



**HAL**  
open science

# Biosynthèse de caroténoïdes aromatiques hydroxylés par des bactéries non photosynthétiques : Des carotènes aux xanthophylles.

Stephanie Savy

► **To cite this version:**

Stephanie Savy. Biosynthèse de caroténoïdes aromatiques hydroxylés par des bactéries non photosynthétiques : Des carotènes aux xanthophylles.. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2005. Français. NNT: . tel-00193188

**HAL Id: tel-00193188**

**<https://theses.hal.science/tel-00193188v1>**

Submitted on 2 Dec 2007

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE

*Présentée devant*

L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

*Pour obtenir le grade de*

DOCTEUR de L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention Microbiologie

Par

**Stéphanie MORIN-SAVY**

Ecole Doctorale Sciences de la Matière, de l'Information et de la Santé

TITRE DE LA THÈSE :

**Biosynthèse de caroténoïdes aromatiques hydroxylés  
par des bactéries non photosynthétiques :  
Des carotènes aux xanthophylles.**

Soutenue le 04 Février 2005 devant la commission d'examen :

B. CAMARA	Professeur, Université Louis Pasteur Strasbourg	Rapporteur
G. LEBLON	Professeur, Université Paris Sud 11	Rapporteur
Y. FLEURY	Maître de Conférences, Université de Bretagne Occidentale	Examineur
R. LABIA	Directeur de Recherches CNRS, IRPF Toulouse	Examineur
A. BINET	Professeur, Université de Bretagne Occidentale	Directeur de thèse

# *Table des Matières*

<i>Liste des figures</i> .....	<b>5</b>
<i>Liste des tableaux</i> .....	<b>11</b>
<i>Introduction</i> .....	<b>13</b>

<b><i>Introduction Bibliographique</i></b>
--

<b>1- Généralités sur les caroténoïdes</b> .....	<b>15</b>
1.1- Définition .....	15
1.2- Fonctions Biologiques .....	16
1.3- Organismes producteurs.....	17
<b>2- Biosynthèse des caroténoïdes</b> .....	<b>18</b>
2.1- La synthèse d'IsoPentenyl Pyrophosphate.....	18
2.1.1- La voie de l'acide mévalonique .....	18
2.1.2- La voie du deoxyxylulose phosphate .....	19
2.2- De l'IPP au phytoène .....	22
2.3- Désaturations successives du phytoène .....	24
2.4- Cyclisation du lycopène .....	27
2.4.1- Lycopène $\beta$ -cyclase.....	29
2.4.2- Lycopène $\epsilon$ -cyclase .....	31
2.5- Désaturation des cycles.....	32
2.6- Formation des xanthophylles .....	34
2.6.1- Les xanthophylles linéaires.....	34
2.6.2- Les xanthophylles cycliques .....	36

<b>3- Les Cytochromes P450 .....</b>	<b>44</b>
3.1- Nomenclature .....	44
3.2- Mise en évidence et Structure .....	44
3.3- Classification des systèmes P450.....	45
3.4- Cycle Catalytique.....	47
3.5- Réactions catalysées et les effecteurs .....	49
3.5.1- Les réactions catalysées .....	49
3.5.2- Les effecteurs .....	50
3.6- Modélisation en trois dimensions .....	52
<b>4- Les bactéries étudiées .....</b>	<b>54</b>
4.1- <i>Brevibacterium linens</i> .....	54
4.2- <i>Streptomyces mediolani</i> .....	56
4.3- <i>Mycobacterium aurum</i> .....	57

<i>Matériel et méthodes</i>
-----------------------------

<b>1- Les souches bactériennes .....</b>	<b>63</b>
<b>2- Milieux et conditions de culture.....</b>	<b>63</b>
<b>3- Détermination de la quantité de biomasse.....</b>	<b>64</b>
<b>4- Extraction des pigments .....</b>	<b>65</b>
<b>5- Réaction phénolate.....</b>	<b>66</b>
<b>6- Méthode d'analyse en HPLC .....</b>	<b>67</b>
<b>7- Méthode d'analyse en LCMS.....</b>	<b>69</b>
<b>8- Préparation et utilisation des inhibiteurs et inducteur enzymatique.....</b>	<b>70</b>
<b>9- Etude des P450 <i>in vitro</i> .....</b>	<b>72</b>
9.1- Préparation des extraits acellulaires .....	72
9.2- Spectre d'absorbance différentiel de P450 réduits en présence de CO .....	72
<b>10- Méthodes de mutagénèse .....</b>	<b>73</b>
10.1- Mutagénèse aléatoire, aux U.V.....	73
10.2- Electroporation.....	73
<b>11- Extraction ADN bactérien.....</b>	<b>74</b>
<b>12- PCR et Electrophorèse .....</b>	<b>75</b>

<b><i>Résultats discussion</i></b>
------------------------------------

<b>1- Caractérisation des pigments produits par les bactéries.....</b>	<b>77</b>
1.1- Etudes sur la production de biomasse et de pigments.....	77
1.1.1- Production de pigments et de biomasse chez <i>B. linens</i> .....	77
1.1.2- Production de pigments et de biomasse chez <i>S. mediolani</i> .....	79
1.1.3- Production de pigments et de biomasse chez <i>M. aurum</i> .....	80
1.1.4- Bilan des données obtenues .....	83
1.2- Effet d'une base forte sur le spectre d'absorbance des pigments .....	84
1.2.1- Spectre d'absorbance des pigments de <i>B. linens</i> .....	84
1.2.2- Spectre d'absorbance des pigments de <i>S. mediolani</i> .....	84
1.2.3- Spectre d'absorbance des pigments de <i>M. aurum</i> .....	85
1.3- Caractérisation des caroténoïdes par HPLC .....	87
1.3.1- Standards.....	87
1.3.2- Profil HPLC des pigments de <i>B. linens</i> .....	91
1.3.3- Profil HPLC des pigments de <i>S. mediolani</i> .....	92
1.3.4- Profil HPLC des pigments de <i>M. aurum</i> .....	94
1.4- Analyses LCMS des caroténoïdes extraits.....	95
1.4.1- Analyse des pigments de <i>B. linens</i> en LCMS .....	96
1.4.2- Analyse des pigments de <i>S. mediolani</i> en LCMS .....	96
1.4.3- Analyse des pigments de <i>M. aurum</i> en LCMS .....	97
1.5- Conclusion .....	99
1.5.1- Etudes des xanthophylles produits par <i>M. aurum</i> .....	99
1.5.1.1- L'hypothèse du di-méthoxy-isorénéiratène .....	99
1.5.1.2- Purification des pigments pour une analyse en RMN .....	100
1.5.2- Caractérisation des pigments produits par <i>B. linens</i> et <i>S. mediolani</i> .....	101
<b>2- Biosynthèse des caroténoïdes aromatiques.....</b>	<b>102</b>
2.1- Recherche de gène codant pour une hydroxylase dans le cluster <i>crt</i> .....	102
2.1.1- Etude des séquences de gènes <i>crt T</i> et <i>crt V</i> de <i>S. griseus</i> et <i>M. aurum</i> .....	103
2.1.2- Recherche de séquences homologues à celle de l' ORF 10 de <i>B. linens</i> .....	104
2.2- Inhibitions <i>in vivo</i> .....	107
2.2.1- Inhibitions chez <i>M. aurum</i> .....	107
2.2.2- Effecteurs chez <i>S. mediolani</i> .....	108
2.2.2.1- Métyrapone .....	108
2.2.2.2- Tetcyclacis.....	109
2.2.2.3- Phénobarbital.....	112

---

2.2.3- Inhibitions chez <i>B. linens</i> .....	112
2.2.3.1- Métyrapone .....	122
2.2.3.2- Tetcyclacis.....	113
2.2.4- Conclusion .....	115
2.3- Cytochrome P 450 <i>in vitro</i> .....	117
2.3.1- <i>M. aurum</i> .....	118
2.3.2- <i>S. mediolani</i> .....	119
2.3.3- <i>B. linens</i> .....	119
2.3.4- Conclusion .....	119
2.4- Mutagenèse chez <i>B. linens</i> .....	120
2.4.1- Mutagenèse aléatoire .....	120
2.4.1.1- Description des mutants obtenus.....	120
2.4.1.2- Caractérisation des pigments produits par le mutant jaune .....	124
2.4.1.3- Etude de l'orf 10 du cluster crt de BLMJ.....	131
2.4.2- Mutagenèse « dirigée » sur <i>B. linens</i> sauvage.....	145
2.4.2.1- Electroporation de <i>B. linens</i> sauvage.....	145
2.4.2.2- Description du mutant BLE7J.....	147
2.4.2.3- Caractérisation des pigments produits par le mutant BLE7J .....	148
2.4.2.4- Etude de l'orf 10 du cluster crt de BLE7J.....	151
<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>159</b>
<b>Références Bibliographiques .....</b>	<b>163</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>173</b>

## Liste des figures

- Figure 1 : Synthèse d'IPP par la voie de l'acide mévalonique.
- Figure 2 : Synthèse d'IPP par la voie du deoxyxylulose phosphate.
- Figure 3 : Voie de biosynthèse générale des isoprénoïdes.
- Figure 4 : Désaturations du phytoène. Les caroténoïdes en aval du phytofluène sont colorés.
- Figure 5 : Désaturations dans la voie de biosynthèse d'apocaroténoïdes (C30).
- Figure 6 : Différents cycles obtenus après cyclisations des extrémités du lycopène.
- Figure 7 : Biosynthèse des caroténoïdes cycliques.
- Figure 8 : Schéma des structures primaires des lycopènes cyclases bactériennes hétérodimériques, des champignons et des archaebactéries.
- Figure 9 : Voie de biosynthèse menant à la formation de caroténoïde aromatique : isoréniératène.
- Figure 10 : Biosynthèse de xanthophylles acycliques chez *Rhodobacter*.
- Figure 11 : Hydroxylation du  $\beta$ -carotène par la  $\beta$ -carotène hydroxylase (CrtZ).
- Figure 12 : Mode d'action de la  $\beta$ -carotène hydroxylase.
- Figure 13 : Hydroxylation des caroténoïdes chez *A. thaliana*.
- Figure 14 : Différentes voies de biosynthèses pour la formation de xanthophylles cycliques.
- Figure 15 : Différents substrats de l'hydroxylase Crt Z.
- Figure 16 : Différents substrats de la cétolase Crt W.
- Figure 17 : Site actif du P450 cam.
- Figure 18 : Représentation des différentes classes de P450.
- Figure 19 : Cycle réactionnel d'un cytochrome P450.
- Figure 20 : Représentation schématique du mode d'action du métyrapone.
- Figure 21 : Formule du tetcyclacis.
- Figure 22 : Structure 3D du P450 BMP.
- Figure 23 : Caroténoïdes aromatiques produits par *B. linens*.

- Figure 24 : Cluster *crt* de *B. linens*.
- Figure 25 : Cluster *crt* de *S. griseus*.
- Figure 26 : Voie de biosynthèse des caroténoïdes chez *M. aurum*.
- Figure 27 : Cluster *crt* de *M. aurum*.
- Figure 28 : Voie de biosynthèse de caroténoïdes aromatiques chez *B. linens*, *S. mediolani* et *M. aurum*.
- Figure 29 : Courbes de croissance et de production de pigments par *B. linens*.
- Figure 30 : Courbes de croissance et de production de pigments par *S. mediolani*.
- Figure 31 : Courbes de croissance et de production de pigments par *M. aurum*.
- Figure 32 : Spectres d'absorbance des pigments de *B. linens* avec et sans KOH.
- Figure 33 : Spectres d'absorbance des pigments de *S. mediolani* avec et sans KOH.
- Figure 34 : Spectres d'absorbance des pigments de *M. aurum* avec et sans KOH.
- Figure 35 : Séparation de caroténoïdes standard selon 2 méthodes HPLC.
- Figure 36 : Spectres d'absorbance des caroténoïdes standard : Lycopène,  $\beta$ -carotène et Zéaxanthine.
- Figure 37 : Spectres d'absorbance des caroténoïdes standard :  $\beta$ -carotène, Astaxanthine et Canthaxanthine.
- Figure 38 : Chromatogramme des pigments de *B. linens*.
- Figure 39 : Spectres d'absorbance des pigments majoritairement accumulés par *B. linens*.
- Figure 40 : Chromatogramme des pigments de *S. mediolani*.
- Figure 41 : Spectres d'absorbance des pigments majoritairement accumulés par *S. mediolani*.
- Figure 42 : Chromatogramme des pigments de *M. aurum*.
- Figure 43 : Spectres d'absorbance des pigments majoritairement accumulés par *M. aurum*.
- Figure 44 : Chromatogramme des pigments de *B. linens*, issu de l'analyse LCMS.
- Figure 45 : Chromatogramme des pigments de *S. mediolani*, issu de l'analyse LCMS.
- Figure 46 : Chromatogramme des pigments de *M. aurum*, issu de l'analyse LCMS.
- Figure 47 : Caroténoïdes hypothétiques proposés pour *M. aurum*.
- Figure 48 : Chromatogramme HPLC du di-méthoxy-isoréniératène de synthèse.
- Figure 49 : Alignement des séquences les plus proches de l'ORF 10 de *B. linens*.



- Figure 50 : Séquence protéique de l'ORF 10 du cluster *crt* de *B. linens*.
- Figure 51 : **a** : Chromatogrammes des extraits méthanoliques et acétoniques combinés de *Streptomyces mediolani* cultivée en présence de différentes concentrations de métyrapone.  
**b** : Pourcentages relatifs des trois classes de caroténoïdes extraits de *Streptomyces mediolani* cultivée en présence de différentes concentrations en Métyrapone (mM).
- Figure 52 : **a** : Chromatogrammes des extraits méthanoliques et acétoniques de *Streptomyces mediolani* cultivée en présence de différentes concentrations en tétcyclacis.  
**b** : Pourcentages relatifs des trois classes de caroténoïdes extraits de *Streptomyces mediolani* cultivée en présence de différentes concentrations en tétcyclacis (mM).
- Figure 53 : Co-élution des extraits méthanoliques et acétoniques de *Streptomyces mediolani* avec des caroténoïdes standards.
- Figure 54 : **a**- Identification des composés apolaires présents chez *S. mediolani*.  
**b**- Formules chimiques des composés identifiés ( $\beta$ -carotène et isoréniératène) et du composé suspecté ( $\beta$ -isoréniératène).
- Figure 55: Influence du Phénobarbital sur la production de biomasse et de caroténoïdes chez *S. mediolani*.
- Figure 56 : **a** : Chromatogrammes des extraits méthanoliques de *Brevibacterium linens* cultivée en présence de différentes concentrations en tétcyclacis.  
**b** : Pourcentages relatifs des trois classes de caroténoïdes extraits de *Brevibacterium linens* cultivée en présence de différentes concentrations en tétcyclacis (mM).
- Figure 57: Co-élution des extraits méthanoliques de *Brevibacterium linens* avec des caroténoïdes standard.
- Figure 58 : Voie de biosynthèse proposée de l'isoréniératène et ses dérivés hydroxylés chez *B. linens* et *S. mediolani*.
- Figure 59 : Spectres d'absorbance d'extraits acellulaires bactériens en présence de CO.
- Figure 60 : *B. linens* et ses mutants U.V.

- Figure 61 : Chromatogrammes HPLC des pigments produits par *B. linens* témoin, BLMJ et BLMB.
- Figure 62 : Chromatogrammes HPLC des extraits pigmentaires de BLMJ.
- Figure 63 : Co-élution des pigments de BLMJ avec du lycopène standard.
- Figure 64 : Co-élution des pigments de BLMJ avec du  $\beta$ -carotène standard.
- Figure 65 : Co-élution des pigments de BLMJ avec l'isoréniératène standard.
- Figure 66 : Chromatogrammes issus de l'analyse LCMS des pigments de BLMJ.
- Figure 67 : Représentation des amorces et des produits PCR de l'*orf 10*.
- Figure 68 : Electrophorèse des 16 produits PCR de *orf 10*.
- Figure 69 : Séquences protéiques de l'ORF 10 de *B. linens* sauvage et BLMJ.
- Figure 70 : Séquences de l'ORF 10 du cluster *crt* de BLMJ.
- Figure 71 : Extrait de l'alignement des séquences nucléiques de l'*orf 10* de BLMJ avec celui du *B. linens* sauvage.
- Figure 72 : Extrait de l'alignement des séquences protéiques de l'ORF 10 de BLMJ avec celui du *B. linens* sauvage.
- Figure 73 : Schéma résumant les différentes modifications entre ORF 10 de BLMJ et celui de *B. linens* sauvage.
- Figure 74 : Extrait de l'alignement des P450 les plus proches de l'ORF 10 de *B. linens*.
- Figure 75 : Représentation d'une partie de l'alignement du PD 000936.
- Figure 76 : Structure 3D du CYP 119.
- Figure 77.A : Représentation de tous les éléments du CYP 119 établissant des interactions avec la phénylalanine 87.
- Figure 77.B : Représentation de l'interaction existante entre F87 et l'hème du CYP 119.
- Figure 78 : Electrophorèse des produits PCR de l'*orf 10* de BLMJ.
- Figure 79 : Chromatogramme HPLC des pigments de BLE7J.
- Figure 80 : Co-élution des pigments de BLE7J avec l'isoréniératène standard.
- Figure 81 : Chromatogrammes issus de l'analyse LCMS des pigments de BLE7J.
- Figure 82 : Electrophorèse des produits PCR de BLE7J.
- Figure 83 : Séquence protéique de l'ORF 10 de BLE7J.
- Figure 84 : Séquences de l'ORF 10 du cluster *crt* de BLE7J.

- Figure 85: Extrait de l'alignement des séquences nucléiques de l'*orf 10* de BLE7J avec celui de *B. linens* sauvage.
- Figure 86 : Extrait de l'alignement des séquences protéiques de l'ORF 10 de BLE7J avec celui de *B. linens* sauvage.
- Figure 87 : Schéma représentant les différentes modifications survenues sur l'ORF 10 de BLE7J.
- Figure 88 : Extrait de l'alignement des cinq P450 les plus proches de celui de *B. linens*.
- Figure 89 : Structure du P450 nor dans les régions du ligand cystéine, du « méandre » et de l'hélice K.



