

Le 2-éthylhexyl nitrate

Le 2-éthylhexyl nitrate 2-EHN, (**figure 1.1**) est un additif qui permet d'augmenter l'indice de cétane du gazole. L'indice de cétane conditionne l'aptitude au démarrage des moteurs diesels. Le 2-EHN est l'additif procétane le plus utilisé. Liquide à température ambiante, c'est un composé qui se décompose au dessus de 100°C. Il libère alors des radicaux libres qui contribuent à réduire le délai d'auto-inflammation du moteur. Le 2-EHN est incorporé aux carburants à raison de 0,3 à 1 g.L⁻¹ ce qui explique que 10⁵ tonnes sont produites annuellement dans le monde, dont 60 % par une usine du groupe EURENCO (EUROpean ENergetics COrporation) (www.eurengo.com/en/2ehn/index.html) basée à Bergerac en France. Le 2-EHN est formé par le mélange stœchiométrique d'acide nitrique et de 2-éthylhexanol dans l'acide sulfurique. La formation de 2-EHN est presque instantanée. La réaction est la suivante : $C_8H_{17}OH + HNO_3 \rightarrow C_8H_{17}NO_3 + H_2O$

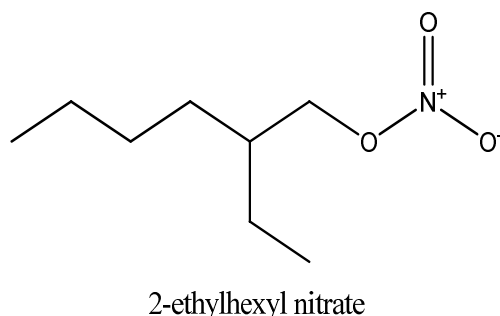


Figure 1.1 : Structure du 2-éthylhexyl nitrate

1.1 Propriétés physico-chimiques

Le 2-EHN est un ester nitraté, il peut aussi être nommé ester nitrique de 2-éthylhexanol. Le **tableau 1.1** résume ses caractéristiques physico-chimiques.

Le 2-EHN est un liquide presque translucide à température ambiante et il se décompose suite à une exposition à 100°C. Cette réaction exothermique peut être extrêmement violente et provoquer une explosion. C'est pourquoi il est impossible de déterminer son point d'ébullition.

Tableau 1.1 : Principales propriétés physico-chimiques du 2-EHN

Caractéristique	Valeur
N° CAS	27247-96-7
Formule chimique	C ₈ H ₁₇ NO ₃
Point de fusion	> 70°C
Point de congélation	< - 45°C
Masse molaire	175,2 g.mol ⁻¹
Masse volumique à 20°C	0,96 kg.L ⁻¹
	27 Pa à 20°C
Pression de vapeur	40-53 Pa à 40°C
	1.33 kPa à 82°C
Solubilité	12,6 mg.L ⁻¹
Log Ko/w	5,24
Température de décomposition	> 100°C

(Source : www.epa.gov/HPV/pubs/summaries/nitracd2/c14932rt.pdf)

1.2 Données toxicologiques et écotoxicologiques

1.2.1 Impact sur l'environnement

Suite à une demande des producteurs de 2-EHN et aux contraintes imposées par la directive européenne REACH, les propriétés de biodégradabilité du 2-EHN ont été étudiées selon un protocole standard par mesure du CO₂ dans l'espace de tête de la fiole de test. C'est en octobre 2006 qu'un rapport demandé par les entreprises adhérant à l'HERTG (The Health, Environmental, and Regulatory Task Group) a rendu compte des critères de dégradation du 2-EHN. Il s'avère que ce dernier n'est pas biodégradable selon les tests normalisés (The American Chemistry Council Petroleum additives panel, 2006). En cas d'accident ou de déversement accidentel, il existe donc un risque de pollution rémanente de l'environnement par le 2-EHN. C'est un composé de faible solubilité dans l'eau qui forme une émulsion en solution aqueuse. Il peut aussi former un film sur l'eau et ainsi faire barrière au transfert d'oxygène et limiter la vie d'organismes aérobie. Le coefficient de répartition octanol/eau (K_{O/W}) est élevé, on peut ainsi en déduire que le 2-EHN a une mobilité réduite en milieu aqueux et qu'il s'adsorbe modérément aux particules de terre et de sédiments. De plus, il est très volatil à température ambiante et de ce fait peu accessible aux microorganismes. Ces dernières remarques se basent sur des hypothèses formulées par l'ATC. Ces hypothèses reposent sur les propriétés de biodégradabilité d'hydrocarbures dont les propriétés physico-chimiques sont voisines de celles du 2-EHN.

1.2.2 Ecotoxicité

Les propriétés d'écotoxicité du 2-EHN sont connues. Le 2-EHN est faiblement toxique puisque les LC50 (dose létale pour 50 % de la population) vis-à-vis du poisson Zebra (*Danio rerio*), de la daphnie (*Daphnia magna*) et des algues (*Selenastrum capricornutum*) sont supérieures à sa solubilité dans l'eau à 20°C (soit 12,6 mg.L⁻¹).

(www.epa.gov/HPV/pubs/summaries/nitracd2/c14932tp.pdf).

1.2.3 Toxicité

La toxicité orale a été testée par une injection (10 mL/kg) de 2-EHN dans le système gastrique de rats. Après 14 jours, sur cinq animaux testés, deux sont morts, les autres ont présenté des nécroses et ont été euthanasiés (ATC 2004). Une autre étude sur les effets neurochimiques du 2-EHN chez le rat, menée par Someroja et Savolainen (Someroja & Savolainen, 1983) a montré que le 2-EHN a les mêmes effets, d'un point de vue pharmacologique, que la nitroglycérine *i.e.* la vasodilatation des vaisseaux sanguins.

La toxicité dermatologique du 2-EHN a été testée sur des lapins (Albinos) à la dose de 5 mL.kg⁻¹. La fourrure et l'abdomen des animaux ont été sévèrement irrités. Aucun signe de toxicité n'a cependant été observé après 14 jours (ATC, 2004).

Le 2-EHN a les mêmes effets que la nitroglycérine sur l'homme, à savoir la vasodilatation des vaisseaux sanguins. Une simple exposition au 2-EHN peut causer des céphalées graves, des faiblesses, des étourdissements, des rougeurs de la peau, de l'hypotension et des palpitations.

Le 2-EHN est un contaminant pour l'environnement, de plus il est à l'origine de trouble pour la santé. L'étude de sa biodégradabilité est ainsi justifiée. Pour ce faire, il est important de comprendre comment les micro-organismes peuvent accéder à ce substrat hydrophobe et volatil.

2 Accession des microorganismes aux composés organiques hydrophobes

Certains microorganismes utilisent les hydrocarbures comme source de carbone pour leur croissance. De ce fait, ils se sont adaptés en termes de résistance et d'équipement enzymatique pour utiliser ce type de substrat. Les hydrocarbures sont des composés hydrophobes dont la solubilité diminue à mesure que la masse moléculaire des composés augmente. Pour les hydrocarbures dont la solubilité est faible (< 0,1 g.L⁻¹), les microorganismes ont développé des stratégies pour venir au contact du substrat. Quatre modes

d'accession, illustrés dans la **figure 1.2** ont été avancés pour expliquer l'assimilation des hydrocarbures par les microorganismes (Bouchez-Naitali *et al.*, 1999; Hommel, 1994).

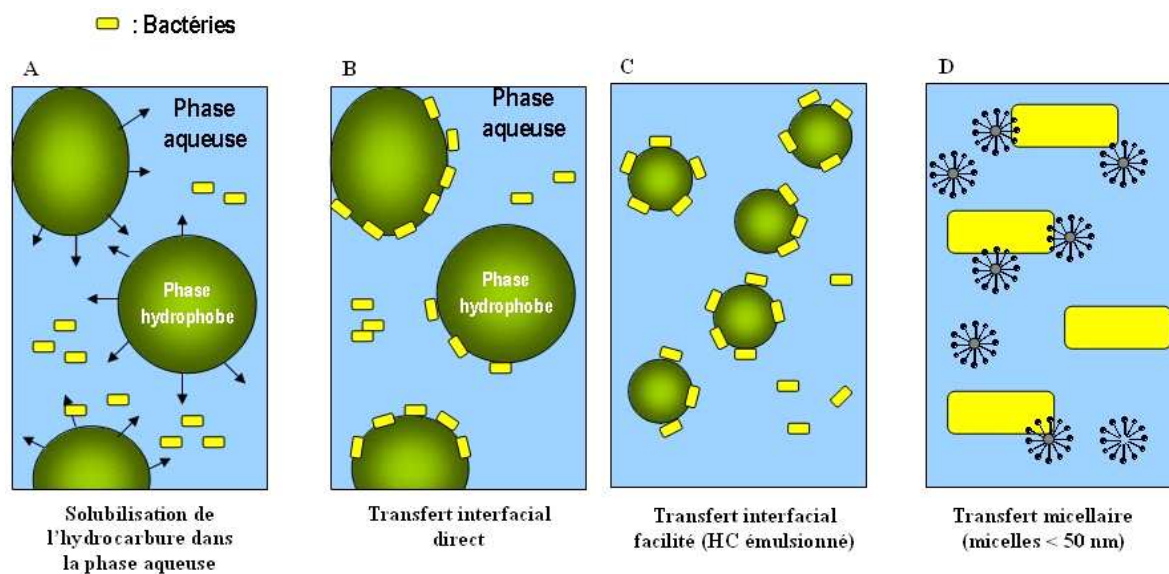


Figure 1.2 : Les mécanismes d'accession des microorganismes aux hydrocarbures (Vandecasteele, 2005)

2.1 L'assimilation des hydrocarbures solubles

L'assimilation en phase aqueuse a surtout été rapportée pour les hydrocarbures aromatiques suffisamment solubles et les alcanes légers (Bouchez *et al.*, 1995a; Goswami & Singh, 1991). C'est sous forme solubilisée que le substrat pénètre dans la cellule.

2.2 L'accession interfaciale

Les micro-organismes utilisant les alcanes peu solubles possèdent fréquemment une membrane externe hydrophobe (Miura, 1978; Rosenberg, 1986). L'hydrophobicité élevée de cette enveloppe permet l'adhésion du microorganisme aux gouttelettes de substrat présentes dans le milieu aqueux, souvent de taille très supérieure à celle des bactéries. Le substrat pénètre directement dans la cellule par diffusion ou transport actif sans dissolution préalable dans la phase aqueuse. L'hydrophobicité des microorganismes concernés entraîne souvent une forte tendance à l'agrégation.

2.3 L'accession interfaciale facilitée (émulsification)

Dans ce cas, l'intervention de biosurfactants produits par les microorganismes accélère le transfert des hydrocarbures en augmentant l'aire interfaciale entre les phases hydrophobe et hydrophile. On parle de transfert interfacial assisté. L'action des biosurfactants est souvent

complexe. Ils participent à la pseudo solubilisation des alcanes nécessaires à la croissance tout en restant associés aux cellules bactériennes pendant la croissance, puis sont libérés massivement lorsque le microorganisme a cessé toute croissance (Singer & Finnerty, 1984).

2.4 Le transfert micellaire

Différents auteurs ont montré que la solubilité apparente des *n*-alcanes était très largement supérieure à celle mesurée dans l'eau dans les cultures de levures sur *n*-alcanes (Roy *et al.*, 1978) ou sur HAP (Kim *et al.*, 2001). Cette augmentation de la solubilité apparente est liée à la formation d'une microémulsion résultant de la pseudo solubilisation des hydrocarbures par des biosurfactants produits par le microorganisme. Les micelles ainsi formées, de taille très inférieure aux bactéries, entrent en contact avec la cellule. Le mécanisme de transfert à travers l'enveloppe cellulaire n'est en réalité pas connu. Une protéine de transport membranaire AlkL a été cependant mise en évidence (van Beilen *et al.*, 1992b). Hommel et Ratledge (Hommel, 1994) ont formulé une hypothèse sur l'existence des pores hydrophobes au niveau de l'enveloppe bactérienne. Il faut noter que la surface externe d'une micelle est majoritairement hydrophile et le transfert micellaire apparaît privilégié chez les microorganismes dont l'hydrophobicité de l'enveloppe micellaire est faible (Bouchez-Naitali *et al.*, 1999). Les interactions hydrophobes entre substrat et cellule microbienne sont d'ailleurs complexes car les biosurfactants produits sont susceptibles d'affecter l'hydrophobicité cellulaire. En effet, le rôle physiologique des biosurfactants est multiple. Ils interviennent dans la formation de microcolonies, ils facilitent l'association en surface des bactéries et de part ce fait la formation d'agrégats, ils assurent la formation d'une structure de type filamenteuse et jouent un rôle dans la dispersion des biofilms (Pamp & Tolker-Nielsen, 2007).

3 Biodégradation des hydrocarbures aliphatiques

Plusieurs familles d'hydrocarbures regroupent des composés pétroliers, parmi lesquels, des alcanes linéaires, ramifiés, cycliques et des composés mono- et poly- aromatiques. Le 2-EHN est un ester branché à 8 atomes de carbone. J'aborderai ici seulement ce qui concerne la biodégradation des hydrocarbures linéaires et branchés. Concernant l'étude exhaustive de la biodégradation des hydrocarbures pétroliers, vous pouvez vous référer à l'ouvrage « Microbiologie Pétrolière » de J.P. Vandecasteele (2005).

3.1 Les alcanes linéaires

Les *n*-alcanes de longueur de chaîne supérieure à neuf atomes de carbone sont les composés les plus facilement biodégradables lors d'une éventuelle pollution (Britton, 1984). Ils contribuent à la formation de films d'hydrocarbures (Leahy & Colwell, 1990). En revanche les alcanes de plus courte chaîne sont toxiques et plus difficilement biodégradables, ils agissent comme des solvants vis-à-vis des membranes (Watkinson & Morgan, 1990). La première étape d'oxydation est catalysée par une oxygénase. La présence d'oxygène est donc une condition nécessaire à la dégradation de ces molécules. Trois voies de dégradation ont été clairement élucidées qui mettent en œuvre une alcane hydroxylase qui catalyse une réaction d'oxydation terminale ou subterminale. Le schéma présenté par la **figure 1.3** illustre les voies de dégradation des alcanes connues chez les micro-organismes.

En général, l'alcane est tout d'abord oxydé en alcool primaire par une alcane-1-monoxygénase, puis en aldéhyde par une alcool déshydrogénase et enfin en acide carboxylique par une aldéhyde déshydrogénase. Lors de l'oxydation subterminale, l'alcane est oxydé en alcool secondaire puis en méthyl-cétone, elle-même dégradée en ester par une réaction de type « Baeyer-Villiger », impliquant une monoxygénase. L'ester s'hydrolyse ensuite en alcool, puis s'oxyde en aldéhyde, puis acide. L'acide carboxylique ainsi formé est soit métabolisé par l'intermédiaire de la voie de la β -oxydation, soit incorporé dans la voie de synthèse des lipides cellulaires.

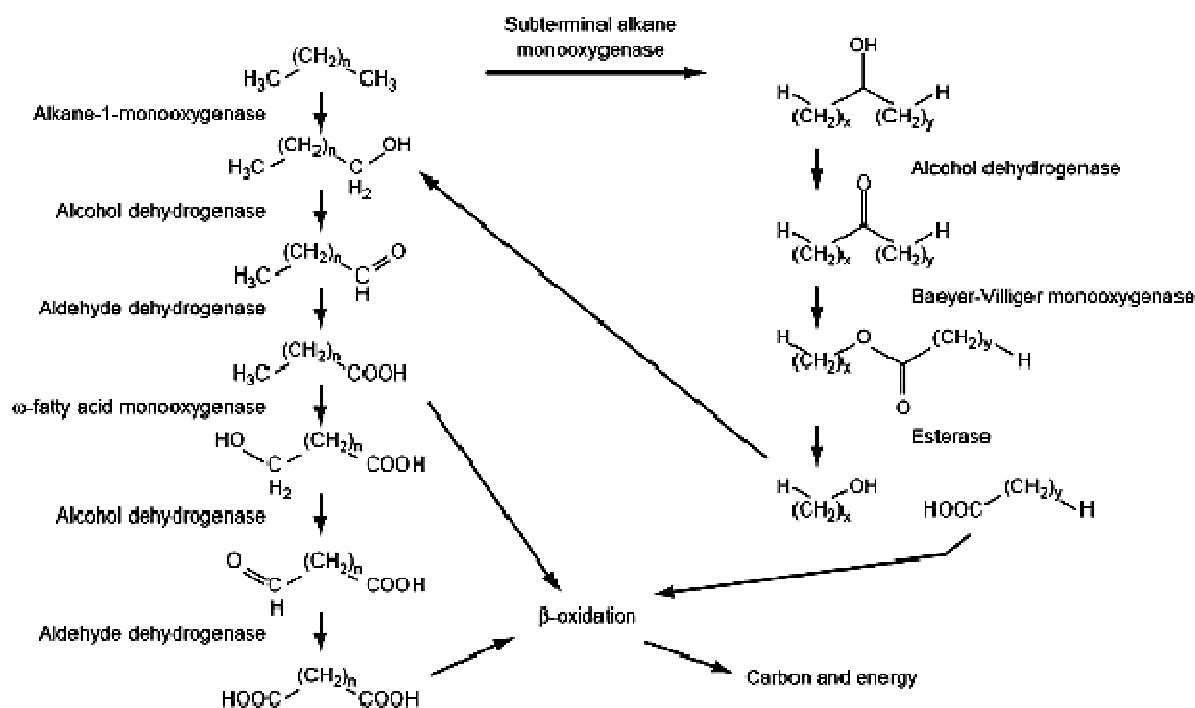


Figure 1.3 : Voies de dégradation des alcanes aliphatiques (van Beilen et al., 2003).

3.2 Les alcanes ramifiés

Les composés branchés sont en général plus résistants à la dégradation que leurs homologues linéaires. Les alcanes branchés contenant un ou deux groupements méthyles sur leur chaîne principale sont complètement métabolisés en CO₂. Les voies de dégradation mises en jeu sont similaires à celles intervenant lors de la dégradation des alcanes linéaires (Thijsse & Van der Linden, 1961). En général, plus les groupements méthyles sont éloignés de l'extrémité de la chaîne, plus la biodégradation est facile (Pirnack, 1977). Les molécules présentant des carbones tertiaires sont dégradées plus lentement. Les composés les plus récalcitrants sont ceux qui comportent un carbone quaternaire. La molécule est d'autant plus difficilement biodégradable que la chaîne carbonée est grande, le carbone substitué est près du centre de la chaîne principale, le degré de substitution est élevé (Mc Kenna, 1972). La résistance des alcanes branchés peut avoir d'autres explications parmi lesquelles : i) les cellules sont incapables de transférer les molécules branchées au travers des membranes, ii) le système enzymatique n'est pas capable d'oxyder ce type de molécule, iii) les alcanes branchés ne parviennent pas à induire le système enzymatique d'oxydation ou iv) le substrat est toxique pour les cellules (Schaeffer *et al.*, 1979).

3.2.1 Substrats utilisés par la β -oxydation

La β -oxydation correspond à quatre réactions successives au cours desquelles la chaîne carbonée d'un acide gras couplé au coenzyme A est réduite de deux atomes de carbone. L'acyl gras-CoA dont la chaîne carbonée est réduite de deux unités, retourne alors dans un cycle de β -oxydation et est de nouveau réduit de deux atomes de carbone. L'acide gras-CoA subit ainsi plusieurs cycles de β -oxydation jusqu'à sa dégradation complète en acétyl-CoA. Ce mécanisme peut être stoppé en fonction de plusieurs facteurs mêlant les propriétés physico-chimiques de l'acyl-CoA, la longueur de la chaîne carbonée, la présence d'un alcane β -substitué ou ayant un carbone quaternaire, la concentration du substrat, la présence de CoA, d'acétyl-CoA ou le ratio NAD⁺/NADH. Alvarez (2003) suggère que la β -oxydation joue un rôle central chez les Actinomycètes (**figure 1.4**). Une partie des *n*-alcanes est incorporée aux lipides cellulaires après une oxydation de l'une de ses extrémités sans qu'il y ait dégradation complète de l'acyl-CoA. Dans ce cas, la biosynthèse des acides gras *de novo* est probablement inhibée. Les acides gras produisent ainsi des intermédiaires clés chez les Actinomycètes pour la biosynthèse de plusieurs espèces lipidiques leur permettant des interactions environnementales avec des hydrocarbures. Ainsi, la β -oxydation ne sert pas

seulement à la voie catabolique des Actinomycètes mais aussi à la production de lipides de fonction et de structure diverses (Alvarez, 2003).

