

Caractérisation d'arène  
dioxygénases impliquées dans la  
biodégradation des  
hydrocarbures aromatiques  
polycycliques chez *Mycobacterium*  
sp. 6PY1

Thèse présentée par Sylvain Kuony

Directeur de thèse : Yves Jouanneau

BBSI – CEA Grenoble

# Plan

- Introduction

Les HAP, les dioxygénases, *Mycobacterium* sp. 6PY1

- Clonage de gènes de dégradation des HAP

3 loci, analyse des séquences

- Propriétés catalytiques de Pdo1 et Pdo2

Etude de l'activité et de la sélectivité de Pdo1 et Pdo2

- Surexpression et purification de Pdo1 et Pdo2

- Régulation de l'expression

- Conclusions et perspectives

# Plan

## ■ Introduction

Les HAP, les dioxygénases, *Mycobacterium* sp. 6PY1

## ■ Clonage de gènes de dégradation des HAP

3 loci, analyse des séquences

## ■ Propriétés catalytiques de Pdo1 et Pdo2

Etude de l'activité et de la sélectivité de Pdo1 et Pdo2

## ■ Surexpression et purification

## ■ Régulation de l'expression

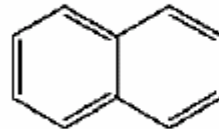
## ■ Conclusions et perspectives

# HAP: Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

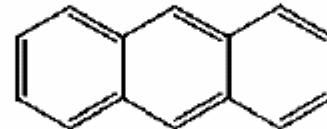
- combustion incomplète de matière organique fossile ou pyrolyse

- très stables
- peu volatils
- hydrophobes
- ubiquitaires

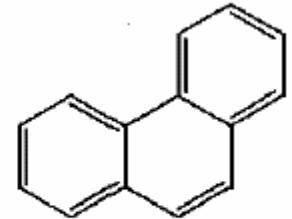
## HAP Légers



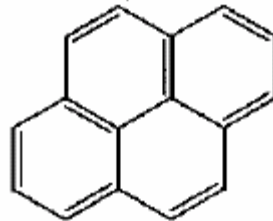
Naphthalene



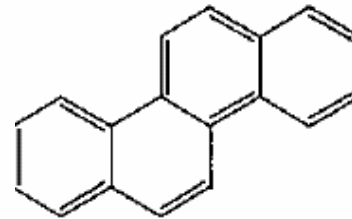
Anthracene



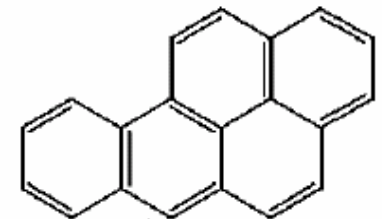
Phenanthrene



Pyrene



Chrysene



Benzo[a]pyrene

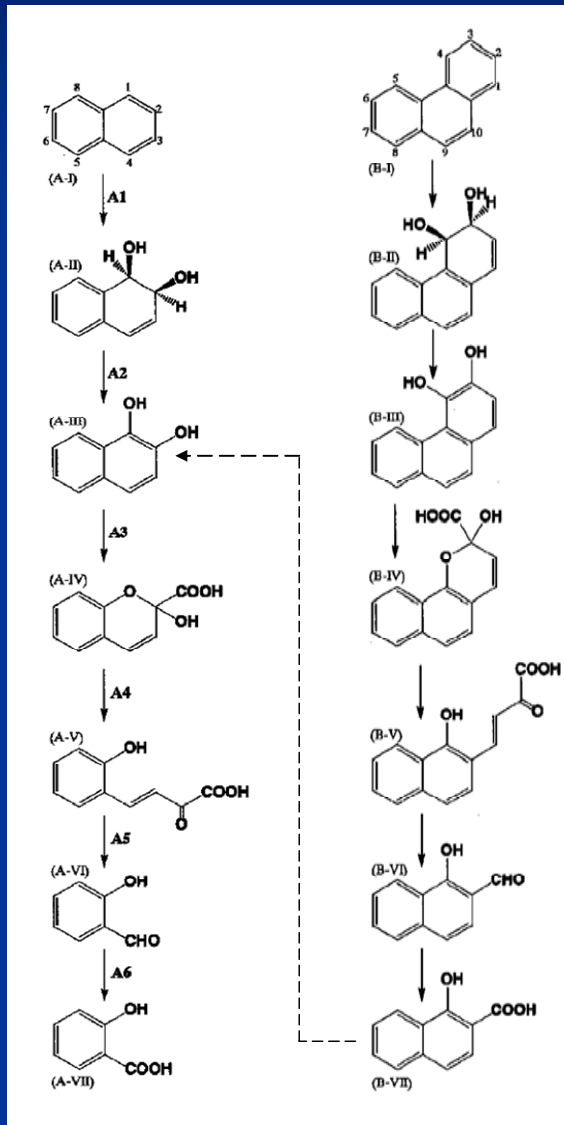
## HAP Lourds

- toxiques : risques de cancers

# Biodégradation bactérienne

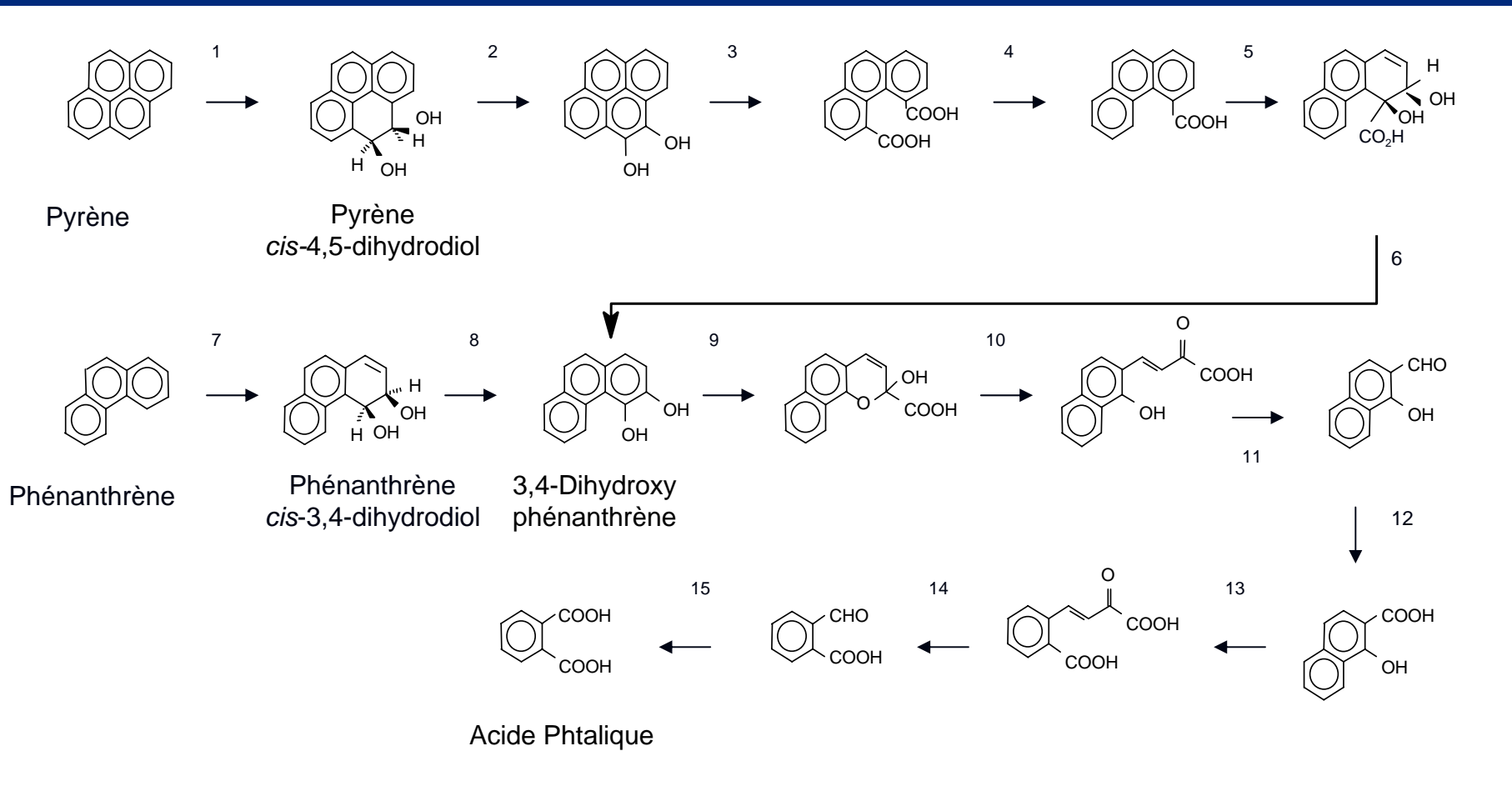
- Utilisation des HAP comme sources de carbone et d'énergie
- HAP à 2 ou 3 cycles:
  - Espèces du genre *Pseudomonas*
  - Gènes, protéines et régulation étudiés
- HAP à 4 cycles ou plus
  - Espèces des genres *Mycobacterium* ou *Sphingomonas*
  - Gènes, protéines et régulation à étudier

# Biodégradation des HAP par les bactéries : cas du naphthalène et du phénanthrène

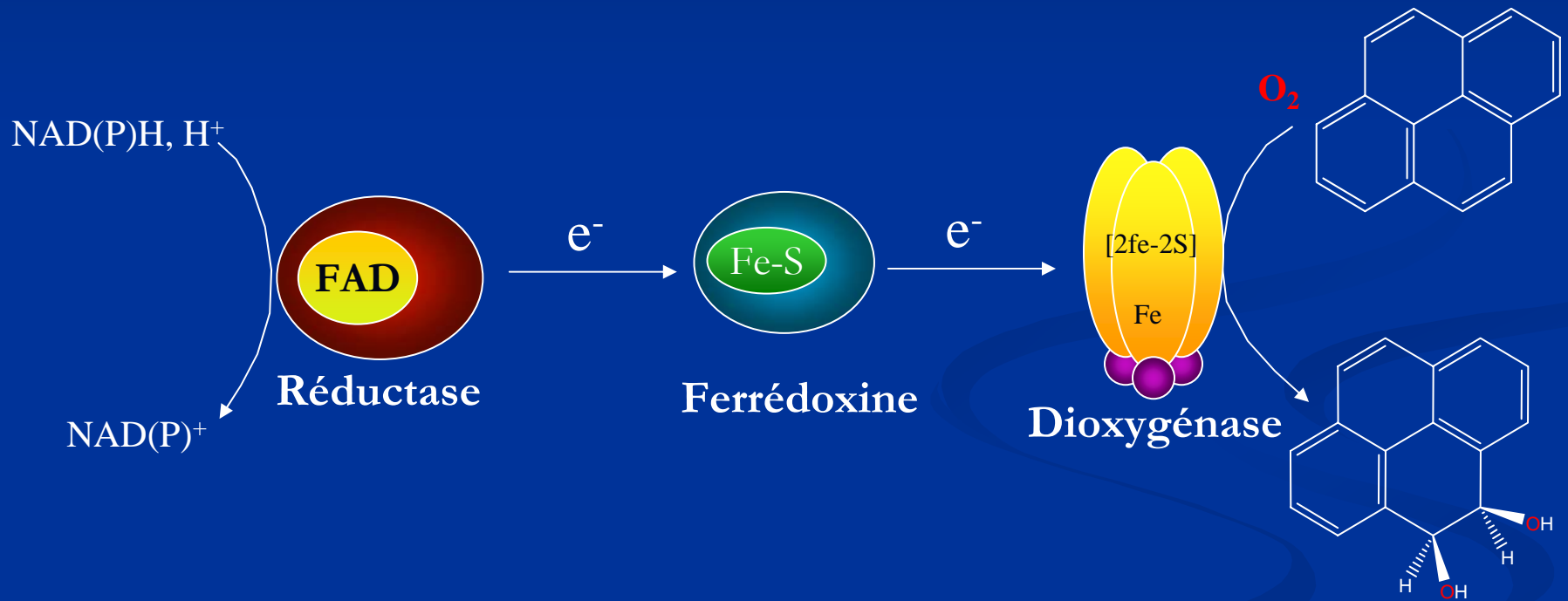


- Etape initiale catalysée par une enzyme de type dioxygénase
- La voie de dégradation du phénanthrène rejoint celle du naphthalène
- Gènes organisés en clusters
  - Opérons *nah* et *sal*
- Minéralisation complète