## *Liste des tableaux*

- Tableau 1 : Distribution des voies mévalonate et deoxyxylulose phosphate pour la biosynthèse d'isoprénoïdes.
- Tableau 2 : Différentes enzymes impliquées dans la formation des xanthophylles cycliques.
- Tableau 3 : Gradients GA et GB utilisés pour les analyses HPLC des caroténoïdes.
- Tableau 4 : LCMS : Gradient utilisé pour la séparation HPLC, la phase mobile est composé d'un mélange de
- Tableau 5 : Amorces de l'*orf 10* du cluster *crt*.
- Tableau 6 : Production de biomasse et de pigments chez les *B. linens* ; *S. mediolani* et *M. aurum*.
- Tableau 7 : Caroténoïdes standard utilisées pour les analyses HPLC.
- Tableau 8 : Séquences similaires à l'ORF 10 de *B. linens* après BLAST-p sur NCBI.
- Tableau 9 : Quantification de la biomasse et des pigments produits par *B. linens* sauvage et les mutants BLMJ, BLMB.
- Tableau 10 : Concentrations en caroténoïdes des différents extraits pigmentaires de BLMJ.
- Tableau 11 : amorces et amplimères de la PCR de l'*orf 10*.
- Tableau 12 : Résultat du BLAST de la séquence protéique de l'ORF 10 avec les domaines ProDom.
- Tableau 13 : 11 cytochromes P450 dont les structures 3D sont connues ayant le PD 000936.
- Tableau 14 : Informations concernant la structure 3D des 11 P450 possédant le PD 000936.
- Tableau 15 : Résultats des électroporations pratiquées sur *B. linens* sauvage.



## *Introduction*

La couleur est un paramètre important de notre perception du monde. Outre son caractère esthétique évident, elle joue un rôle important dans notre vie, elle influence nos humeurs. On observe qu'un véritable langage des couleurs s'est développé sur la base de cette constatation. Ce langage est utilisé par les principaux acteurs de la consommation (publicitaire, médias ...)

L'industrie alimentaire n'est pas en reste. A l'exigence du consommateur face à l'apparence du produit, l'industriel répond par un effort de contrôle de ces paramètres. Pour ce faire, certains aliments sont enrichis par des molécules colorantes telles que les caroténoïdes.

La synthèse chimique de ces molécules est cependant coûteuse. L'origine biologique de ces pigments s'avère être une alternative intéressante. Outre cet aspect visuel, les caroténoïdes présentent également un intérêt fonctionnel reposant essentiellement sur leurs propriétés antioxydantes. Leur domaine d'application s'étend alors aux industries cosmétiques et pharmacologiques.

Mis à part l'identification de nouveaux pigments, la détermination de leurs voies de biosynthèse est un enjeu majeur pour les applications. En effet, la connaissance d'un grand nombre d'enzymes de la caroténogénèse permet de modifier les voies de biosynthèse chez les micro-organismes ou les plantes. Cette approche permet d'aboutir à des organismes

présentant une caroténogénèse orientée vers la production de caroténoïdes d'intérêt spécifique voir de nouveaux caroténoïdes.

Ce travail de thèse s'inscrit dans cet effort de compréhension de voies de biosynthèse des caroténoïdes aromatiques synthétisés par des bactéries non photosynthétiques.

Dans ce cadre spécifique, seule la dernière étape reste à éclaircir, celle transformant les carotènes en xanthophylles, l'étape d'hydroxylation, à l'origine de la production de caroténoïdes aromatiques hydroxylés.

Une première partie sera consacrée à l'introduction bibliographique. Après avoir défini la notion de caroténoïdes, on s'intéressera à leurs fonctions biologiques et aux organismes producteurs. La voie de biosynthèse des caroténoïdes sera ensuite présentée, depuis les étapes primaires communes à tous les organismes caroténogènes jusqu'aux étapes plus tardives notamment les réactions d'oxygénation. Puis une classe particulière d'enzymes intervenant dans ces réactions sera introduite, les cytochromes P450. Un état des connaissances sur la caroténogénèse des trois bactéries étudiées : *Brevibacterium linens*, *Streptomyces mediolani* *Mycobacterium aurum* terminera cette introduction bibliographique.

Les résultats sur les travaux réalisés pendant la thèse s'articulent en deux parties.

La première consacrée à l'étude des productions des pigments bactériens puis à leur caractérisation biochimique notamment au moyen d'analyses HPLC et LCMS.

La seconde est consacrée à l'étude de l'étape d'hydroxylation dans la voie de biosynthèse. Une approche bioinformatique est utilisée en complément d'expériences d'inhibitions *in vivo* et de mutagénèse. L'ensemble de ces outils est destiné à identifier le substrat, le type d'enzyme et le gène impliqués dans la réaction d'hydroxylation : étape finale de la caroténogénèse étudiée.



# *Introduction Bibliographique*

## **1- Généralités sur les caroténoïdes**

### 1.1- Définition

Les caroténoïdes sont des molécules lipidiques appartenant à la famille des terpènes. Les terpènes représentent une grande classe de composés à fonctions très variées. L'appartenance à cette catégorie est alors établie sur les critères de structure et de biosynthèse. L'unité de base de ces structures est l'isoprène composé à 5 atomes de carbone (C5). Les terpènes sont issus de la condensation d'au moins deux isoprènes. La classification en monoterpène, diterpène ou tétraterpène dépend du nombre d'isoprène condensé. Les terpènes les plus connus sont ceux responsables du principe odoriférant des végétaux comme le limonène pour le citron, le menthol ou le camphre. Les caroténoïdes sont dans la catégorie des tétraterpènes, car généralement issus de la condensation de 8 unités C5. Les caroténoïdes sont des composés à structure hydrocarbonée généralement composés de 40 atomes de carbone (structure en C40), mais il existe aussi des structures en C30 ou C50. Les caroténoïdes hydrocarbonés appartiennent à la sous famille des carotènes. Ils peuvent être modifiés par un groupement fonctionnel oxygéné, on parlera alors de xanthophylles [3]. Il existe une variété importante de caroténoïdes, spécialement parmi ceux synthétisés par les bactéries. On compte plus de 700 structures différentes [115]. Plusieurs éléments interviennent dans cette diversité :

- Tout d'abord le nombre de carbone constituant le squelette de la molécule peut varier de 30 à 50 avec une majorité pour les structures en C40.
- Ensuite ces pigments peuvent être à structure linéaire ou cyclique. Les cycles, au nombre de un ou deux, se situent aux extrémités de la molécule.
- Le type de cycle rencontré sur ces structures est lui aussi variable, il peut s'agir de cycle  $\beta$ ,  $\epsilon$  ou aromatique.

- Enfin le dernier élément permettant cette diversité de structure est la présence ou non d'atome d'oxygène dans la molécule. Ces atomes d'oxygène peuvent être présent sous forme de fonction hydroxyle, cétone, époxy ou méthoxy. Ils sont généralement insérés aux extrémités de la molécule qu'elle soit à structure cyclique ou non. Les groupements hydroxyles des cycles  $\beta$  peuvent ensuite être glycosylés, phénomène observé avec la zéaxanthine chez *Erwinia herbicola* [101].

La couleur est l'élément caractéristique de ces molécules, elle peut varier du jaune au rouge. Ces molécules doivent leur couleur à leur système de doubles liaisons conjuguées créant un chromophore et permettant ainsi l'absorption de la lumière visible entre 400 nm et 500 nm. Le degré de conjugaison du chromophore détermine les caractéristiques d'absorption du caroténoïde [20]. Il faut un minimum de 7 doubles liaisons conjuguées à un composé pour absorber la lumière visible (cas du  $\zeta$ -carotène). Au delà de 7, plus le nombre de double liaison conjugué est important plus le  $\lambda_{\max}$  (longueur d'onde d'absorbance maximale) du caroténoïde est grand et plus sa couleur tend vers le rouge foncé.

## 1.2- Fonctions Biologiques

Chez les organismes photosynthétiques, les caroténoïdes interviennent au niveau de l'antenne photo-collectrice qui permet le transfert de l'énergie lumineuse à la chlorophylle. La photosynthèse est alors efficace sur un plus large éventail de longueurs d'onde. Pour expliquer leur biosynthèse par des organismes non photosynthétiques, on suggère un rôle de régulation de la fluidité membranaire. Mais l'intérêt de ces pigments tient également à leurs propriétés anti-oxydantes [8]. Leur structure permet de piéger les espèces réactives de l'oxygène protégeant ainsi la cellule. Cet effet antioxydant présente un avantage pour toutes les espèces aérobies qu'elles soient ou non photosynthétiques.

Certains caroténoïdes sont des éléments nutritifs importants pour l'homme et les animaux puisqu'ils servent de précurseurs à la vitamine A, le rétinol. En effet, la première étape dans la formation du rétinol est le clivage de la double liaison centrale du  $\beta$ -carotène, ce qui permet l'obtention de deux molécules de rétinol qui, après réduction, donneront la vitamine A [2 , 9]. En outre, les caroténoïdes seraient également impliqués dans la prévention de certaines maladies. Leur effet bénéfique a été montré dans les maladies de

l'œil dont la DMLA (Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age), les maladies cardiovasculaires, certains cancers et l'érythème induit par la lumière. L'action des caroténoïdes dans la prévention de ces maladies serait liée à leur pouvoir anti-oxydant. Enfin les caroténoïdes auraient un rôle dans la régulation du système immunitaire et dans la protection de la stabilité génomique [32].

### 1.3- Organismes producteurs

Les caroténoïdes sont synthétisés par les organismes photosynthétiques, depuis la bactérie à photosynthèse anoxygénique à la cyanobactérie (pour les procaryotes), les algues et les plantes supérieures (pour les eucaryotes). De même de nombreux organismes non photosynthétiques, certaines bactéries et champignons synthétisent ces composés [37]. Chez les plantes, les caroténoïdes sont clairement observables par la couleur qu'ils donnent aux fruits (tomate), fleurs et racines (carotte). Ils sont également présents dans les tissus verts mais leur couleur est masquée par celle de la chlorophylle, il faut attendre la dégradation de celle-ci, à l'automne, pour observer ces pigments.

Les animaux sont incapables de synthétiser des caroténoïdes. Leur présence chez certains organismes comme les crustacés, insectes, poissons, et les oiseaux résulte d'une absorption alimentaire [5, 81].

Les caroténoïdes aromatiques sont peu représentés dans cette grande classe de pigments. Ils ont d'abord été découverts dans l'éponge marine *Reniera japonica*, qui contient entre autre l'isoréniératène [132]. Ensuite des caroténoïdes aromatiques ont été identifiés chez plusieurs espèces bactériennes. Parmi les bactéries non photosynthétiques, on retrouve uniquement des actinomycètes avec, entre autres, *Brevibacterium linens* [56], *Mycobacterium aurum*, *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium tuberculosis* [129], *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces odorifer*, *Streptomyces mediolani*, *Streptomyces lividans* [59]. Ces actinomycètes pour lesquels seulement trois genres bactériens sont représentés, synthétisent tous de l'isoréniératène. Chez les bactéries photosynthétiques, la synthèse d'isoréniératène est limitée aux bactéries brunes (Chlorobiaceae) comme *Chlorobium phoebacteroides* ou *Chlorobium phoevibrioïdes*. D'autre type de caroténoïdes aromatiques, l'okénone et le chlorobactène sont synthétisés par des bactéries pourpres (Chromatiacea) ou vertes (Chlorobiaceae) [68].

## 2- Biosynthèse des caroténoïdes

La biosynthèse des caroténoïdes dérive de la biosynthèse générale des isoprénoïdes, l'embranchement de ces deux voies se fait au niveau du phytoène.

Quelque soit l'organisme considéré, les premières étapes de la biosynthèse des caroténoïdes sont communes. Les enzymes intervenant dans cette voie de biosynthèse sont codées par des gènes notés *crt* suivie d'une lettre. Ces gènes sont regroupés en cluster dit cluster *crt*.

### 2.1- La synthèse d'IsoPentenyl Pyrophosphate : IPP

Les isoprénoïdes sont des métabolites présents dans tous les organismes vivants, leur précurseur biologique universel est l'isopentenyl pyrophosphate. Jusqu'au début des années 1990, on considérait la voie de l'acide mévalonique comme la seule voie de biosynthèse permettant la formation d'IPP [21]. Mais une seconde voie, celle du deoxyxylulose phosphate, totalement différente de la première fut découverte chez les eubactéries et les organismes eucaryotes photosynthétiques [95].

#### 2.1.1- La voie de l'acide mévalonique

La synthèse d'IPP par la voie de l'acide mévalonique est surtout utilisée par les champignons. Des expériences de marquage radioactif, ont montré que les champignons et les levures utilisaient uniquement la voie du mévalonate pour la production d'IPP [29]. Les différentes étapes de cette voie de biosynthèse sont présentées dans la figure 1. Le mévalonate est formé par trois acetyl-CoA *via* l'hydroxyméthylglutaryl-CoA. Les étapes successives impliquent deux réactions de phosphorylation menant à l'acide mévalonique pyrophosphate. Le mévalonate pyrophosphate subit ensuite une décarboxylation à l'origine de la formation d'isopentenyl pyrophosphate.

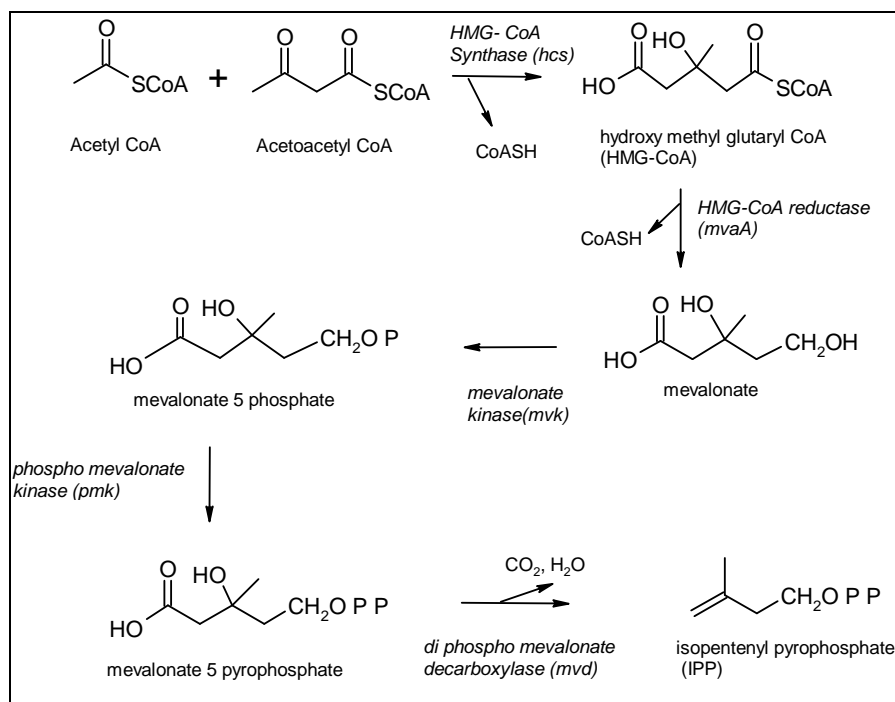


Figure 1 : Synthèse d'IPP par la voie de l'acide mévalonique.

### 2.1.2- La voie du deoxyxylulose phosphate (voie mévalonate-indépendente)

Cette voie découverte dans les années 1990, est présentée comme une alternative à la voie du mévalonate [97]. Dans cette voie, le précurseur de l'IPP n'est plus le mévalonate mais le glycéraldéhyde phosphate et le pyruvate. L'utilisation de glucose marqué (Glucose <sup>13</sup>C) a permis d'identifier cette voie chez les eubactéries [96], l'algue verte *Scenedesmus obliquus* [107] et les plantes supérieures [70].

La première réaction de cette voie de biosynthèse (Fig. 2) conduit à la formation de 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate par la condensation du pyruvate avec le glycéraldéhyde-3-phosphate sous l'action de la deoxyxylulose phosphate synthase thiamine dépendante. Le produit de cette première réaction est ensuite transformé en 2C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate par la deoxyxylulose phosphate réducto-isomérase. La réaction suivante permet la formation de 4-diphosphocytidyl-2-C-méthylérythritol par une réaction CTP-dépendante (référence 4 citée [99]). Ce composé subit ensuite une phosphorylation en position 2, puis la libération du CMP. Le 2-C-méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate est

alors formé. Les réactions ultérieures menant à la synthèse d'IPP sont restées inconnues plusieurs années.