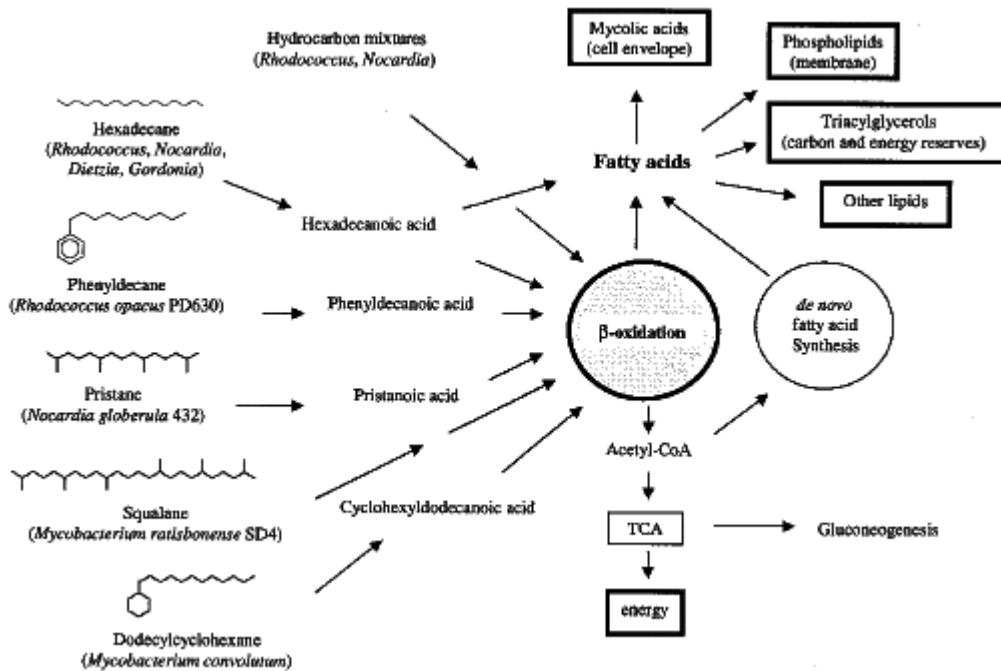


Figure 1.4 : Dégradation et assimilation de nombreux hydrocarbures chez les Actinomycètes (Alvarez, 2003).

Le fonctionnement de la β -oxydation décrit pour les chaînes d'alcane linéaires tolère des alcanes qui possèdent des branchements méthyles. Les études portant sur la dégradation du 2-méthylhexane par *P. aeruginosa* sont les premiers travaux réalisés sur la dégradation des alcanes branchés (Thijsse & Van der Linden, 1961). La mise en évidence d'acide 2-méthylhexanoïque et 5-méthylhexanoïque confirment l'existence de voies de dégradation similaires à celles intervenant dans la dégradation des *n*-alcane. Pour cette raison, seule la dégradation d'alcane ramifiés particuliers (alcane polyméthylés, β -substitués ou ayant un carbone quaternaire) est détaillé ci-dessous.

3.2.2 Cas du pristane et phytane : Alcanes polyméthylés

Le pristane (2,6,10,14-tétraméthylpentadécane) et son homologue le phytane (2,6,10,14-tétraméthylhexadécane) sont présents dans les pétroles et dans les sédiments anciens. Les produits isolés de l'oxydation monoterminale (Nakamiya *et al.*, 1985), diterminale (McKenna & Kallio, 1971; Pirnik *et al.*, 1974) et subterminale (Rontani *et al.*, 1986) conduisent au schéma présenté dans la **figure 1.5**. L'acide ou le diacide, après activation en acyl-CoA, peut être dégradé par β -oxydation. Le point important est que la position 2 de chaque branchement méthyle par rapport aux positions successives du

groupement carboxyl-CoA terminal ne bloque pas la progression de la β -oxydation qui libère tour à tour du propionyl-CoA et de l'acétyl-CoA.

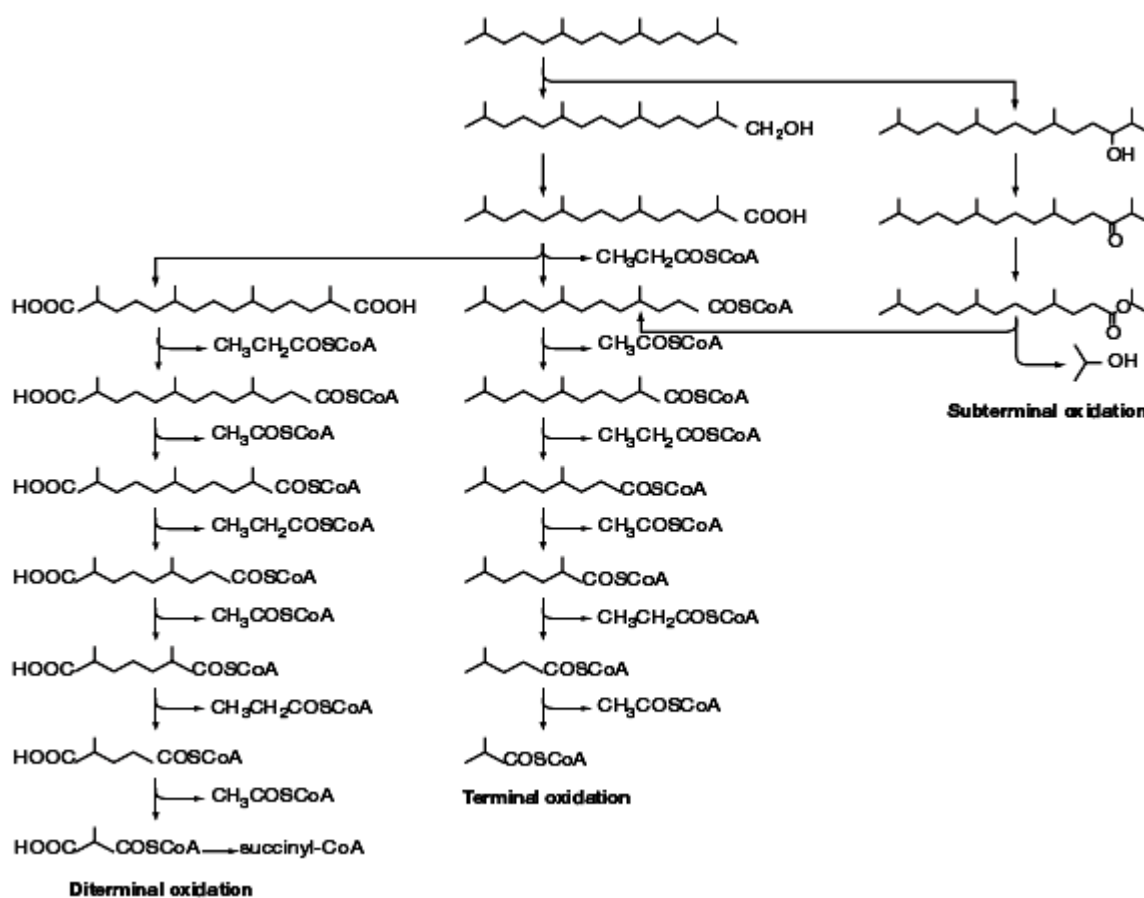


Figure 1.5 : Voie métaboliques de dégradation du pristane (Vandecasteele, 2005)

3.2.3 Voie du citronellol et alcanes β -substitués

Les antéiso-alcanes (β -substitués) sont rarement oxydés en raison de la présence d'un carbone quaternaire bloquant la voie classique de la β -oxydation (croix bleue sur la **figure 1.6**). En effet pour les 3-alkylacyl-CoA, la β -oxydation est bloquée après l'étape d'hydratation. Ce problème se pose aussi pour les terpénoïdes comme le citronellol, le géranol et le nérol. Il est ici résolu chez certains micro-organismes par carboxylation du groupement méthyle concerné et élimination du groupement carboxyméthyle formé.

Cette voie a été initialement découverte par Seubert et ses collègues chez *Pseudomonas citronellolis* capable de dégrader le citronellol (Seubert & Fass, 1964) et a été ensuite rapporté chez d'autres *Pseudomonas* (Forster-Fromme *et al.*, 2008). Selon Fall *et al.* (1979), les voies de dégradation du citronellol et des 3-méthylalcanes se rejoignent. Ils proposent ainsi que la dégradation d'un 3-méthylalcane se fasse initialement par la voie de dégradation des alcanes

(formation d'un acide carboxylique) puis ensuite par la voie de dégradation du citronellol et se termine par β -oxydation classique.

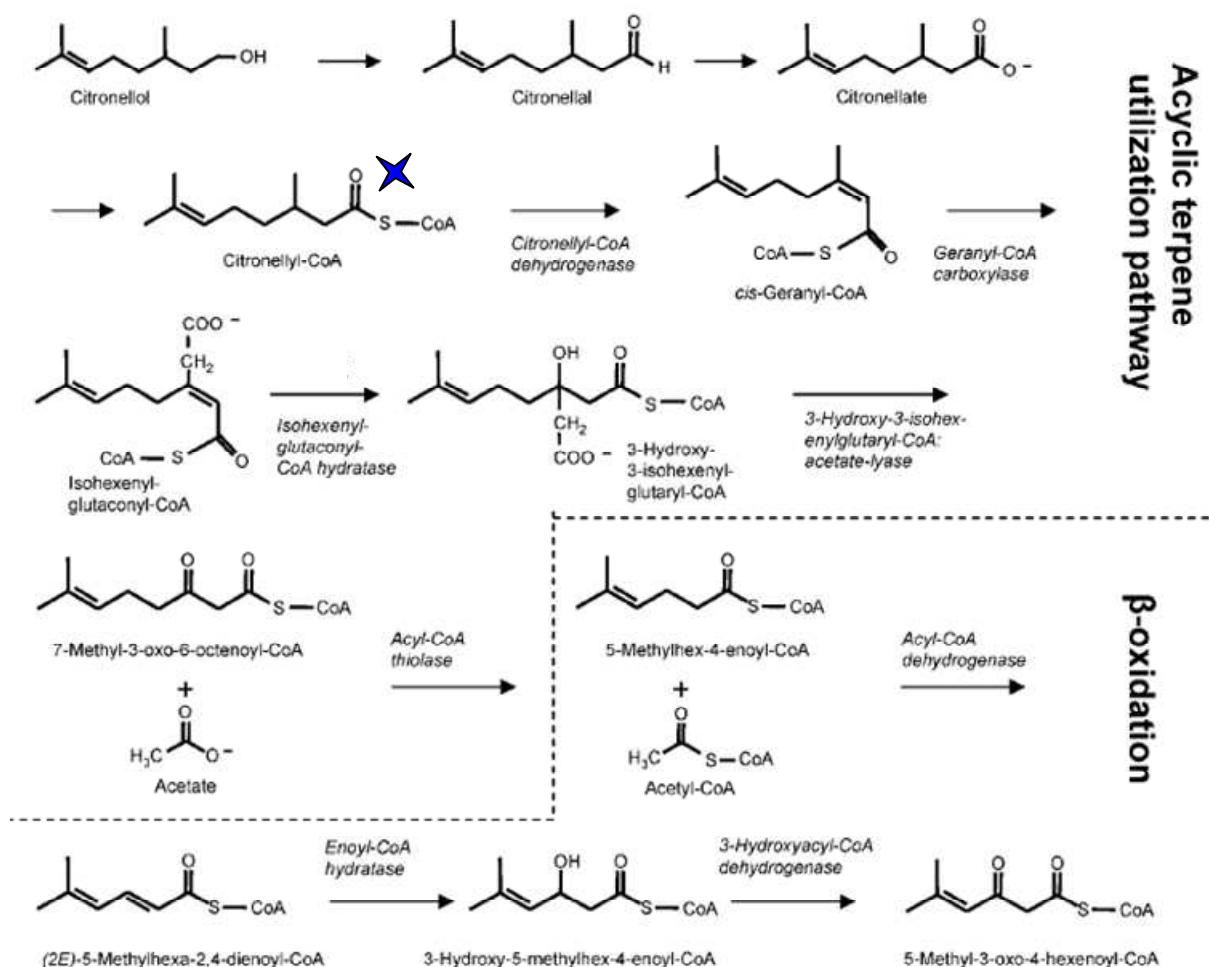


Figure 1.6: Voies métaboliques de dégradation du citronellol par *Pseudomonas aeruginosa* et *P. citronellolis*. (Adapté de Forster-Fromme et al., 2008)

Pseudomonas citronellolis et plus récemment *P. aeruginosa* ont été étudiés pour leur capacité à dégrader les terpènes, en particulier le citronellol (Seubert & Fass, 1964 ; Forster-Fromme et al., 2008). Ces bactéries possèdent une enzyme capable de débloquent le cycle de la β -oxydation lors de la présence d'un méthyle en position β . C'est une géranyl CoA décarboxylase qui permet la formation d'une fonction acétate au niveau du groupement méthyle qui bloque normalement la β -oxydation. Cette réaction permet au substrat d'être utilisé par d'autres enzymes spécifiques de la dégradation des terpènes comme l'isohexenyl-glutaconyl CoA hydratase puis la 3-hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA acetate lyase. Après

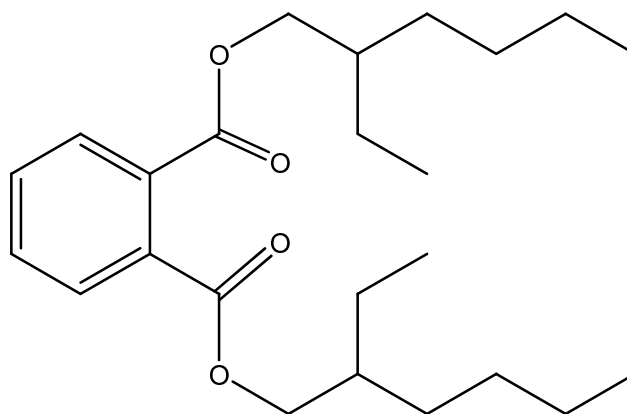
la formation de l'intermédiaire enoyl CoA (7-méthyl-3-oxo-6-octenoyl-CoA sur la **figure 1.6**), le cycle de β -oxydation se poursuit sans encombre.

3.2.4 Alcanes polyméthylés récalcitrants à la biodégradation

Du fait du mécanisme particulier de dégradation des alcanes β -substitués, la dégradation des alcanes polyméthylés dépend de la capacité à attaquer des branchements méthyles en position 2. Ainsi, (Schaeffer *et al.*, 1979) rapportent que la présence de structures *anteiso* aux deux extrémités de l'hydrocarbure rend la molécule totalement récalcitrante alors que les structures *iso* ralentissent l'oxydation par rapport à la molécule linéaire correspondante. Ces observations basées sur des tests de croissance sur des isomères d'octane disubstitués (diméthyl octanes) et avec des micro-organismes sélectionnés sur octane, ne sont cependant pas généralisables aux micro-organismes dotés de la voie du citronellol. Par exemple, des micro-organismes capables de dégrader des isoalcanes peuvent parfois s'attaquer à des alcanes substitués. C'est le cas de *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2173, isolée pour sa capacité à dégrader l'iso-octane (Solano-Serena *et al.*, 2000b) et qui dégrade totalement de façon similaire les 2,5- et 3,4-triméthylpentane (voir § 5.2.2). Cependant, les isoalcanes possédant des atomes de carbone substitués consécutifs, comme le 2,3,4-triméthylpentane, sont résistants à la biodégradation (Solano-Serena *et al.*, 1999).

3.2.5 Dégradation du di-2-éthylhexyl phtalate

La dégradation du di-(2-éthylhexyl) phtalate (DEHP) aussi nommé *bis* (2-éthylhexyl) phtalate a fait l'objet d'études récentes. Le *bis* (2-éthylhexyl) phtalate a une structure qui, une fois libérée du groupement phtalate, libère du 2-éthylhexanol dont la structure est proche du 2-EHN (**figure 1.7**).



bis(2-éthylhexyl) phtalate

Figure 1.7 : Structure du *bis*-(2-éthylhexyl) phtalate

Les diesters de phtalate comme le DEHP sont largement utilisés pour les productions industrielles de plastiques et bien connus pour causer des perturbations endocriniennes (Nalli *et al.*, 2006). Ce sont des composés récalcitrants qui s'accumulent dans l'environnement, en l'occurrence dans les eaux usées. Il a été montré que la dégradation des diesters de phtalate se déroule dans l'eau des rivières et dans les boues activées de station d'épuration. Les micro-organismes capables d'une telle dégradation appartiennent au genre des *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Micrococcus sp.* et *Gordonia*. Une estérase catalyse l'hydrolyse des diesters de phtalate en monoesters correspondant. Aucune enzyme d'organisme supérieur hydrolysant le monoester n'a été identifiée. En général, la dégradation d'esters du *n*-butyl phtalate a lieu en deux étapes : une estérase forme des mono-esters et une hydrolase forme l'acide phtalique et du 2-éthylhexanol (Nishioka *et al.*, 2006). Récemment, une souche de *Mycobacterium sp.* capable de dégrader les DEHP en acide 1,2-benzenedicarboxylique ou acide phtalique et en 2-éthylhexanol a été isolée (Nakamiya *et al.*, 2005). Ces études mettent en évidence la facilité de l'hydrolyse du DEHP et de dégradation de l'acide phtalique et la récalcitrance du 2-éthylhexanol, qui s'accumule dans le milieu, dont la structure est très proche du 2-EHN. Il en est de même pour la dégradation du bis (2-éthylhexyl) adipate (BEHA), un autre additif des plastiques, qui au cours de sa dégradation par *Rhodococcus rhodochrous* accumule du 2-éthylhexanol et de l'acide 2-éthylhexanoïque. Nalli *et al.* ont noté que l'acide 2-éthylhexanoïque accroît la toxicité du milieu et que ce dernier n'est pas dégradé (Nalli *et al.*, 2002). Cet exemple illustre le caractère récalcitrant de l'entité « 2-éthylhexyl » lors de la dégradation de ce type d'ester.

4 Systèmes enzymatiques de dégradation d'alcane ramifiés

Les enzymes mises en œuvre pour la dégradation de composés polluants ont été largement étudiées et recherchées dans les microorganismes issus de sols et de sites pollués (Kloos *et al.*, 2006; Penet *et al.*, 2006). Les études portent surtout sur des oxygénases, catalysant l'étape initiale de dégradation. Les enzymes de la β -oxydation sont très redondantes chez les bactéries des sols et prennent en charge la dégradation des acides carboxyliques. Dans le cas du 2-EHN, les enzymes potentiellement impliquées dans la voie de dégradation seraient des alcane hydroxylases, des estérases, des aldéhyde et alcool déshydrogénases et les enzymes de la β -oxydation. Seules ces catégories d'enzymes seront considérées ci-dessous.

4.1 Les alcane-1 monooxygénases (E.C. 1.14.15.3).

Les alcane monooxygénases sont responsables de l'attaque initiale de l'alcane qui est converti en son alcool correspondant par le biais d'une oxydation du carbone à l'extrémité terminale ou subterminale. Le système enzymatique hydroxylase catalysant cette réaction est généralement couplé à un système transporteur d'électrons. En fonction de la longueur de chaîne des alcanes, différents systèmes d'enzymes sont impliqués (**tableau 1.2**).

Les enzymes de type méthane monooxygénase oxydent les alcanes composés de 1 à 10 carbones. Deux formes de cette enzyme ont été décrites : la méthane monooxygénase particulaire (pMMO) et la méthane monooxygénase soluble (sMMO). La pMMO est une enzyme membranaire synthétisée chez la plupart des bactéries méthanotrophes qui fonctionne avec un centre fer-cuivre où elle oxyde les alcanes de C₁ à C₅. Alors que la sMMO est une enzyme soluble oxydant les alcanes de C₁ à C₁₀. (Ayala & Torres, 2004; Deeth & Dalton, 1998).

Tableau 1.2 : Enzymes capables d'oxyder les alcanes (d'après Van Beilen & Funhoff, 2005)

Enzyme	Composition and cofactors	Examples of host organisms	Substrate range
Class I P450 (CYP153)	P450 oxygenase: P450 heme Ferredoxin: [2Fe-2S] Ferredoxin reductase: FAD, NADH	<i>Sphingomonas</i> sp. HXN-200, <i>Mycobacterium</i> sp. HXN-1500, <i>Acinetobacter</i> sp. EB104	C ₄ -C ₁₆
Class II P450 (CYP52)	Microsomal oxygenase: P450 heme Reductase: FAD, FMN, NADPH	<i>Candida maltosa</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>	C ₁₀ -C ₁₆
Class II P450 (CYP2E, CYP4B)	Microsomal oxygenase: P450 heme Reductase: FAD, FMN, NADPH	Humans and rabbits	C ₆ -C ₁₀
Integral membrane alkane hydroxylase	Membrane hydroxylase: dinuclear iron Rubredoxin: iron Rubredoxin reductase: FAD, NADH	<i>Acinetobacter</i> , <i>Alcanivorax</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rhodococcus</i>	C ₅ -C ₁₆
Soluble methane monooxygenase	$\alpha_2\beta_2\gamma_2$ structure Hydroxylase: dinuclear iron Reductase: [2Fe-2S], FAD, NADH Regulatory subunit	<i>Methylinus trichosporium</i> OB3b, <i>Methylococcus capsulatus</i> (Bath)	C ₁ -C ₁₀
Particulate methane monooxygenase	Putative $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ structure	All known methanotrophs	C ₁ -C ₅
Propane monooxygenase	Putative $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ structure Reductase: NADH Regulatory subunit	<i>Gordonia</i> sp. TY-5	C ₃ and C ₁₃ -C ₂₂
Butane monooxygenase	$\alpha_2\beta_2\gamma_2$ structure Hydroxylase: dinuclear iron Reductase: [2Fe-2S], FAD, NADH Regulatory subunit	<i>Pseudomonas butanovora</i> ATCC 43655	C ₂ -C ₈
Engineered P450cam	P450 oxygenase: P450 heme Putidaredoxin: [2Fe-2S] Putidaredoxin reductase: FAD, NADH	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 29607	C ₃ -C ₁₀
Engineered P450BM-3	Single polypeptide: FAD, FMN, NADPH	<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581	C ₃ -C ₈

Les alcanes contenant entre 4 et 16 atomes de carbone sont oxydés soit par une alcane hydroxylase trans-membranaire à fer non hémique de type AlkB (Shanklin *et al.*, 1997), soit par un cytochrome P450 soluble de type CYP153 (Funhoff *et al.*, 2006).

Les alcanes de longueur de chaîne supérieure à C₁₇ sont aussi oxydés par des mono-oxygénases nommées LadA (Feng *et al.*, 2007).