# Biodégradation des HAP par les bactéries : cas du pyrène

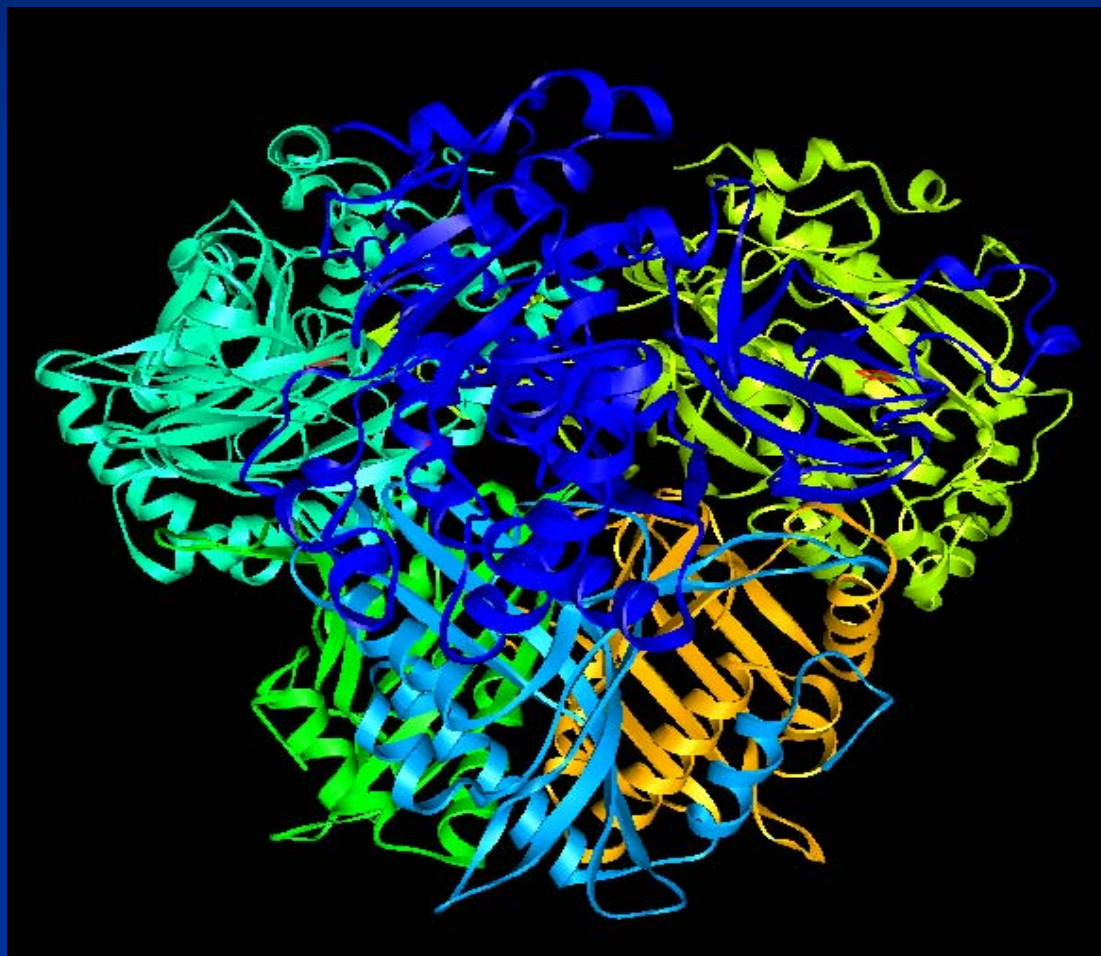


# Le système dioxygénase



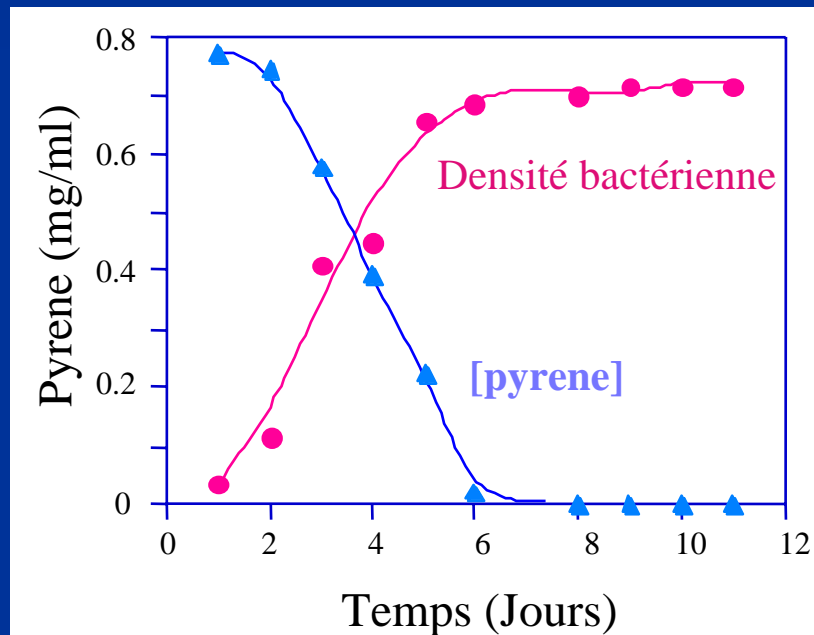


# Structure de la naphthalène dioxygénase



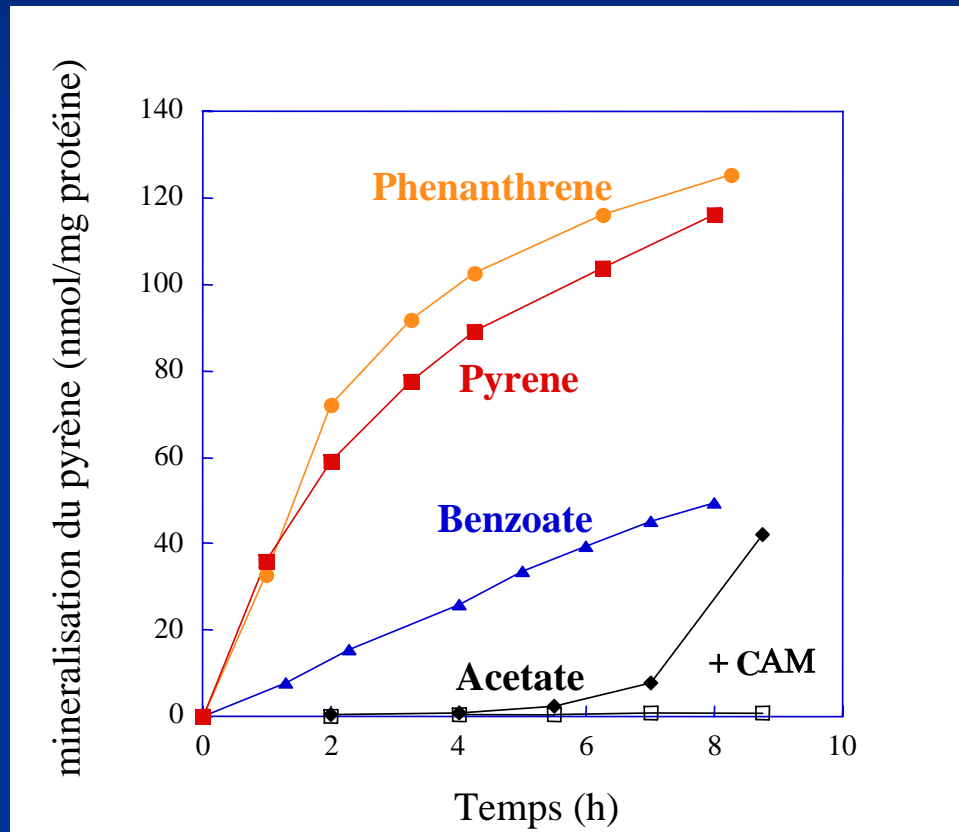
# *Mycobacterium* sp. 6PY1

- Bacille, Gram<sup>+</sup>, actinomycète
- Isolée pour sa capacité à croître sur pyrène comme unique source de carbone et d'énergie



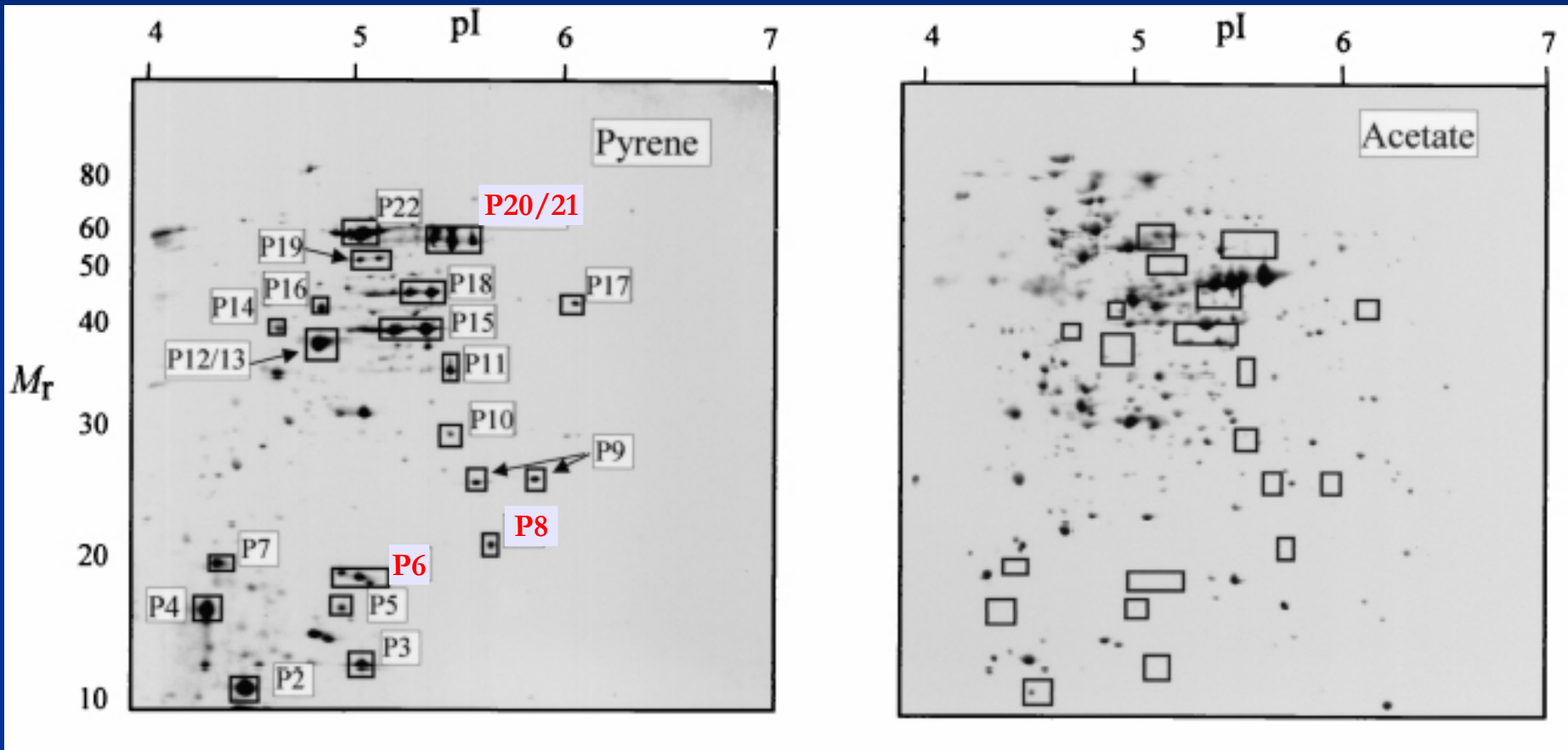
- Capable de croître sur phénanthrène, benzoate et acétate