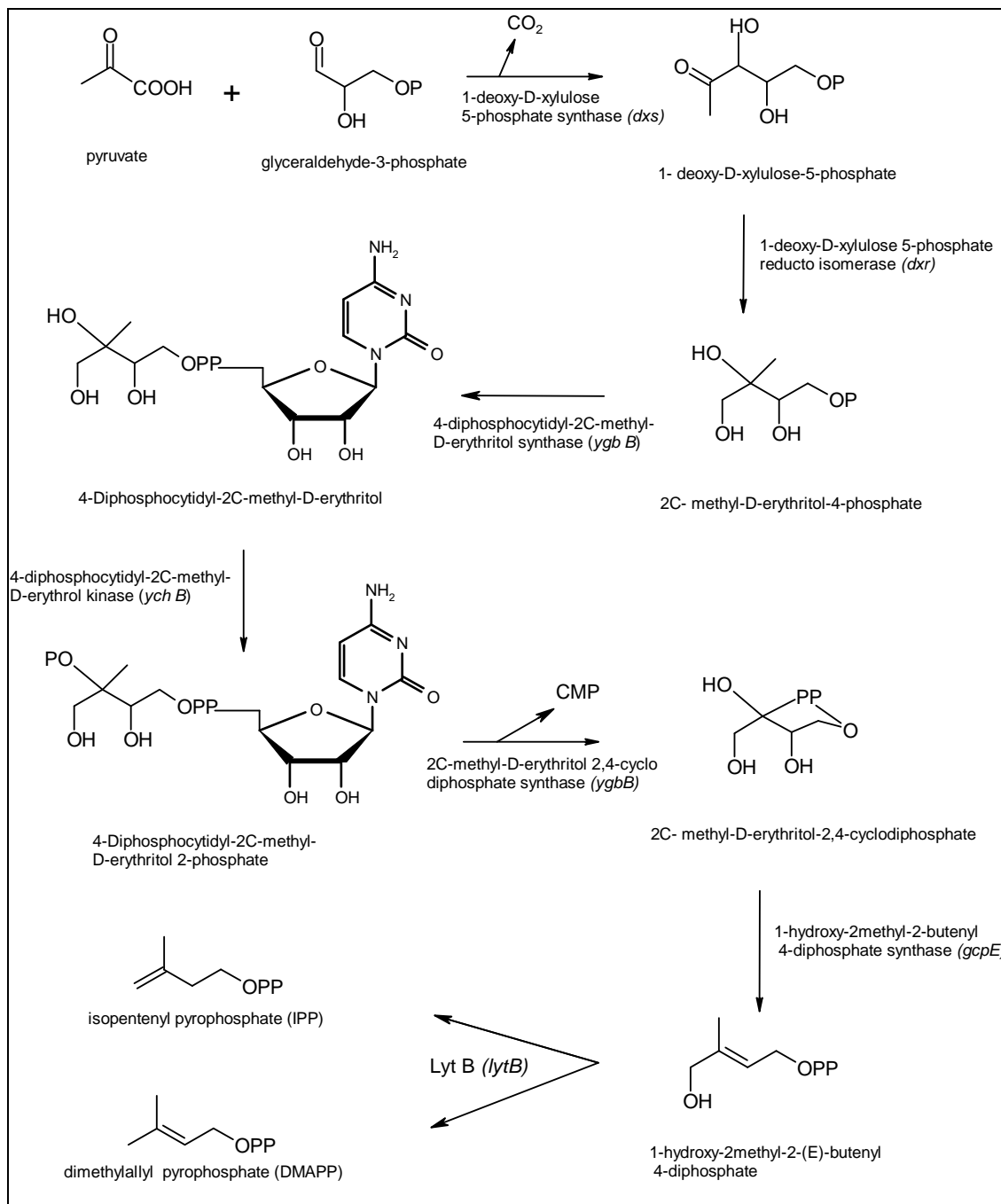


Figure 2 : Synthèse d'IPP par la voie du deoxyxylulose phosphate.

Il faut attendre les années 2001 et 2002 pour connaître les dernières étapes de cette voie de biosynthèse. Les travaux de Hecht *et al.* [47] sur des souches recombinantes d'*Escherichia coli* surexprimant le gène *gcpE*, montrent l'implication de ce dernier dans la

transformation du diphosphate cyclique en 1-hydroxy-2-méthyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate. Enfin les travaux de Rohdich *et al.* [94] révèlent le rôle de la protéine LytB dans la conversion du 1-hydroxy-2-méthyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate en IPP et en DMAPP et ainsi élucident la toute dernière réaction de la voie du déoxyxylulose phosphate. Il existe également une enzyme, l'isopentenyl-diphosphate-isomérase (*idi*), capable de convertir l'IPP en diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP) et inversement.

Si la voie du mévalonate est considérée comme ubiquitaire, il faut aussi admettre que la voie alternative du déoxyxylulose phosphate est largement représentée dans la nature [30]. Ces voies ne sont pas exclusives car certains organismes ont la possibilité d'utiliser la voie du mévalonate ainsi que celle du deoxyxylulose phosphate (Tableau 1).

Ainsi, chez les plantes supérieures, il apparaît l'existence des 2 voies pour la synthèse d'IPP. L'IPP utilisé pour la synthèse des stérols cytoplasmiques provient de la voie du mévalonate, alors que l'IPP nécessaire à la synthèse des isoprénoïdes liés au chloroplaste (caroténoïdes, chaînes prenyl des chlorophylles et plastoquinone-9) est issu de la voie du deoxyxylulose phosphate [70]. La présence des deux voies est également reportée pour la synthèse d'IPP chez *Streptomyces sp.* [60].

Organismes	Mévalonate		Déoxyxylulose
Bactérie	✓	Ou	✓
Archaeobactérie	✓		
Champignon	✓		
Algue	✓	Et / ou	✓
Plantes supérieures : Compartiment plastidique			✓
Compartiment cytosolique	✓		
Protozoaire	✓		✓
Animaux	✓		

**Tableau 1** : Distribution des voies mévalonate et deoxyxylulose phosphate pour la biosynthèse d'isoprénoïdes. Tableau présenté dans l'article de Eisenreich *et al.* [30].

Pour résumer, les archaebactéries, certaines eubactéries, les levures, les champignons, certains protozoaires et animaux utilisent la voie du mévalonate. Cependant beaucoup de bactéries et les algues vertes produisent l'IPP uniquement par la voie du deoxyxylulose phosphate. L'utilisation des deux voies a été établie chez les

Streptomycètes, certaines algues, des diatomées marines et les plantes supérieures. Enfin certains microorganismes parasites semblent incapables de synthétiser les précurseurs des isoprénoïdes. Ces derniers doivent donc être capables d'utiliser les terpénoïdes provenant de leur hôte.

## 2.2- De l'IPP au phytoène

La voie de biosynthèse générale des isoprénoïdes est présentée dans la figure 3.

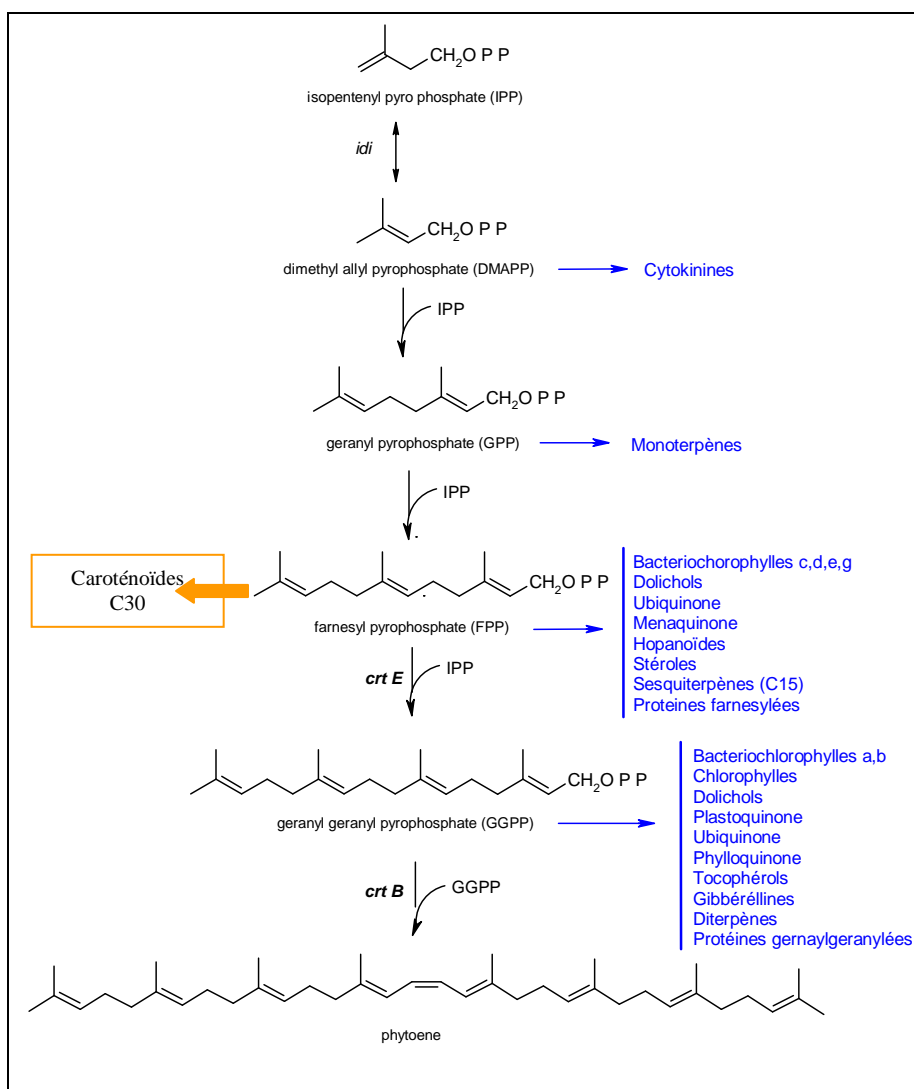


Figure 3 : Voie de biosynthèse générale des isoprénoïdes [3].

Tous les isoprénoïdes dérivent de la condensation de plusieurs unités IPP.



Ils sont formés après isomérisation de l'IPP en DMAPP par des condensations successives entre les carbones 1' et 4 avec des molécules d'IPP. La liaison carbone est formée entre le carbone 4 de l'IPP et le carbone 1 du co-substrat allylique. Pour toutes ces réactions prényl transférase on observe un mécanisme identique de « head-to-tail joining » [99]. Le premier intermédiaire issu de cette condensation est le géranyl pyrophosphate (GPP). Ce composé est à l'embranchement de la synthèse des monoterpènes. La condensation d'une nouvelle molécule d'IPP avec le GPP donne lieu à la formation de farnesyl pyrophosphate (FPP). Ce composé est le précurseur d'une multitude d'isoprénoïdes différents (bactériochlorophylles, ubiquinones, hopanoïdes, stérols etc...) et également des caroténoïdes en C30, les apocaroténoïdes. La synthèse de ces caroténoïdes à 30 atomes de carbone commence par la condensation de 2 FPP en diapophytoène sous l'action de la diapophytoène synthase Crt M. Le diapophytoène (C30) subit ensuite 4 désaturations successives sous l'action de la diapophytoène désaturase Crt N [123]. Cette voie de biosynthèse a été observée chez *Staphylococcus aureus*, bactérie productrice de 4,4'-diaponeurosporène [131].

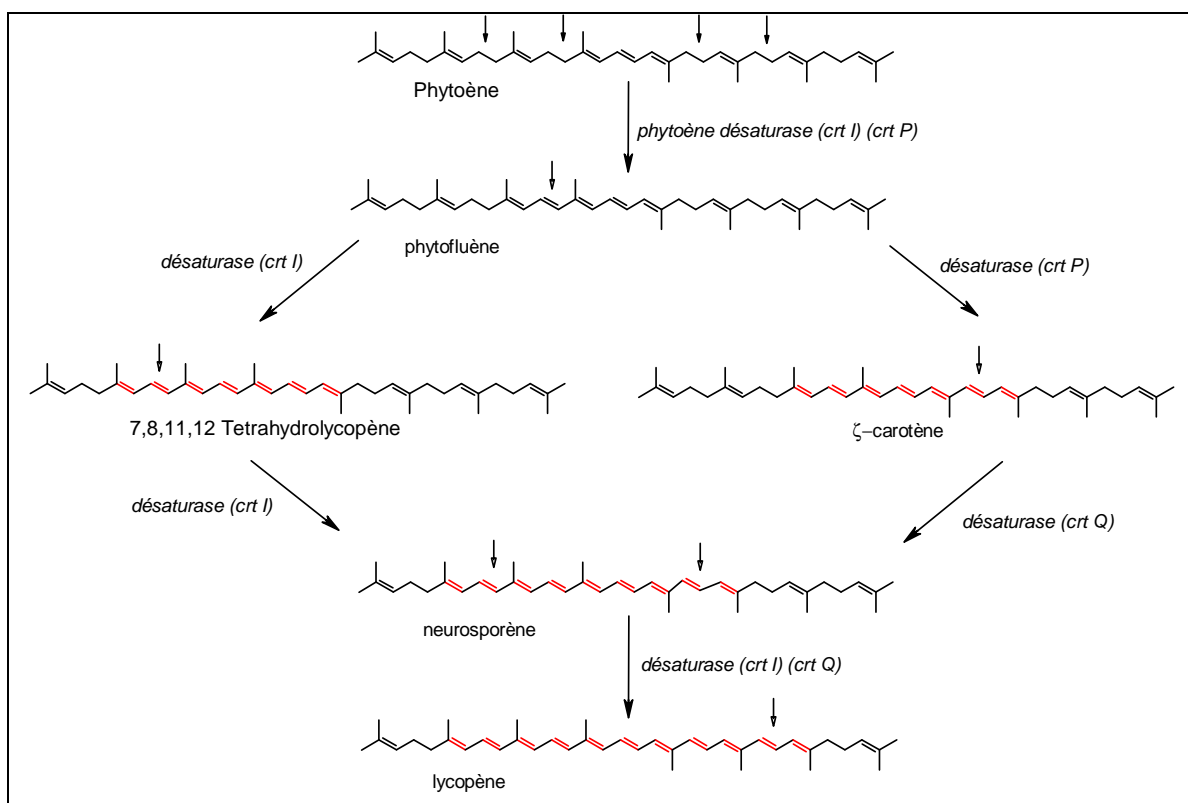
La réaction suivante dans la voie générale de biosynthèse des isoprénoïdes est la synthèse de géranylgéranyl pyrophosphate (GGPP). Celle-ci peut être réalisée à partir de deux substrats différents selon l'organisme considéré. Chez les plantes supérieures c'est le DMAPP qui est condensé avec plusieurs IPP [99] tandis que chez beaucoup de bactéries le GGPP est issu de la condensation d'un IPP avec le FPP sous l'action de la GGPP synthase (codée par le gène *crt E*). Le géranylgéranyl pyrophosphate est le dernier composé commun à la voie de biosynthèse générale des isoprénoïdes et des caroténoïdes.

La réaction suivante est la première réaction spécifique à la branche caroténogène du métabolisme des isoprénoïdes. Elle est commune à tous les organismes C40 caroténogène [3]. Cette réaction correspond à la condensation de deux molécules de GGPP sous l'action de la phytoène synthase (codée par le gène *crt B* pour les bactéries ou le gène *psy* pour les eucaryotes). Le produit de cette réaction est le phytoène, premier composé C40 considéré comme un caroténoïde malgré son absence de couleur. Le gène *crt B* d'*Erwinia uredovora* a été surexprimé chez *E. coli*. Le produit du gène, la phytoène synthase a ensuite été purifiée et étudiée *in vitro*. De ces expériences il apparaît que le phytoène synthétisé *in vitro* est présent sous la forme de deux isomères : le 15-*cis* phytoène et le tout *trans*

phytoène. De plus sa synthèse requiert des cofacteurs essentiels comme l'ATP associé avec soit le  $Mn^{2+}$  soit le  $Mg^{2+}$  [80].

### 2.3- Désaturations successives du phytoène

Le phytoène est le premier composé en C40 précurseur des caroténoïdes. Son appartenance à la famille des caroténoïdes repose uniquement sur un critère de biosynthèse. En effet comme la majorité des membres de cette famille, il est issu de la condensation de 8 unités IPP. Mais ce composé n'est pas un vrai caroténoïde dans la mesure où il n'absorbe pas la lumière visible. Bien qu'il possède 9 doubles liaisons, seules trois sont conjuguées ce qui est insuffisant pour créer un chromophore. Le phytoène est incolore, il absorbe dans l'U.V. à 285 nm [20]. Afin d'obtenir un système de double liaisons conjuguées permettant l'absorption dans le visible, le phytoène va subir plusieurs désaturations successives (Fig.4).



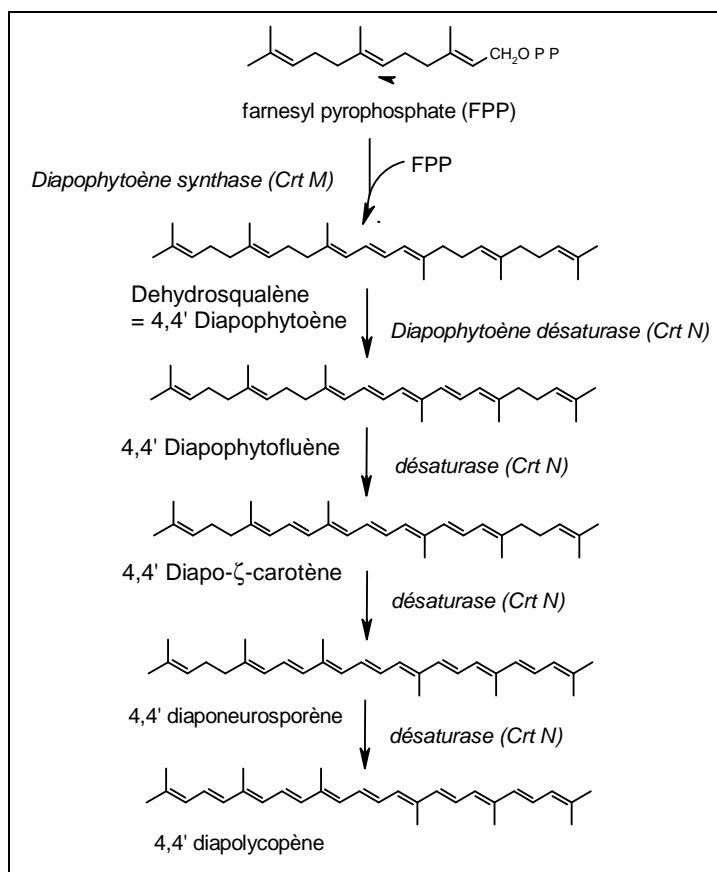
**Figure 4** : Désaturations du phytoène. Les caroténoïdes en aval du phytofluène sont colorés.