Les alcane hydroxylases catalysent l'hydroxylation des alcanes linéaires et/ou branchés, des cyclo-alcanes simples ou *n*-alkylés. Dans le cadre de la dégradation du 2-EHN, nous ne nous intéresserons qu'aux alcane hydroxylases dégradant les alcanes linéaires et/ou branchés de longueurs de chaîne comprises entre C₅ et C₁₆ chez les bactéries. Il s'agit des méthane mono-oxygénases solubles (sMMO), des hydroxylases membranaires de type AlkB et de cytochromes P450 de la famille des CYP153.

4.1.1 Les méthane monoxygénases solubles sMMO

Les MMO catalysent la conversion du méthane en méthanol, ce qui permet aux bactéries méthanotrophes d'utiliser le méthane comme unique source de carbone et d'énergie. Les enzymes impliquées dans l'oxygénation du méthane sont représentées par la **figure 1.8**. Cette réaction est aussi catalysée par des cytochromes P450.

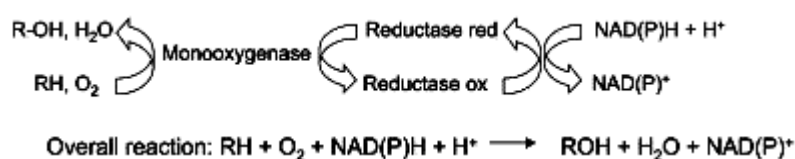


Figure 1.8 : Étapes impliquées dans la réaction d'oxydation par la méthane monoxygénase soluble (d'après Ayala & Torres, 2004).

A la différence des pMMO, la sMMO est une enzyme soluble, induite lors de carences en cuivre et qui n'est pas présente chez tous les méthanotrophes. Les méthane monoxygénases solubles les plus étudiées sont celles de *Methylosinus trichosporium* OB3b et *Methylococcus capsulatus*. Ce sont des méthane monoxygénases à trois composantes comprenant une hydroxylase à fer binucléaire (MMOH) de 245 kDa, une NADH oxidoreductase à FAD contenant un cluster fer-soufre (MMOR) de 40 kDa et une petite sous unité de régulation, indispensable au fonctionnement de l'enzyme (MMOB) de 16 kDa représentée en vert sur la **figure 1.9** illustrant le cycle catalytique des sMMO (Kopp & Lippard, 2002) (Hamamura *et al.*, 1999).

L'oxygénation du méthane n'a lieu qu'en présence de la protéine de régulation MMOB. Le cycle catalytique commence par la fixation et l'activation de l'O₂ par l'enzyme réduite MMOH_{red}. De ce fait, des intermédiaires très réactifs sont formés (MMOH_{superoxo} et

MMOH_{peroxo}), qui conduisent à l'hydroxylation du méthane en laissant les atomes de fer de l'enzyme sous forme ferrique. La réductase MMOR utilise alors deux électrons provenant de l'oxydation du NADH pour réduire la MMOH oxydée et boucler le cycle catalytique (Kopp & Lippard, 2002).

La croissance sur les alcanes gazeux de C₂ à C₄ est aussi attribuée à des bactéries appartenant aux genres *Corynebacterium-Nocardia-Mycobacterium-Rhodococcus* (Ashraf *et al.*, 1994). Hamamura *et al.* ont montré que malgré les points communs existant entre la butane monooxygénase de *Mycobacterium vaccae* JOB5 et celle de *Pseudomonas butanovora*, les enzymes ne sont pas sensibles aux mêmes inhibiteurs et ne fonctionnent pas de la même manière. Par exemple, *P. butanovora* peut oxyder l'éthène uniquement en présence de peroxyde d'hydrogène, mais son rendement est trois fois moindre que celui d'une sMMO de *Methylosinus trichosporium* OB3b (Dubbels *et al.*, 2007). D'autre part, certaines bactéries sont équipées de plusieurs alcanes monooxygénases. C'est le cas de *Nocaroides* sp. CF8 pouvant produire deux enzymes durant l'oxydation des alcanes : une méthane monooxygénase à cuivre (pMMO) et une alcanes hydroxylase membranaire à fer binucléaire de type AlkB. (Hamamura *et al.*, 2001).

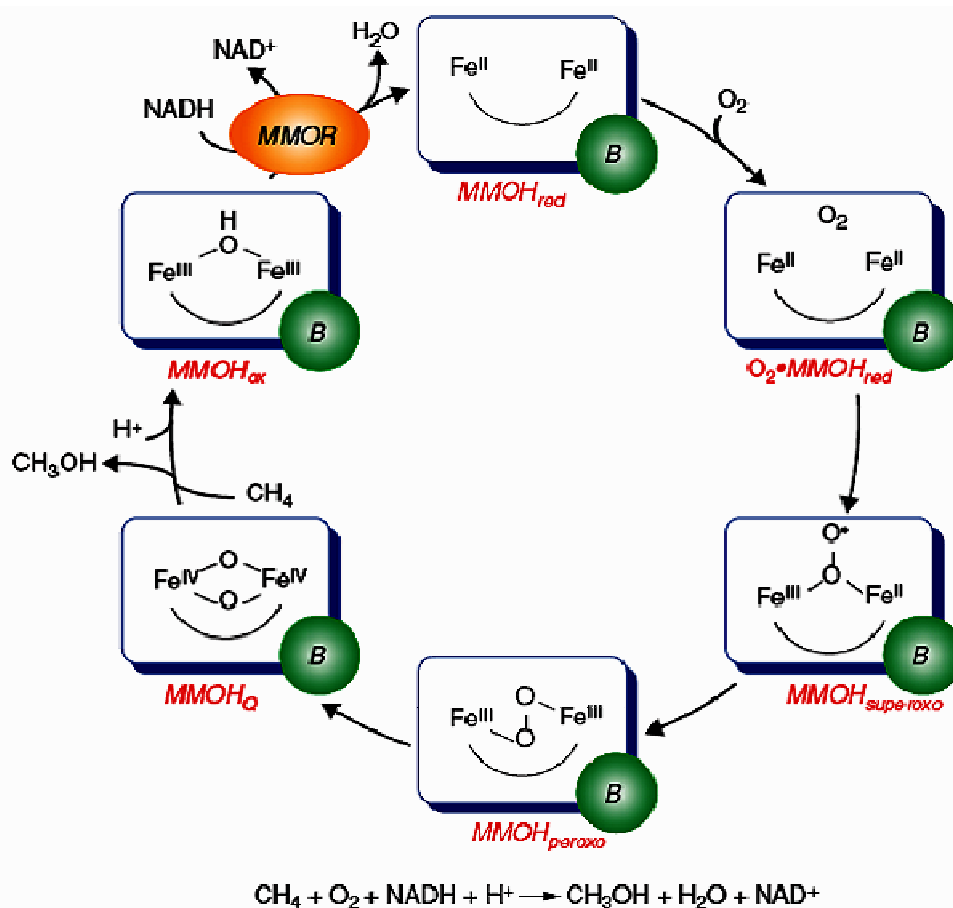


Figure 1.9 : Cycle catalytique de la méthane monooxygénase (Kopp & Lippard, 2002).

4.1.2 Les hydroxylases de type AlkB (E.C 1.14.15.3)

4.1.2.1 Propriétés générales

L'équipe de Coon (Peterson *et al.*, 1967) a caractérisé le système alcane hydroxylase de *P. oleovorans*, renommé par la suite de *P. putida* (van Beilen *et al.*, 1992a; van Beilen *et al.*, 1994; van Beilen *et al.*, 2001). Il est constitué de trois protéines : une hydroxylase à fer non hémique nommée AlkB, une rubrédoxine contenant un atome de fer et une rubrédoxine réductase. Ces deux dernières protéines agissent en tant que transporteurs d'électrons entre le NADH et l'hydroxylase comme indiqué sur la **figure 1.10**. L'hydroxylase est une protéine de masse moléculaire comprise entre 44 et 50 kDa. Elle est présente dans la membrane cytoplasmique, et son activité nécessite la présence de phospholipides et de fer. La rubrédoxine est une protéine qui contient un centre actif constitué d'un atome de fer lié aux atomes de soufre de quatre résidus cystéine et formant ainsi une structure tétraédrique. La rubrédoxine réductase est classée dans les flavoprotéines utilisant le Flavine Adénine Dinucléotide (FAD) comme co-facteur (van Beilen *et al.*, 1994).

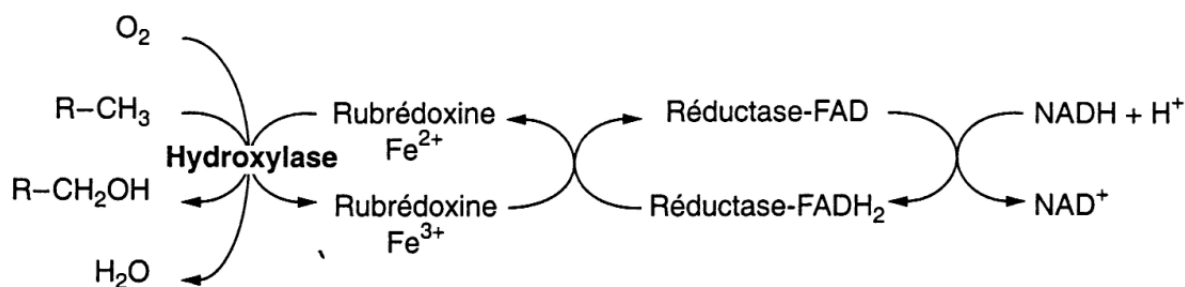


Figure 1.10 : Chaîne de transfert d'électrons des systèmes d'hydroxylases à fer non hémique.

4.1.2.2 Diversité des gènes *alkB* d'origine bactérienne

Plus d'une centaine de gènes *alkB* de type alcane-1 monooxygénase sont répertoriés dans les bases de données. Les séquences des gènes *alkB* homologues peuvent présenter des divergences importantes, avec des taux d'identité ne dépassant pas parfois 40 % (Heiss-Blanquet *et al.*, 2005). Certaines variations reflètent des différences de spécificité vis-à-vis du substrat, en fonction de la longueur de chaîne des alcanes. La présence de trois à cinq homologues divergents de *alkB* dans plusieurs souches de *Rhodococcus* accroît la gamme d'alcanes (C_6 - C_{16}) dégradés par ces souches (van Beilen *et al.*, 2002b).

Les gènes d'alcane hydroxylases de micro-organismes présents sur un site pollué par des hydrocarbures ont été recherchés et partiellement séquencés. Un arbre phylogénétique a pu être ainsi réalisé sur la base des séquences partielles des gènes *alkB* codant pour l'alcane hydroxylase (**figure 1.11**). Cet arbre montre que la divergence des séquences des gènes *alkB*

n'est pas corrélée à celle qui a été établie par les espèces bactériennes en se basant sur les séquences des ARNr 16S. van Beilen *et al.* (2003) ont souligné que cette observation résulte probablement de transferts horizontaux des gènes *alkB* parmi les souches bactériennes appartenant au même genre bactérien.

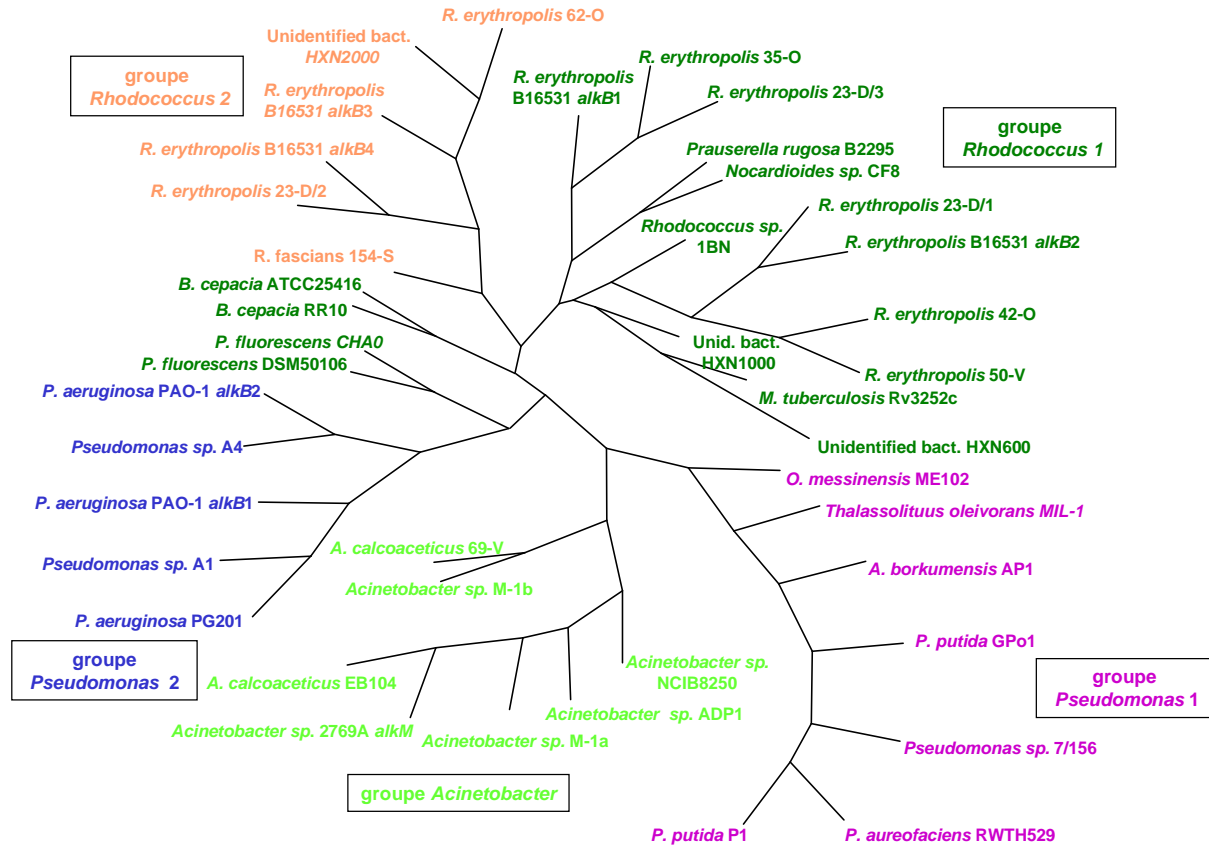


Figure 1.11 : Arbre phylogénétique des séquences partielles d'alcane hydroxylases (*AlkB*) connues et obtenues à partir d'un sol contaminé par des hydrocarbures. Adapté de Heiss *et al.* (2005).

4.1.2.3 Organisation génétique des gènes *alkB*

Dans la plupart des bactéries étudiées, les gènes de dégradation des alcanes sont dispersés dans l'ensemble du génome. Les alcane hydroxylases de type *AlkB* sont présentes aussi bien chez des bactéries à Gram négatif du genre *Pseudomonas* ou *Acinetobacter* que chez les bactéries à gram positif du genre *Rhodococcus* ou *Mycobacterium*. Il en existe parfois plusieurs copies comme le montre la **figure 1.12**.

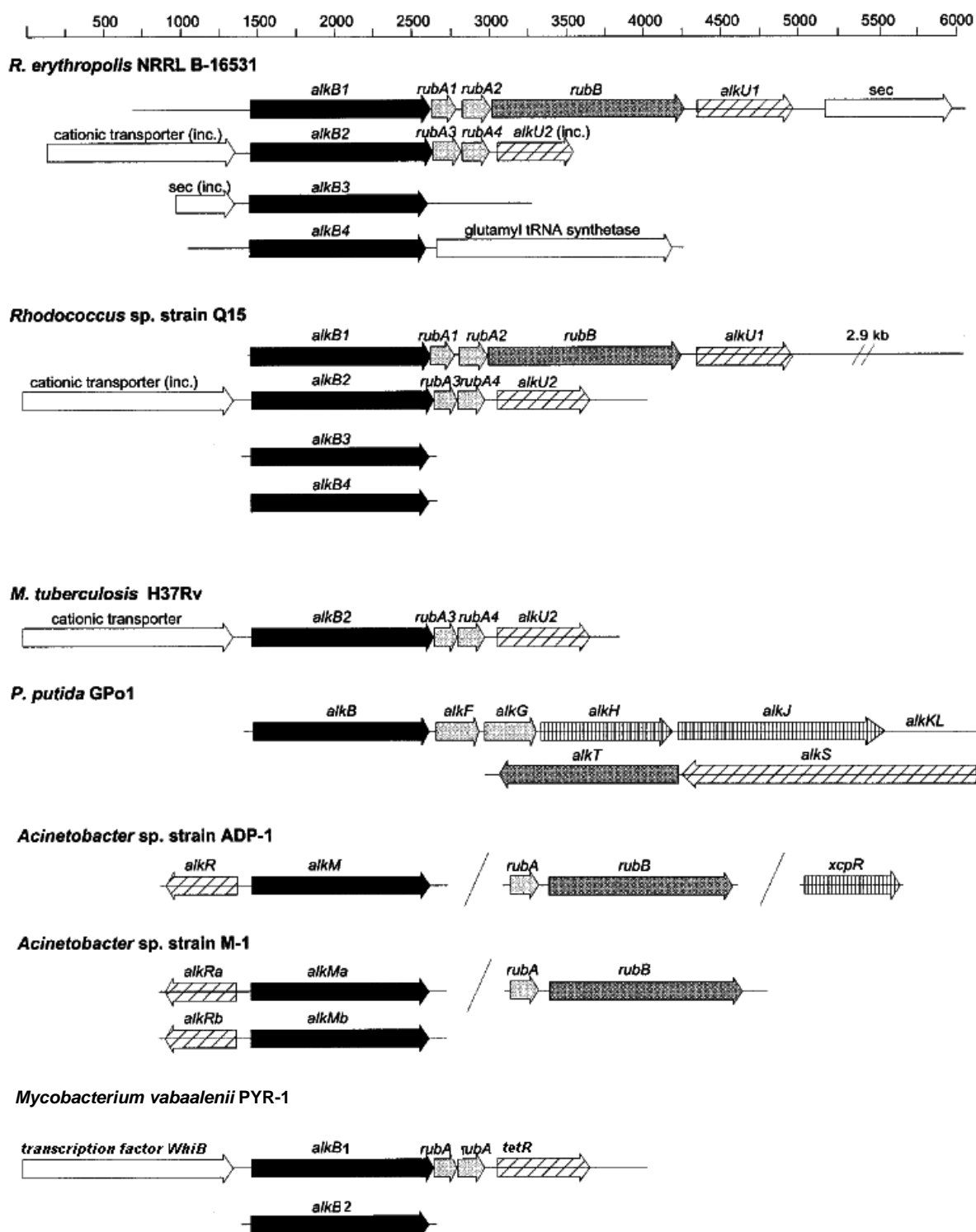


Figure 1.12 : Exemples d'organisation de gène *alk* chez des bactéries dégradant les alcanes. Adapté de (Whyte et al., 2002).

En noir sont représentés les gènes *alkB*, en gris clair les rubrédoxines, en gris foncé les rubrédoxine réductases, en rayures horizontales les deshydrogénases et en rayé les gènes de régulation.

Dans un certain nombre de cas, les gènes de la rubrédoxine et de l'hydroxylase sont séparés, sauf pour le système d'oxydation des alcanes de *P. putida* GPo1 découvert par van Beilen *et*

al. (2001). Dans cette configuration, toutes les protéines nécessaires à l'oxydation de l'alcane jusqu'aux dérivés acyl-CoA correspondant sont codées par l'opéron *alkBFGHJKL* (**figure 1.13**).

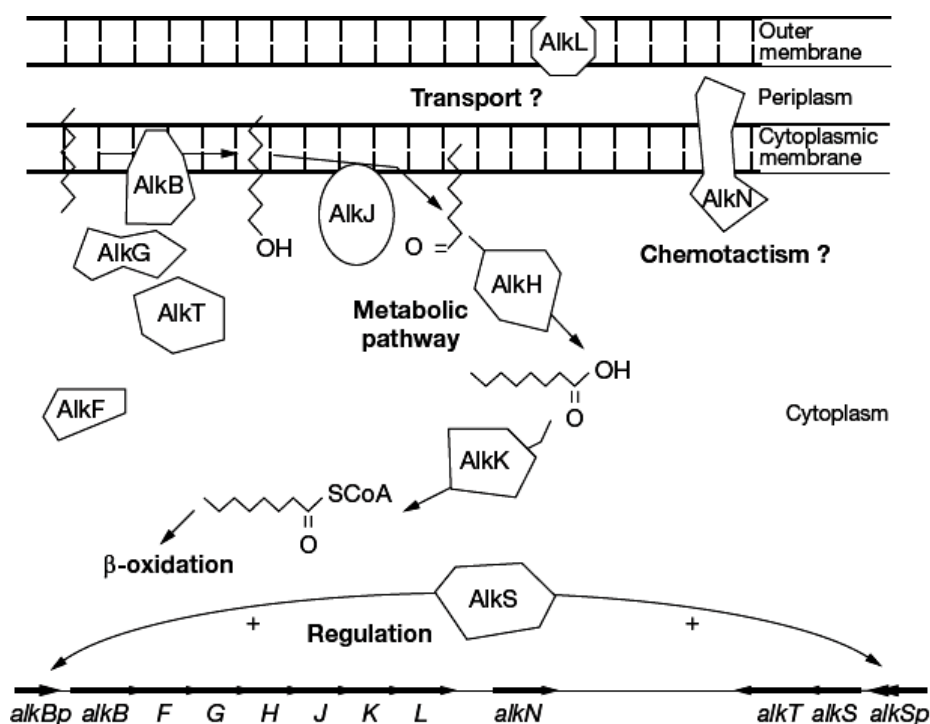


Figure 1.13 : Voie de dégradation des alcanes chez *P. putida* Gpo1 : rôle et localisation cellulaire des protéines impliquées. Adapté de van Beilen *et al.* (2001).

