhane utilisation), caractérisée par l'équipe.

L'objectif principal de cette thèse a été de déterminer si des bactéries de la phyllosphère peuvent jouer le rôle de filtre pour l'émission de chlorométhane par les plantes. Dans ce but, un modèle de laboratoire a été mis en place, constitué de la plante *Arabidopsis thaliana* connue pour produire du chlorométhane par une réaction impliquant le gène *HOLI*, et la bactérie *Methylobacterium extorquens* CM4, souche de référence pour l'étude du métabolisme de dégradation du chlorométhane, qui possède la voie *cmu* et dont le génome complet a été séquencé et analysé.

Des variants d'*A. thaliana* avec différents niveaux d'expression du gène *HOLI* (le type sauvage, le mutant homozygote « knock-out » *hol1-1* et un variant *HOLI*-OX6 avec surexpression) ont été sélectionnés par PCR et qPCR. Des souches bactériennes chlorométhane-dégradantes ont été isolées à partir de la phyllosphère d'*A. thaliana*, dont il a été montré qu'elles possèdent la voie *cmu*. Un bio-rapporteur bactérien pour le chlorométhane a été construit à l'aide d'un plasmide exploitant la région promotrice du gène conservé de la déshalogénase (*cmuA*) de la souche *M. extorquens* CM4. Il présente une réponse fluorescente rapide, sensible, et spécifique aux méthyl-halogénés de manière concentration-dépendante. L'application du bio-rapporteur aux trois variants d'*A. thaliana* étudiés suggère des niveaux d'émissions de chlorométhane différents. L'analyse, par qPCR et qRT-PCR, de l'ADN métagénomique extrait de la surface des feuilles a montré une corrélation entre la proportion relative de bactéries portant le gène *cmuA* et l'exprimant dans cet environnement, et l'expression du gène *HOLI*. Ces résultats indiquent qu'une production de chlorométhane, même très modeste par rapport aux fortes émissions de méthanol par *A. thaliana*, confère un avantage sélectif pour les bactéries épiphytes chlorométhane-dégradantes. Ces dernières pourraient ainsi bien jouer un rôle de filtre pour les émissions de chlorométhane de la phyllosphère vers l'atmosphère.

En perspective, de nouvelles expériences complémentaires, basées sur l'analyse par génomique comparative des souches chlorométhane-dégradantes également effectuée dans le cadre du projet et sur une analyse par séquençage à haut-débit initiée dans ce travail, sont proposées pour améliorer la compréhension des mécanismes d'adaptation des bactéries chlorométhane-dégradantes dans la phyllosphère.

Mots-clés : chlorométhane, bactéries méthylotrophes, *Methylobacterium extorquens*, *Arabidopsis thaliana*, génomique bactérienne, bio-rapporteur, *HOLI*, *cmuA*