# Inductibilité de l'activité de minéralisation du pyrène



Les enzymes de dégradation du pyrène sont induites par les HAP et le benzoate

# Induction de protéines par le pyrène



22 polypeptides induits sur pyrène, absents sur acétate

# Plan

- Introduction

Les HAP, les dioxygénases, *Mycobacterium* sp. 6PY1

- Clonage de gènes de dégradation des HAP

3 loci, analyse des séquences

- Propriétés catalytiques de Pdo1 et Pdo2

Etude de l'activité et de la sélectivité de Pdo1 et Pdo2

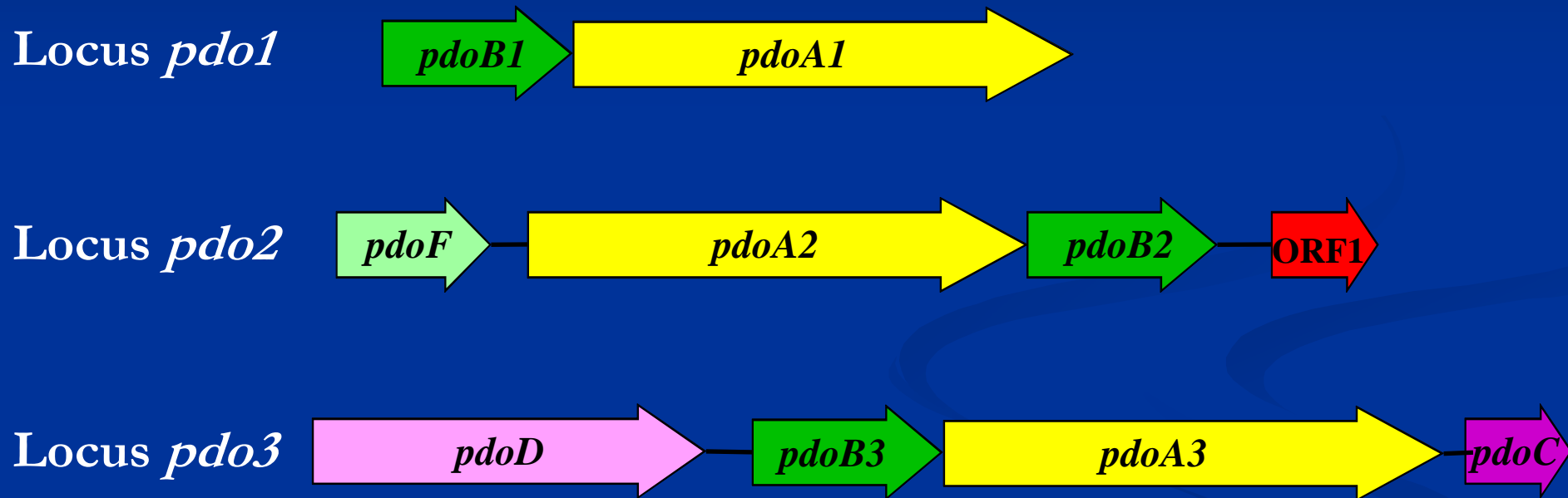
- Surexpression et purification

- Régulation de l'expression

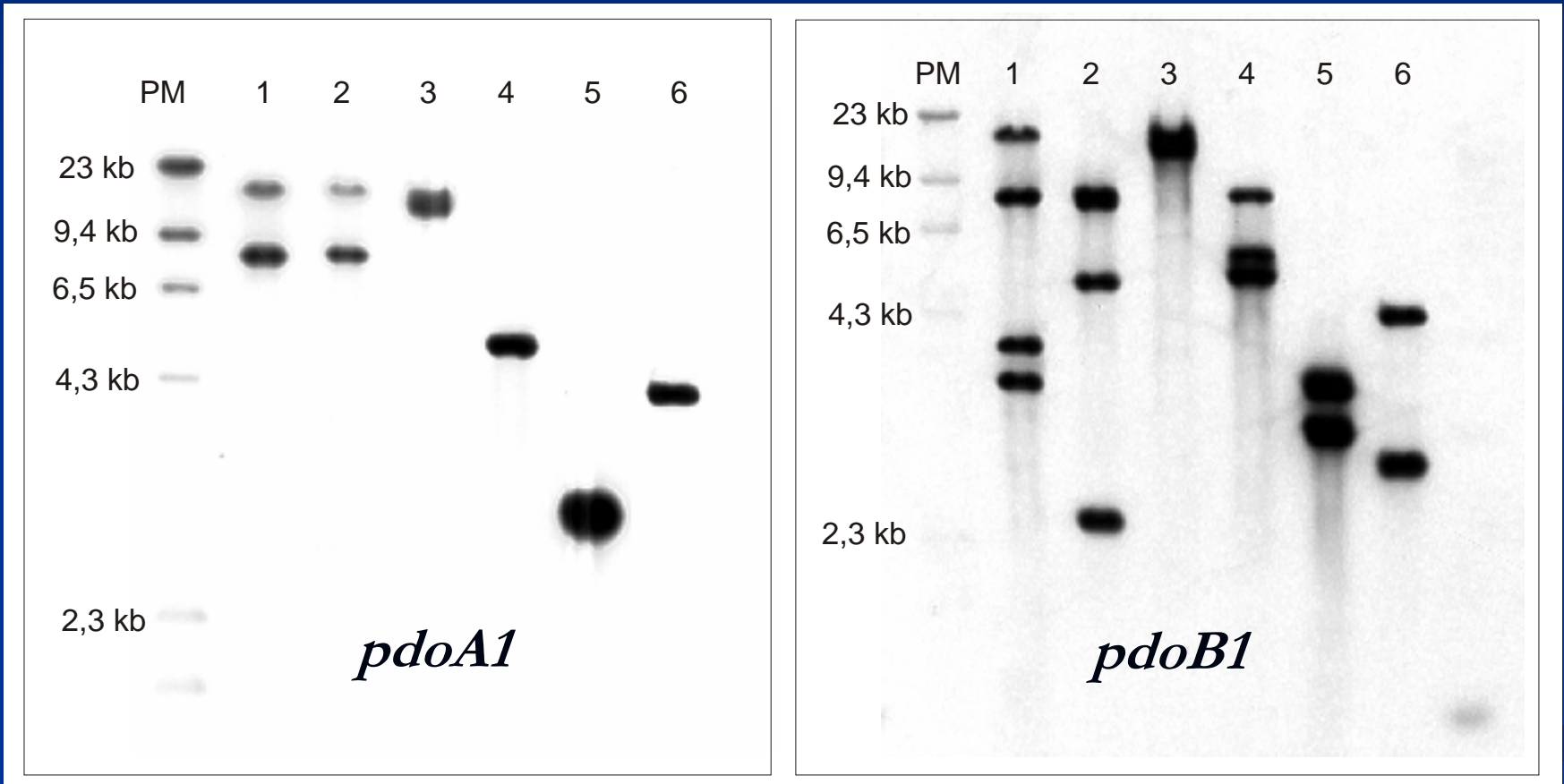
- Conclusions et perspectives



# Gènes codant des dioxygénases dans le génome de 6PY1



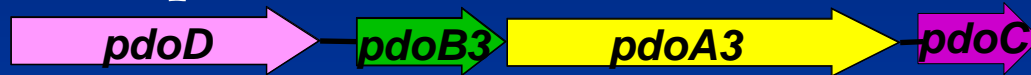
# Southern blots avec sondes *pdoA1* et *pdoB1*