Sur cette étape de désaturation du phytoène, on peut diviser les organismes qui synthétisent des caroténoïdes en deux groupes :

- les organismes à photosynthèse oxygénique : les cyanobactéries, les algues et les plantes supérieures. Pour ces organismes la phytoène désaturase, codée par le gène *crt P* ou *pds* réalise deux désaturations menant au  $\zeta$ -carotène. Ces réactions sont stimulées par le NAD, NADP et l'oxygène [103] et inhibées par plusieurs types d'herbicides comme le Norflurazon [61] ou l'Isoxaflutole [85]. Après la formation du  $\zeta$ -carotène, une deuxième désaturase intervient pour permettre la formation du lycopène. Cette  $\zeta$ -carotène désaturase réalise deux deshydrogénations successives introduisant deux doubles liaisons : une en position 7,8 du  $\zeta$ -carotène et l'autre en position 7',8' du neurosporène. A partir des cyanobactéries *Anabaena* et *Synechocystis*, deux gènes différents codant la  $\zeta$ -carotène désaturase ont été clonés. La désaturase d'*Anabaena* codée par le gène *crt Qa* (aussi appelé *zds*) est apparentée aux désaturases de type bactérien codées par les gènes *crt I*. Tandis que celle de *Synechocystis* codée par le gène *crt Qb* (ou *crt Q2*) est assez similaire à celle codée par le gène *crt P* ainsi que celle des plantes codée par le gène *zds* [99].
  
- les bactéries à photosynthèse anoxygénique, les bactéries non photosynthétiques et les champignons. Chez ces derniers, la phytoène désaturase codée par le gène *crt I* est capable d'effectuer quatre désaturations successives. La désaturase Crt I utilise le FAD comme co-facteur [33] et est inhibée par la diphenylamine. Le lycopène, le produit final de ces déhydrogénations comporte ainsi 11 doubles liaisons conjuguées. On compte quelques exceptions à ces 4 désaturations. En effet chez *Rhodobacter capsulatus* et *Rhodobacter sphaeroides*, la désaturase Crt I effectue seulement 3 déhydrogénations. Le neurosporène est alors, chez ces deux espèces de *Rhodobacter*, le substrat des réactions plus tardives dans caroténogénèse (réactions d'oxygénation détaillées page 20) [4]. Une autre exception est rencontrée avec le champignon *Neurospora crassa*, dont la désaturase Al-1 réalise 5 désaturations successives. Cette enzyme peut ainsi désaturer le lycopène pour générer le 3,4- dihydrolycopène, caroténoïde intermédiaire dans la synthèse du torulène [45].

Il apparaît ainsi d'importantes différences entre les désaturases des organismes à photosynthèse oxygénique (Crt P) et les désaturases des autres organismes (Crt I). Ces différences portent sur le nombre d'étapes de désaturations effectués, le type de co facteur utilisé, la sensibilité à différents inhibiteurs et la spécificité de substrat (plus importante avec Crt P que Crt I) [112].

Une dernière désaturase reste à présenter ; il s'agit de la diapophytoène désaturase qui est l'équivalent phytoène désaturase pour les caroténoïdes en C30. La diapophytoène désaturase retrouvée chez *S. aureus* permet la synthèse de 4,4'-diaponeurosporène en insérant 3 doubles liaisons à partir du diapophytoène (Fig. 5) [131].



**Figure 5** : Désaturations dans la voie de biosynthèse d'apocaroténoïdes (C30).

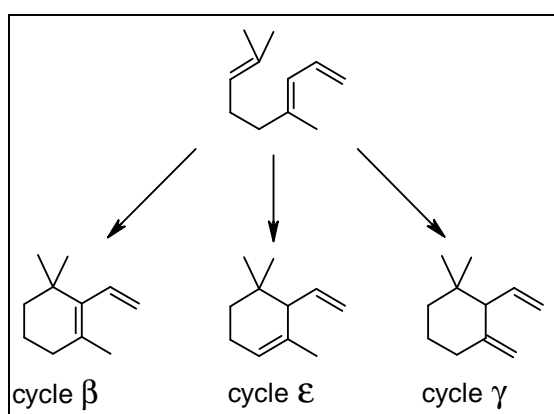
Cette désaturase codée par le gène *crt N* utilise le FAD comme cofacteur et est inhibée par la diphenylamine. Ces caractéristiques sont proches des phytoènes désaturases bactériennes (CrtI). De plus, des expériences de complémentation ont montré que cette diapophytoène désaturase est également capable de désaturer le phytoène. Par ailleurs la

phytoène désaturase de *R. capsulatus* semble capable de réaliser de déhydrogénation du diapophytoène. Il apparaît ainsi une grande similarité entre les phytoènes désaturases bactériennes (Crt I ; pour les caroténoïdes en C40) et la diapophytoène désaturase de *S. aureus* ( Crt N ; pour les caroténoïdes en C30) [92]

C'est à partir des produits de la désaturation du phytoène : neurosporène et lycopène que la voie de biosynthèse des caroténoïdes se divise en plusieurs branches qui donnent lieu à cette grande variété de caroténoïdes. Les étapes suivantes seront nommées étapes tardives de la caroténogénèse et sont à l'origine de la diversité des caroténoïdes.

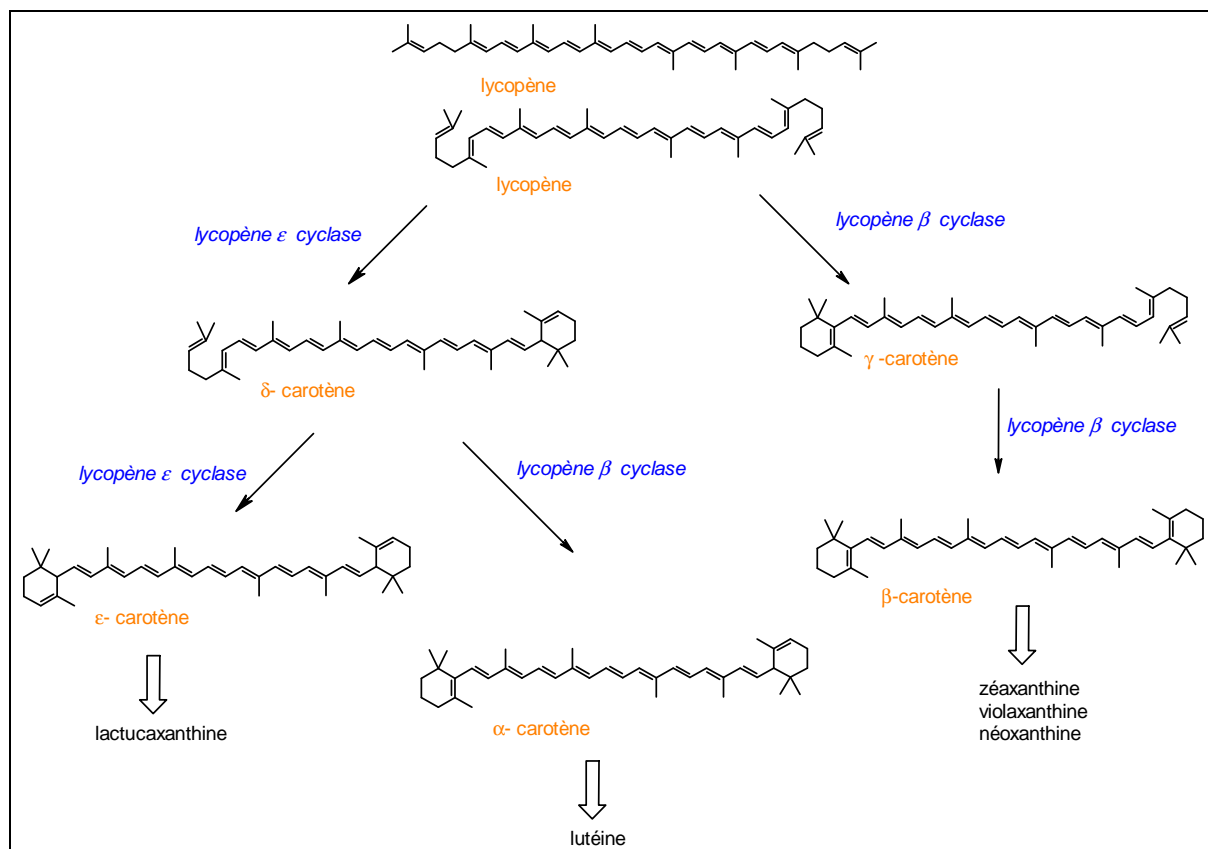
## 2.4- Cyclisation du lycopène

Tous les caroténoïdes ne sont pas cycliques, la cyclisation du lycopène n'est donc pas une réaction universelle dans la caroténogénèse mais est commune à tous les organismes produisant des caroténoïdes cycliques. Elle consiste à introduire un cycle à chaque extrémité de la molécule de lycopène. Le cycle introduit peut être de type  $\beta$ ,  $\epsilon$  ou  $\gamma$  ; selon la position de la double liaison dans le cycle (Fig. 6). Les cycles les plus communs sont les cycles de type  $\beta$ . Les cycles  $\epsilon$  sont uniquement retrouvés chez les plantes et certaines algues [27]. Cependant une étude récente a rapporté la présence de cycle  $\epsilon$  chez des caroténoïdes de la cyanobactérie *Prochlorococcus marinus* [114].



**Figure 6** : Différents cycles obtenus après cyclisations des extrémités du lycopène.

Les enzymes qui permettent ces réactions sont appelées des cyclases. Il en existe plusieurs catégories selon le type de cycle formé. Les lycopène  $\beta$ -cyclases sont à l'origine des cycles  $\beta$  tandis que les lycopène  $\epsilon$ -cyclases sont à l'origine des cycles  $\epsilon$  (Fig. 7).



**Figure 7** : Biosynthèse des caroténoïdes cycliques.

Ces deux types d'enzymes permettent d'insérer successivement un cycle à chaque extrémité de la molécule de lycopène. Plusieurs combinaisons sont alors possibles (Fig. 7):

- L'insertion d'un premier cycle  $\beta$  sous l'action de la lycopène  $\beta$ -cyclase permet la formation de  $\gamma$ -carotène. La lycopène  $\beta$ -cyclase peut ensuite utiliser ce carotène comme substrat et former ainsi un caroténoïde à deux cycle  $\beta$  : le  $\beta$ -carotène. L'action successive de lycopène  $\beta$ -cyclase à l'origine de la formation du  $\beta$ -carotène correspond au cas le plus classique.
- Le  $\delta$ -carotène synthétisé sous l'action de la lycopène  $\epsilon$ -cyclase peut ensuite être le substrat d'une lycopène  $\beta$ -cyclase et ainsi former un caroténoïde possédant un cycle de

chaque type : l' $\alpha$ -carotène. Ce carotène est le précurseur d'un xanthophylle très connu, la lutéine.

- L'action successive de la lycopène  $\varepsilon$ -cyclase permet d'obtenir un carotène possédant 2 cycles  $\varepsilon$ . Ces caroténoïdes sont peu représentés dans la nature. On les retrouve uniquement à l'état de trace chez les plantes et les algues. La laitue *Lactuca sativa* est une des rares espèces à produire un caroténoïde possédant deux cycles  $\varepsilon$  : lactucaxanthine en des quantités non négligeables [24].

### 2.4.1- Lycopène $\beta$ -cyclase

Il existe plusieurs types de lycopène  $\beta$ -cyclase [58]. Chez les bactéries, cette enzyme est monomérique et codée par le gène *crt Y*. Le deuxième type de lycopène  $\beta$ -cyclase retrouvé chez les plantes et les cyanobactéries est codé par le gène *crt L*.

Les deux types d'enzymes Crt Y ou Crt L sont capables d'introduire deux cycles  $\beta$  pour former le  $\beta$ -carotène ou bien un seul cycle  $\beta$  pour former l' $\alpha$ -carotène (si elles utilisent le  $\delta$ -carotène comme substrat). La structure primaire de ces deux cyclases est très différente. Cependant des petites séquences conservées ont pu être repérées : une séquence pour la liaison des cofacteurs, et deux séquences consensus. Elles partagent également un profil hydrophatique révélant des zones transmembranaires. On estime alors que ces similarités sont le résultat d'une évolution convergente de différentes enzymes essentielle à leur fonction [129].

La lycopène  $\beta$ -cyclase Crt Y d' *Erwinia uredovora* a été surexprimée chez *E. coli* puis purifiée. L'activité lycopène cyclase de cette enzyme est ainsi caractérisée comme une réaction en deux étapes. Dans cette réaction, les deux extrémités de la molécule de lycopène sont cyclisés en cycles  $\beta$ -ionone et le caroténoïde monocyclique :  $\gamma$ -carotène est un intermédiaire. De plus, le neurosporène et le 1-hydroxy-lycopène peuvent également être cyclisés par Crt Y en  $\beta$ -zéacarotène et hydroxy- $\gamma$ -carotène. Cependant Crt Y ne peut convertir ni le 1,1'-dihydroxylycopène, ni le prolycopène ni même le  $\zeta$ -carotène. Les cofacteurs impliqués dans cette réaction sont le NADH soit le NADPH [104]. La lycopène cyclase peut être inhibée par différents composés comme : le diméthylamino-benzenediazonium fluoroborate (DDF), le diméthylphenylaziridinium (DPA), le méthylphenoxytriéthylamine (MPTA) ou la nicotine [12].

Les cyclases Crt Y et Crt L semblent montrer les mêmes spécificités de substrats. La lycopène  $\beta$ -cyclase Crt L issue de la cyanobactérie *Synechococcus sp.* inhibée par le MPTA est capable de convertir le lycopène et le neurosporène en  $\beta$ -carotène et  $\beta$ -zéacarotène mais ne peut cycliser le  $\zeta$ -carotène. Il semble alors que la désaturation 7-8 ou 7'-8' soit nécessaire à la cyclisation [26].

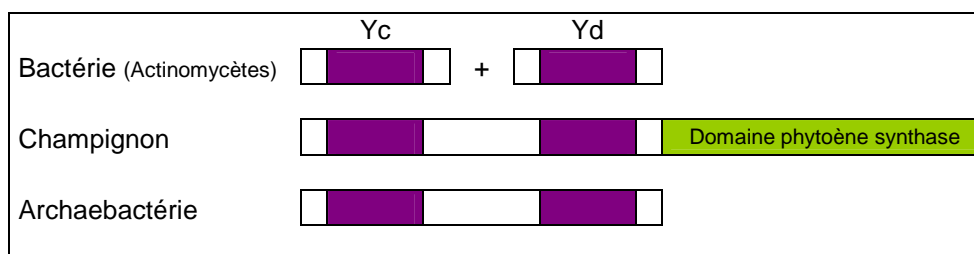
Outre ces deux principaux types de lycopène  $\beta$ -cyclase (Crt Y et Crt L) on peut trouver quelques cas particuliers. Chez les bactéries à Gram positifs *Brevibacterium linens* [57] et *Mycobacterium aurum* [129], la lycopène  $\beta$ -cyclase est un hétérodimère codé par les gènes *crt Yc* et *crt Yd*. Cette cyclase permet l'introduction de deux cycles  $\beta$  à l'extrémité de la molécule de lycopène et permet ainsi la formation de  $\beta$ -carotène. Les gènes *crt Yc* et *crt Yd* sont contigus et seraient issus de la duplication d'un gène. Ce nouveau type de cyclase serait également à l'origine d'un autre type de cyclase rencontré chez les champignons.

Chez les champignons, on ne retrouve pas de gène correspondant aux gènes *crt Y* ou *crt L*. La cyclisation du lycopène est réalisée par une enzyme bifonctionnelle : phytoène synthase et lycopène cyclase. Ce type d'enzyme a pu être identifié chez le basidiomycète *Xanthophyllomyces dendrorhous* (codée par le gène *crt YB*) [126]; les zygomycètes *Mucor circinelloides* (codée par le gène *car RP*) [125] et *Phycomyces blakesleeanus* (codée par le gène *car RA*) [6]; l'ascomycète *Neurospora crassa* (codée par le gène *al-2*) [7]. Les produits des gènes *crt YB*, *car RP*, *car RA* et *al-2* possèdent tous, deux domaines bien définis. Le premier, localisé dans la partie carboxy-terminale, est responsable de l'activité phytoène synthase et serait proche des phytoène et squalène synthases des autres organismes caroténogènes. Le deuxième domaine, localisé dans la partie amino-terminale est responsable de l'activité lycopène cyclase. Ce domaine ne présente pas d'homologie avec les lycopènes cyclases Crt Y et Crt L mais serait proche de la lycopène cyclase hétérodimérique de *B. linens*. Le domaine lycopène cyclase dériverait de la duplication d'un gène issu d'un ancêtre commun aux champignons et à *B. linens* [6].

Les lycopènes  $\beta$ -cyclases d'archaebactéries *Halobacterium salinarium* [87] et *Sulfolobus solfataricus* [48] sont capables de convertir le lycopène en  $\beta$ -carotène.



L'analyse de leur séquence a montré une forte homologie avec la lycopène cyclase hétérodimérique et la lycopène cyclase retrouvée chez les champignons. Les homologies de structures primaires de ces cyclases sont schématisées par la figure 8.



**Figure 8** : Schéma des structures primaires des lycopènes cyclases bactériennes hétérodimériques, des champignons et des archaebactéries [48].

L'accumulation de ces cas particuliers, initialement perçus comme des exceptions, a conduit à considérer l'existence d'un nouveau type de lycopène  $\beta$ -cyclase. Après les cyclases Crt Y et Crt L, l'ensemble des trois cyclases présentées dans la figure 8 constitue alors un troisième type de cyclase.

#### 2.4.2- Lycopène $\epsilon$ -cyclase

Les caroténoïdes sont souvent étroitement liés à la photosynthèse. Par conséquent les mêmes caroténoïdes sont retrouvés au niveau des membranes photosynthétiques des plantes supérieures. On trouve typiquement les caroténoïdes suivant :  $\beta$ -carotène, violaxanthine, néoxanthine, zéaxanthine (caroténoïdes à deux cycles  $\beta$ ) et la lutéine (caroténoïde à un cycle  $\beta$  et un cycle  $\epsilon$ ). Les cycles  $\epsilon$  sont uniquement retrouvés chez les plantes et quelques algues [27]. Les enzymes responsables de la formation de ces cycles sont alors identifiées chez ces organismes.