L'opéron contient outre le gène codant pour une alcane hydroxylase membranaire (AlkB), deux gènes codant pour des rubrédoxines (AlkF et AlkG) (Peterson *et al.*, 1967; Peterson & Coon, 1968; van Beilen *et al.*, 2002a), une aldéhyde déshydrogénase (AlkH) et une protéine impliquée dans le transport des substrats (AlkL). Les gènes *alkS* et *alkT*, situés sur un locus séparé sur le plasmide OCT de cette souche codent respectivement une protéine de régulation nécessaire à l'activation de l'expression de l'opéron *alk* (van Beilen *et al.*, 1994) et une rubrédoxine réductase (Eggink *et al.*, 1990; Ueda & Coon, 1972). L'ensemble des gènes *alk* est flanqué de deux séquences d'insertion caractéristique d'un transposon de classe 1 (van Beilen *et al.*, 1994; van Beilen *et al.*, 2001).

4.1.2.4 Spécificité

Bien que la structure tridimensionnelle de la protéine ne soit pas connue, il est probable que l'alcane hydroxylase de type AlkB ait six hélices transmembranaires. Celles-ci sont arrangées par paires reliées entre elles avec de très courtes boucles du côté périplasmique (**figure 1.14**). L'enzyme possède une poche hydrophobe dans laquelle le substrat accède au

site catalytique. Ce dernier a deux atomes de fer liés à des résidus histidine localisés dans quatre séquences très conservées. Les motifs histidine se situent au sein des domaines hydrophiles cytoplasmiques de l'enzyme (van Beilen *et al.*, 2005b). Les séquences sont les suivantes : **A** : H₁₃₈EXXHK₁₄₃; **B** : E₁₆₇HXXGHH₁₇₃; **C** : N₂₆₉YXEHYG₂₇₅ et **D** : L₃₀₉QRHXDHHA₃₁₇. Elles sont visibles sur la **figure 1.14**. Les motifs A, B et C ont été trouvés dans les séquences partielles des alcane hydroxylases de *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012, IFP 2015 et IFP 2173, de *Mycobacterium* sp. IFP 2009 et de *M. vaccae* JOB5 (Lopes Ferreira *et al.*, 2007), de *Acinetobacter* sp. ADP-1 et M-1, de *M. tuberculosis* H37Rv, de *Rhodococcus* sp. Q15 et *R. erythropolis* NRRL B-16531 (Whyte *et al.*, 2002) et de *Pseudomonas putida* Gpo1 (van Beilen & Funhoff, 2005).

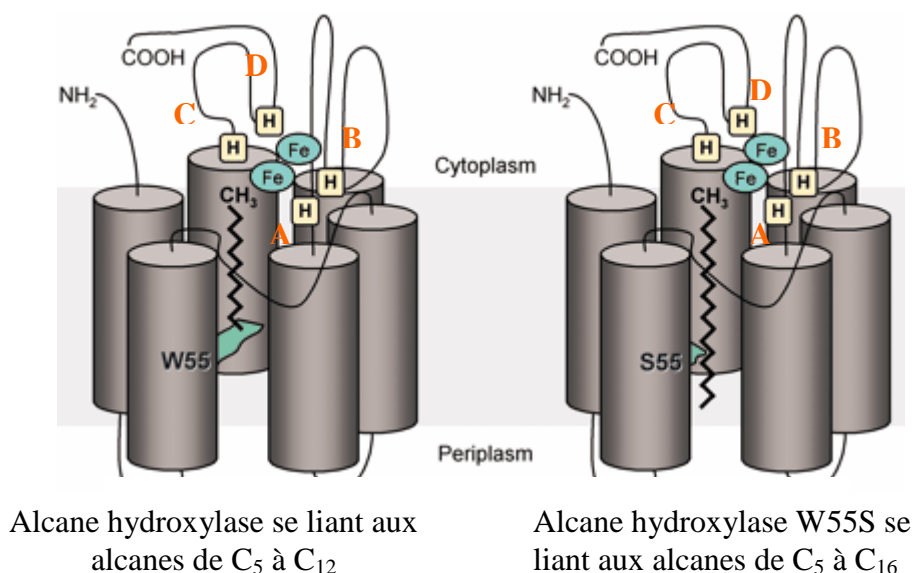


Figure 1.14 : Modèle montrant le substrat dans le site catalytique de l'alcane hydroxylase de *P. putida* Gpo1 w.t. (W55-AlkB) ou du mutant W55S (S55-AlkB). Selon (Rojo, 2005) et adapté de (van Beilen & Funhoff, 2005).

Les hélices transmembranaires de l'alcane hydroxylase sont représentées par des cylindres, les histidines (H) se lient aux atomes de fer (Fe). Les lettres A, B, C et D représentent les motifs histidine conservés.

Les tentatives pour déterminer la structure spatiale de l'alcane hydroxylase membranaire étant pour l'instant encore infructueuses, la spécificité des alcane hydroxylases pour des alcanes de différentes longueurs (van Beilen *et al.*, 2005b) a été étudiée en parallèle chez des variants de *P. putida* Gpo1 et de *A. borkumensis* AP1 obtenus par mutagenèse dirigée. L'étude a montré que le changement d'un seul acide aminé dans la séquence peptidique de l'alcane hydroxylase, W55 ou W58, respectivement, par un acide aminé d'encombrement moindre, la sérine ou la cystéine, rendrait l'enzyme capable d'oxyder des alcanes plus longs non oxydés par les

enzymes sauvages. Sur cette base, ces auteurs proposent un modèle moléculaire d'insertion de l'alcane dans le site actif de l'alcane hydroxylase de *P. putida* Gp01 (**figure 1.14**).

Si les données expérimentales sur l'alcane hydroxylase de type AlkB à fer non hémique sont très nombreuses, ce n'est pas le cas de l'alcane-1 monooxygénase à fer hémique de type CYP153 dont la fonction n'a été décrite qu'à partir de 2005.

4.1.3 Les monooxygénases de type cytochromes P450

Les monooxygénases à P450 sont des enzymes très étudiées du fait de leur présence ubiquitaire dans les organismes et de leur fréquente implication dans la dégradation des composés xénobiotiques. La nature hémique des cytochromes P450 a été établie en 1964 par Omura et Sato. La fonction enzymatique du cytochrome P450 et son rôle dans le métabolisme des composés xénobiotiques et dans l'hydroxylation des stéroïdes a ensuite été montré (Denison & Whitlock, 1995).

4.1.3.1 Classification des cytochromes P450 :

Les cytochromes P450 sont présents chez les eucaryotes supérieurs mais aussi chez les levures et les bactéries. Une nomenclature des P450 a été établie (Nelson, 2003). Il existe plusieurs familles de P450, nommées CYP ou Cyp chez la souris uniquement. En fonction du règne animal, les numérotations des familles de P450 changent. Chez les bactéries, la nomenclature a nommé les cytochromes P450 de CYP101 à CYP281 (Nelson, 2003). Pour classer des P450 dans une même famille protéique, il faut que les protéines aient au minimum 40 % d'identité de séquence (Nebert & Nelson, 1991).

Ces enzymes sont divisées en trois classes selon leur mode d'action catalytique :

a) Les cytochromes P450 de classe I correspondent aux enzymes mitochondriales et bactériennes, qui sont solubles. Ce sont des complexes composés de trois protéines : une ferrédoxine réductase contenant un coenzyme flavinique (FAD), une petite protéine contenant un centre fer-soufre (la ferrédoxine) et le cytochrome P450. La chaîne de transfert des électrons du NAD(P)H au P450 est décrite dans la **figure 1.15**. Dans de nombreux systèmes bactériens, les gènes codant pour le cytochrome P450, la ferrédoxine et la protéine réductase sont regroupés en opéron, généralement inductible (Peterson *et al.*, 1990; Peterson *et al.*, 1992); (Chauvaux *et al.*, 2001; Nagy *et al.*, 1995). Ce type de cytochrome est peu spécifique et peut catalyser l'oxydation de nombreux composés.

b) Les cytochromes de classe II, qui incluent les enzymes microsomiales et membranaires. Ils comprennent seulement deux protéines, une réductase contenant deux coenzymes (FAD et FMN) et le cytochrome P450. Le transfert des électrons est décrit par la **figure 1.15**.

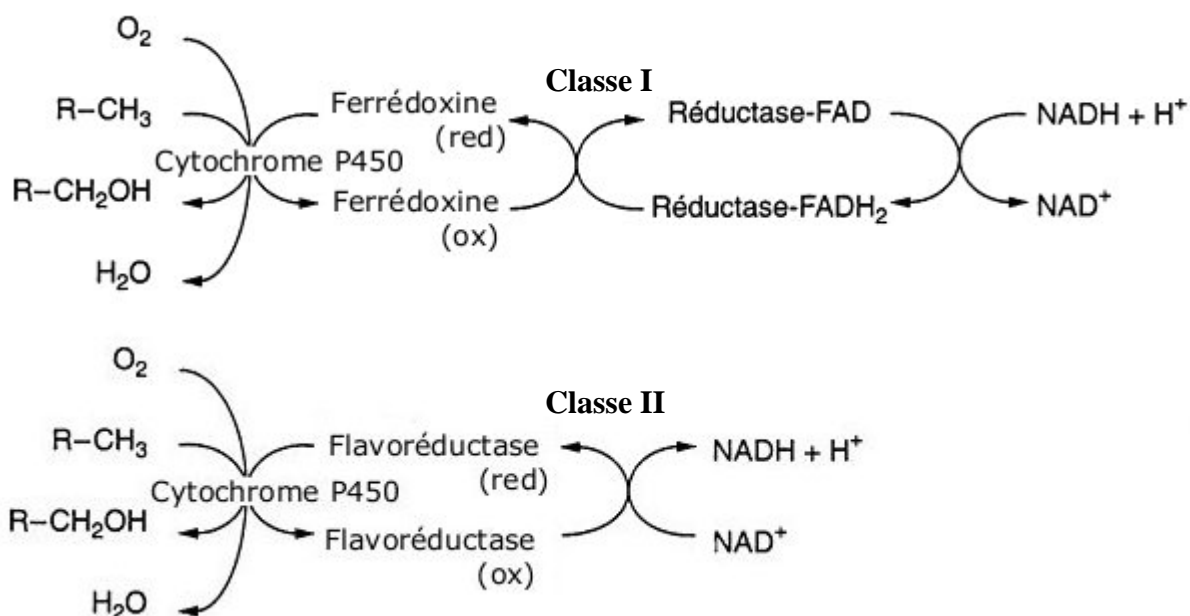


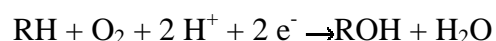
Figure 1.15 : Les monoxygénases à cytochrome P450 : les chaînes de transfert d'électron. Classification selon Munro & Lindsay (1996).

c) Un cytochrome P450 de classe III, CYP102, a été isolé chez *Bacillus megaterium* (P450 BM-3). Cette enzyme soluble de 119 kDa intervient dans le métabolisme des acides gras à longue chaîne et est intermédiaire entre les classes I et II. Ce cytochrome ne nécessite que la présence de NADPH pour oxyder les acides gras (Narhi & Fulco, 1987). Il est composé de deux domaines : un polypeptide de 66 kDa contenant les deux coenzymes flaviniques (FAD et FMN) et un polypeptide de 55 kDa correspondant au cytochrome P450 (Narhi & Fulco, 1987). Ces deux domaines présentent plus de similitudes avec la réductase et le cytochrome P450 à deux composants (type II) qu'avec les systèmes bactériens (type I).

4.1.3.2 Réactions catalysées

Les cytochromes P450 sont des protéines possédant un centre « hème-thiolate ». C'est une classe de protéine à fer hémique dont le cinquième ligand est un groupement thiol (généralement celui d'un résidu cystéine).

La réaction catalysée par les P450 mono-oxygénase est l'insertion d'un atome d'oxygène dans le substrat alors que l'autre atome d'oxygène est réduit en eau.



La plupart des réactions catalysées suivent le cycle catalytique présenté par la **figure 1.16**.

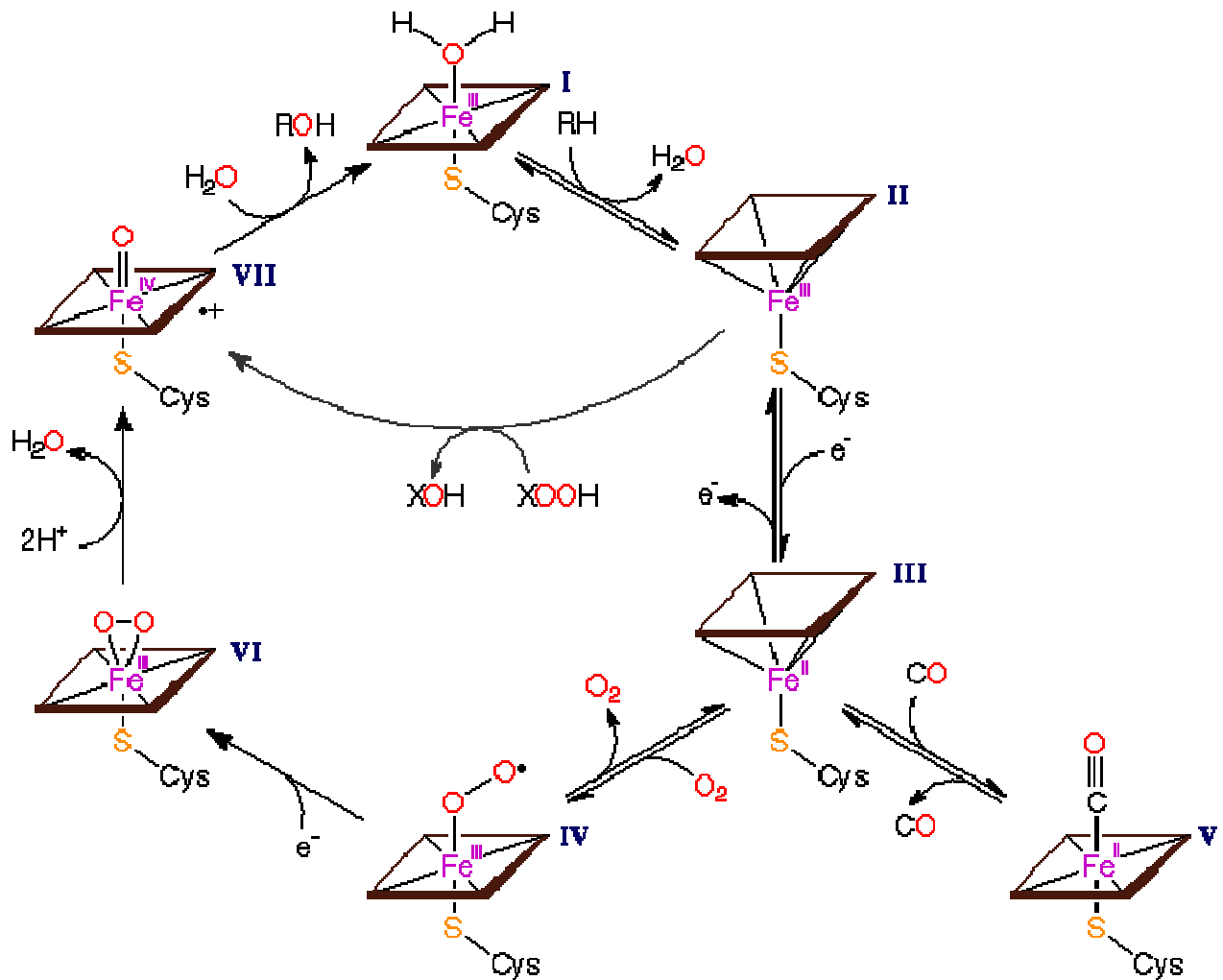


Figure 1.16 : Le cycle catalytique par le système cytochrome P450. D'après Munro et Lindsay (1996).

Un mécanisme général de l'activité catalytique des cytochromes P450 a été proposé par (Guengerich & MacDonald, 1990). Le cytochrome P450cam de *Pseudomonas putida* a largement servi de modèle pour ces études. Au cours de ce mécanisme catalytique, l'oxygène moléculaire est clivé et le substrat est oxydé (**figure1.16**). La première étape de ce mécanisme réactionnel est la fixation du substrat. Lors de cette étape, qui est supposée rapide, le spin de l'atome de fer est souvent modifié. L'atome de fer initialement sous la forme ferrique (**I**) dans un état bas spin hexacoordonné est converti en état haut spin pentacoordonné représenté par le complexe (**II**). Lors de la fixation du substrat le changement d'état de spin s'accompagne d'une modification du spectre d'absorption. Dans une seconde étape, le fer est réduit par l'arrivée d'un électron de la protéine réductase ou de la ferrédoxine. Le fer ferreux passe à l'état haut spin, représenté par le complexe (**III**). Au cours de la troisième étape, un complexe (**IV**), instable $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2]$, est formé par la fixation de l'oxygène moléculaire sur l'ion ferreux.

Lors des dernières étapes, un second électron est transféré au complexe cytochrome P450- $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2]$ ce qui régénère les intermédiaires (VI) peroxy $[\text{FeO}_2]^+$ et (VII) oxyferrique $[\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}]$. La liaison de l'oxygène moléculaire est ensuite rompue libérant une molécule d'eau et un intermédiaire réactif. Le substrat est alors oxygéné et libéré. Le cytochrome P450 est disponible pour un nouveau cycle.

Les cytochromes P450 sont capables de catalyser différentes réactions d'oxydation sur un grand nombre de substrats qu'il serait trop long de détailler dans cette étude. Pour illustrer certaines de ces réactions un exemple des différentes réactions catalysées chez *Rhodococcus*, une bactérie capable de dégrader un grand nombre de composés organiques, est présenté ci dessous (**figure 1.17**) :

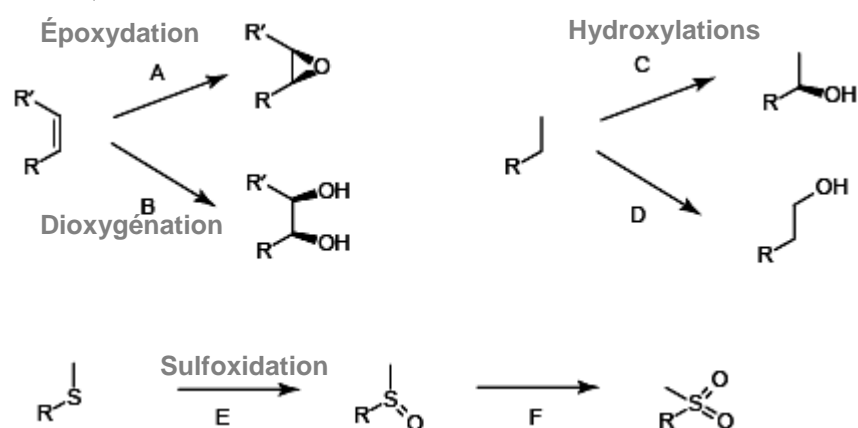


Figure 1.17 : Réactions catalysées par les cytochromes P450 de *Rhodococcus* facilitant sa croissance et la dégradation d'un large spectre de polluants. (Larkin *et al.*, 2005).

A : Réaction d'époxydation d'oléfines et de cycles aromatiques. Les époxydes des composés aromatiques peuvent subir un réarrangement pour former un phénol ou un trans-diol.

B : Réaction de *cis*-dihydroxylation. Au cours de cette réaction, 2 atomes d'oxygène sont incorporés au substrat. La réduction de l'oxygène moléculaire nécessite 4 électrons dont deux sont fournis par le substrat et les deux autres par le NADH. C'est une réaction qui est aussi catalysée par les dioxygénases, comme la naphthalène dioxygénase. Cette dernière est une enzyme à 3 composantes comprenant une NADH oxydoreductase à cofacteur flavinique, une ferrédoxine à cluster $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ et une composante oxygénase terminale avec un cluster $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ de Rieske et un centre à fer mononucléaire (Bassan *et al.*, 2004).

C : Réaction d'hydroxylation subterminale, c'est une réaction aussi catalysée par la propane monooxygénase de *Gordonia* sp. TY-5 et de *Pseudonocardia* sp. TY-7 (Kotani *et al.*, 2006).

D : Réaction hydroxylation terminale. La plupart des alcanes hydroxylases catalysent cette réaction. C'est en 2001 qu'a été mis en évidence par Maier *et al.* une nouvelle famille de

cytochrome P450 catalysant uniquement l'hydroxylation d'alcane linéaire. Il s'agit d'un cytochrome P450 de la famille des CYP153 de *Acinetobacter* sp. EB104 (Maier *et al.*, 2001).

E et F : Réaction de sulfoxydation de thiol en sulfoxides et des sulfoxides en sulfones.

Parmi ces réactions, nous nous intéresserons aux cytochromes P450 qui sont capables de dégrader des alcanes linéaires ou branchés de longueur de chaîne comprise entre C₄ et C₁₆.

4.1.3.3 Les cytochromes P450 de la famille des CYP153

Les cytochromes P450 catalysent l'oxygénation d'un grand nombre de composés aussi bien naturels que procarcinogènes, mutagènes et xénobiotiques. A la différence des P450 eucaryotes, les P450 procaryotes sont solubles. Il a été montré par Asperger *et al.* en 1981 que *Acinetobacter* était capable d'utiliser l'hexadécane comme unique source de carbone grâce à un cytochrome P450 fonctionnant comme une alcane hydroxylase (Asperger *et al.*, 1981). Chez les eucaryotes, les cytochromes P450 ayant une fonction d'alcane-1 mono-oxygénase sont appelés CYP4A. Dans les bases de données, l'équivalent procaryote est nommé AlkB, or il s'agit de l'alcane hydroxylase membranaire à fer non hémique (§ 4.1.2). Les cytochromes P450 catalysant une réaction d'hydroxylation d'alcane linéaire chez les bactéries ont été nommés CYP153 (Maier *et al.*, 2001). Il s'agit peut être d'une allusion à la nomenclature de l'enzyme : E.C.1.14.15.3.