# Similarités des gènes de dioxygénases chez les mycobactéries

## Mycobacterium sp. 6PY1



## Mycobacterium sp. S65

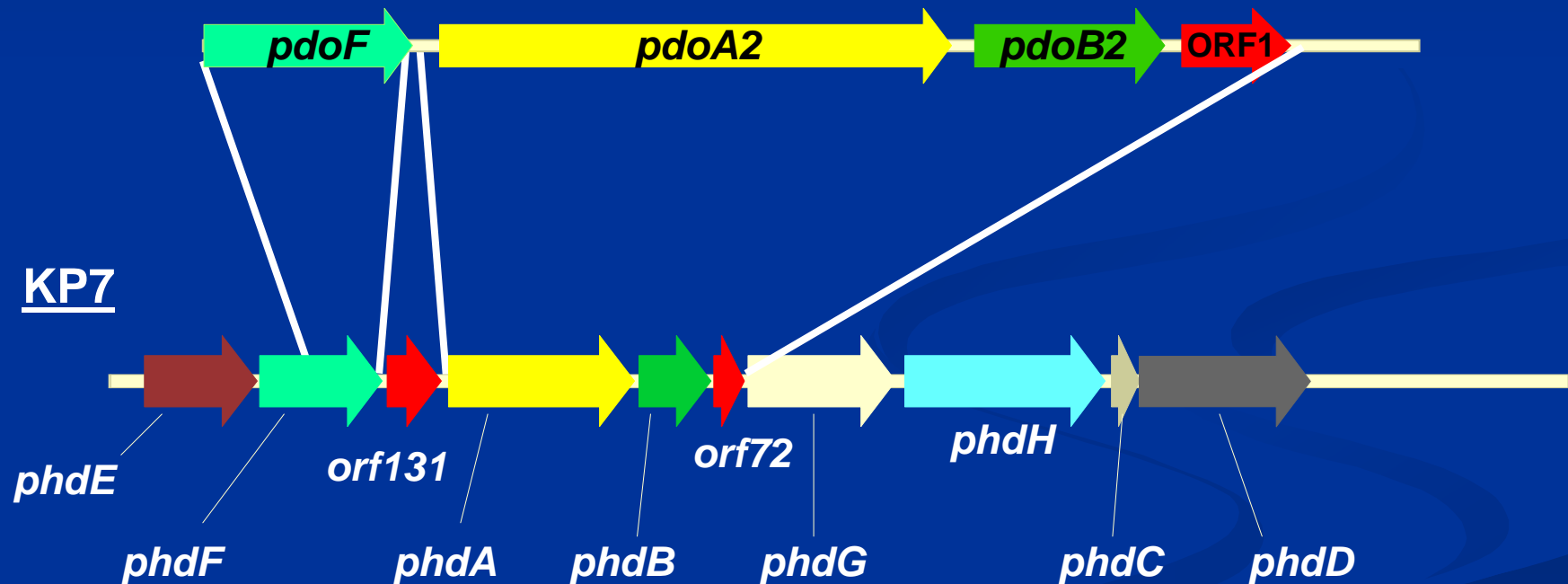


## Mycobacterium sp. PYR-1

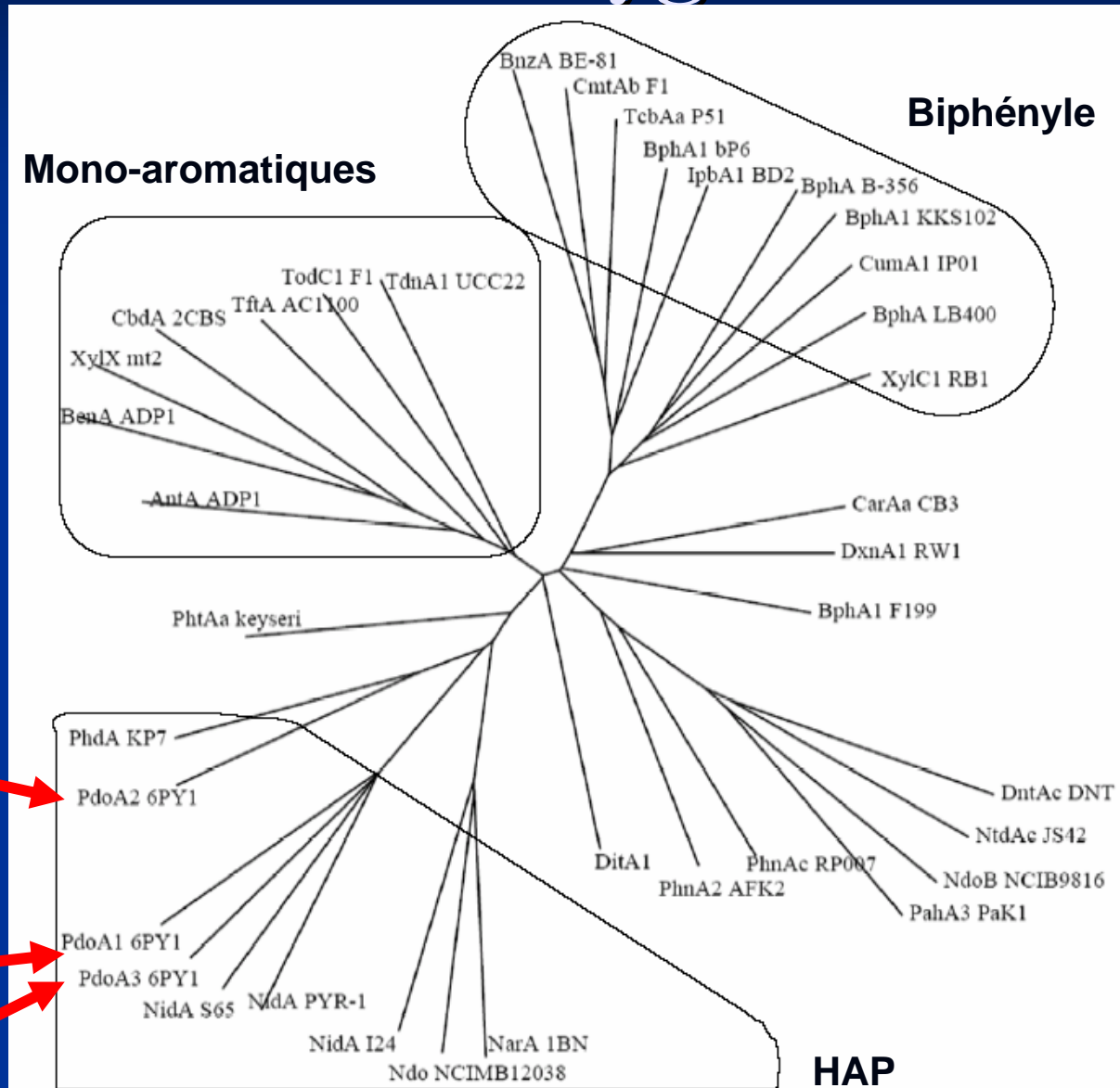


# Comparaison du locus *pdo2* avec les gènes *phd* de *Nocardioïdes* sp. KP7

6PY1

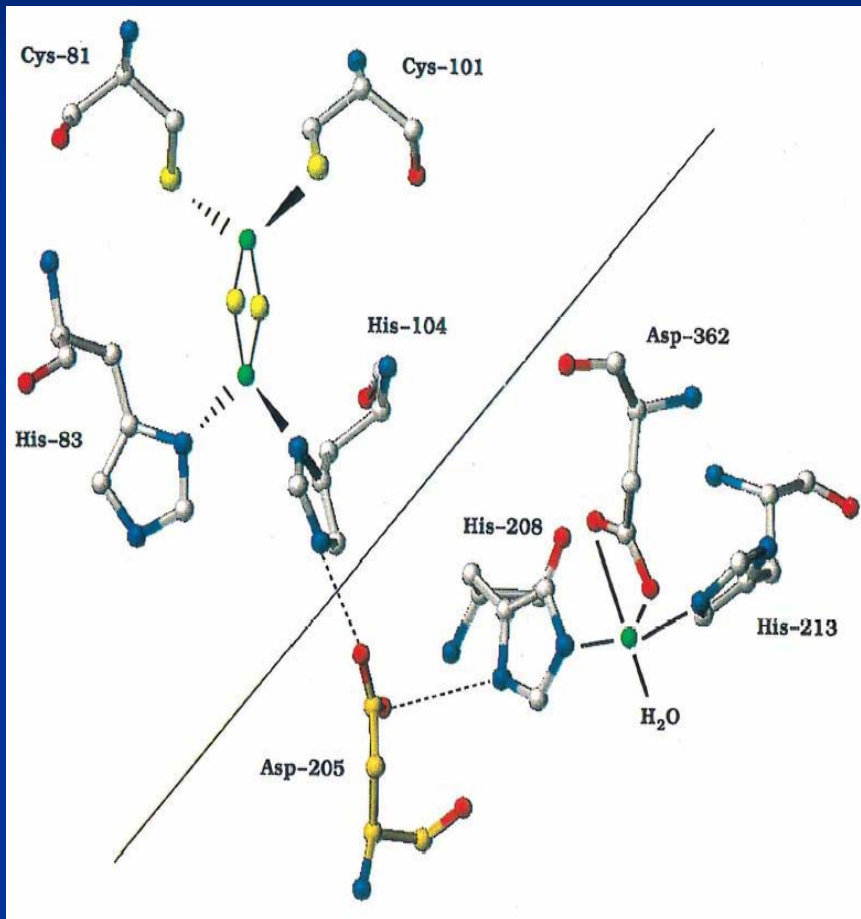


# Arbre phylogénétique de sous-unités $\alpha$ de dioxygénases





# Acides aminés ligands du centre Fer-Soufre et du fer ferreux



Le centre [2Fe-2S] d'une sous-unité  $\alpha$  serait connecté au centre catalytique de la sous-unité  $\alpha$  adjacente par l'intermédiaire de Asp<sub>205</sub>

# Plan

- Introduction

Les HAP, les dioxygénases, *Mycobacterium* sp. 6PY1

- Clonage de gènes de dégradation des HAP

3 loci, analyse des séquences

- Propriétés catalytiques de Pdo1 et Pdo2

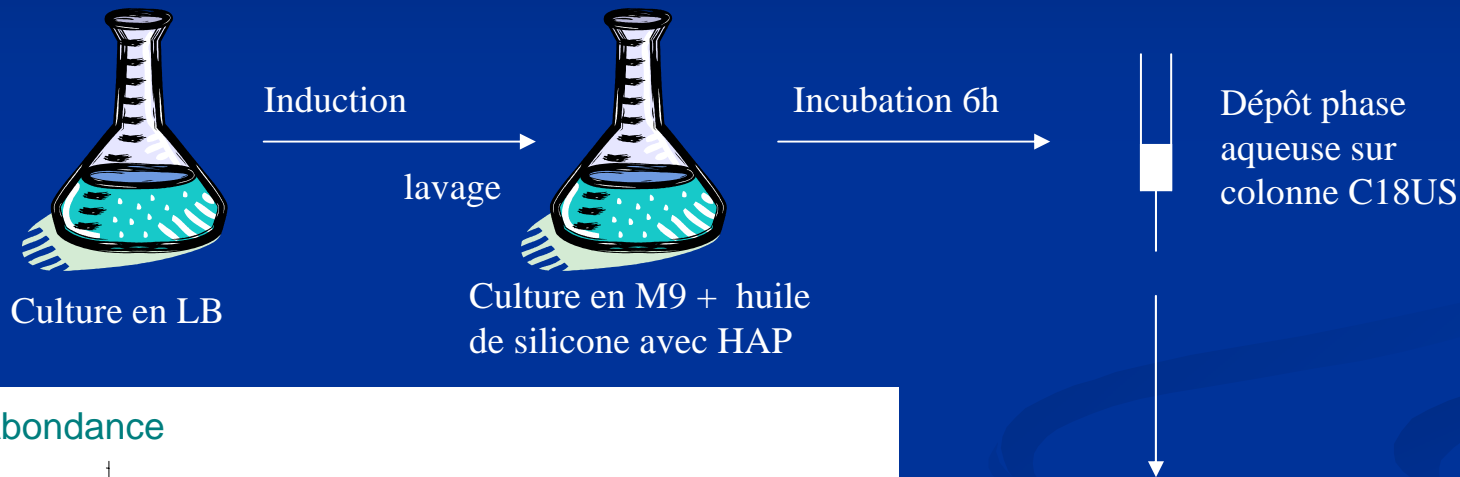
Etude de l'activité et de la sélectivité de Pdo1 et Pdo2

- Surexpression et purification

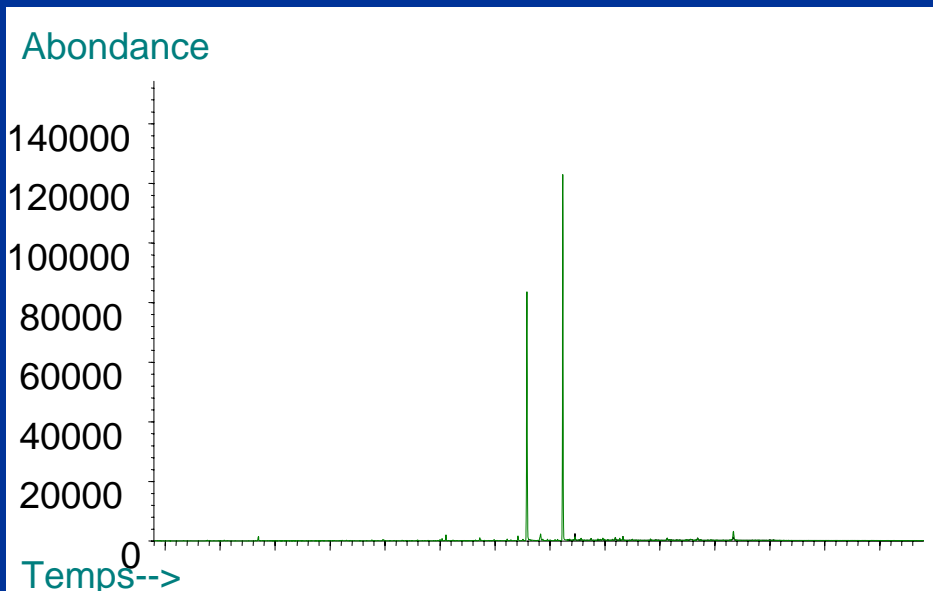
- Régulation de l'expression

- Conclusions et perspectives

# Mesure de l'activité dioxygénase *in vivo*



Analyse par CPG-SM  
en mode SIM



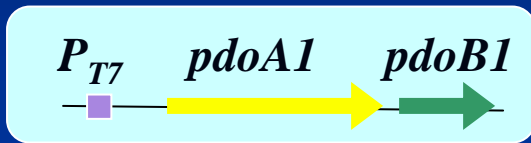
# Activité dioxygénase de Pdo1

Phénanthrène  $\longrightarrow$  3,4-phénanthrène dihydrodiol + 9,10-phénanthrène dihydrodiol