Le premier gène codant une lycopène  $\epsilon$ -cyclase a été identifié chez *Arabidopsis* [25], plante possédant également un gène codant une lycopène  $\beta$ -cyclase. Les séquences primaires des deux enzymes présentent 36% d'identité et 56% de similarité. De plus la lycopène  $\epsilon$ -cyclase s'avère similaire en séquence aux lycopène  $\beta$ -cyclases des autres organismes photosynthétiques. Une étude comparative des deux enzymes a montré qu'elles utilisaient le même substrat : le lycopène. La lycopène  $\beta$ -cyclase comme déjà vu précédemment peut insérer deux cycles  $\beta$  pour former le  $\beta$ -carotène tandis que la lycopène

$\epsilon$ -cyclase ne peut insérer qu'un seul cycle  $\epsilon$  pour former de  $\delta$ -carotène (caroténoïde monocyclique). L'action combinée des deux enzymes entraîne la formation d' $\alpha$ -carotène (caroténoïde avec un cycle  $\beta$  et un cycle  $\epsilon$ ). Malgré une forte similarité avec la lycopène  $\beta$ -cyclase, la lycopène  $\epsilon$ -cyclase est incapable d'insérer deux cycles  $\epsilon$ .

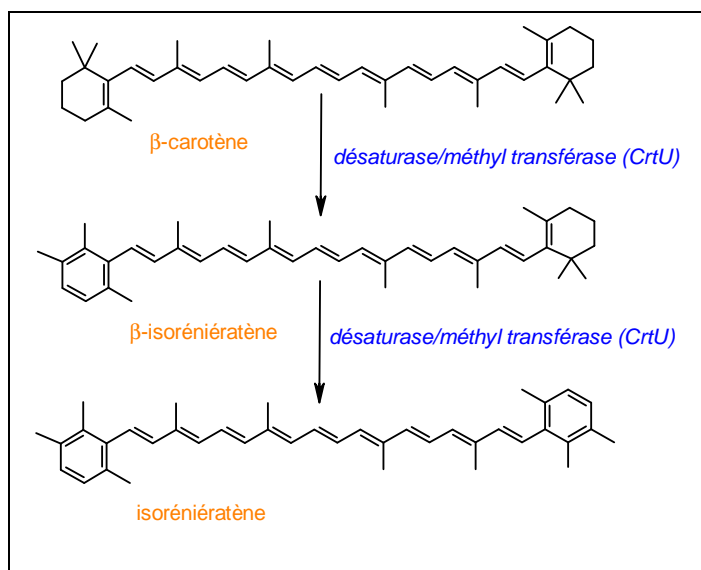
Une autre lycopène  $\epsilon$ -cyclase issue de la laitue *Lactuca sativa* a fait l'objet d'une étude en 2000 [24]. La séquence en acide aminé de cette enzyme est identique à 77% à celle d'*Arabidopsis*. Cependant la cyclase de la laitue est capable d'introduire deux cycles  $\epsilon$ . Elle transforme ainsi le lycopène en  $\epsilon$ -carotène (précurseur de la lactucaxanthine). Des expériences de mutagenèse ont montré qu'un seul résidu est responsable de la détermination du nombre de cycles  $\epsilon$  inséré.

Enfin, un autre type de lycopène  $\epsilon$ -cyclase a été identifié chez la cyanobactérie *Prochlorococcus marinus* MED4. Cette cyclase est bifonctionnelle : elle peut catalyser la formation de cycle  $\beta$  comme celle de cycle  $\epsilon$ . Elle permet ainsi l'accumulation simultanée chez *E. coli* de  $\alpha$ -  $\beta$ -  $\delta$ - et  $\epsilon$ -carotène [114].

## 2.5- Désaturation des cycles

Après les différentes étapes de désaturation de la chaîne polyène des carotènes et les différents types de cyclisation des extrémités, il existe une dernière modification pouvant survenir sur ces molécules hydrocarbonées : la désaturation de cycles. Cette désaturation s'effectue sur des cycles  $\beta$ -ionone et aboutie à la formation de caroténoïdes aromatiques. Cette dernière réaction demeure peu usuelle étant donné la rareté des caroténoïdes aromatiques. La désaturase responsable de la formation des cycles aromatiques identifiée chez plusieurs actinomycètes est codée par le gène *crt U*.

Tout d'abord découverte chez *Streptomyces griseus* [59], cette désaturase permet la transformation du  $\beta$ -carotène en isoréniératène via le  $\beta$ -isoréniératène (Fig. 9).



**Figure 9** : Voie de biosynthèse menant à la formation de caroténoïde aromatique : isoréniératène.

L'enzyme codée par le gène *crt U* possède deux activités car dans cette désaturation deux types de réactions différentes sont mis en jeu. Tout d'abord une activité désaturase qui introduit deux doubles liaisons supplémentaires dans chacun des cycles et permet l'aromatisation de chaque cycle. Ensuite l'enzyme Crt U dispose d'une activité méthyl transférase afin de transférer le groupement méthyle de la position C1 à la position C2 (ou C1' à C2' pour l'autre extrémité de la molécule).

L'analyse de la séquence en acide aminé de Crt U témoigne de ces deux activités.

- D'une part, concernant l'activité désaturase, la séquence possède deux régions conservées retrouvées dans les différents types de carotène désaturase (Crt I, pds). L'une est localisée dans la partie amino-terminale et l'autre dans la partie carboxy-terminale.
- D'autre part, concernant l'activité méthyl transférase, la séquence comprend un motif typique de méthyl transférase.

Cette enzyme Crt U appartenant à un nouveau type de carotène désaturase a ensuite été identifiée chez d'autres actinomycètes, *Brevibacterium linens* [57] et *Mycobacterium aurum* [129]. Chez ces deux espèces, l'enzyme Crt U permet comme précédemment présenté, la formation d'isoréniératène à partir du β-carotène.

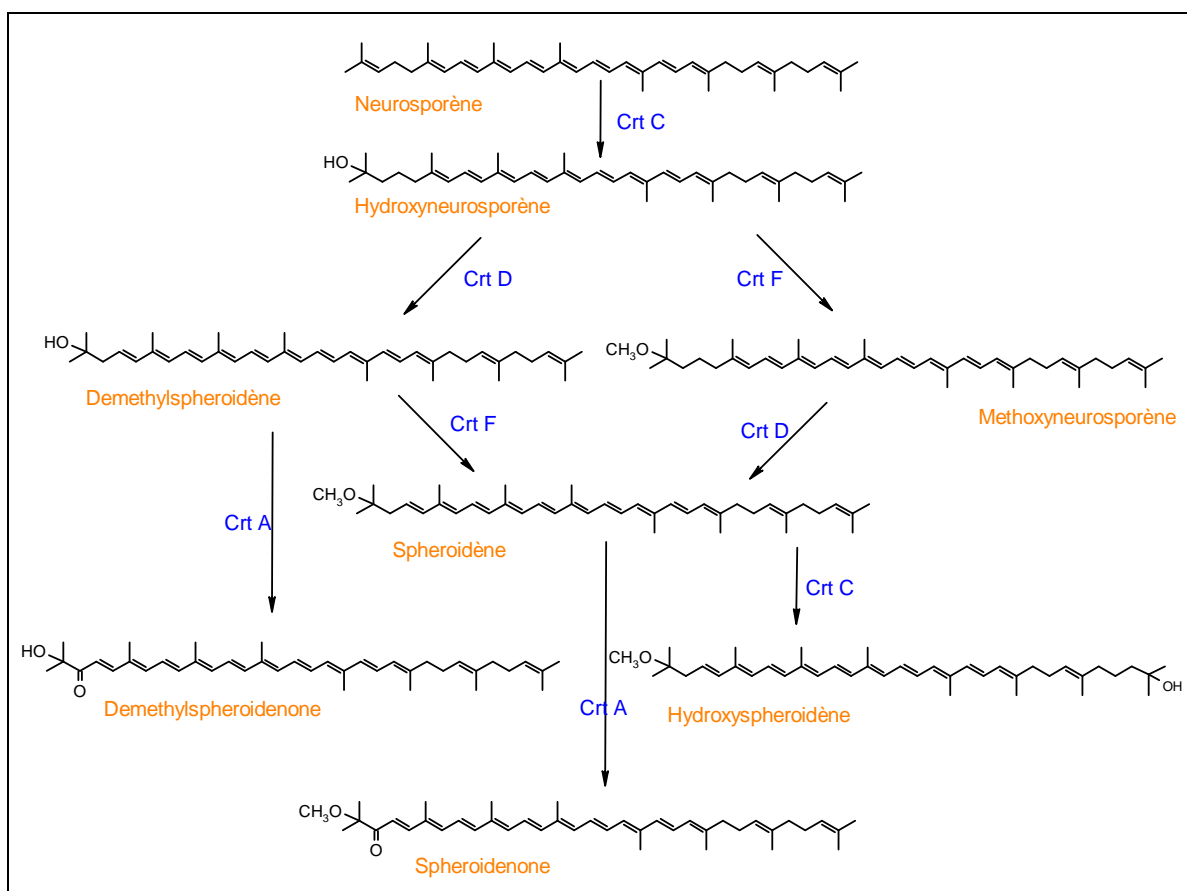
## 2.6- Formation des xanthophylles

Dans certains cas, la caroténogénèse s'arrête avec la formation de carotène. Dans d'autres, les carotènes synthétisés subissent une oxygénation aboutissant à la formation de xanthophylles. Ces carotènes qu'ils soient linéaires ou cycliques, donneront ainsi naissance à des xanthophylles linéaires ou cycliques. Les xanthophylles linéaires sont toutefois plus rares que leurs homologues cycliques. L'oxygène introduit dans ces réactions peut être sous la forme de groupement hydroxyle, méthoxyle ou carbonyle (plus rarement sous forme d'époxyde). Malgré la forte représentation des xanthophylles, les réactions impliquées dans leur formation sont beaucoup moins bien connues que les réactions primaires de la caroténogénèse.

### 2.6.1 Les xanthophylles linéaires

Les xanthophylles linéaires, sont essentiellement synthétisés par des bactéries photosynthétiques pourpres du genre *Rhodobacter*. La caroténogénèse chez deux espèces *R. sphaeroides* et *R. capsulatus* a été largement étudiée [3, 5, 112]. Elle nécessite le produit de 7 gènes rassemblés dans un cluster *crt* à opérons multiples. Ce cluster est localisé dans un large cluster contenant les gènes impliqués dans la photosynthèse. Il s'agit des gènes de biosynthèse des bactériochlorophylles et des apoprotéines de l'antenne photocollectrice et du centre réactionnel [63]. Parmi les 7 gènes utiles à la caroténogénèse, trois (*crt E*, *crt B*, *crt I*) sont impliqués dans les étapes primaires de cette voie de biosynthèse menant à la formation de neurosporène alors que les 4 autres gènes (*crt A*, *crt C*, *crt D*, *crt F*) interviennent dans les étapes tardives de la caroténogénèse [108] présentées dans la figure 10.

On peut distinguer deux types d'enzymes impliquées dans ces réactions ; celles qui introduisent un atome d'oxygène : *Crt C*, hydroxyneurosporène synthase (hydratase) et *Crt A*, spheroidène monooxygénase (monooxygénase) et celles qui n'introduisent pas d'atome d'oxygène : *Crt D*, méthoxyneurosporène désaturase et *Crt F*, hydroxyneurosporène O-méthyltransférase.



**Figure 10** : Biosynthèse de xanthophylles acycliques chez *Rhodobacter*.

*Rhodobacter* synthétise des xanthophylles acycliques à partir du neurosporène. L'ajout d'un groupement hydroxyle à l'extrémité de la molécule est effectué par le produit du gène *crt C* codant une hydroxyneurosporène synthase. Les désaturations ultérieures sont réalisées par la méthoxyneurosporène désaturase (Crt D). Le gène *crt F* code une hydroxyneurosporène O-méthyltransférase responsable de la O-méthylation des caroténoïdes aboutissant au méthoxyneurosporène et au sphéroïdène. Enfin, l'enzyme Crt A catalyse l'oxygénation du sphéroïdène en sphéroïdénone. Tous ces caroténoïdes ne sont pas synthétisés dans les mêmes conditions. Le sphéroïdène et l'hydroxysphéroïdène sont synthétisés en condition anoxygénique tandis que la présence d'oxygène moléculaire permet la synthèse de sphéroïdénone. Il a été montré que l'oxygène du groupement méthoxy du sphéroïdène provient d'une molécule d'eau. Cet oxygène est introduit par un processus d'hydratation au niveau de la double liaison C1-C2. La méthylation ultérieure permet l'apparition du groupement méthoxy du sphéroïdène. Dans le cas de la fonction

cétone du spheroidenone, il a été montré que l'oxygène provient ici de l'oxygène moléculaire [133] il s'agit alors d'une réaction de monooxygénation catalysée par la sphéroidène monooxygénase (Crt A).

La bactérie photosynthétique pourpre *Rubrivivax gelatinosus* est également capable de synthétiser des xanthophylles acycliques. L'étude de la sphéroidène monooxygénase a montré qu'elle pouvait accepter une large variété de substrat. Ainsi, l'utilisation combinée de Crt A et Crt F permet d'obtenir de nouveaux caroténoïdes [88].

### 2.6.2 Les xanthophylles cycliques

Bien que les xanthophylles cycliques et leurs glycosides soient majoritairement représentés parmi les caroténoïdes, leur biosynthèse demeure moins bien connue.

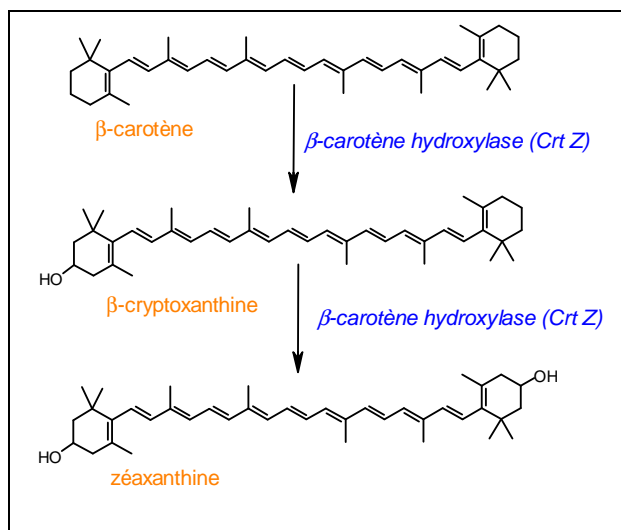
Ces xanthophylles dérivent pour la plupart du  $\beta$ -carotène, auquel plusieurs fonctions peuvent être introduites et engendrer une multitude de caroténoïdes différents. On compte à ce jour, 5 types d'enzymes impliqués dans la formation de xanthophylles cycliques (tableau 2).

Gène	Enzyme	Fonction introduite
<i>crt X</i>	zéaxanthine glucosylase	glycoside
<i>zep</i>	zéaxanthine époxydase	époxy
<i>crt Z</i>	$\beta$ -carotène hydroxylase	hydroxyle
<i>p450</i>	$\beta$ - ou $\epsilon$ -carotène hydroxylase	hydroxyle
<i>crt W, bkt</i>	$\beta$ -C-4-oxygénase	cétone

**Tableau 2** : Différentes enzymes impliquées dans la formation des xanthophylles cycliques.

#### La $\beta$ -carotène hydroxylase Crt Z dans la synthèse de zéaxanthine

La  $\beta$ -carotène hydroxylase codée par le gène *crt Z*, est l'enzyme la plus répandue dans la biosynthèse des xanthophylles cycliques. Comme son nom l'indique elle utilise le  $\beta$ -carotène comme substrat pour introduire un groupement hydroxyle en position 3 ou 3' du cycle  $\beta$ -ionone produisant ainsi la  $\beta$ -cryptoxanthine puis la zéaxanthine (Fig. 11).



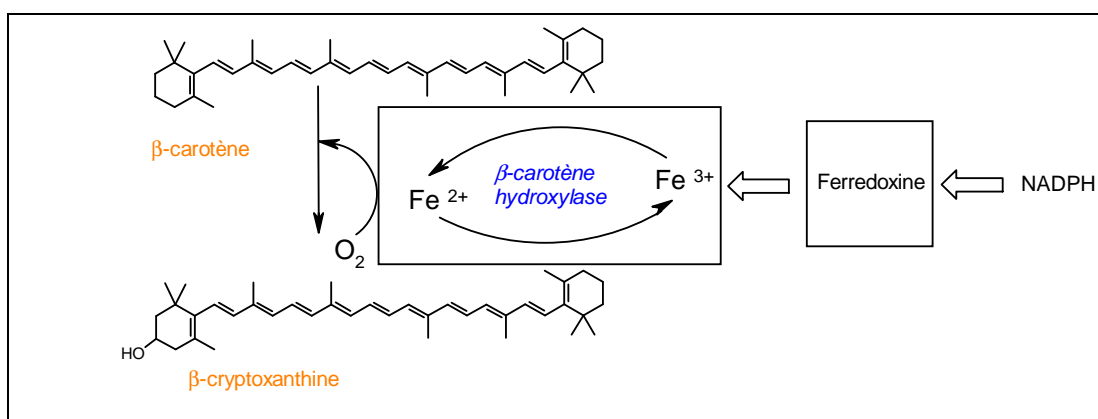
**Figure 11** : Hydroxylation du  $\beta$ -carotène par la  $\beta$ -carotène hydroxylase (Crt Z).

Les clusters de la caroténogénèse (*crt*) ont été initialement identifiés chez deux bactéries non photosynthétiques : *Erwinia uredovora* [51] et *Erwinia herbicola* [73], bactéries productrices de xanthophylles cycliques (zéaxanthine et zéaxanthine- $\beta$ -diglucoside). Les 6 gènes nécessaires à cette voie de biosynthèse sont rassemblés dans le cluster *crt*. Parmi eux, on retrouve les gènes impliqués dans les réactions primaires (*crt B*, *crt E*, *crt I*), le gène *crt Y* responsable de la cyclisation du lycopène en  $\beta$ -carotène et enfin deux gènes spécifiques à la formation des xanthophylles. Le gène *crt Z* codant une  $\beta$ -carotène hydroxylase permet la synthèse de zéaxanthine selon la voie présentée par la figure 11. Le gène *crt X* est à l'origine de la formation de zéaxanthine- $\beta$ -diglucoside par glycosylation de la zéaxanthine. L'étude *in vitro* de l'hydroxylase d' *E. herbicola* [52], a montré que cette enzyme est liée à la membrane et qu'elle possède une masse molaire de 22 kDa.