4.1.3.3.1 Fonction des CYP153

Les cytochromes P450 de la famille des CYP153 sont des cytochromes de classe I car ils utilisent une ferrédoxine et une ferrédoxine réductase pour fonctionner (van Beilen *et al.*, 2006). De plus, ce type de cytochrome P450 est soluble. Les cytochromes P450 CYP153 hydroxylent préférentiellement les alcanes linaires de chaîne moyenne avec une forte sélectivité sur les régions *n*-terminales. Les CYP153 peuvent aussi hydroxyler des *n*-alcanes de longue chaîne et les alcanes cycliques. L'hydroxylation est uniquement terminale *in vivo*. Il a été montré que *in vitro*, le CYP153A6 peut former du 2-alcanol en faible proportion (< 5 %) (Funhoff *et al.*, 2006).

L'hydroxylation d'un alcane de chaîne moyenne semble être la fonction principale des CYP153. Funhoff *et al.* (2006) ont testé l'activité de onze CYP153. Il s'est avéré que certains cytochromes P450 (5/11) sont aussi capables de faire des réactions d'époxydation, en plus des réactions d'hydroxylation. Les réactions sont présentées par la **figure 1.18**.

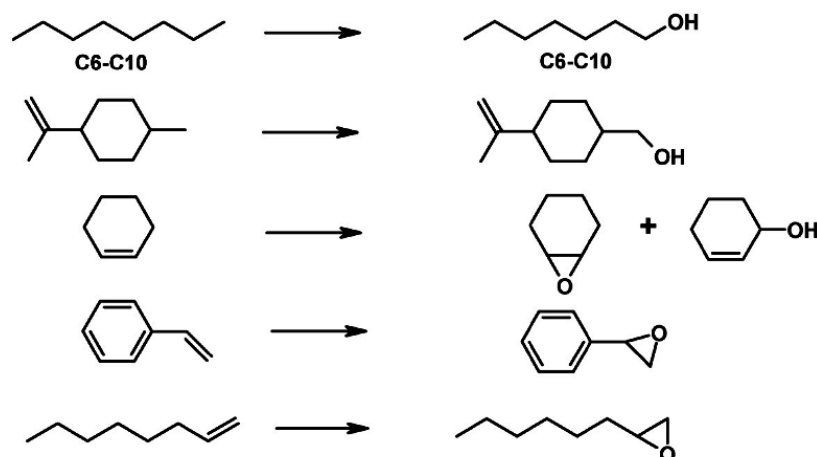


Figure 1.18 : Réactions catalysées par des CYP153 d'après (van Beilen & Funhoff, 2007)

Le CYP153A6 de *Mycobacterium* sp. XHN1500 utilise préférentiellement l'octane, alors que le CYP153A7 de *Sphingomonas* sp. préfère oxyder l'octène. Le CYP153A6 est utilisé pour convertir des alcanes en alcanols ou bien encore le limonène en alcool périllylique, un agent anticancéreux (van Beilen *et al.*, 2005a). Le CYP153A7 est utilisé pour hydroxyler des pyrrolidines, pyrrolidones, pipéridine et azétidines substituées qui sont des intermédiaires d'intérêt pour l'industrie pharmaceutique.

4.1.3.3.2 Présence et redondance dans les génomes bactériens

Une analyse des homologies de séquence peptidique au niveau du site actif du CYP153 est représentée sur la **figure 1.19**. La région comparée est comprise entre le site de fixation du substrat proche de l'hélice I et la séquence terminale de fixation de l'hème par la cystéine en position axiale. (Voir § suivant pour la structure).

La plupart des séquences analysées correspondent à la sous-famille des CYP153A. Cinq autres CYP153 appartiennent aux sous-familles C, D ou E. La séquence la plus éloignée est celle de *Novosphingobium aromaticivorans* CYP153C1 qui a entre 38 et 43% d'identité avec les autres séquences de CYP153.

4.1.3.3.3 Structure

Puisque les tentatives de cristallisation du CYP153 ont été infructueuses, une modélisation de la structure a été réalisée par Funhoff *et al.* (2006) (**figure 1.20**). Le modèle obtenu révèle que le site actif du CYP153 a une nature hydrophobe, ce qui est le cas d'autres CYPs. C'est aussi ce qu'avait supposé Maier en 2001 en observant la nature hydrophobe des acides aminés composant la première hélice α du cytochrome P450 de *Acinetobacter* sp.

EB104. Dans ce cas, la réaction catalysée prend place dans une poche catalytique de nature hydrophobe. Ce qui facilite le passage du substrat.

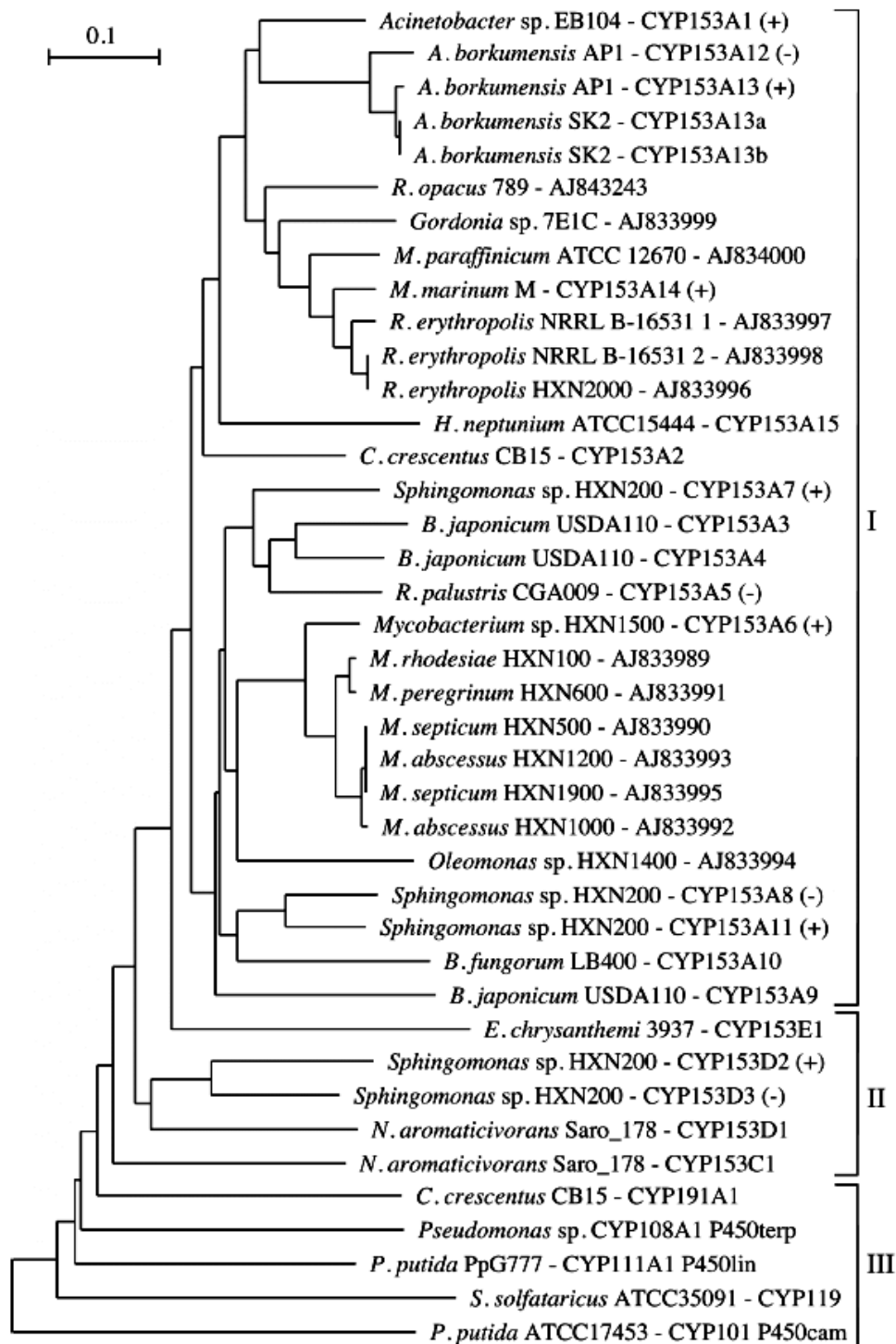


Figure 1.19 : Arbre phylogénique des P450 de type CYP153 basé sur l'alignement de séquences partielles (région de fixation de l'hème). (van Beilen et al., 2006)

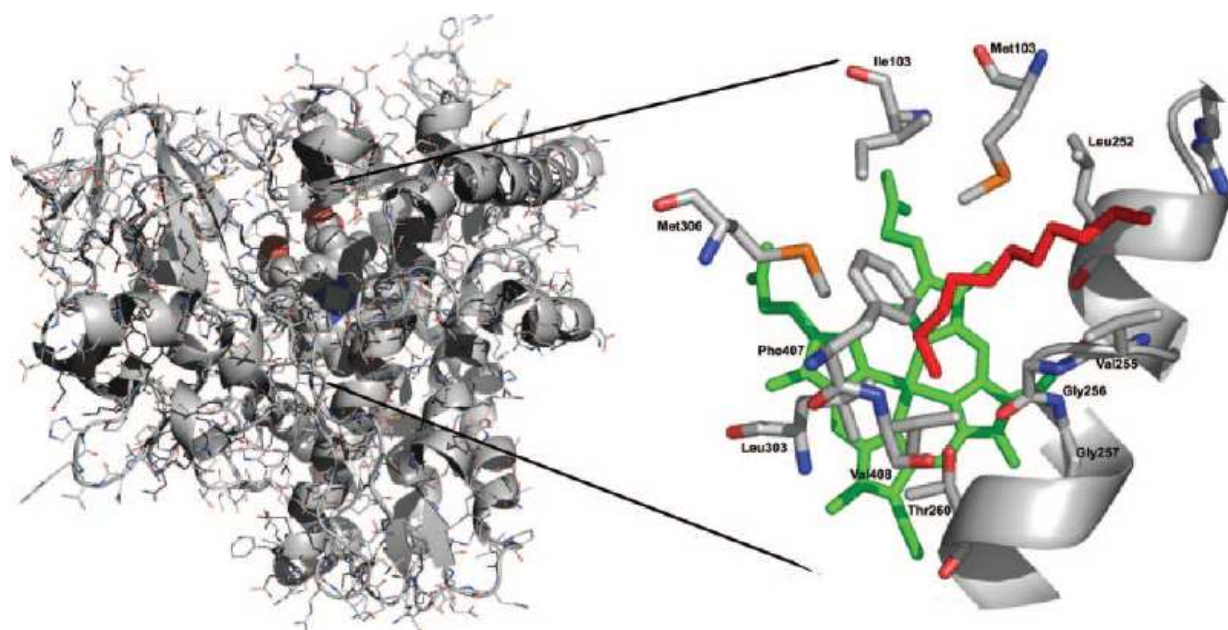


Figure 1.20 : Modèle de la structure du CYP153A6 selon Funhoff et al. 2006.

À gauche, la structure du CYP153A6 modélisée et à droite en rouge le undécane coordonné à l'hème (en vert).

Pour le CYP153A6 de la souche de *Mycobacterium* sp. XHN1500 (illustré par la **figure 1.20**) les résidus composant le site actif sont les suivants : Met101, Ile103 et Met106. Ces résidus sont localisés, en partie, à proximité d'autres acides aminés hydrophobes : Leu252, Val255, Gly256, Gly257 et Thr260 dans l'hélice centrale I et de Leu303, Phe407, Val408. Des analyses in silico d'amarrage d'alcane en C₅ à C₁₀ ont montré que dans plus de 90 % des cas, les molécules se présentaient de la même manière au site actif. Le carbone terminal est proche de l'ion ferreux de l'hème (4,5 Å) et l'alcane a une conformation coudée le long de l'hélice I, ceci, en raison de la présence de la Phe407. Si des alcanes de longueur de chaîne supérieure à 10 carbones ou inférieure à 5 carbones sont présentés au site catalytique, seule une partie (jusqu'à 50%) peut s'y fixer.

4.1.4 CYP153 ou AlkB ? : L'exemple de *Alcanivorax borkumensis* SK2

Il existe deux types d'alcane hydroxylases impliquées dans l'étape initiale de dégradation d'alcane de chaîne moyenne, l'AlkB et le CYP153. Certaines bactéries sont équipées des deux catégories d'enzymes, comme *Rhodococcus erythropolis* qui a quatre AlkB et trois CYP153 (Whyte et al., 2002) ou *Alcanivorax borkumensis* SK2 qui a deux AlkB et deux CYP153. *A. borkumensis* est une bactérie marine qui utilise exclusivement les hydrocarbures comme sources de carbone. Son génome a été séquencé récemment et il s'avère que ce dernier a plusieurs systèmes enzymatiques de dégradation des *n*-alcane (**figure 1.21**) (Schneiker et al., 2006).

L'opéron *alkSB1GHJ* de *A. borkumensis* SK2 a près de 80 % de similitude de séquences protéiques avec l'opéron *alkBFGHJKL* de *P. putida* GPo1 (Kok *et al.*, 1989a) (Vahaoja *et al.*, 2005; van Beilen *et al.*, 2001; van Beilen *et al.*, 2002b; van Beilen *et al.*, 2003) à l'exception de l'*alkS* codant pour un activateur de transcription de type LuxR et de la sous famille des MalT qui n'a que 48 % d'identité de séquence. L'AlkB1 de *A. borkumensis* SK2 oxyde les alcanes de C₅ à C₁₆. L'*alkB1* est induit en présence d'alcanes lors de la phase de croissance exponentielle de la bactérie et non lors de la phase stationnaire (Sabirova *et al.*, 2006b; van Beilen *et al.*, 2004). Les autres gènes reliés à la dégradation des alcanes comme *alkK* (une rubrédoxine), *alkL* (une protéine de transport membranaire) et *alkN* (une protéine potentiellement impliquée dans le chimiotactisme) ont moins de similitudes avec les orthologues de *P. putida* Gpo1. En outre, il n'y a pas d'équivalent pour l'*alkF* codant pour la rubrédoxine 1 de *P. putida* Gpo1. Cependant, deux gènes *rubA* et *rubB* codant pour la rubrédoxine et la rubrédoxine réductase ne sont pas dans l'opéron *alkSB1GHJ* de *A. borkumensis* SK2 mais dans une autre région du génome de la bactérie.

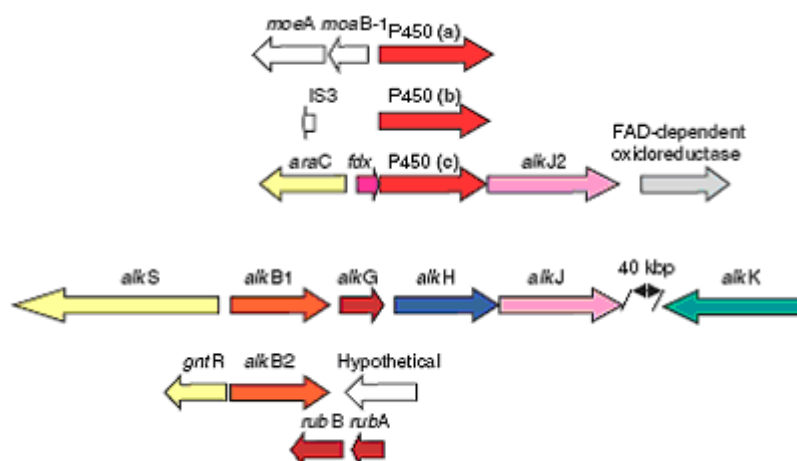


Figure 1.21 : Déterminants génétiques impliqués dans la dégradation des alcanes chez *A. borkumensis* SK2 (Schneiker *et al.*, 2006)

Un second système enzymatique fonctionnant avec une alcane hydroxylase a été découvert, il s'agit de l'*alkB2* sous le contrôle d'un répresseur de transcription GntR. L'AlkB2 oxyde des alcanes de chaîne moyenne, de C₈ à C₁₆ (Smits *et al.*, 2002; van Beilen *et al.*, 2004). L'*alkB2*, tout comme l'*alkB1*, est induit en présence d'alcanes de C₁₀ à C₁₆ (van Beilen *et al.*, 2004). Il est intéressant de noter que les systèmes de gènes des alcanes hydroxylases sont proches de l'origine de réplication du chromosome de *A. borkumensis* SK2 ce qui permet à cette dernière de croître rapidement sur alcanes.

A. borkumensis SK2 pousse aussi en présence d'isoterpénoïdes. Néanmoins le temps de génération de la bactérie est deux fois plus long sur pristane ($0.106 \pm 0.016 \text{ h}^{-1}$) que sur

hexadécane ($0.115 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$) utilisé comme seule source de carbone et d'énergie (Martins dos Santos *et al.*, 2008).

Les gènes d'*alkB1* et d'*alkB2* ne sont pas exprimés en présence de terpénoïdes. C'est un autre système de dégradation des alcanes qui entre en jeu, celui des monooxygénases de type cytochromes P450. Les cytochromes P450 (b) et (c) sont des paralogues (**figure 1.21**), le cytochrome P450 (a) est en opéron avec une ferrédoxine (*fdx*), une alcool déshydrogénase (*alkJ2*), une oxydoréductase FAD dépendante et un régulateur de transcription AraC (Schneiker *et al.*, 2006). Des analyses protéomiques ont montré que toutes ces enzymes qui sont sous le contrôle de ce cluster de gènes sont surexprimées lors de la croissance de *A. borkumensis* SK2 sur octadécane (Sabirova *et al.*, 2006a). Des analyses de PCR quantitative ont montré que les P450 (b et c) sont exprimés seulement en présence d'alcanes, ce qui n'est pas le cas du P450 (a) dont l'expression est constitutive (Martins dos Santos *et al.*, 2008). Une analyse de séquence des P450 paralogues et tout deux induits en présence d'alcane a montré qu'ils sont très proches du cytochrome P450 de *Acinetobacter* sp. Eb104 qui catalyse l'oxydation terminale des alcanes (Maier *et al.*, 2001). Il s'agit donc de CYP153.

D'après ces éléments de génomes, une reconstitution schématique de dégradation des alcanes est représentée par la **figure 1.22**.

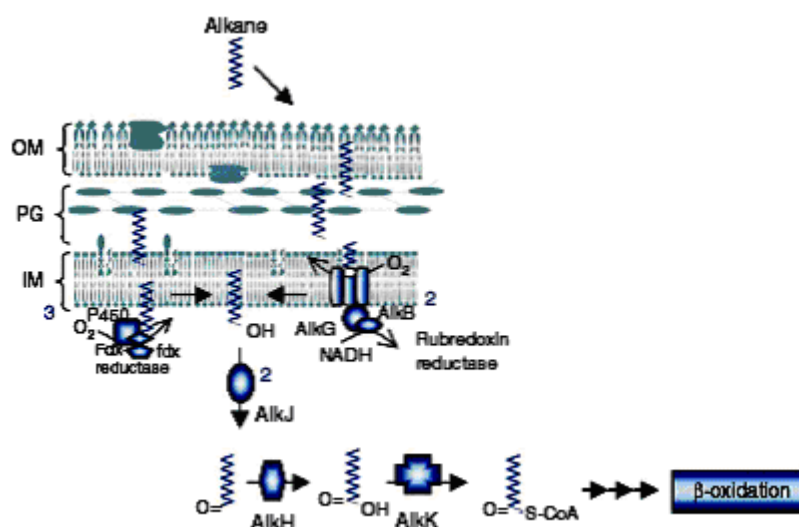


Figure 1.22 : Reconstitution des voies de dégradation putatives des alcanes chez *A. borkumensis* SK2. (Schneiker *et al.*, 2006)

Afin de dégrader les alcanes, les bactéries utilisent soit une alcane hydroxylase de type AlkB soit un cytochrome P450 de type CYP153 soit les deux. A l'exception de l'étude du génome de *A. borkumensis*, les cibles spécifiques de ces enzymes ne sont pas détaillées dans la littérature. Cette étude réalisée par l'équipe de Golyshin P.N. est la première à montrer

l'existence de deux types d'alcane mono-oxygénase, une à fer hémique et l'autre non chez une bactérie. Parmi les génomes de bactéries récemment séquencées, comme celui de *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1, *M. gilvum* PYR-GCK, les deux systèmes ne sont pas présents. Ces bactéries sont en général équipées d'enzymes de type AlkB.

Ces enzymes, catalysant l'étape initiale de dégradation des alcanes, sont généralement présentes chez les bactéries capables d'utiliser ce type de substrat comme unique source de carbone et d'énergie. C'est la raison pour laquelle ces bactéries sont aussi bien équipées en oxydoréductases qui prennent ensuite le relais de dégradation des alcools pour s'en servir pour leur croissance ou pour participer à la synthèse des lipides cellulaires.

4.2 Les oxydoréductases (E.C. 1).

Les oxydoréductases, ou enzymes redox, sont une importante classe d'enzymes naturelles, représentant près du quart des enzymes connues. Elles catalysent des réductions et oxydations chimiques et interviennent dans la dégradation ou la synthèse de nombreuses substances biochimiques.

Le nom commun est « déshydrogénase ». Comme alternative, "réductase accepteur" peut être employé. Le nom "oxydase" est employé seulement si l'O₂ est l'accepteur d'électrons. La classification est difficile dans certains cas, en raison du manque de spécificité envers l'accepteur.