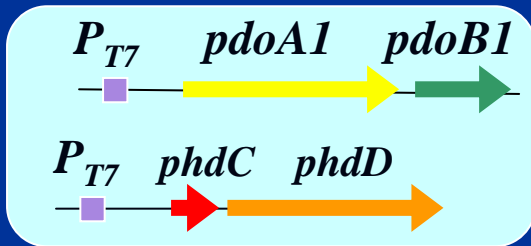
## Construction

## Protéines produites

## Activité

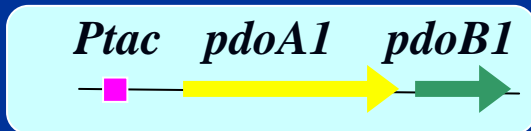


Pdo1

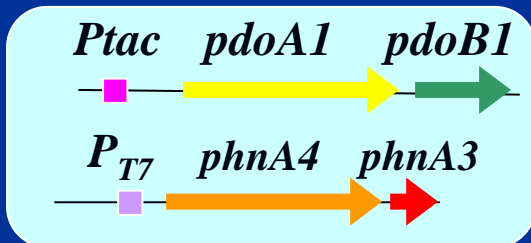


Pdo1

+ PhdC  
+ PhdD

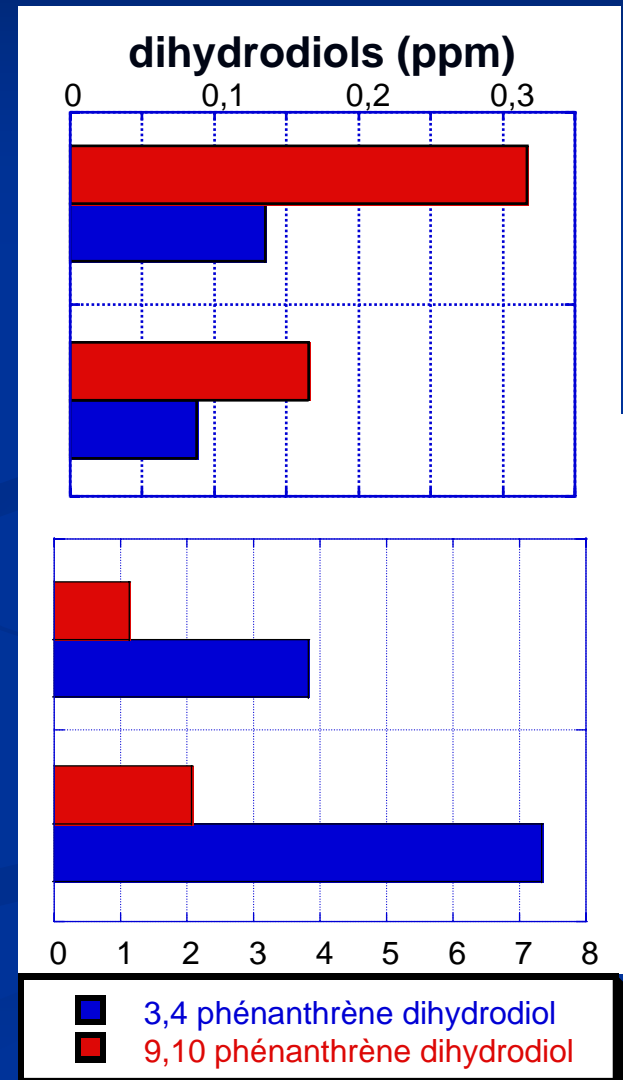


Pdo1



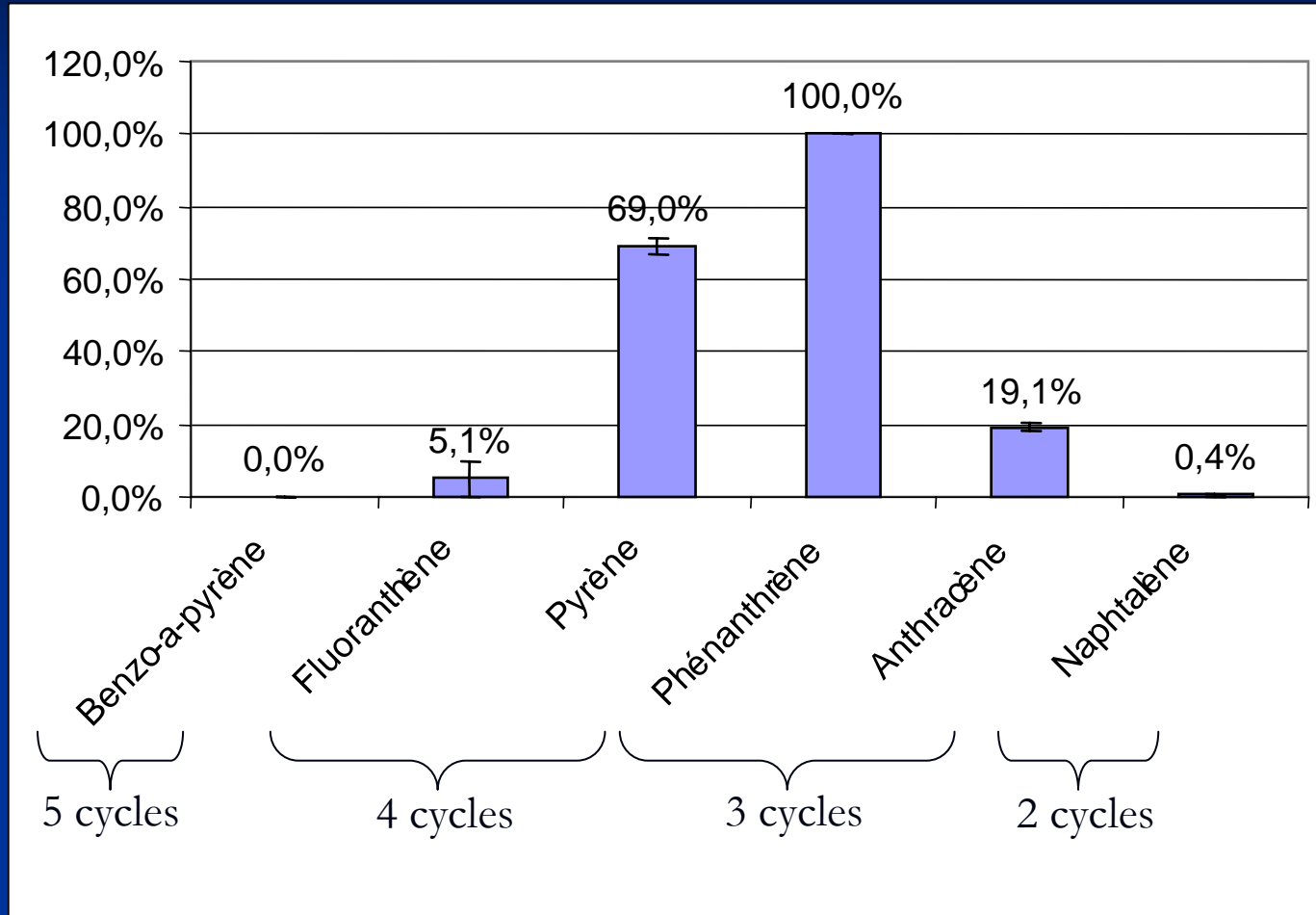
Pdo1

+ PhnA3  
+ PhnA4





# Sélectivité de Pdo1



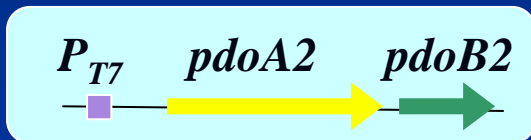
Pdo1 oxyde préférentiellement des HAP à 3 ou 4 cycles

# Activité dioxygénase de Pdo2

## Construction

## Protéines produites

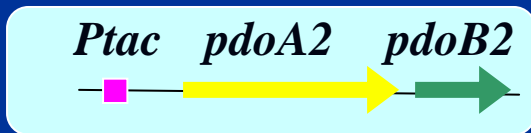
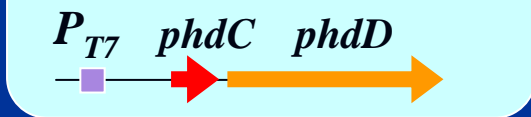
## Activité



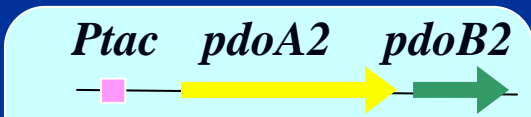
Pdo2



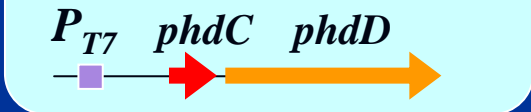
Pdo2  
+ PhdC  
+ PhdD



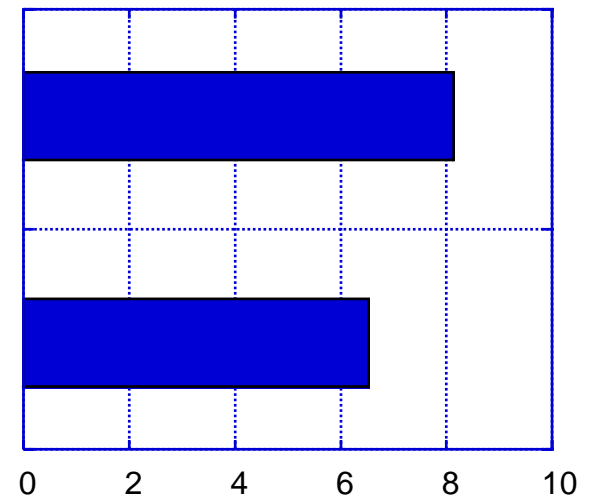
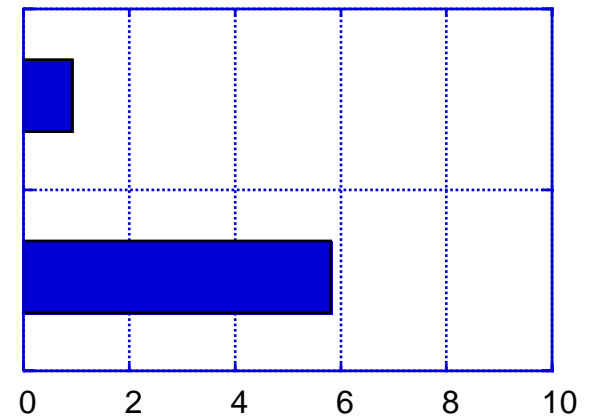
Pdo2



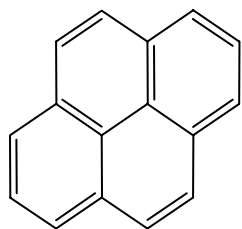
Pdo2  
+ PhdC  
+ PhdD



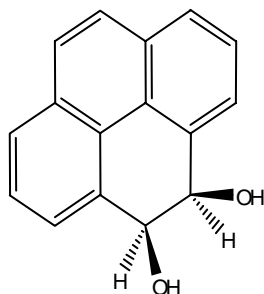
dihydrodiols (ppm)