La voie de biosynthèse des caroténoïdes chez la bactérie non photosynthétique *Flavobacterium sp.* (R1534) est semblable à celle décrite chez *Erwinia*. La synthèse s'arrête à la production de zéaxanthine. L'hydroxylase Crt Z présente environ 50 % d'homologie avec celles rencontrées chez *Erwinia* [86].

La  $\beta$ -carotène hydroxylase identifiée chez la cyanobactérie *Synechocystis sp.* (PCC 6803) permet la synthèse de zéaxanthine mais serait également impliquée dans la synthèse de myxoxanthophylle [62].

L'étude *in vitro* de deux  $\beta$ -carotènes hydroxylases issues de *Capsicum annuum* (piments) réalisée par Bouvier *et al.* [14], apporte des informations essentielles sur les caractéristiques de cette enzyme Crt Z. Il apparaît qu'elle est dépendante d'une ferredoxine et est inhibée par des chélateurs de fer. Les auteurs suggèrent alors que le transfert d'électron du NADPH vers l'hydroxylase est réalisé par l'intermédiaire de la ferredoxine. De plus cette réaction implique un atome de fer pour activer le processus d'insertion de l'oxygène. La comparaison de plusieurs séquences de Crt Z (procaryote et eucaryote confondus) montre la présence de 4 motifs histidine conservés, également caractéristiques des acides gras désaturases. Les résidus histidine de ces motifs sont indispensables à l'activité enzymatique. Ils seraient des ligands du fer ou bien participeraient au processus de transfert d'électrons. Ainsi les carotènes hydroxylases appartiennent à une nouvelle classe de protéines à deux atomes de fer, proches des acides gras désaturases dans leur mécanisme d'action (Fig. 12).



**Figure 12** : Mode d'action de la  $\beta$ -carotène hydroxylase [14].

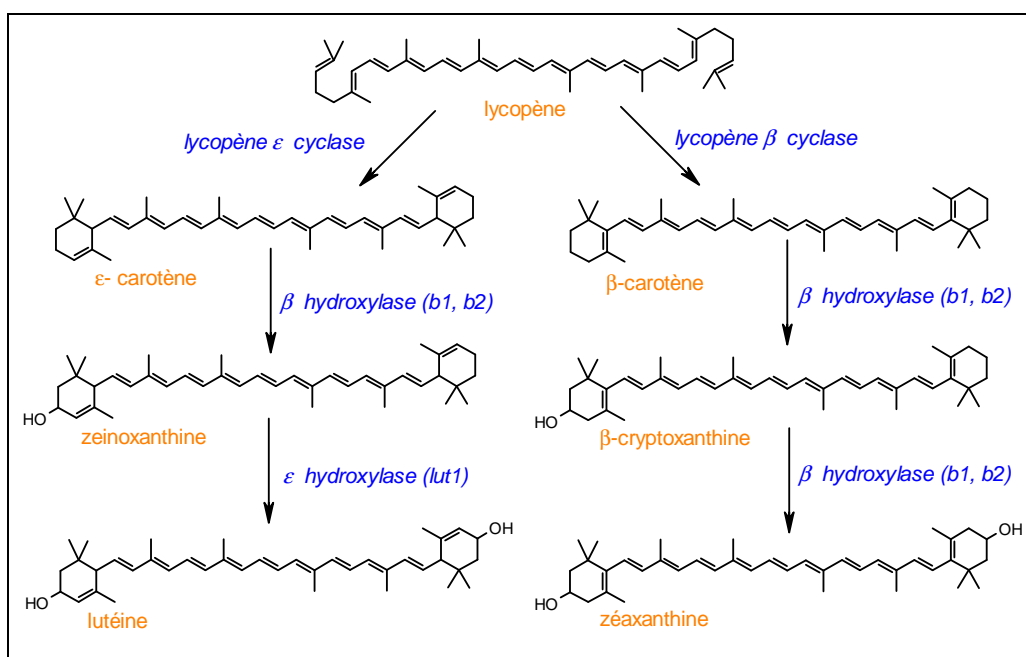
*C. annuum* possède une autre enzyme permettant l'introduction d'un atome d'oxygène sur une molécule de  $\beta$ -carotène, sous la forme d'une fonction cétone. Il s'agit d'une cétolase à l'origine de la formation de céto-caroténoïdes. Elle possède également une époxydase (ZEP) qui agit sur les cycles  $\beta$  des caroténoïdes pour former des époxy-caroténoïdes comme la violalxanthine [13].

La plante *Arabidopsis thaliana* synthétise deux types de xanthophylles dihydroxylés ; la zéaxanthine (deux cycles  $\beta$ ) et la lutéine (un cycle  $\beta$  et un cycle  $\epsilon$ ) (Fig. 13). Deux gènes codant des hydroxylases de cycles  $\beta$  ont été identifiés. Ces enzymes nommées



$\beta$ -hydroxylase 1 et  $\beta$ -hydroxylase 2 catalysent l'introduction d'un groupement hydroxyl en position C3 ou C3' d'un cycle  $\beta$ -ionone et permettent ainsi la synthèse de zéaxanthine. En revanche, ces hydroxylases ont une très faible activité envers les cycles  $\epsilon$  [119]. Ces hydroxylases sont du même type que la  $\beta$ -carotène hydroxylase Crt Z décrite chez *C. annuum*. En effet il s'agit d'une monooxygénase à deux atomes de fer non hémique.

L'hydroxylation du cycle  $\epsilon$  pour la synthèse de lutéine est réalisée par une  $\epsilon$ -hydroxylase codée par le gène *lut 1*. Cette enzyme appartient à un nouveau type d'hydroxylase, jamais rencontré dans la caroténogénèse jusqu'alors puisqu'elle fait partie de la famille des cytochromes P450 (monooxygénases à fer hémique). Ce P450, le CYP 97C1, permet l'hydroxylation du cycle  $\epsilon$  de la zeinoxanthine et ainsi la formation de lutéine [120]. Enfin Il existe une troisième activité  $\beta$ -hydroxylase chez *A. thaliana* indépendante des  $\beta$ -hydroxylases 1 et 2. Cette activité serait due à un autre cytochrome P450 CYP 97A3 identique à 49 % au CYP 97C1 [118 , 120].

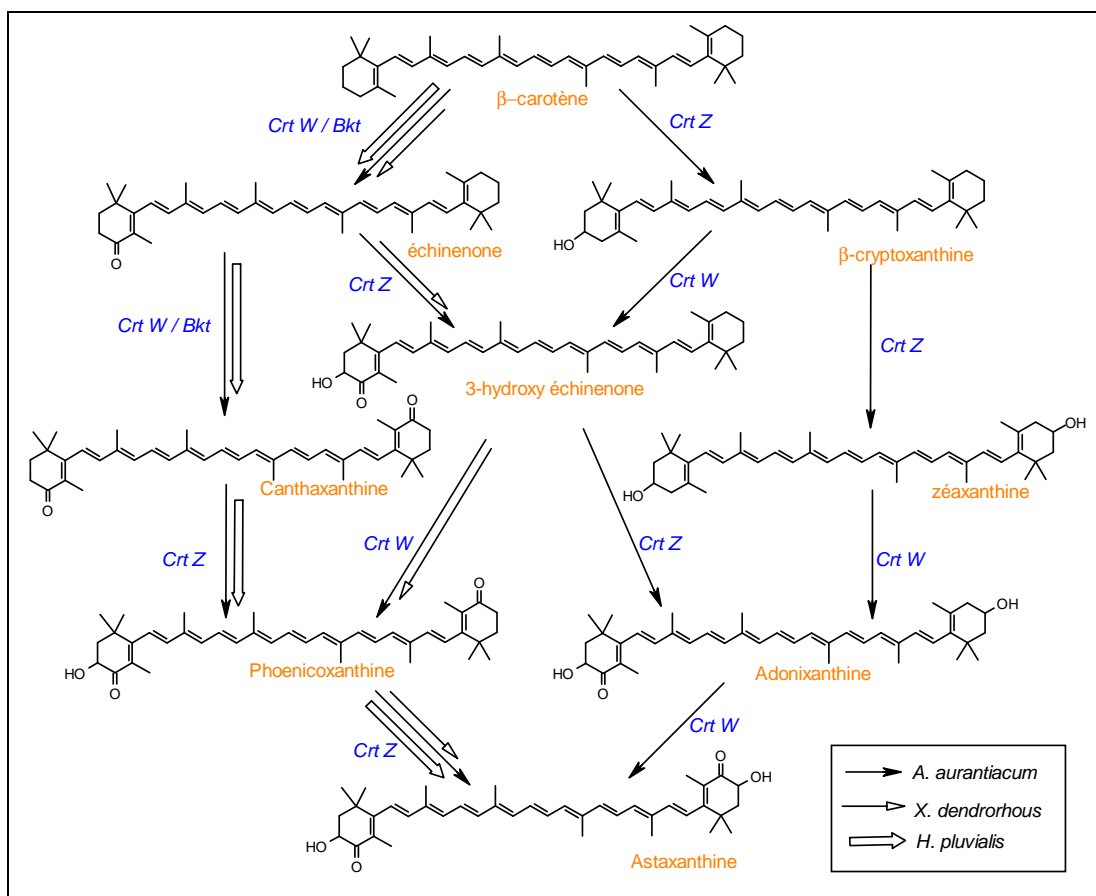


**Figure 13** : Hydroxylation des caroténoïdes chez *A. thaliana*.

L'hydroxylation des caroténoïdes chez cette plante peut ainsi être réalisée par deux types d'oxygénases différents : soit une monooxygénase à fer non hémique de type  $\beta$ -carotène hydroxylase Crt Z soit une monooxygénase à fer hémique (cytochrome P450).

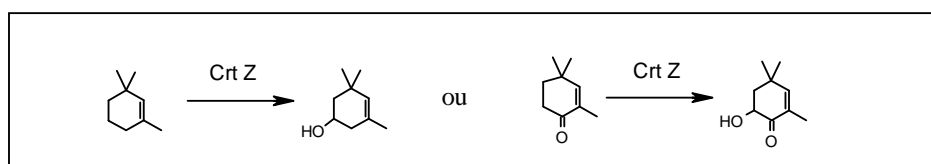
La  $\beta$ -carotène cétolase dans la formation de l'astaxanthine

Si certains organismes arrêtent leur caroténogénèse à la formation de zéaxanthine d'autres peuvent réaliser des oxygénations supplémentaires. L'astaxanthine est un cétocaroténoïde produit par beaucoup de bactéries marines et de microalgues. C'est un xanthophylle très oxygéné, il possède pour chacun de ses cycles une fonction hydroxyle en position C3 ; C3' et une fonction cétone en position C4 ; C4'. L'insertion de la fonction hydroxyle est réalisée par une  $\beta$ -carotène hydroxylase tandis que l'insertion de la fonction cétone est réalisée par une  $\beta$ -carotène cétolase. Le mécanisme d'action de cette cétolase serait le même que celui de la carotène hydroxylase décrite chez *C. annuum* [14]. Les organismes qui produisent ces caroténoïdes possèdent alors ces deux types d'oxygénases. Parmi eux on retrouve, les bactéries marines *Agrobacterium aurantiacum* [134] et *Alcaligenes* PC-1 [2], la levure *Xanthophyllomyces dendrorhous* [128] et l'algue verte *Haematococcus pluvialis* [72]. Les différentes voies de biosynthèses permettant la formation d'astaxanthine chez ces organismes sont présentées dans la figure 14 [112].



**Figure 14** : Différentes voies de biosynthèses pour la formation de xanthophylles cycliques.

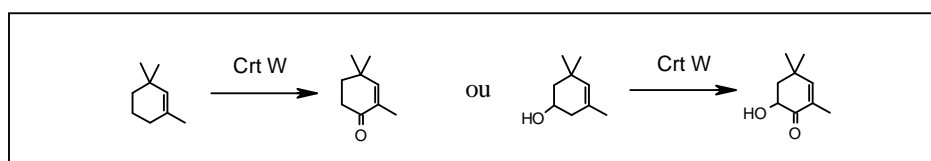
Le cluster *crt* d'*A. aurantiacum* comprend tous les gènes nécessaires à la synthèse d'astaxanthine dont les deux gènes *crt Z* et *crt W*, impliqués dans les réactions d'oxygénation des caroténoïdes [74]. La  $\beta$ -carotène hydroxylase codée par le gène *crt Z* présente environ 50% d'homologie avec celles décrites chez les deux espèces d'*Erwinia*. Comme nous avons pu le voir précédemment cette hydroxylase catalyse l'introduction d'un groupement hydroxyl en position C3 ou C3' d'un cycle  $\beta$ -ionone pour produire de la zéaxanthine (via la  $\beta$ -cryptoxanthine). Mais dans le cas de la synthèse d'astaxanthine, il apparaît que l'enzyme Crt Z est également capable d'introduire un groupement hydroxyl sur un cycle 4-céto- $\beta$ -ionone (Fig. 15).



**Figure 15** : Différents substrats de l'hydroxylase Crt Z.

On remarque que la Crt Z d'*Erwinia* présente également cette particularité bien qu'elle ne synthétise pas d'astaxanthine.

L'enzyme codée par le gène *crt W* est une  $\beta$ -carotène cétolase qui introduit une fonction cétone en position C4 ou C4' du cycle  $\beta$ -ionone pour produire la canthaxanthine via l'échinénone. Elle peut également utiliser un cycle 3 ou 3' hydroxy- $\beta$ -ionone comme substrat (Fig.16).



**Figure 16** : Différents substrats de la cétolase Crt W.

Les produits des gènes *crt Z* et *crt W* à l'origine des réactions d'oxygénation dans la voie de biosynthèse de l'astaxanthine possèdent de faibles spécificités de substrats permettant la formation d'une grande variété de caroténoïdes intermédiaires chez *A. aurantiacum* (Fig.14).

L'accumulation d'astaxanthine par l'algue verte *Haematococcus pluvialis* est induite en condition de stress. La  $\beta$ -carotène hydroxylase isolée chez l'algue verte présente 38 % d'identité avec la Crt Z de *C. annuum*, 32% avec celle d'*Erwinia* et 34% avec celle d'*A. aurantiacum*. Les 4 motifs histidines impliqués dans la liaison au fer ainsi que la séquence consensus caractéristique de la  $\beta$ -carotène hydroxylase Crt Z sont retrouvés dans la séquence de l'hydroxylase isolée chez *H. pluvialis*. Cette hydroxylase possède la même spécificité de substrat que celle décrite précédemment (Fig. 15) [71]. La  $\beta$ -carotène cétolase codée par le gène *bkt* est une  $\beta$ -C-4 oxygénase qui permet l'introduction d'une fonction cétone en position C4 ou C4' des cycles  $\beta$ -ionone, mais contrairement à celle codée par le gène *crt W* les cycles  $\beta$ -ionone hydroxylés sont de mauvais substrats pour cette cétolase [72]. Dans un premier temps, le  $\beta$ -carotène est transformé en échinonone puis en canthaxanthine sous l'action de la cétolase codée par le gène *bkt*. Ensuite la canthaxanthine subit deux hydroxylations successives sous l'action de la  $\beta$ -carotène hydroxylase Crt Z pour aboutir à l'astaxanthine (Fig. 14).

Avec la levure *X. dendrorhous*, la voie de biosynthèse d'astaxanthine génère également moins de caroténoïdes intermédiaires que dans le cas d'*A. aurantiacum* (Fig. 14). En effet, si l'hydroxylase accepte indépendamment un cycle  $\beta$ -ionone ou un cycle 4-céto- $\beta$ -ionone, on ne retrouve pas cette faible spécificité de substrat pour la cétolase. Les gènes responsables des réactions d'oxygénations ne sont à ce jour pas connus. Cependant, l'implication du gène *ast* (astaxanthine synthétase) a été récemment montrée dans la transformation du  $\beta$ -carotène en astaxanthine. Ce gène coderait une enzyme très différente des oxygénases vues jusqu'alors dans la caroténogénèse puisqu'elle serait de type cytochrome P450. Toutefois, le mode d'action de cette enzyme est encore inconnu [127 , 128].

La synthèse d'astaxanthine à partir du  $\beta$ -carotène nécessite l'action conjointe de deux types d'oxygénases : une hydroxylase (Crt Z) et une cétolase (Crt W ou Bkt). La cétolase Crt W d'*A. aurantiacum* semble la seule à pouvoir utiliser des cycles  $\beta$ -ionone hydroxylés comme substrat. Cette particularité conduit à une voie de biosynthèse complexe avec beaucoup d'intermédiaires. Dans tous les cas ces enzymes nécessitent de l'oxygène moléculaire O<sub>2</sub> ainsi que la présence de fer Fe<sup>2+</sup> [34].

Comme nous avons pu le voir avec *A. thaliana*, il existe un nouveau type d'hydroxylase impliquées dans la caroténogénèse (différent des carotènes hydroxylases Crt Z), ce sont les monooxygénases de type P450. Ce type d'enzyme n'a été identifié dans la caroténogénèse que très récemment.

Ainsi d'autres organismes semblent également utiliser des P450 pour les réactions d'oxygénations dans la caroténogénèse :

- Chez la levure *X. dendrorhous* [128] et l'algue verte *H. pluvialis* [105] l'implication possible d'une monooxygénase de type cytochrome P450 dans la caroténogénèse est mentionnée. Pour l'algue verte, il a été montré que la synthèse d'astaxanthine est inhibée par l'éllipticine. Ce résultat permet d'évoquer l'implication d'un cytochrome P450 dans cette biosynthèse. Cependant que ce soit pour la levure ou l'algue verte, aucune autre précision au sujet de l'intervention de ce type d'enzyme n'est disponible actuellement.
- La bactérie thermophile *Thermus thermophilus* possède un cluster regroupant des gènes de la caroténogénèse sur un plasmide [117]. Elle synthétise des xanthophylles cycliques. Le produit final de cette biosynthèse est la zéaxanthine et ses glycosides esterifiés [135]. Un cytochrome P450 de la bactérie thermophile *Thermus thermophilus*, CYP 175A1 a été récemment étudié par des expériences de complémentation fonctionnelle chez *E. coli* [11]. Ce P450 est capable d'ajouter deux fonctions hydroxyles sur les cycles  $\beta$ -ionone du  $\beta$ -carotène pour former de la zéaxanthine. Il semblerait que ce P450, à la différence des hydroxylases Crt Z ne puisse hydroxyler des cycles cétones.