4.2.1 Les alcool déshydrogénases (E.C. 1.1.)

Les alcool déshydrogénases (ADHs) appartiennent à la sous-classe E.C. 1.1 des oxydoréductases oxydant des alcools primaires, secondaires et des hémi-acétals en aldéhydes ou en cétones. Les ADHs sont impliquées dans des voies métaboliques nombreuses et peuvent oxyder des alcools primaires ou secondaires, à chaîne linéaire ou branchée, aliphatiques ou aromatiques (MacKintosh & Fewson, 1987). Les microorganismes possèdent généralement plusieurs ADHs et leurs rôles physiologiques respectifs sont alors difficiles à connaître précisément.

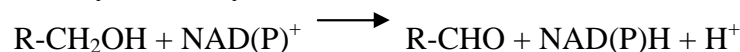
Les ADHs utilisent différents accepteurs d'électrons comme le NAD(P)⁺, la pyrrolo quinoline quinone (PQQ), un groupement hémique en association avec la PQQ, le cofacteur F₄₂₀ ou le FAD.

Les ADHs peuvent être divisées en trois catégories majeures (Reid & Fewson, 1994) :

1. Les alcool déshydrogénases NAD- ou NADP- dépendantes
2. Les alcool déshydrogénases NAD(P)- indépendantes
3. Les oxydases

4.2.1.1 Les ADH utilisant le NAD(P)⁺ comme accepteur d'électrons (E.C. 1.1.1.).

Les alcool déshydrogénases NAD(P)-dépendantes correspondent à la classe d'ADH la plus étudiée. Ces enzymes catalysent la réaction suivante :



Trois groupes composent cette superfamille (Reid & Fewson, 1994):

Groupe I : les ADHs zinc-dépendantes à longue chaîne (environ 350 acides aminés). Il représente le groupe le plus étudié (Yokoyama *et al.*, 1990) et l'ADH de foie de cheval (HLADH) en est l'archétype. Les ADHs de ce groupe appartiennent aux eucaryotes, aux champignons, aux levures ou aux bactéries. Il y a par exemple la benzyl alcool déshydrogénase de *Pseudomonas putida* (Shaw & Harayama, 1990). C'est aussi le cas de 4 alcool déshydrogénases de *Rhodococcus* (Peng *et al.*, 2006) et d'une alcool déshydrogénase, Adh, de *Corynebacterium glutamicum* (Arndt & Eikmanns, 2007) qui présentent les résidus conservés GXGXXG correspondant au site de fixation du coenzyme et un second ligand du site catalytique à Zn²⁺ GHEXXGXXXXXXGXXV.

Groupe II : les ADHs zinc-indépendantes à courte chaîne (environ 250 acides aminés). Ce groupe n'est pas bien caractérisé. Il comprend une vingtaine d'ADHs. Ces enzymes ont un large spectre d'action et ont été isolées principalement de drosophiles et de Procaryotes. La ribitol déshydrogénase de *Klebsiella aerogenes* a été caractérisée comme appartenant à ce groupe (Loviny *et al.*, 1985).

Groupe III : les ADH à fer. Ce groupe correspond aux ADH à fer dont la taille des sous-unités est autour de 385 acides aminés. La plupart des enzymes de ce groupe ont été isolées chez des bactéries. L'alcool déshydrogénase II de *Zymomonas mobilis* et l'alcool déshydrogénase IV de *Saccharomyces cerevisiae* appartiennent à ce groupe. Cependant, certaines enzymes peuvent avoir presque 900 résidus, c'est le cas de l'alcool déshydrogénase multifonctionnelle d'*Escherichia coli* et de *Clostridium acetobutylicum*. *Z. mobilis* a deux ADH, une ADH I zinc dépendante et une ADH II à fer. Cette dernière est sensible à l'oxydation, car en présence d'oxygène l'activité de l'enzyme est perdue car il n'y a plus de métal dans son site actif (Tamarit *et al.*, 1997).

4.2.1.2 Les alcool déshydrogénases NAD(P)-indépendantes (E.C. 1.1.[2-3-4-5-99]).

Les alcool déshydrogénases NAD (P)-indépendantes catalysent la réaction suivante :



où 2X(ox) et 2X(réd) sont, respectivement, les formes oxydée et réduite de l'accepteur d'électrons qui peut être soit un cytochrome (classe d'enzyme E.C. 1.1.2), soit une molécule

d'oxygène (E.C. 1.1.3), soit un disulfide (E.C. 1.1.4), soit un co-facteur dérivé de la quinone (E.C. 1.1.5). Parmi ces enzymes, la famille des alcool déshydrogénases pyrrolo quinoline quinone (PQQ) –dépendante a été particulièrement étudiée (Toyama *et al.*, 2004). Ces enzymes sont trouvées chez les α , β et γ -protéobactéries et sont localisées dans le cytoplasme. Cette classe d'enzymes inclue les quinoprotéines et les quinohémostéines. Elles sont divisées en 3 catégories :

- Type I : ce sont les ADH trouvées en petit nombre chez les méthanotrophes comme par exemple la méthanol déshydrogénase de *Paracoccus denitrificans* (de Vries *et al.*, 1988). Ce sont des quinoprotéines avec une PQQ comme groupement prosthétique. Elles sont différenciées en fonction de la spécificité du substrat.
- Type II et III : ce sont des quinohémostéines ou des ADH contenant une sous-unité quinohémostéine et un cytochrome c. Les enzymes de type II sont solubles alors que celles de type III sont liées à la membrane. L'éthanol déshydrogénase NAD(P) indépendante de *Acetobacter* (Takemura *et al.*, 1993) et de *Gluconobacter* spp. (Matsushita *et al.*, 1991) fonctionnent avec une sous unité comprenant un cytochrome c et sont liées à la membrane, ce sont des ADH-PQQ-dépendantes de type III.

4.2.1.3 Une famille particulière, les flavoprotéines

Une famille particulière et correspondant à des NAD(P)H : flavine oxydoréductases a été créée après la découverte de caractéristiques communes à certaines oxydoréductases issues de ces différentes sous-classes. Cette famille est divisée elle-même en deux classes, la classe I correspond aux enzymes dans lesquelles la flavine n'est pas liée dans un groupement prosthétique alors que la classe II correspond aux enzymes dans lesquelles la flavine est liée dans un groupement prosthétique. La famille des GMC oxydoréductases appartient à la classe I car la flavine, le cofacteur, n'est pas liée de façon covalente.

Cavener (1992) a proposé de définir cette famille sur la base des résultats obtenus avec un groupe de flavoenzymes qui incluaient alors, la glucose déshydrogénase (GLD ; EC 1.1.99.10) de *Drosophila melanogaster*, la méthanol oxydase (MOX ; EC 1.1.3.13) des levures *Hansenula polymorpha* et *Pichia pastoris*, la glucose oxydase (GOX ; EC 1.1.3.4) de *Aspergillus niger* et la choline déshydrogénase (CHD ; EC 1.1.99.1) de *Escherichia coli*. Ces enzymes présentaient des séquences primaires similaires, ce qui en faisaient des protéines homologues malgré l'écart phylogénétique considérable entre ces différentes espèces. Les identités de séquences entre ces différentes enzymes se situent entre 23 et 32 %. Ce sont les

enzymes comme la glucose déshydrogénase et la choline déshydrogénase qui ont le plus fort degré de similarité.

Les réactions catalysées sont les suivantes :

- Choline déshydrogénase (CHD) : Choline + accepteur à l'état oxydé → bétaine aldéhyde + accepteur réduit
- Glucose déshydrogénase (GLD) : Glucose + accepteur à l'état oxydé → δ -gluconolactone + accepteur réduit
- Glucose oxydase (GOX) : Glucose + O₂ → δ -gluconolactone + H₂O₂
- Méthanol oxydase (MOX) : Méthanol + O₂ → Formaldéhyde + H₂O₂

Les sites catalytiques de ces enzymes ne sont pas connus et dans deux cas, CHD et GLD, les accepteurs ne sont pas identifiés. Depuis cette étude, d'autres enzymes ont été rattachées à cette famille, l'aryl-alcool oxydase (AAO) de *Pleurotus eryngii* et *Pleurotus pulmonarius* (Varela *et al.*, 2000) ainsi qu'une polyéthylène glycol déshydrogénase (PEG-DH) de *Sphingomonas terrae* (Sugimoto *et al.*, 2001).

Ces enzymes ont en commun trois séquences consensus « signatures » ainsi qu'une séquence conservée impliquée dans la liaison du FAD dont le motif GxGxxG est caractéristique. Il se trouve dans la partie N-terminale de cette protéine au sein d'une zone de repliement dont la structure est de type β - α - β (Varela *et al.*, 2000).

AlkJ, impliqué dans la voie de dégradation des alcanes chez *P. putida* GpoI (**Figure 1.13, 1.21**) et codée par l'opéron *alkJKL*, est une alcool déshydrogénase appartenant à la famille des flavine oxydoréductases. Un alignement a d'ailleurs été réalisé avec les 4 premières enzymes composant au départ cette famille (van Beilen *et al.*, 1992a).

4.2.2 Les aldéhyde déshydrogénases (E.C. 1.2).

4.2.2.1 Fonction

Les aldéhyde déshydrogénases (ALDHs) constituent quant à elles une vaste famille d'enzymes très diversifiées. Elles permettent de métaboliser une grande variété d'aldéhydes exogènes et endogènes (Sophos *et al.*, 2001). Cette famille est classée dans les déshydrogénases oxydant les aldéhydes où les groupes oxo des donneurs qui peuvent être oxydés aussi bien avec addition d'eau puis clivage de la liaison C-C que, dans le cas des composés cycliques, par addition de molécules d'eau puis déshydrogénation. Avec le nombre grandissant de séquences de génomes, cette famille est en constante expansion. La présence de gènes codant pour des ALDHs dans une grande majorité de génomes de Archea, d'Eubactéries et d'Eucaryotes vient renforcer l'idée que l'intervention de ces enzymes dans les

processus métaboliques a des origines très anciennes, ce qui a été montré par une analyse phylogénique (Sophos & Vasiliou, 2003).

Ces enzymes catalysent notamment la conversion d'aldéhydes en acides correspondants (activés ou non), et ce de façon irréversible. Elles existent sous plusieurs formes avec des localisations tissulaires et subcellulaires variées. Leurs substrats sont en général des aldéhydes aliphatiques et aromatiques. La littérature présente beaucoup d'études sur les aldéhyde déshydrogénases eucaryotes (Gonzalez-Duarte & Albalat, 2005; Sophos *et al.*, 2001; Sophos & Vasiliou, 2003). Associées aux alcool déshydrogénases (ADHs), ces enzymes sont des acteurs majeurs des voies de dégradation bactérienne assimilant les alcanes, les alcools et les aldéhydes, elles remplissent d'ailleurs d'importantes fonctions de détoxification cellulaire et sont aussi impliquées dans des systèmes de défense contre des xénobiotiques (Hempel *et al.*, 1993) (Jornvall, 1994; Vasiliou & Pappa, 2000). Les enzymes les plus étudiées de cette famille sont les aldéhyde déshydrogénases de classe ALDH1 (cytosolique) et ALDH2 (mitochondriale) de foie humain en raison de leur implication dans la conversion de l'acétaldéhyde dérivé de l'éthanol. Les sous-unités de ALDH comprennent environ 500 résidus d'acides aminés et sont le plus souvent tétramériques. La première structure de déshydrogénase de classe I a été établie par Hempel *et al.* (Hempel *et al.*, 1984). Ces enzymes ont une conformation générale assez similaire. On note la présence de trois domaines, un domaine impliqué dans la liaison au co-enzyme, un domaine catalytique et un domaine d'oligomérisation.

4.2.2.2 Classification

La super famille des ALDH est subdivisée en fonction de l'accepteur d'électrons qui peut être le NAD(P)⁺ (E.C. 1.2.1), un cytochrome (E.C. 1.2.2), l'oxygène (E.C. 1.2.3), un disulfide (E.C. 1.2.4.), un protéine fer-souffre (E.C. 1.2.7) ou un autre accepteur (E.C. 1.2.99). Ainsi les ALDH sont classées sur la base de leur spécificité de substrat et peuvent être regroupées en plusieurs familles (Sophos & Vasiliou, 2003):

- Semialdéhyde déshydrogénase (E.C. 1.2.1.[16-24-27-31-32-41])
- ALDHs non-spécifiques (E.C. 1.2.1.3)
- Bétaïne aldéhyde déshydrogénases (E.C.1.2.1.8)
- Glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénases non-phosphorylante (E.C. 1.2.1.9)
- Phénylacetaldéhyde déshydrogénase (E.C. 1.2.1.39)
- Lactaldéhyde deshydrogénase (E.C. 1.2.1.22)

- ALDH-like protéines incluant des protéines contenant parfois des séquences partielles d'ALDHs.

L'intégralité de la nomenclature de cette catégorie d'enzyme figure sur le site www.aldh.org

Il est intéressant de noter que dans la famille des bétaine aldéhyde déshydrogénases on trouve l'enzyme AlkH, impliquée dans la voie de dégradation des alcanes chez *P. putida* GPo1 et codée par le gène *alkH* appartenant à l'opéron *alkBFGHJKL* (**figure 1.13** ; (Kok *et al.*, 1989a; Kok *et al.*, 1989b; van Beilen *et al.*, 1992a)

4.3 Les estérases (E.C.3.1.1.x)

Les estérases appartiennent au groupe des hydrolases E.C.3.1.1 qui catalysent la formation ou la coupure des liaisons esters de composés solubles dans l'eau. Ces enzymes sont largement distribuées chez les animaux, les plantes et les microorganismes. La réaction peut être réversible, cela en fonction des conditions thermodynamiques. Il faut différencier les lipases (E.C.3.1.1.1) dont les substrats sont des triglycérides et des acides gras à longue chaîne, des estérases (E.C.3.1.1.13) qui agissent sur les esters carboxyliques.

4.3.1 Mécanisme d'hydrolyse de l'ester

Beaucoup d'estérases ont une large gamme de tolérance aux substrats ce qui montre qu'elles ont évolué pour faciliter leur accès aux diverses sources de carbone lors des voies cataboliques. De plus, les estérases ont une forte régio- et stéréo- spécificité, ce qui les rend intéressantes pour la biocatalyse et la production de composés optiquement purs (Bornscheuer, 2002). L'intérêt de ces enzymes réside dans le fait qu'elles ne nécessitent pas la présence de cofacteurs et sont habituellement stables et même actives dans les solvants organiques. Deux classes majeures d'hydrolases sont à dissocier :

Les lipases (EC 3.1.1.1, triacylglycerol hydrolases)

Les vraies estérases (EC 3.1.1.3, carboxyl ester hydrolases).

La structure tridimensionnelle des deux enzymes (Ollis *et al.*, 1992) met en évidence un repliement caractéristique α/β de l'hydrolase. En effet, un ordre précis des hélices α et des feuillets β qui est aussi retrouvé dans les halopéroxydases et les époxydes hydrolases. La triade catalytique est composée de la séquence Serine - acide Aspartique - Histidine (la Glu remplace l'Asp pour quelques lipases), d'une séquence consensus Gly-X-Ser-X-Gly et du site actif à sérine. Petersen *et al.* (2001) ont montré que les estérases ont un motif Gly-X-X-Leu tout comme les enzymes montrant de fortes homologues de séquence avec la classe C des L-lactamases (Petersen *et al.*, 2001).

Le mécanisme d'hydrolyse de l'ester est à peu près le même pour les estérases et les lipases et est composé de quatre étapes:

La première est la formation d'un intermédiaire tétrahédrique issu de liaison avec la sérine et stabilisé par les résidus hisidine et acide aspartique du site catalytique. Puis, l'alcool est formé suite à l'hydrolyse et un complexe acyl est formé au niveau de l'enzyme. Après une attaque nucléophile, par de l'eau dans le cas d'une hydrolyse, ou sur un alcool ou un ester en (trans-) estérification reforme alors un intermédiaire tétrahédrique, qui est libéré sous forme d'acide et d'ester.

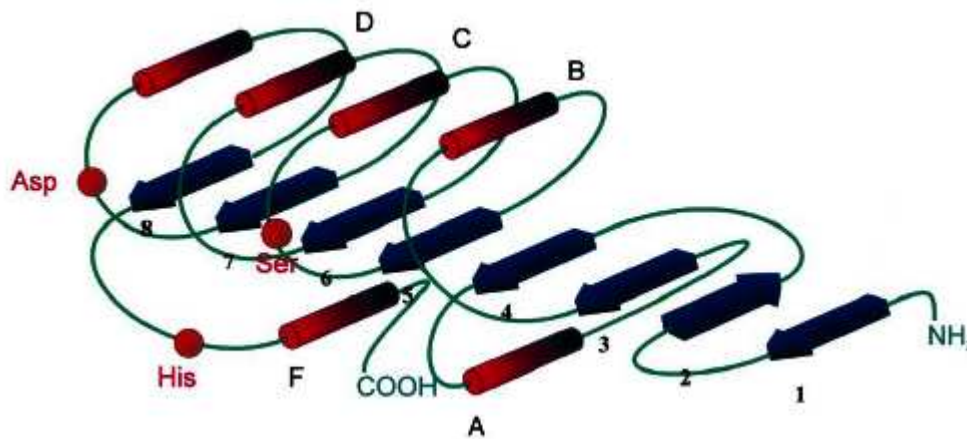


Figure 1.23 : Représentation schématique du repliement α/β de l'hydrolase.

Les feuillets β sont représentés en bleu et les hélices α en rouge. La position des acides aminés de la triade catalytique est représentée en rouge. (Bornscheuer, 2002)

Les lipases agissent lors d'un phénomène d'activation interfaciale ce qui n'est pas le cas des estérases. En effet, les lipases agissent dans des conditions particulièrement hydrophobes en raison d'un domaine hydrophobe au niveau du site actif de la molécule. Seule la présence d'une concentration minimum de substrat et la présence d'une phase non aqueuse permet au substrat d'accéder au site actif. En outre, les lipases préfèrent des substrats insolubles dans l'eau comme les triglycérides composés d'acides gras de longues chaînes alors que les estérases hydrolysent préférentiellement des esters simples comme l'acétate d'éthyle. Les deux enzymes sont stables et actives dans les solvants organiques (Fojan *et al.*, 2000).

Afin de rechercher une activité estérase, il est courant d'utiliser des substrats chromophores (*i.e.* *p*-nitrophenyl esters) (Palomo *et al.*, 2004; Soror *et al.*, 2007).

4.3.2 Classification des estérases

La classification des enzymes peut être faite soit sur la spécificité de leurs substrats, soit à partir d'alignements de séquences. La classification selon la spécificité du substrat

nécessite de comparer toutes les enzymes avec le même type de substrats et de préférence dans les mêmes conditions. Ceci obligerait donc à ce que les biochimistes qui caractérisent ces enzymes utilisent les mêmes protocoles, ce qui n'est pas une stratégie d'analyse habituelle. La seconde option de classification est plus facile d'accès grâce à l'information croissante de séquences dans les bases de données. La comparaison de séquences en acides aminés permet de donner une image claire de l'évolution et des relations entre les différentes enzymes. C'est ainsi qu' (Aurilia *et al.*, 2008) ont classé ces enzymes et ont montré que les estérases forment une superfamille comprenant 90 sous-familles. Parmi elles, 156 protéines différentes ont été cristallisées. Il a été établi que la séquence consensus des lipases et des carboxyles - estérases avait le motif Gly-X-Ser-X-Gly, avec un site actif à proximité de la sérine. Aurilia *et al.* (2008) ont analysé toutes les séquences d'estérases et ont confirmé la présence de ce motif chez la plupart des estérases classiques. Cependant, ce n'est pas parce que deux enzymes ont une similitude de séquence qu'elles ont les mêmes propriétés comme : la spécificité vis à vis des substrats, la stéréospécificité, le pH, la température optimale de fonctionnement et la stabilité dans les solvants. Par exemple, la bromoperoxydase de *Streptomyces aureofaciens* a 55% d'identité de séquences avec une estérase de *Pseudomonas fluorescens* mais ces deux enzymes n'ont pas tout à fait la même spécificité vis-à-vis de leurs substrats (Pelletier & Altenbuchner, 1995). Même si l'on considère aujourd'hui que toutes les lipases et les carboxyl-estérases ont la même séquence consensus Gly-X-Ser-X-Gly où le site actif est représenté par une sérine. En 1999, une analyse de séquence a montré que ce n'était pas le cas de toutes les enzymes (Arpigny & Jaeger, 1999). Par exemple, la séquence consensus de *Streptomyces scabies* contient une séquence Gly-Asp-Ser-Leu avec un site catalytique contenant le duo Ser-His au lieu de la triade classique Ser-Asp-His (Wei *et al.*, 1995). C'est aussi le cas pour d'autres estérases comme celle de *Pseudomonas aeruginosa* (AF005091), *Salmonella typhimurium* (AF047014) et de *Photobacterium luminescens* (X66379). D'autres informations concernant les propriétés biochimiques et les substrats préférés de certaines estérases figurent dans le **tableau 1.3**.

Tableau 1.3 : Comparaison de diverses carboxyl estérases bactériennes (Bornscheuer, 2002).