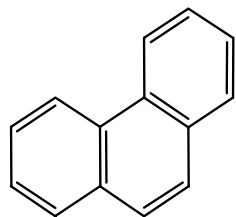
# Activités catalytiques de Pdo1 et Pdo2



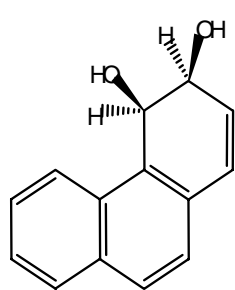
pyrène



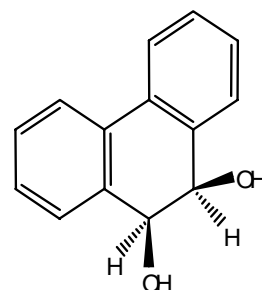
Pyrène-4,5-dihydrodiol



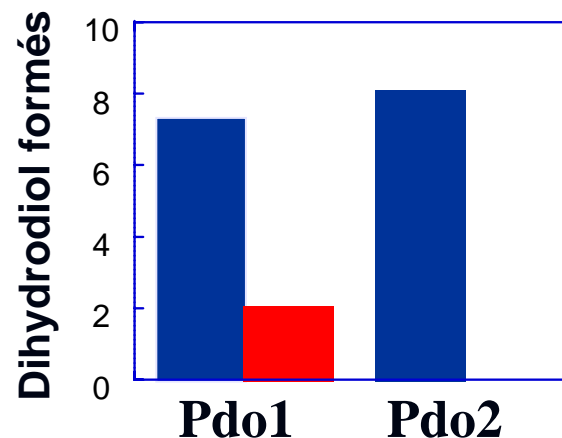
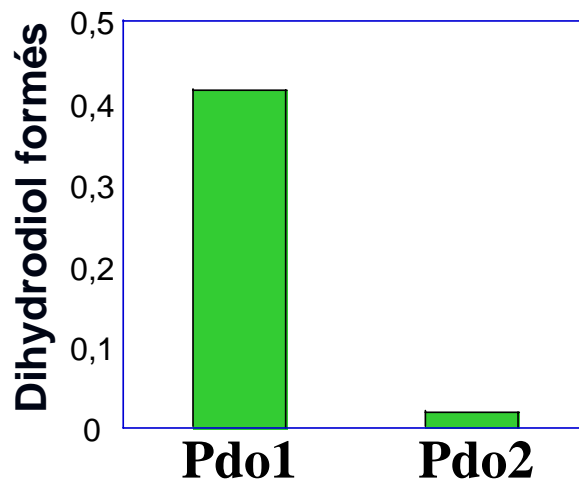
phénanthrène



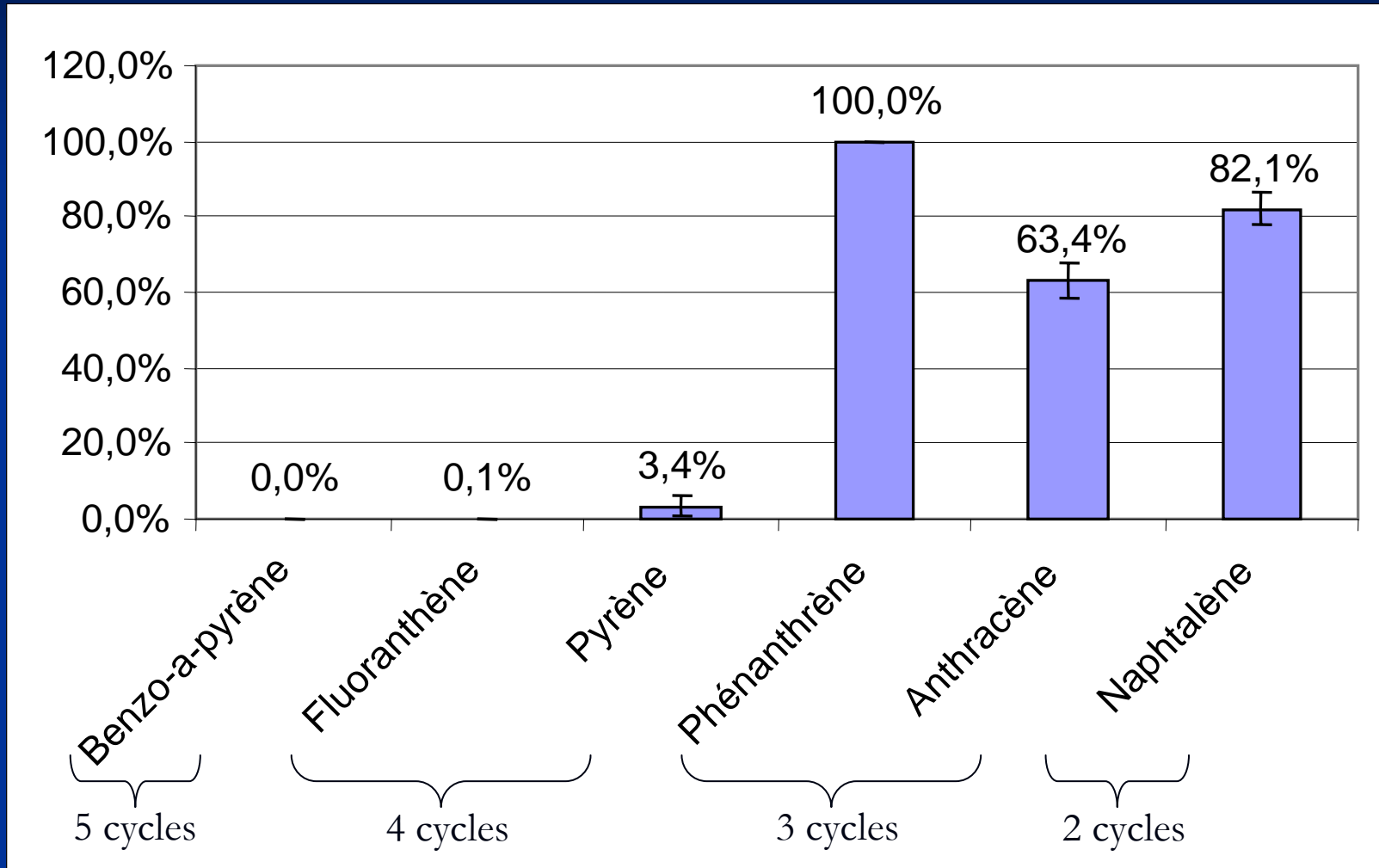
Phénanthrène-3,4-dihydrodiol



Phénanthrène-9,10-dihydrodiol



# Sélectivité de Pdo2



Pdo2 oxyde préférentiellement des HAP à 2 ou 3 cycles

# Plan

## ■ Introduction

Les HAP, les dioxygénases, *Mycobacterium* sp. 6PY1

## ■ Clonage de gènes de dégradation des HAP

3 loci, analyse des séquences

## ■ Propriétés catalytiques de Pdo1 et Pdo2

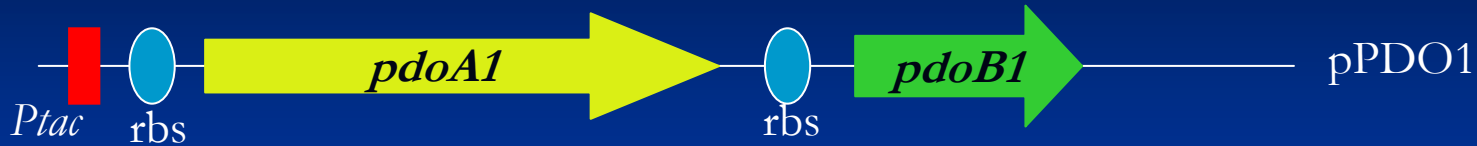
Etude de l'activité et de la sélectivité de Pdo1 et Pdo2