C'est à partir des années 2000 que commence à apparaître la notion de P450 dans la caroténogénèse avec les études sur *H. pluvialis* [105] et *X. dendrorhous* [128]. Mais les preuves réelles d'implication de ces enzymes ne sont retrouvées que depuis un ou deux ans avec les études sur *A. thaliana* [120] et *T. thermophilus* [11].

### 3- Les Cytochromes P450

Les cytochromes P450 représentent une superfamille de monooxygénases, impliqués dans le métabolisme oxydatif de nombreux composés endogènes (hormones stéroïdiennes, acides gras, vitamines) et exogènes (médicaments, pesticides, polluants). Ces enzymes sont présentes dans tous les organismes vivants qu'ils soient eucaryotes ou procaryotes.

#### 3.1- Nomenclature

On compte à présent plus de 3000 séquences de cytochrome P450 référencées selon une nomenclature [79] basée uniquement sur le pourcentage d'homologie entre les séquences en acides aminés. Deux P450 appartiennent à la même famille s'ils possèdent une homologie de séquence supérieure à 40%. Si cette homologie est supérieure à 55 % les deux protéines font partie de la même sous famille. Pour désigner un P450 on utilise le terme CYP pour **CY**tochrome **P**450, en italique lorsqu'on fait référence au gène et en lettres capitales lorsqu'on fait référence à l'ADNc, l'ARNm ou la protéine. Ce terme est suivi :

- d'un nombre arabe qui désigne la famille (pour les P450 bactériens ce nombre est supérieur à 100),
- d'une lettre pour désigner la sous famille,
- et enfin d'un chiffre arabe pour identifier le gène. La lettre P après un gène est utilisée pour nommer un pseudogène.

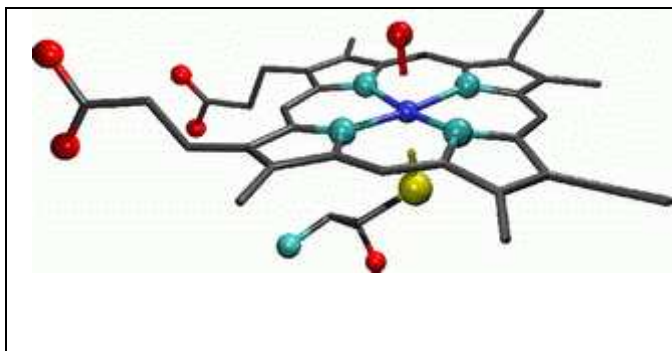
#### 3.2- Mise en évidence et Structure

Ce type d'enzyme identifié dans des microsomes de foie en 1958 [55 , 36] est considéré comme un pigment qui absorbe à 450 nm en présence de monoxyde de carbone. Ce pigment est ensuite caractérisé en 1964 par Omura et Sato [82], où ils démontrent que ce pigment est une hémoprotéine de type b.

Ainsi les cytochromes P450 sont composés d'une chaîne protéique de 400 à 500 acides aminés associé à un hème : noyau tétrapyrolique liant un atome de fer par 4 liaisons covalentes (Fe-protoporphyrine IX, Fig. 17).

**Figure 17 :**

Site actif du P450 cam. Le fer de l'hème est représenté en bleu foncé, les atomes d'oxygène en rouge, d'azote en bleu clair et de soufre en jaune. Le squelette carboné est représenté en gris [109].



La cinquième liaison de coordination du fer est établie avec le soufre d'une cystéine située dans la partie carboxy-terminale de l'apoprotéine. Enfin la sixième liaison du fer est formée avec un atome d'oxygène provenant d'une molécule d'oxygène ou d'eau. Cette liaison peut également se former avec un atome d'azote de certains inhibiteurs.

Le principe catalytique du cytochrome P450 repose sur l'état d'oxydoréduction du fer hémique. Les électrons permettant une modification de l'état d'oxydation du fer sont apportés par un système de transfert d'électrons qui varie selon les classes de P450.

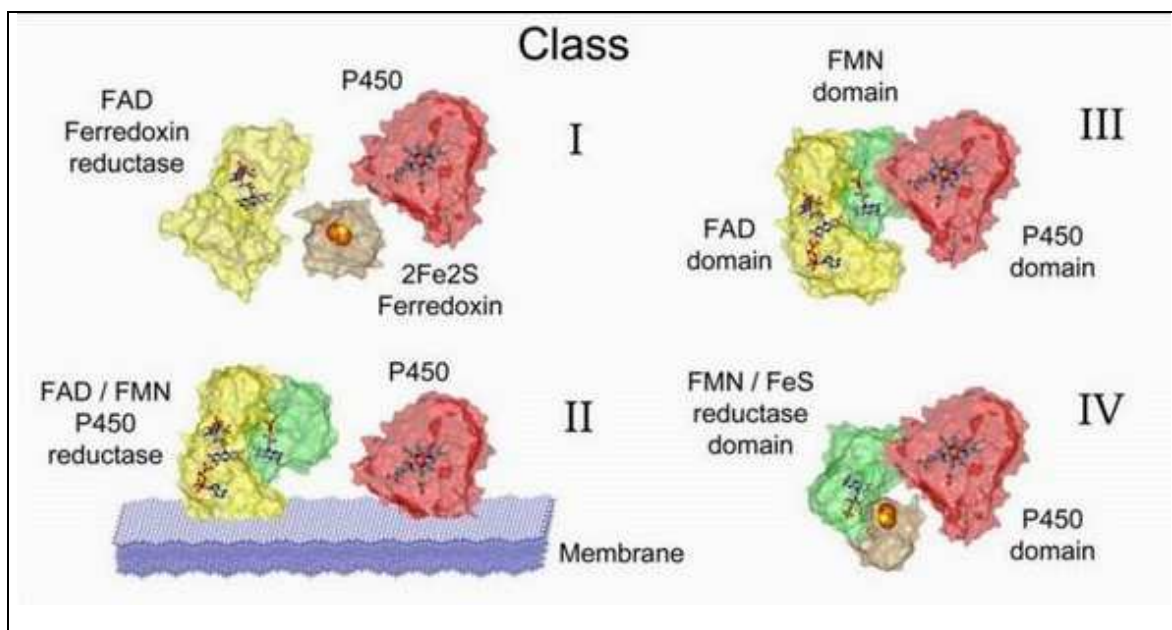
Il existe une différence essentielle entre les P450 d'origine eucaryote (microsomaux et mitochondriaux) et ceux d'origine procaryote. Les cytochromes P450 procaryotes sont solubles à la différence de leurs homologues eucaryotes qui sont membranaires. Ainsi, la séquence en acide aminé des P450 eucaryotes est plus grande (environ 500 résidus) que celle procaryotes (environ 400 résidus) car on retrouve dans la partie amino-terminale, une séquence responsable de l'ancrage de ces protéines dans les membranes.

### 3.3- Classification des systèmes P450

Les P450 forment des complexes multienzymatiques avec les réductases, l'ensemble est alors appelé « P450-containing systems ». On distingue alors 4 classes de P450 (Fig.18). Les deux principales classes sont les systèmes de classe I et II.

- Les P450 de classe I regroupent les P450 mitochondriaux et la majorité des P450 bactériens. Ils sont associés à un système de transfert d'électrons à deux composantes : une ferredoxine (FD) et une flavoprotéine (ferredoxine réductase à FAD ; FDR) dépendante du NAD(P)H.

- Les P450 de classe II sont présents dans les microsomes et sont associés à un système de transfert d'électrons à une composante. Il s'agit d'une NADPH cytochrome P450 réductase (CPR) constituée de 2 flavines (FAD et FMN). Les deux composants de ce système (P450 et réductase) sont liés à la membrane.



**Figure 18** : Représentation des différentes classes de P450.  
 (<http://www.chem.ed.ac.uk/chapman/p450.html#bm3>).

- Les P450 de classe III comme le P450 de *Bacillus megaterium* (P450 BM3) utilisent les mêmes cofacteurs que ceux de la classe II mais sont situés dans la partie carboxy-terminale de l'apoprotéine du P450. Ils forment ainsi une seule et même protéine soluble.
- Les P450 de classe IV récemment découvert chez *Rhodococcus* ressemblent à celui de *B. megaterium* dans le sens où l'ensemble P450 et cofacteurs forment là aussi une seule protéine. Cependant la nature des co-facteurs est différente. Il s'agit d'une ferredoxine et d'une réductase à FMN dépendante du NADPH. [28].

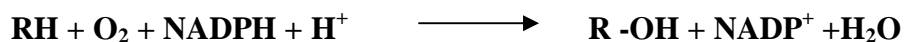


Le parcours des électrons selon les classes est le suivant :

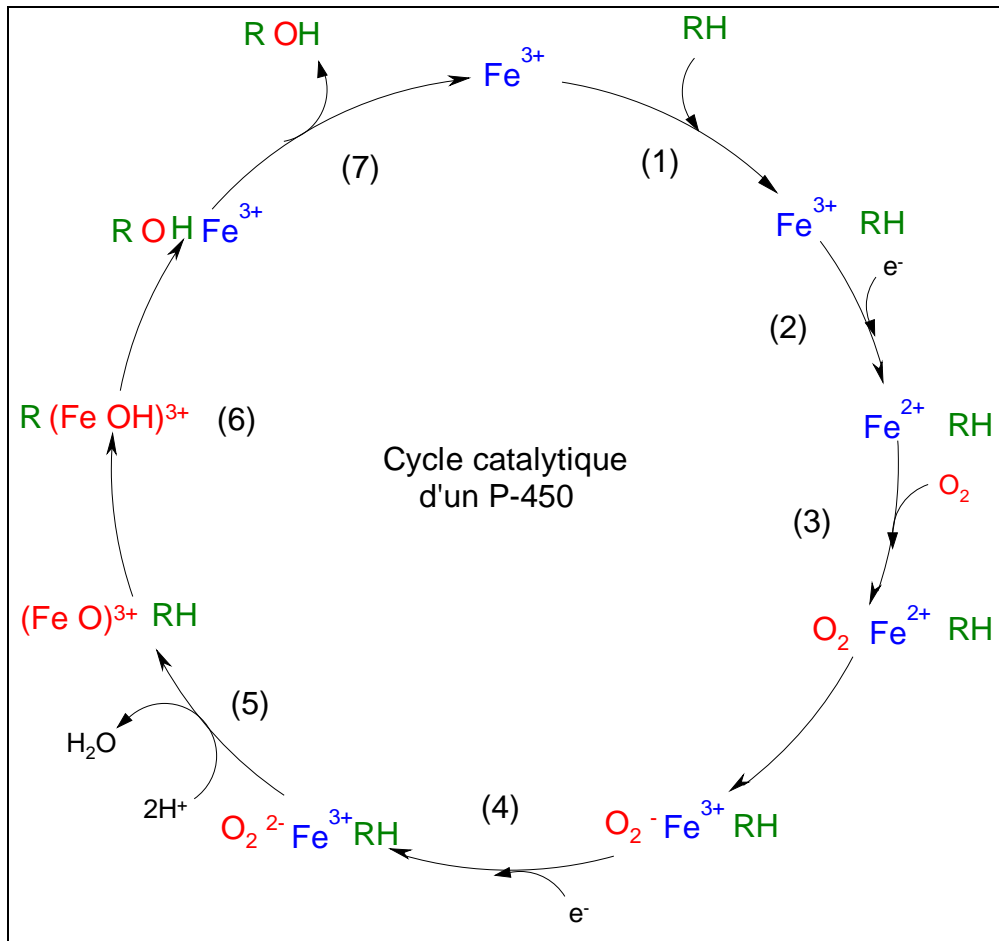


### 3.4- Cycle Catalytique

Les cytochromes P450 catalysent un grand nombre de réactions d'oxygénations différentes, comme des hydroxylations, époxydations, sulfoxydations. Ils peuvent aussi réaliser des réactions de réductions, déshalogénations, désalkylation ou désamination [41 , 130 , 83]. Cependant ils sont principalement connus pour l'insertion d'un atome d'oxygène selon la réaction suivante (réaction de monooxygénation) :



Cette réaction se produit en plusieurs étapes schématisées par la figure 19.



**Figure 19** : Cycle réactionnel d'un cytochrome P450.

La première étape correspond à la fixation du substrat au niveau du site actif de l'enzyme. Le substrat est de nature apolaire et son accès au site actif se fait par un canal hydrophobe. Cette fixation entraîne l'expulsion de la molécule d'eau située sur la 6<sup>ème</sup> liaison de coordination du fer hémique.

Au cours de l'étape suivante, le fer ferrique est réduit en fer ferreux grâce à l'arrivée d'un électron transmis par la réductase. Le soufre de la cystéine reliée au fer hémique joue un rôle essentiel dans ce transfert d'électron.

La troisième étape correspond à la fixation de l'oxygène moléculaire sur la sixième liaison du fer hémique.

Ensuite un électron supplémentaire est incorporé, la seconde réduction se produit. Le dioxygène ferreux est réduit en complexe activé capable de réagir avec le substrat.

A la cinquième étape, on assiste à une protonation à l'origine de la libération d'une molécule d'eau et du clivage de la liaison dioxygène.

Au cours de la sixième étape, le produit est formé. L'atome d'oxygène lié au fer est transféré sur le substrat. La forme hydroxylée du substrat est générée.

Enfin le produit formé est libéré et le site actif retrouve sa conformation initiale.

Ces réactions s'accompagnent de changements conformationnels importants. L'accès du substrat au niveau du site actif de l'enzyme se fait *via* un canal hydrophobe. Certains P450 présentent une flexibilité conformationnelle importante au niveau de ce canal qui permet l'accès de différents substrats au site actif de l'enzyme. Cette plasticité est à l'origine de la spécificité de substrat des P450 [46]. De plus, l'arrivée du substrat dans la poche hydrophobe entraîne une modification de la conformation de l'enzyme qui déclenche le processus catalytique [75 , 43]. En effet en libérant le fer hémique de sa molécule d'eau celui-ci devient alors disponible pour fixer l'oxygène moléculaire. Ce changement conformationnel permettrait également l'interaction avec les partenaires redox (pour les systèmes P450 à plusieurs composantes) [109 , 67].

L'élucidation des structures 3D des P450 grâce à la cristallographie a permis de faire de grandes avancées dans la compréhension du mécanisme catalytique de ces enzymes. La première structure de P450 apparaît en 1985 avec celle du P450cam (CYP 101) de la bactérie *Pseudomonas putida* qui catalyse l'hydroxylation du camphre [89]. Aujourd'hui on compte une vingtaine de P450 différents dont la structure 3D est connue.

### 3.5- Réactions catalysées et les effecteurs

#### 3.5.1 Les réactions catalysées

Les cytochromes P450 interviennent généralement dans des réactions de monooxygénations et métabolisent une grande variété de composés. Ainsi on retrouve ces enzymes dans la biosynthèse d'hormones stéroïdes, de vitamine D, de l'acide rétinoïque mais aussi dans l'oxygénation des acides gras et dans les voies de biosynthèses de métabolites secondaires. Outre leur implication dans le métabolisme de substances endogènes, ils jouent un rôle important dans les processus de détoxification de xénobiotiques (médicaments, polluant, produits toxiques). A ce titre ils sont abondamment

représentés dans les tissus hépatiques des mammifères et représentent un enjeu pharmaceutique et agronomique considérable [130].

### 3.5.2- Les effecteurs

Le cycle catalytique d'un cytochrome P450 traverse trois étapes très vulnérables aux inhibitions [84] :

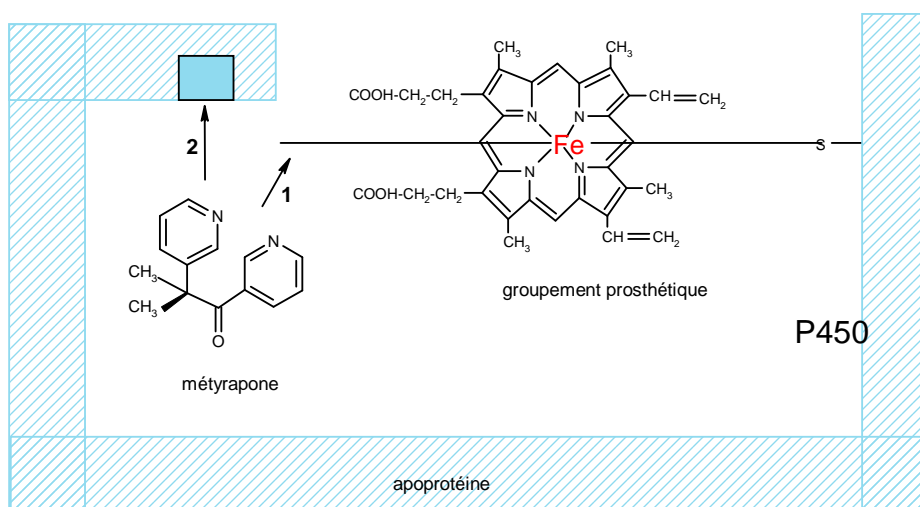
- 1- la liaison du substrat,
- 2- la liaison de l'oxygène moléculaire,
- 3- l'étape catalytique au cours de laquelle le substrat reçoit un atome d'oxygène.

Les inhibiteurs peuvent se lier de manière réversible, quasi irréversible et irréversible. Il existe ainsi un grand nombre d'inhibiteurs de P450.

Dans la suite de cette partie, nous allons nous concentrer sur les deux inhibiteurs utilisés dans ce travail : le métyrapone et le tétracyclacis généralement décrits comme des inhibiteurs réversibles de cytochromes P450.

#### Le métyrapone

Ce composé est souvent utilisé pour mettre en évidence un cytochrome P450. Le métyrapone est un inhibiteur réversible qui se lie à l'hème et à la région lipophile de la protéine (site de fixation du substrat) [98] (Fig. 20).