Origin ^a	Biochemical properties	Specific substrates ^b	Remarks
<i>B. gladioli</i> ATCC10248 (EstB)	392 aa, 42 kDa	pNP-esters, triglycerides (up to C ₆), deacylates, cephalosporins	S-x-x-K motif, β -lactamase-like
<i>B. gladioli</i> ATCC10248 (EstC)	298 aa, 32 kDa	pNP-esters (up to C ₅), not triglycerides	G-x-S-x-G motif, homology to plant hydroxynitrile lyases
<i>P. fluorescens</i> DSM50106	36 kDa, T _{opt.} 43°C	Lactones, ethyl caprylate, moderate enantioselectivity	G-x-S-x-G motif, homology to a haloperoxidase
<i>P. fluorescens</i> SIKW1	27 kDa, homodimer	pNP-esters, high enantioselectivity for α -phenyl ethanol, moderate <i>E</i> values for other alcohols and carboxylic acids	Low haloperoxidase activity, altered substrate specificity and improved enantioselectivity by directed evolution
<i>Pseudomonas putida</i> MR2068	29 kDa, homodimer, T _{opt.} 70°C	Alkyl-dicarboxylic acid methyl esters, high stereoselectivity (<i>E</i> > 100)	-
<i>Bacillus acidocaldarius</i>	34 kDa, T _{opt.} 70°C	pNP-esters (best: hexanoate), moderate stereoselectivity (best: <i>E</i> ≈ 18)	Homology to hormone-sensitive lipase
<i>B. subtilis</i> NRRL B8079	489 aa, 54 kDa, T _{opt.} 52°C (56.5°C for best mutant)	<i>p</i> -nitrobenzyl ester of Loracarbef	Evolved by directed evolution for increased stability in DMF and thermostability
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	-	pNP-esters, moderate enantioselectivity	Thermostable mutants
<i>B. subtilis</i> (Thai-8) ^c	32 kDa, T _{opt.} 35-55°C	High enantioselectivity towards 2-arylpropionic acids	Structure known, more stable mutants by SDM ^b
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp. JW/SL YS485	320 aa, 36 kDa	Xylose tetra acetate, cephalosporin C, MU-Ace ^b	G-x-S-x-G motif
<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	37 kDa	pNP-esters (best: hexanoate), benzyl esters	G-x-S-x-G motif, involved in catechol branch of β -ketoadipate pathway
<i>Clostridium thermocellum</i>	31 kDa	Feruloyl esters	Esterase activity within cellulosome
<i>Pyrococcus furiosus</i> DSM13638	T _{opt.} 100°C, t _{1/2} 50 min at 126°C	MU-Ace ^b	-
<i>Lactococcus lactis</i> ^d	258 aa, 30 kDa	pNP-esters (best: hexanoate), tributyrin, C ₆ -phospholipids	G-x-S-x-G motif, function unclear
<i>Rhodococcus ruber</i> DSM 43338 ^d	Two esterases with opposite enantiopreference	Linoleol-acetate (<i>E</i> > 100)	Two esterases with opposite enantiopreference
<i>Rhodococcus</i> sp. H1	34 kDa, tetramer	Heroin	G-x-S-x-G motif, conserved His ₁₆₆
<i>Rhodococcus</i> sp. MBI	574 aa, 65 kDa, monomer	Cocaine	G-x-S-Y-x-G motif, homology to X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidases
<i>Streptomyces chrysomallus</i>	42 kDa	pNP-esters (best: butyrate)	G-x-S-x-G motif, high homology to esterase from <i>A. globiformis</i>
<i>Streptomyces diazotachromogenes</i>	326 aa, 31 kDa	pNP-esters, moderate enantioselectivity	-
<i>Orpinomyces</i> sp. PC-2	313 aa, 35 kDa, T _{opt.} 30°C	Xylose tetra acetate	High homology to other acetyl xylan esterases
<i>Aspergillus awamori</i> IFO4033 ^e	275 aa, 31 kDa	Wheat bran, α -naphthol acetate	Homology to lipases from <i>Geotrichum candidum</i> and <i>Candida cylindracea</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO2347	28 kDa, homodimer, T _{opt.} 25°C	Isoamyl acetate, isobutyl acetate	=

^aOverexpressed in *E. coli*, if not stated otherwise

^bpNP, *p*-nitrophenyl; MU-Ace, 4-methylumbelliferyl-acetate; SDM, site-directed mutagenesis

^cNon-recombinant purified enzymes

^dOverexpressed in *L. lactis*

^eOverexpressed in *B. subtilis*

4.4 Les enzymes de la β -oxydation

La β -oxydation correspond à quatre réactions successives au cours desquelles la chaîne carbonée d'un acide gras lié au coenzyme A est réduite de deux atomes de carbone. Cinq enzymes sont impliquées dans ces étapes. Les enzymes de la β -oxydation ont été largement décrites chez les eucaryotes (Hiltunen & Qin, 2000). En revanche, peu d'études biochimiques concernent les enzymes d'origine procaryotique. O'Connell *et al.* ont étudié les enzymes de la β -oxydation chez *Caulobacter crescens* (O'Connell *et al.*, 1990). Les réactions catalysées par ces enzymes sont illustrées par une partie de la voie dégradation du citronellol (1.24).

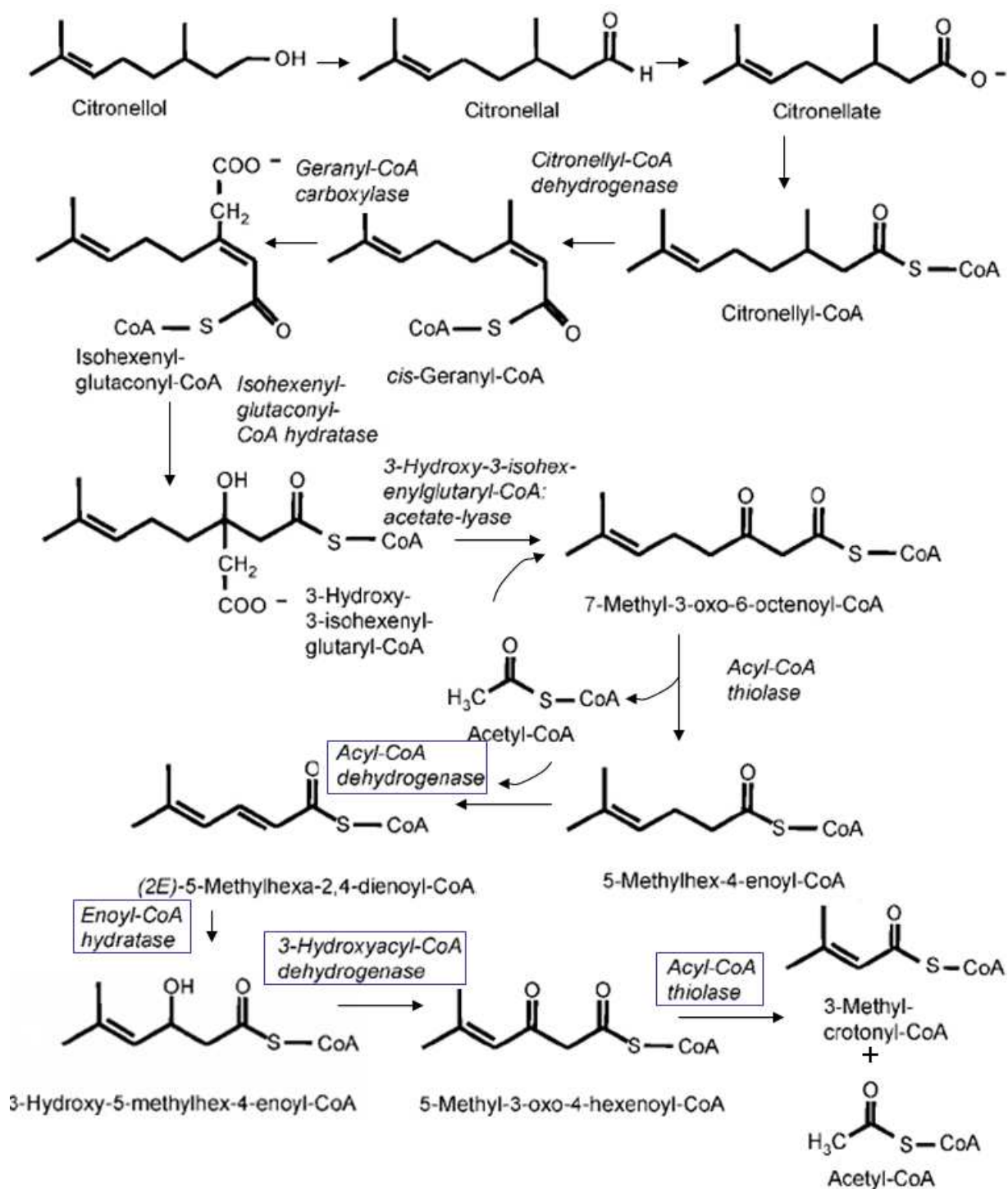


Figure 1.24 : Enzymes de la β -oxydation, chez *Pseudomonas aeruginosa*, impliquées dans la dégradation du citronellol (Adapté de Seubert et Fass 1964 et de Förster-Fromme et al. 2008).

- L'acetyl CoA acétyltransférase catalyse l'étape d'activation de l'acide gras par l'acyl CoA. Cette enzyme condense l'acide gras et l'acétyl-CoA en une molécule d'acétoacétyl-CoA.

- L'acyl CoA déshydrogénase catalyse la formation d'une double liaison entre le deuxième et le troisième carbone. Deux acyl-CoA déshydrogénases ont été trouvées chez *Pseudomonas aeruginosa*. L'une d'elles, AtuD a une spécificité vis-à-vis des terpénoïdes comme le citronellol (**figure 1.24**) l'autre, PA135, est aussi bien active vis-à-vis de l'octanoyl CoA que des dérivés enoyl CoA des terpènes (Forster-Fromme *et al.*, 2008).
- La 2-énoyl CoA hydratase catalyse l'adsorption d'une molécule d'eau à la double liaison précédemment formée. La liaison est généralement stéréospécifique pour former l'isomère L. Cette enzyme présente une très large spécificité de substrat (de longueur de chaîne de C₄ à C₂₀).
- La 3 hydroxyacyl CoA déshydrogénase convertie le groupement hydroxyle en cétone.
- Et une acyl CoA thiolase finalise le cycle de β -oxydation en clivant le 3-cétoacyl CoA par le groupement thiol d'une autre molécule de CoA entre le C₂ et le C₃.

5 Dégradation de xénobiotiques récalcitrants par *Mycobacterium*

5.1 Taxonomie et description du genre *Mycobacterium*


5.1.1 Taxonomie et phylogénie

Les mycobactéries (genre *Mycobacterium*) sont des bactéries à Gram faiblement positif (Hartman *et al.*, 2006) appartenant à l'ordre des Actinomycètes qui regroupe aussi les genres *Nocardia*, *Corynebacterium* et *Rhodococcus*. Les bactéries appartenant à ces différents genres ont en commun un certain nombre de caractéristiques : le métabolisme est de type aérobie, le pourcentage de bases G+C dans l'ADN est élevé (66 à 71 mol % pour les mycobactéries), leur paroi cellulaire contient des acides mycoliques. Ces derniers peuvent, chez les mycobactéries, comporter 60 à 90 atomes de carbone et confèrent aux cellules un caractère hydrophobe.

Les mycobactéries sont non mobiles, ne sporulent pas et se présentent, à l'observation microscopique, sous forme de bacilles droits ou incurvés plus ou moins branchés, ou de coccobacilles. Les colonies sont lisses ou rugueuses, parfois colorées en jaune ou en orange (présence de caroténoïdes).

Les mycobactéries sont largement présentes dans l'eau et les sols. C'est l'un des 14 genres bactériens les plus abondants des sols, puisqu'ils représentent 2,6 % des communautés microbiennes totales (Floyd *et al.*, 2005). Le genre *Mycobacterium* est le seul représentant de la famille des *Mycobacteriaceae*. Les espèces incluent des bactéries pathogènes ou saprophytes et sont généralement réparties en deux sous-divisions : les mycobactéries « à

croissance rapide » et les mycobactéries « à croissance lente », le temps de génération pouvant varier, selon l'espèce, de deux à plus de vingt heures. Mais, il est aussi possible de classer ces bactéries en trois groupes : celles qui sont pathogènes pour l'homme et les animaux, celles qui dégradent les hydrocarbures aromatiques polycycliques et celles qui sont associées à aucune des catégories précédemment citées (Hartman *et al.*, 2006). Les Mycobactéries suscitent un intérêt particulier pour leur aptitude à dégrader certains polluants et ainsi pour leur implication dans l'atténuation naturelle et la bioremédiation des sites pollués. L'identification des mycobactéries est réalisée sur la base de séquences des ARNr 16S pour une identification du genre. Comme les séquences des ARNr sont très proches voire identiques, on a recours aux séquences des gènes *hsp65* et *rpoB* pour une identification plus fine de l'espèce. Le gène *hsp65* (Ringuet *et al.*, 1999) code pour la protéine chaperone Hsp 65 présente chez toutes les bactéries et essentielle pour la résistance à des stress environnementaux. Le gène *hsp 65* possède deux régions hyper-variables dans lesquelles il semble moins conservé que l'ARNr 16S. Le gène *rpoB* code pour la sous unité β de l'ARN polymérase ; il est aussi moins conservé que l'ARNr 16S et les différences de séquence sont utiles pour classer les espèces (Adekambi *et al.*, 2003). La méthode la plus commune de caractérisation est l'analyse RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) discriminant différentes souches ou clones grâce aux différentes tailles d'amplification PCR obtenues sur la région intergénique 16S-23S. Cette méthode est la plus utilisée actuellement pour l'identification des mycobactéries. Elle permet l'identification des mycobactéries « à croissance rapide » grâce à la combinaison des séquences des gènes de l'ARNr 16S et des gènes *hsp 65* et *rpoB* (Wang *et al.*, 2006).

Une étude a permis d'isoler des souches de *Mycobacterium* issues de sols contaminés par divers hydrocarbures et PCB. Pour récupérer les souches de mycobactéries, une culture des microflore en présence d'amibes a permis d'isoler les bactéries. Les amibes servent de réservoir protecteur pour protéger les souches de mycobactéries du stress environnemental et de la toxicité du milieu (Wang *et al.*, 2006). Plusieurs souches de mycobactéries ont été isolées de ces sols et elles ont été identifiées sur la base de ARNr 16S et des gènes *hsp 65* et *rpoB*. Les bactéries isolées sont proches des souches de *M. vabaalenii*, de *M. austroafricanum*, de *M. chlorephenolicum* et de *M. frederickbengense* (ceci est montré par une annotation  sur la **figure 1.25**).

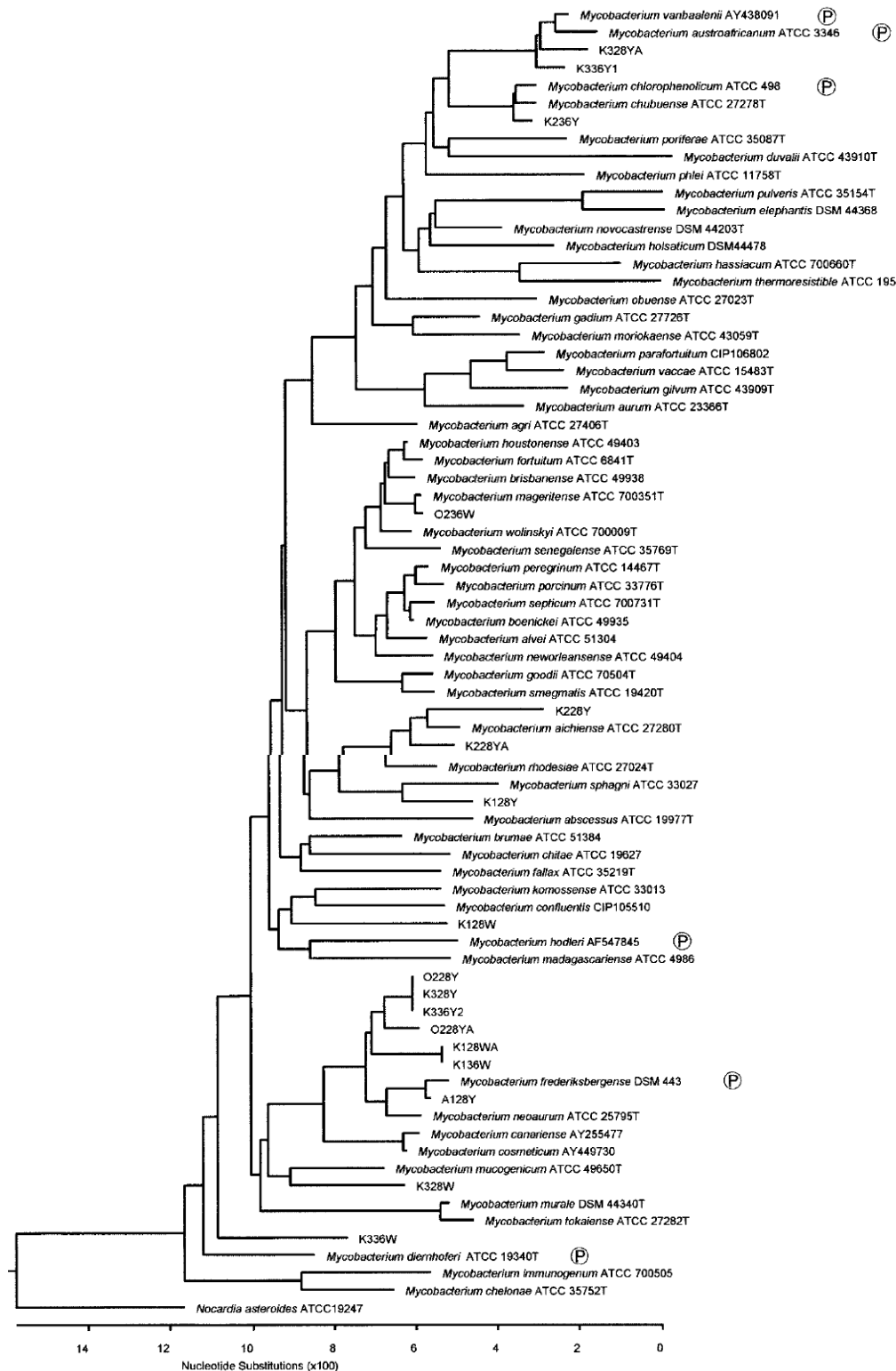


Figure 1.25 : Arbre phylogénétique des espèces du genre *Mycobacterium* à croissance rapide et dégradant les HAP d'après les séquences des différents *hsp65* (d'après Wang et al., 2006). L'arbre phylogénétique, basé sur les séquences des gènes *hsp 65*, permet d'identifier l'espèce des mycobactéries isolées. Cet arbre regroupe des bactéries à croissance rapide dégradant les hydrocarbures et les bactéries isolées sur le sol contaminé.

Grâce aux progrès de la génomique à partir des années 1990 de nombreux génomes bactériens ont été complètement séquencés et notamment ceux de certaines mycobactéries pathogènes. Les génomes des principaux pathogènes, *M. tuberculosis* H37Rv (1998), *Mycobacterium avium* k10 (2004), *M. bovis* AF2122/97 (2003), *M. tuberculosis* CDC1551 (2002) et *M. leprae* TN (2001) furent les premiers à être séquencés. Plus récemment, le génome d'un autre pathogène animal *M. marinum* M (2008) a aussi été séquencé. Les génomes de mycobactéries de l'environnement et qui sont impliquées dans la dégradation d'hydrocarbures ont été séquencés et annotés. Ce sont ceux de *M. smegmatis* mc²155 (2006), *M. gilvum* PYR-GCK (2007), *Mycobacterium* sp. JLS (2006), KMS (2007) ou bien MCS (2006), *M. vanbaalenii* PYR-1 (2006). La taille de ces génomes est comprise entre $3,3 \times 10^6$ et $6,9 \times 10^6$ pb. La fraction codante de ces génomes varie entre 90% chez *M. smegmatis* mc²155 et 99 % chez *M. vanbaalenii* PYR-1.

5.1.2 Description de l'enveloppe des mycobactéries

Le modèle actuel d'architecture de l'enveloppe des mycobactéries découle, entre autres, d'observations obtenues par microscopie électronique (Paul & Beveridge, 1992) soulignant la présence d'une épaisse barrière glycolipidique à l'extérieur de la cellule (**figure 1.26**).

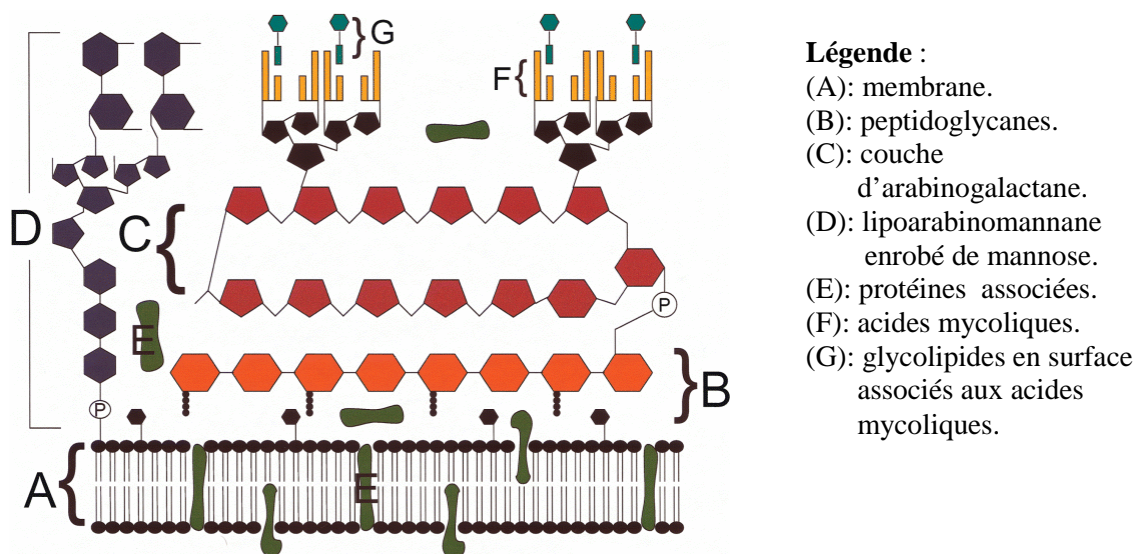


Figure 1.26 : Représentation schématique de la paroi des mycobactéries selon (Karakousis et al., 2004).