## ■ Surexpression et purification

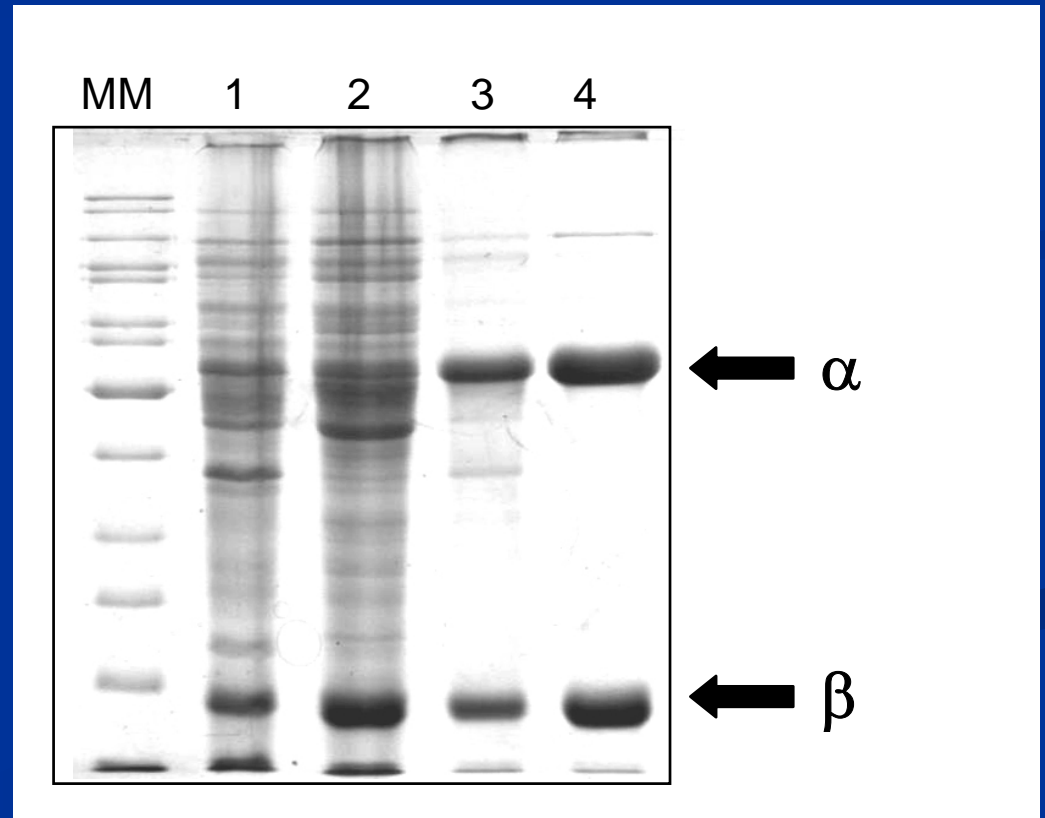
## ■ Régulation de l'expression

## ■ Conclusions et perspectives

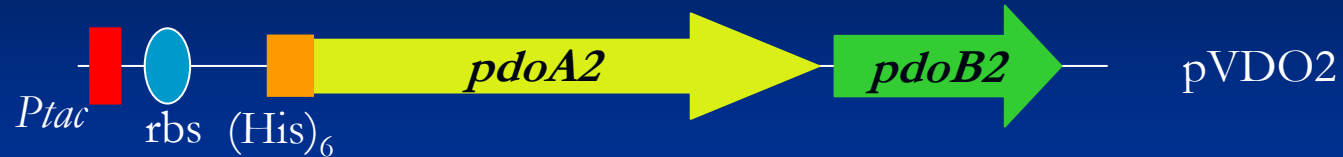
# Purification de Pdo1



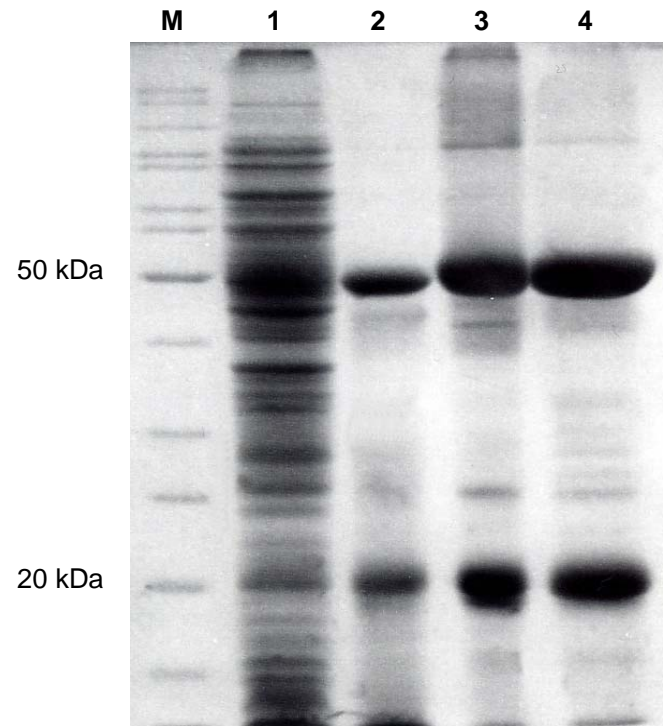
1. Fraction soluble
2. DEAE Cellulose
3. Sulfate d'ammonium 1M
4. Q-HyperD



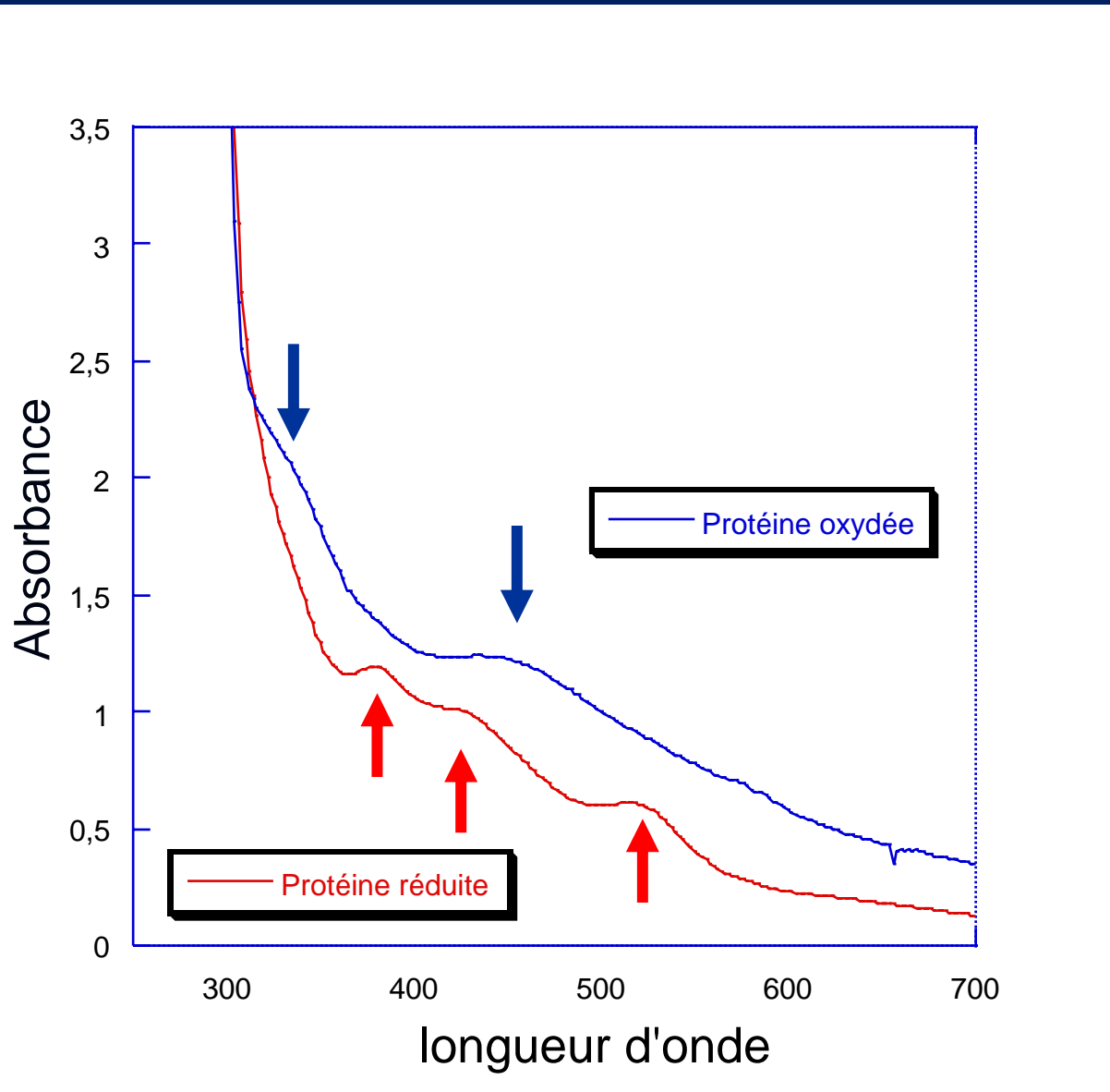
# Purification de His<sub>6</sub>-Pdo2



1. DEAE Cellulose
2. TALON
3. DEAE Cellulose
4. Q-HyperD

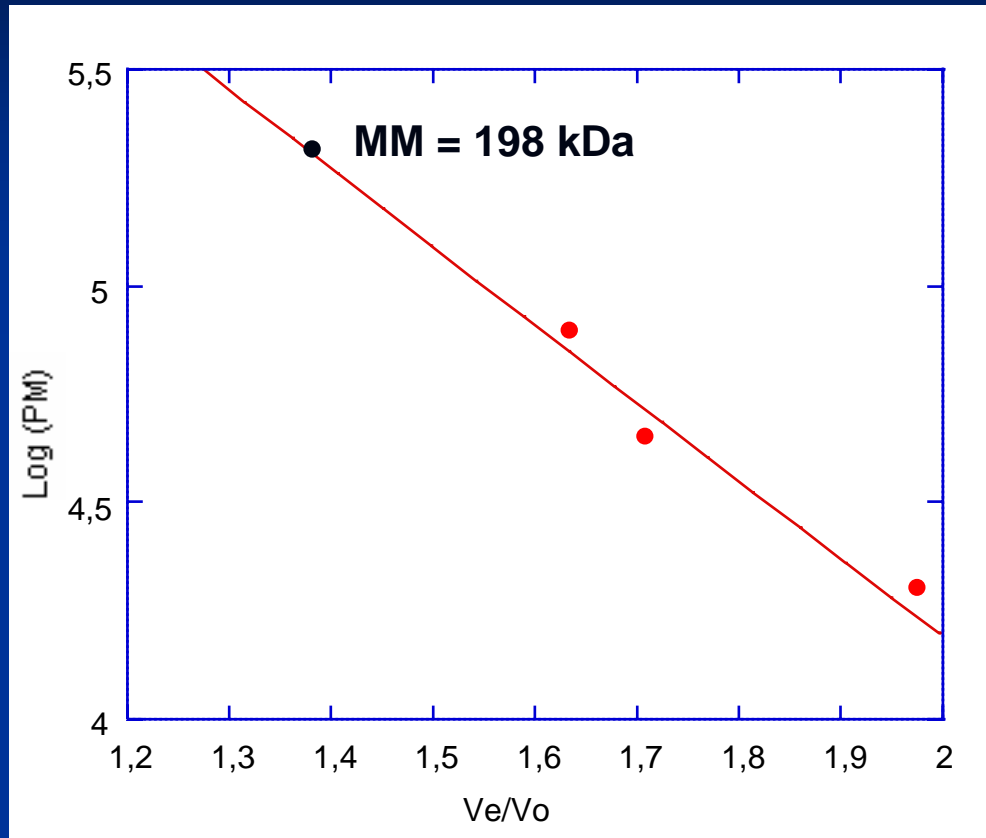


# Spectre d'absorption UV-visible de Pdo2





# Masse moléculaire de Pdo2



Pdo2 est un hétérohexamère de type  $\alpha_3\beta_3$

# Plan

## ■ Introduction

Les HAP, les dioxygénases, *Mycobacterium* sp. 6PY1

## ■ Clonage de gènes de dégradation des HAP

3 loci, analyse des séquences

## ■ Propriétés catalytiques de Pdo1 et Pdo2

Etude de l'activité et de la sélectivité de Pdo1 et Pdo2

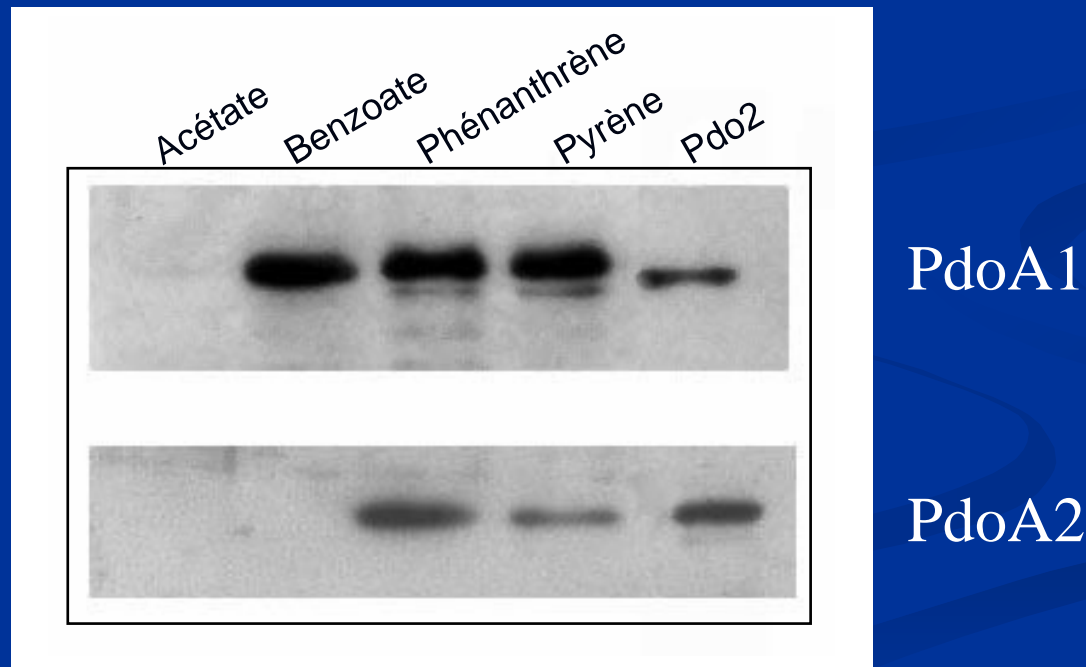
## ■ Surexpression et purification

## ■ Régulation de l'expression

## ■ Conclusions et perspectives

# Régulation de la synthèse des dioxygénases Pdo1 et Pdo2

- Cultures de *Mycobacterium* sp. 6PY1 sur acétate, benzoate, phénanthrène ou pyrène
- Analyse par immuno-détection de Pdo1 et Pdo2