L'ultrastructure externe, également mise en évidence par des études biochimiques (Petit & Lederer, 1984) est composée de structures lipidiques ramifiées où l'on distingue la présence de gros complexes d'acides gras, les acides mycoliques, formant une structure assez dense et

la présence de lipides libres plus courts, tels que le mycocérosate, les glycolipides phénoliques et différents phospholipides. Les acides mycoliques de la paroi sont reliés de manière covalente aux peptidoglycanes par l'intermédiaire de l'arabinogalactane. La paroi présente donc une structure unique de type mycolyl-arabinogalactanepeptidoglycane (mAGP). Le lipoarabinomannane (LAM), qui peut être considéré comme le « lipopolysaccharide (LPS) mycobactérien », s'intercale de manière non covalente dans cet enchevêtrement complexe (Baulard *et al.*, 1999). La structure de la paroi des mycobactéries illustrée par la **figure 1.26** est donc l'une des plus complexes qui existent chez les bactéries. Récemment, des analyses en microscopie à cryo-électron ont permis de visualiser la structure de la membrane des mycobactéries. Les images des Zuber *et al.* et de Hoffmann *et al.* (2008) sont très similaires et tendent à dire que l'enveloppe des mycobactéries forme une bicouche lipidique semblable à celles des bactéries à Gram négatif.

5.2 *Mycobactéries dégradant des polluants*

Grâce à leur paroi complexe, à la présence d'acides mycoliques de longue chaîne et à un équipement enzymatique approprié, les mycobactéries sont bien équipées pour dégrader les polluants de type HAP, alcanes et alcanes branchés. De nombreuses souches de *Mycobacterium* ont été décrites pour leur capacité à dégrader les HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliques), *Mycobacterium* sp. 6PY1 (Krivobok *et al.*, 2003), *M. austroafricanum* GTI-23 (Bogan *et al.*, 2003), *M. vanbaalenii* PYR-1 (Kim *et al.*, 2006), *M. frederiksbergense* LB501T (Wick *et al.*, 2003). D'autres sont connues pour dégrader des composés oxygénés comme le MTBE (méthyl *tert*-butyl ether) : il s'agit des souches de *M. austroafricanum* IFP 2012 et IFP 2015 (Francois *et al.*, 2002; Lopes Ferreira *et al.*, 2006). Une alcane hydroxylase membranaire serait impliquée dans la dégradation de cet éther carburant, alors que chez *Rhodococcus ruber* IFP 2001, il s'agit d'un cytochrome P450 (Chauvaux *et al.*, 2001). La plupart de ces souches possèdent une, voire deux (c'est le cas chez *M. vanbaalenii* PYR-1 et *M. gilvum* PYR-GCK uniquement), alcane hydroxylases membranaires de type AlkB ce qui leur donne aussi la capacité de dégrader certains *n*-alcanes.

5.2.1 Dégradation des *n*-alcanes par *Mycobacterium*

Plusieurs souches de mycobactéries utilisent les *n*-alcanes comme sources de carbone. La gamme de substrats utilisés varie en fonction des souches (**tableau 1.4**). *M. austroafricanum* IFP 2012 et IFP 2015 et *M. vaccae* JOB5 dégradent les alcanes de C₂ à C₁₆. Les souches IFP 2173 et IFP 2009 ne dégradent pas les alcanes à courtes chaînes, C₆ à C₁₆ alors que *M. smegmatis* mc²155 ne dégrade que le dodécane. Le spectre d'action de ces

souches vis-à-vis des alcanes est probablement lié à la spécificité de l'alcanes hydroxylase membranaire. Les souches de mycobactéries ont au moins une alcanes hydroxylase, dont les séquences partielles ont été publiées récemment (Lopes Ferreira *et al.*, 2007).

Tableau 1.4 : Spectre de dégradation des alcanes par des souches de *Mycobacterium* (Adapté de Lopes Ferreira *et al* 2007)

Souches	Croissance et rendement de minéralisation (%) sur <i>n</i> -alcanes							
	Methane	Ethane	Propane	Butane	Hexane	Octane	Dodecane	Hexadecane
<i>M. austroafricanum</i> IFP 2012(a)	-	++*	+*	+*	++*	++*	+	++*
(b)	0	57.8	24.9	39.8	51.2	61.0	57.1	45.9
<i>M. austroafricanum</i> IFP 2015(a)	-	++*	±	+*	++*	++*	±	++
(b)	0	58.3	47.6	39.3	53.7	52.8	42.6	85.9
<i>M. vaccae</i> JOB5 (a)	-	++	+	+*	++	±	+	++
(b)	0	48.1	38.3	31.5	62.7	52.9	28.4	69.5
<i>M. austroafricanum</i> IFP 2173(a)	-	-	-	-	++	++	-	+ (flocs)
(b)	0	0	43.1	44.6	56.3	58.8	36.6	76.6
<i>Mycobacterium</i> sp. IFP 2009 (a)	-	-	-	-	+	++	++	± (flocs)
(b)	0	0	0	0	35.5	77.4	61.0	66.4
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 (a)	-	-	-	-	-	-	+ (flocs)	-
(b)	0	0	0	0	0	0	33.7	43.1

Toutes les cultures ont étéensemencées initialement à D.O.600 de 0,1 et la croissance a été mesurée après 15 jours d'incubation sauf exception. Chaque substrat a été ajouté à une concentration de 200 mg.L⁻¹.

(a) La D.O.₆₀₀ a été mesurée et reportée dans le tableau selon la codification : -, pas de croissance; ± 2 fois la D.O. initiale; +, 3 fois la D.O. initiale; ++, ≤4 fois la D.O. initiale.

(b) Rendement de minéralisation = 100 x (moles de carbone de CO₂ produit / moles de carbone de substrat introduit)

* Mesure de la croissance après 3 jours d'incubation

5.2.2 Dégradation d'un alcanes branché par *M. austroafricanum* IFP 2173

M. austroafricanum IFP 2173 a été isolée à partir d'un échantillon d'eau souterraine polluée par de l'essence pour sa capacité à dégrader l'isooctane. Cette bactérie est capable de dégrader des hydrocarbures variées comme les *n*-alcanes (de C₄ à C₁₆), les *iso*-alcanes, les aromatiques et les composés oxygénés présents dans l'essence ou le gazole (Solano-Serena *et al.*, 2000a), à l'exception du MTBE (Lopes Ferreira *et al.*, 2007).

La dégradation des alcanes ramifiés portant un atome de carbone quaternaire a été peu étudiée car cette structure est habituellement résistante à la biodégradation (Mc Kenna, 1972; Solano-Serena *et al.*, 1999). L'étude de la dégradation du 2,2-diméthylheptane par *Achromobacter* sp. a mis en évidence l'accumulation d'acide 2,2-diméthylpropanoïque, une décomposition partielle et un tour de β-oxydation mais l'atome de carbone quaternaire rend la molécule

résistante à la biodégradation (Catelani *et al.*, 1977). *M. austroafricanum* IFP 2173 a été isolée pour sa capacité à utiliser le 2,2,4-triméthylpentane (isooctane) comme unique source de carbone (Solano-Serena *et al.*, 2004). La voie de dégradation de l'isooctane est représentée à la **figure 1.27**. Quatre intermédiaires de dégradation de l'isooctane ont été identifiés: l'acide 2,4,4-triméthylpentanoïque résultant de l'oxydation subterminale, l'acide pivalique issu de l'oxydation terminale de l'isooctane. Ce dernier est formé après l'acide 2,4,4-triméthylpentanoïque et est accumulé de manière transitoire dans le milieu puis son dérivé CoA est dégradé complètement après un cycle de β -oxydation. La 2,2-diméthyl-3-pentanone puis la 3,3-diméthyl-2-butanone sont formées à partir de l'acide 2,4,4-triméthylpentanoïque. Dans ce cas, c'est une voie mineure de décarboxylation du β -ketoacide car le produit de cette voie de dégradation est récalcitrant. D'autre part, cette voie fournit peu d'énergie à la bactérie pour sa croissance.

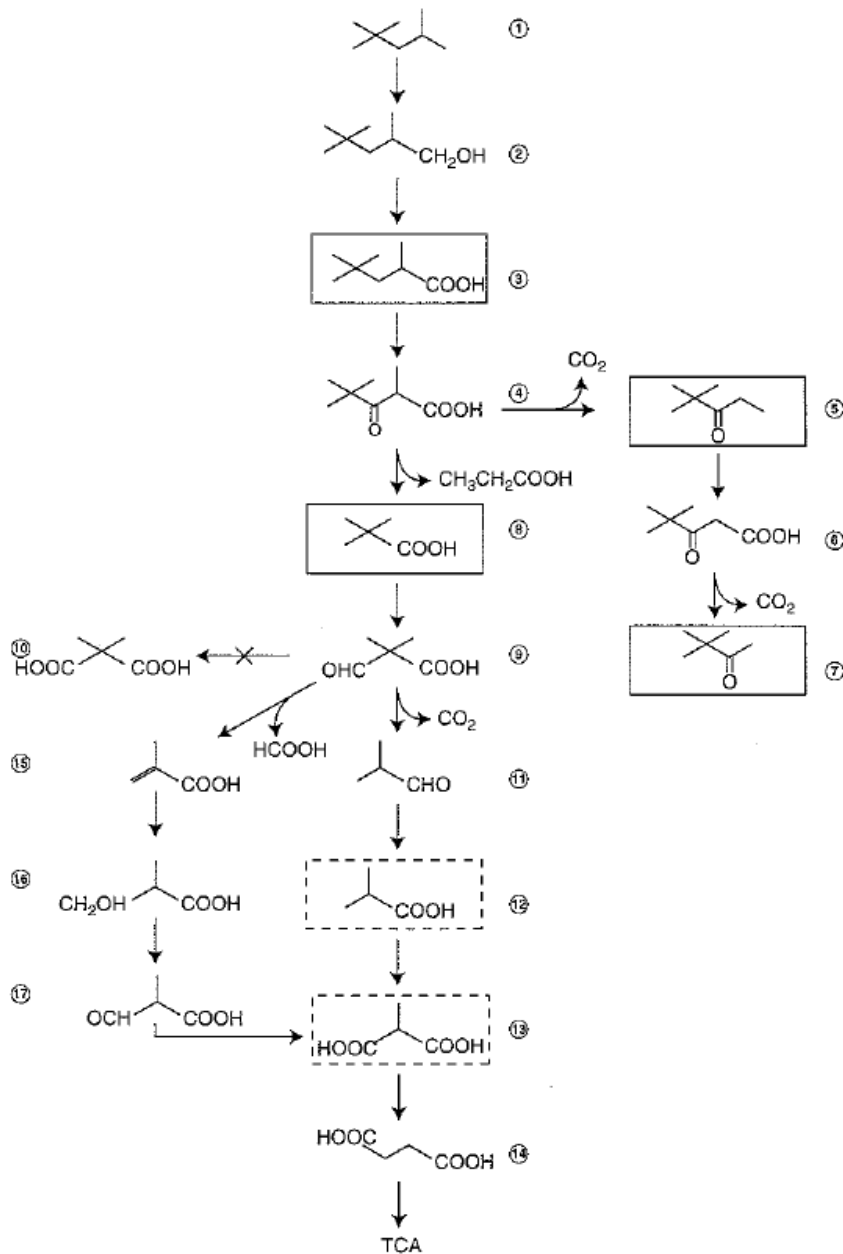


Fig. 4 Proposed pathway for the degradation of isooctane by *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2173. The products isolated in cultures on isooctane are in solid lines boxes and proposed intermediates mineralized by isooctane-grown cells in dotted lines boxes. The free acid form is indicated for acids but is meant to include CoA derivatives. 1: isooctane (2,2,4-trimethylpentane); 2: 2,4,4-trimethyl-1-pentanol; 3: 2,4,4-trimethylpentanoic acid; 4: 2,4,4-trimethyl-3-oxopentanoic acid; 5: 2,2-dimethyl-3-pentanone (pinacolone); 6: 4,4-dimethyl-3-oxopentanoic acid; 7: 3,3-dimethyl-2-butanone; 8: pivalic acid (dimethylpropanoic acid); 9: dimethylmalonic semialdehyde (2,2-dimethyl-3-oxopropanoic acid); 10: dimethylmalonic acid (dime-thylpropanedioic acid); 11: isobutyraldehyde (methylpropionaldehyde); 12: isobutyric acid (methylpropanoic acid); 13: methylmalonic acid (methylpropanedioic acid); 14: succinic acid (butanedioic acid)

Figure 1.27: Biodégradation de l'isooctane par *M. austroafricanum* IFP 2173 (Solano-Serena et al. 2004)

La souche IFP 2173 a donc la capacité de dégrader des alcanes branchés de type antéiso qui ne sont habituellement pas utilisés par la voie classique impliquant la β -oxydation. En outre, cette souche possède une alcane hydroxylase membranaire et un cytochrome P450 induit sur isooctane (Solano-Serena et al., 2004).

PRESENTATION DU TRAVAIL

L'objectif du travail est d'étudier la biodégradabilité du 2-EHN, c'est à dire d'isoler une ou des bactéries capables de dégrader cette molécule, puis d'établir la cinétique de biodégradation et la voie catabolique de ce composé.

La **figure 2.1** représente la stratégie mise en oeuvre pour élucider la voie catabolique du 2-EHN.

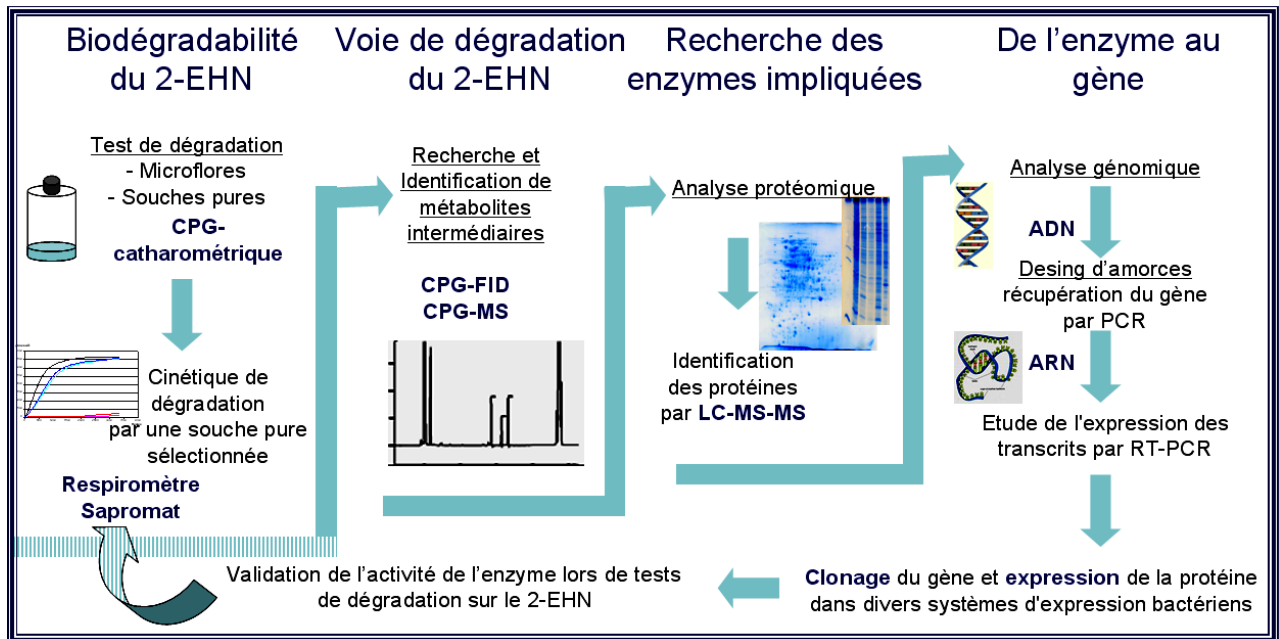


Figure 2.1 : Stratégie suivie pour caractériser la voie de dégradation du 2-EHN

L'étude comporte quatre volets principaux :

1. Sélection de microflores et de souches bactériennes compétentes ;
2. Élucidation globale des voies de dégradation du 2-EHN ;
3. Identification des enzymes induites lors de la croissance sur 2-EHN ;
4. Recherche et clonage des gènes d'intérêt.

1 Sélection de microflores et souches bactériennes compétentes

Dans un premier temps, nous avons cherché à mettre en évidence la biodégradabilité du 2-EHN à l'aide d'un test de biodégradation prenant en compte les propriétés physico-chimiques particulières de la molécule. En effet, le 2-EHN est légèrement soluble dans l'eau ($12,5 \text{ mg.L}^{-1}$ à 20 °C) ; cependant, le 2-EHN présente une hydrophobicité très marquée ($\log K_{O/W}=5,24$). Lorsqu'on introduit dans une fiole d'essai une quantité de 2-EHN dépassant celle autorisée par la pression de vapeur saturante, il se forme une phase liquide distincte. La solubilité maximale du 2-EHN dans la phase aqueuse est alors atteinte. Dans une fiole d'essai

de 120 mL contenant 10 mL de milieu à 20 °C, la pression de vapeur saturante de 2-EHN est équivalente à 0,21 mg. Elle est en équilibre avec 0,12 mg dissous dans la phase liquide. Il se forme donc une phase liquide distincte de 2-EHN pour 0,33 mg de 2-EHN introduit dans une fiole d'essai. Dans nos essais standards, la quantité de substrat mise en oeuvre dans le test de biodégradation utilisé (5 µL) est très sensiblement supérieure à la saturation de l'espace de tête. De par l'effet destructurant qu'il exerce sur les structures membranaires lipidiques, l'excès de 2-EHN est alors susceptible d'empêcher la croissance bactérienne. Pour s'affranchir de l'inhibition, nous avons ajouté au milieu de culture une phase non aqueuse liquide (non aqueous phase liquid ou NAPL selon la terminologie anglosaxonne), telle que le HMN. La phase NAPL piège la majeure partie du 2-EHN et sert de réserve de substrat. Au fur et à mesure de la consommation du substrat dissous, le 2-EHN contenu dans la phase NAPL est progressivement transféré vers la phase aqueuse.

L'utilisation du 2-EHN en tant que substrat de croissance impose aussi de disposer de micro-organismes dotés de propriétés pariétales particulières et capables de résister à la toxicité du substrat. L'aptitude à dégrader des substrats branchés est également requise pour ces micro-organismes. La sélection de micro-organismes compétents est effectuée selon deux types d'approche :

- Des microflores, issues de boues de station d'épuration urbaines et de raffineries ou de sols contaminés par les hydrocarbures, sont testées afin d'isoler des microflores compétentes. Ensuite, des isolements sont tentés à partir de ces microflores.
- Des souches de collection sont testées directement (en raison de la difficulté d'isoler des micro-organismes à partir des microflores compétentes). Ces souches appartiennent principalement au groupe des "CMN" (pour *Corynebacterium-Mycobacterium-Nocardia*) lequel est connu pour sa capacité de résistance aux hydrocarbures. De nombreuses souches de ce groupe sont par ailleurs capables de dégrader les hydrocarbures branchés.

L'ensemble de ces travaux ont été effectués en collaboration avec Floriane Solano-Serena, Maître de Conférences à l'ENSIL (École Nationale Supérieure des Ingénieurs de Limoges).

2 Elucidation globale des voies de dégradation du 2-EHN

Le 2-EHN est potentiellement récalcitrant à la biodégradation. En effet, la molécule de 2-EHN est de petite taille et possède une structure ramifiée du fait de la présence d'un substituant éthyle en position 2 de la chaîne principale.

L'étude des voies de dégradation du 2-EHN est entreprise avec la bactérie (*M. austroafricanum* IFP 2173) présentant la meilleure cinétique de biodégradation. Un bilan final en carbone est établi avec cette souche. Ce bilan met en évidence l'accumulation d'un métabolite qui est identifié par CPG-SM. Il nous permet de proposer une voie de dégradation probable pour le 2-EHN.

L'identification et la synthèse chimique de l'intermédiaire métabolique, non disponible commercialement, ont été effectués dans l'Unité de Phytopharmacie et Médiateurs Chimique de l'INRA de Versailles par Lucien Kerhoas et Martine Lettere.

3 Identification des enzymes induites lors de la croissance sur 2-EHN

Les enzymes impliquées dans la voie de dégradation putative sont recherchées par deux approches classiques :

- L'analyse protéomique de la bactérie après croissance sur 2-EHN comme unique source de carbone est effectuée. Des gels d'électrophorèse 1D et 2D sont réalisés. Des polypeptides sélectionnés font l'objet d'analyse de séquences en LC-MS/MS, et les informations sont confrontées aux banques de données pour obtenir une identification provisoire des polypeptides induits. Ces analyses ont été effectuées au Laboratoire d'Étude Dynamique des Protéomes dirigé par Jérôme Garin au CEA de Grenoble.
- L'analyse des génomes de bactéries récemment séquencés présente une source d'information à ne pas négliger pour retrouver les gènes d'intérêts difficilement repérables par l'approche protéomique.

4 Recherche et expression des gènes d'intérêts

Des sondes nucléiques spécifiques sont élaborées pour cloner les gènes correspondant aux polypeptides. L'analyse de la séquence des gènes d'intérêt et des régions flanquantes nous renseigne sur la nature des gènes impliqués ainsi que sur la fonction des enzymes codées.

Afin de valider l'activité des enzymes trouvées par l'approche protéomique, certains gènes d'intérêt sont surexprimés dans des bactéries appropriées. La surproduction d'enzymes sous forme recombinante devrait faciliter leur isolement et l'étude de leurs propriétés catalytiques et biochimiques.