# Plan

## ■ Introduction

Les HAP, les dioxygénases, *Mycobacterium* sp. 6PY1

## ■ Clonage de gènes de dégradation des HAP

3 loci, analyse des séquences

## ■ Propriétés catalytiques de Pdo1 et Pdo2

Etude de l'activité et de la sélectivité de Pdo1 et Pdo2

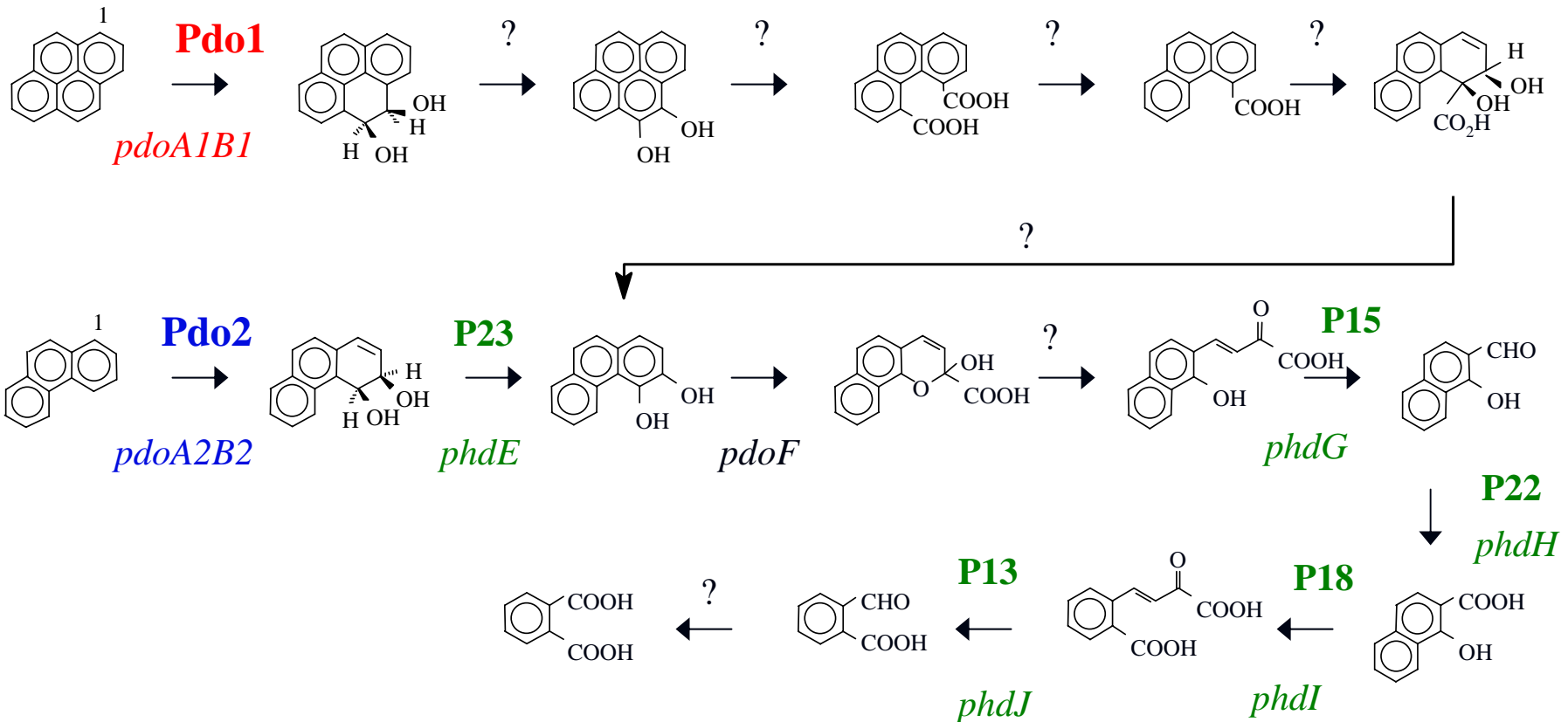
## ■ Surexpression et purification

## ■ Régulation de l'expression

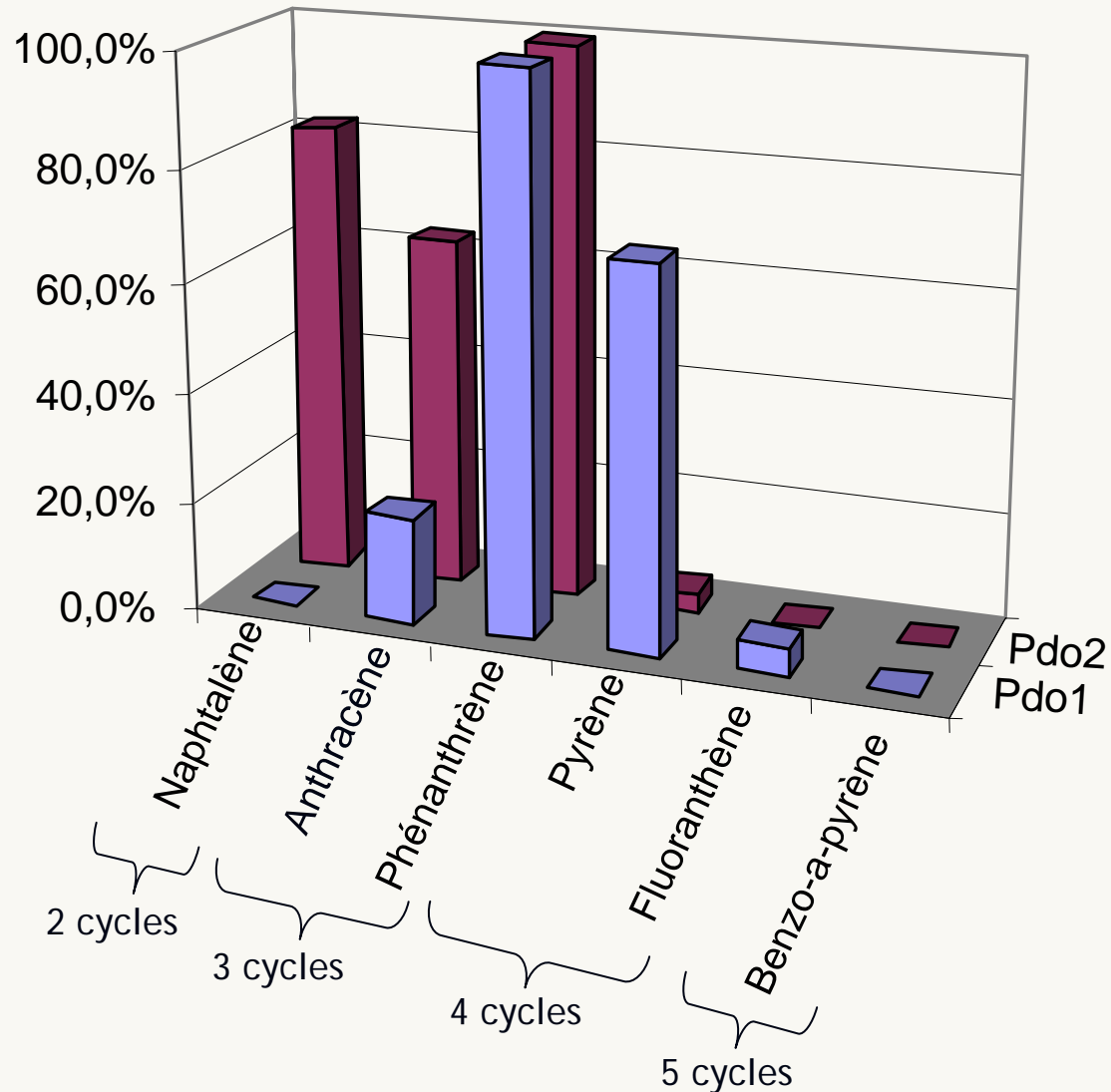
## ■ Conclusions et perspectives

# Catabolisme du pyrène

## Identification des enzymes des premières étapes de la dégradation

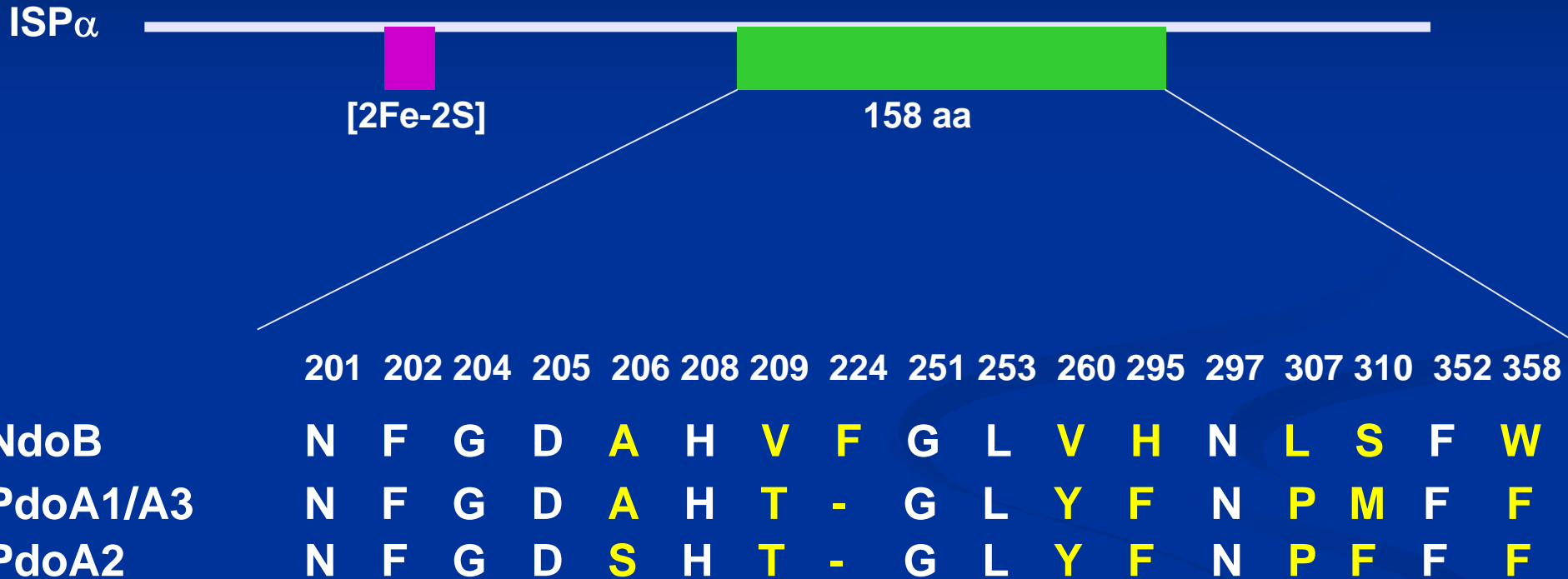


# Sélectivité de Pdo1 et Pdo2



# Sélectivité des dioxygénases

## Rôle des résidus de la poche de liaison du substrat



# Régulation

- Etude de la transcription des gènes codant les dioxygénases:
  - Northern blot, RT-PCR
  - Localisation des promoteurs
    - Construction de fusions transcriptionnelles avec des gènes rapporteurs
- Recherche de protéines de régulation
  - Expériences de retards sur gel
  - Isolement de mutants de régulation



# Remerciements

- Membres du jury
- Yves Jouanneau
- Equipe « HAP »
- Michel Satre
- Stagiaires, doctorants et post-doctorants
- Laboratoire BBSI