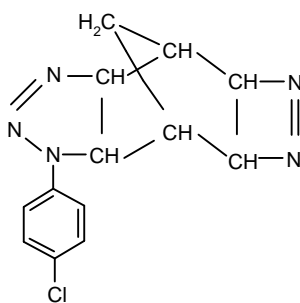


**Figure 20** : Représentation schématique du mode d'action du métyrapone.  
1- liaison au groupement prosthétique 2- liaison au site hydrophobe.

Son caractère hydrophobe lui permet de se lier au niveau du site de fixation du substrat, il s'agit d'une inhibition compétitive. Ce mécanisme a lieu à forte concentration car l'affinité est faible.

La paire d'électrons libres au niveau de l'hétérocycle azoté du métyrapone permet une liaison avec le groupement prosthétique, l'inhibition est alors non compétitive. Cette liaison intervient à faible concentration, l'affinité étant forte.

### Le tetcyclacis



**Figure 21** : Formule du tetcyclacis

Le tetcyclacis (Fig. 21) est généralement utilisé chez les plantes comme retardant de croissance. Il inhibe de manière très spécifique un P450 impliqué dans la voie de biosynthèse des gibbérellines. Il intervient dans la transformation du kaurène en acide kaurenolique [91]. Cependant, à des concentrations plus élevées, il peut être utilisé pour inhiber d'autres P450. En effet, le tetcyclacis a déjà été utilisé pour inhiber la synthèse *in vitro* de  $\beta$ - cryptoxanthine [100].

La paire d'électrons libres de l'hétérocycle azoté du tetcyclacis permet d'interagir avec le fer hémique du P450, déplaçant ainsi l'atome d'oxygène.

Il est possible que d'autres régions de la molécule soient importantes dans le mécanisme d'inhibition. Par des méthodes de modélisation moléculaire, il semblerait que le tetcyclacis ait une structure proche de celle du substrat, le kaurène. Le tetcyclacis interférerait alors avec la fixation du substrat [90]. Le mécanisme d'action du tetcyclacis serait donc proche de celui du métyrapone.

Si les P450 peuvent être inhibés par une grande variété de composés, on connaît également des substances qui permettent d'induire la synthèse de ces enzymes [66]. Ces enzymes peuvent être induites par leur propre substrat (dans le cas des P450 non

constitutifs) mais aussi par d'autres composés. On connaît notamment le phénobarbital qui permet d'induire les CYP 2B (eucaryote) mais aussi des P450 procaryotes. En effet, ce xénobiotique, comme d'autres barbiturates, est capable d'augmenter considérablement les quantités de P450 présentes chez *Bacillus megaterium* [35 , 54 , 77]. Le mécanisme d'action de cet inducteur n'est pas totalement élucidé, il agirait sur la régulation transcriptionnelle *via* de nombreux récepteurs nucléaires [116].

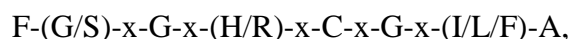
### 3.6- Modélisation en trois dimensions

L'analyse des séquences de cytochromes P450 témoigne de leur grande diversité [130]. Lors des alignements de séquences, les identités de séquence dépassent rarement les 20%. Cette caractéristique est en partie due au fait que ces enzymes métabolisent beaucoup de substrats différents et utilisent différents partenaires redox. Les régions de la protéine responsables de la reconnaissance, de l'accès et de la fixation du substrat représentent des régions variables tout comme les régions impliquées dans le transfert d'électrons. Cependant, l'analyse comparative de structures 3D a permis de dégager des caractéristiques structurales communes à tous les P450. En effet ces enzymes possèdent un « noyau » structural conservé [38 , 39].

Ce noyau structural est composé :

- d'un paquet de 4 hélices  $\alpha$  (hélices D, E, I et L),
- des hélices J et K,
- de 2 feuillets  $\beta$ .

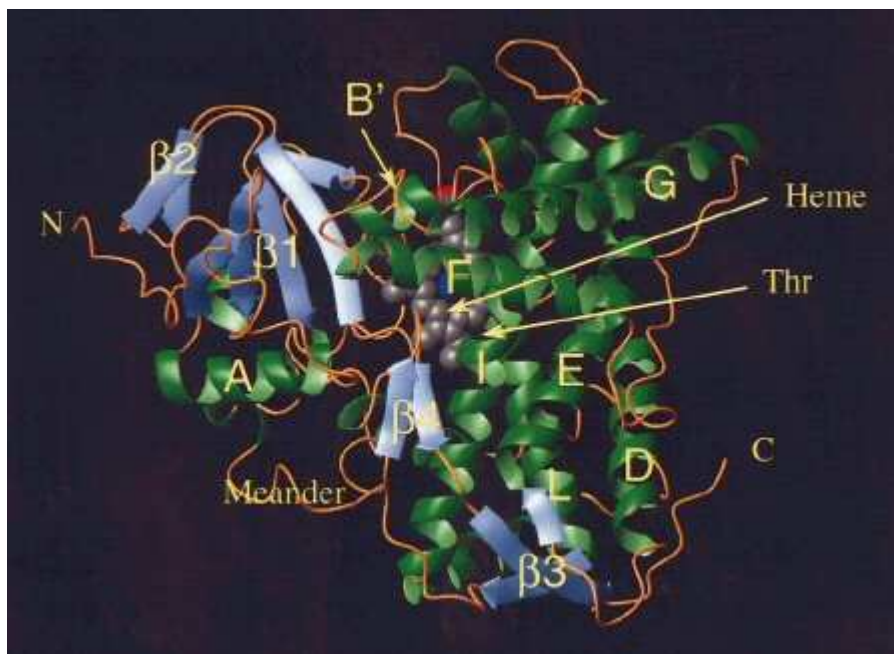
L'hélice I comporte un résidu conservé : une thréonine impliquée dans l'activation de l'oxygène. Cette thréonine est retrouvée dans le motif (A/G)-G-x-(E/D)-T. L'hélice L fait partie du site de liaison de l'hème. La séquence correspondant à cette hélice est facilement identifiable avec la présence du motif suivant :



dont la cystéine est directement liée au fer hémique. Au niveau de l'hélice K, on retrouve un motif très conservé : E-x-x-R. Les acides aminés de ce motif retrouvés coté proximal seraient impliqués dans la stabilisation de ce noyau structural. Il existe enfin un

enroulement conservé appelé : « *meander* » localisé du côté proximal. On distingue le côté proximal (coté hème – cystéine) du côté distal (coté hème – 6<sup>ème</sup> coordination du fer hémique). Schématiquement on peut considérer que le côté proximal est impliqué dans la reconnaissance du substrat tandis que le côté distal est plutôt impliqué dans la liaison avec le partenaire redox. Le flux d'électron est observé du côté proximal vers le côté distal. Le motif E-x-x-R semble impliqué dans la stabilisation du noyau structural. Cependant sa localisation côté proximal peut aussi laisser penser à une implication dans la liaison avec le partenaire redox [66].

La figure 22 présente la structure 3D d'un P450 [38], sur laquelle on peut observer des éléments du noyau structural.



**Figure 22** : Structure 3D du P450 BMP [38].

## 4- Les bactéries étudiées

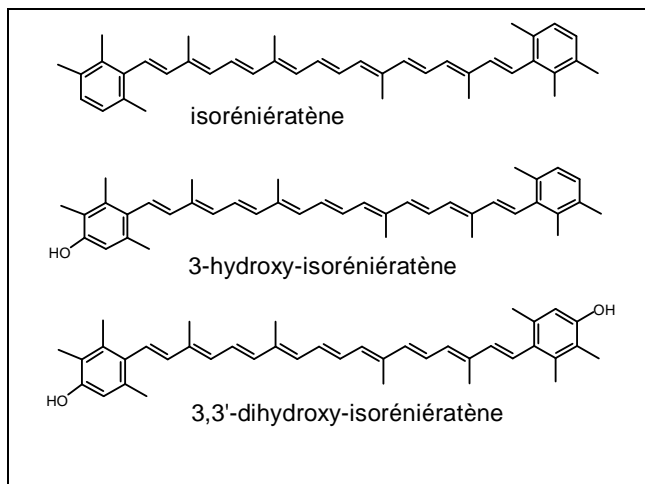
Parmi les bactéries non photosynthétiques productrices de caroténoïdes aromatiques on retrouve exclusivement des actinomycètes pour lesquels seulement trois genres différents sont représentés : *Brevibacterium*, *Streptomyces* et *Mycobacterium*. Dans cette étude nous avons donc choisi d'étudier la caroténogénèse chez une espèce de chacun de ces genres. Les bactéries retenues sont *Brevibacterium linens*, *Streptomyces mediolani* et *Mycobacterium aurum*.

### 4.1- *Brevibacterium linens*

*B. linens* est une corynébactérie (bactérie en forme de massue), Gram+, immobile, non sporulante et aérobie. Aussi connue sous le nom de « ferment rouge », cette bactérie intervient dans l'affinage des fromages à pâte molle et croûte lavée. Elle donne ainsi une couleur orange à marron-orangé à ces fromages. Plusieurs paramètres peuvent influencer la synthèse de ces caroténoïdes comme la teneur en oxygène, l'exposition à la lumière, l'âge de la culture et les conditions nutritionnelles [15, 76]. Les pigments de cette bactérie d'intérêt industriel ont fait d'un intérêt particulier.

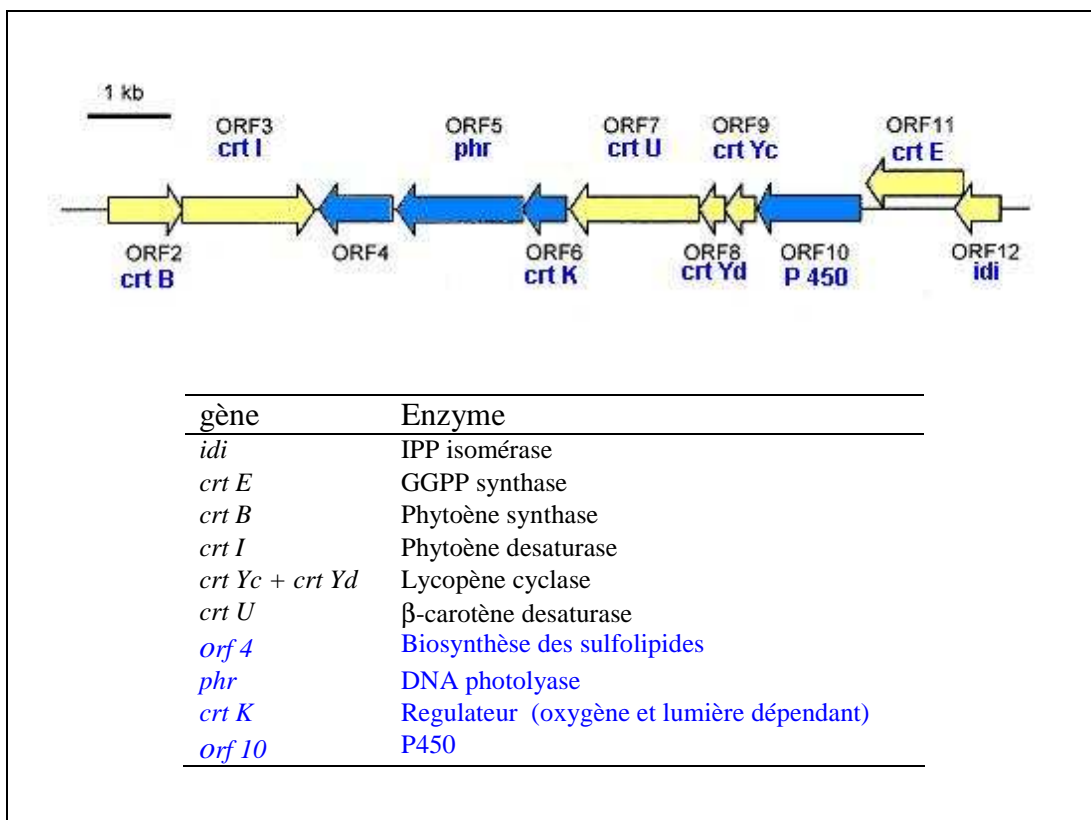
En 1961, Grecz et Dack [40] observaient la réaction spécifique des pigments de *B. linens* à l'ajout d'une base forte comme le KOH 5M ou NaOH 5M. L'ajout d'une seule goutte d'une base forte provoque un changement rapide de coloration du orange (couleur naturelle de la souche) au rouge vif et intense. Quelques années plus tard, les travaux de Jones *et al.* [53] indiquent que cette réaction est certainement due à la présence d'un pigment caroténoïde. En réalité cette réaction est une réaction spécifique de pigment de type flexirubine [31]. Il s'agit d'une réaction (dite réaction phénolate) entre la base forte et le groupement phénol de ces pigments, induisant un shift bathochromique de quelques nanomètres. Les pigments de *B. linens* ont été ensuite clairement identifiés par les travaux de Kohl *et al* [56], qui ont montré que la pigmentation orange de cette bactérie est due à trois caroténoïdes aromatiques : isoréniératène, 3-hydroxyisoréniératène et 3,3'-di-hydroxyisoréniératène (Fig. 23).





**Figure 23** : Caroténoïdes aromatiques produits par *B. linens*.

Le séquençage et l’analyse fonctionnelle du cluster *crt* de *B. linens* [57] ont mis en évidence la présence de tous les gènes nécessaires à la synthèse d’isoréniératène (Fig. 24).



**Figure 24** : Cluster *crt* de *B. linens* présenté dans la publication de Krubasik et Sandmann [57].

Parmi les 11 gènes retrouvés sur ce cluster, 7 ont été clairement identifiés et sont impliqués dans cette biosynthèse. Les gènes *idi*, *crt E*, *crt B*, *crt I* interviennent dans les étapes primaires de la caroténogénèse et donnent lieu à la synthèse de lycopène. Les gènes *crt Yc* et *crt Yd* codent un nouveau type de lycopène cyclase, lycopène cyclase hétérodimérique (déjà présentée dans le paragraphe sur les lycopène cyclases de la partie II), elle permet la cyclisation du lycopène en  $\beta$ -carotène. Le gène *crt U* intervient quant à lui dans la désaturation du  $\beta$ -carotène en isoréniératène. Les 4 autres gènes n'ont pas de fonction définie dans la caroténogénèse chez *B. linens*.

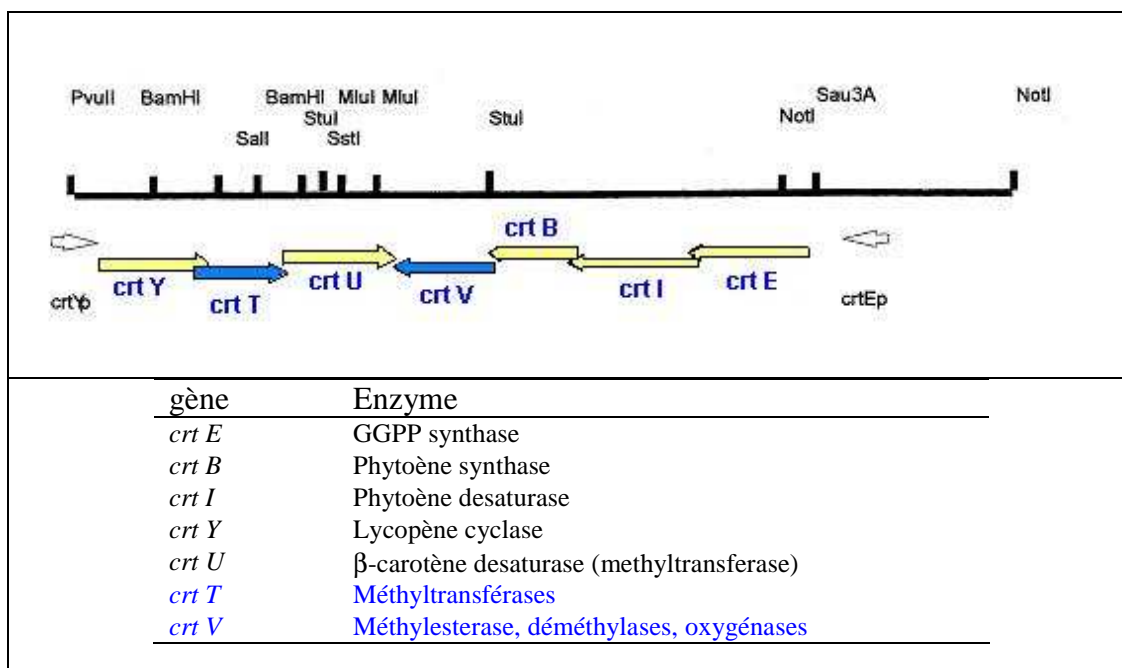
Krubasik et Sandmann émettent l'hypothèse de l'implication de l'ORF 10 dans la caroténogénèse, cependant ils n'excluent pas non plus l'intervention d'une hydroxylase hors cluster *crt*. Ainsi aucune information n'est réellement disponible sur la formation des dérivés hydroxylés de l'isoréniératène. La dernière étape de la caroténogénèse, la réaction permettant la formation des xanthophylles chez *B. linens* n'est donc pas connue à ce jour.

#### 4.2- *Streptomyces mediolani*

*S. mediolani* est une bactérie filamenteuse, à Gram positif, sporulante et aérobie. *S. mediolani*, isolée d'un échantillon de sol. Elle produit trois caroténoïdes aromatiques : isoréniératène, 3-hydroxyisoréniératène et 3,3'-di-hydroxyisoréniératène [1]. Cette souche forme un mycélium compact qui recouvre et pénètre la gélose. Le mycélium végétatif est lisse, de couleur jaune à orange alors que le mycélium aérien est velouté de couleur jaune-beige (aspect du coton). La nature du milieu influence la couleur des mycélia de même que l'aération est un facteur important pour une bonne production de caroténoïdes [10]. *S. mediolani*, ne produit pas de pigments extracellulaires, les caroténoïdes restent liés à la biomasse ; ils sont membranaires.

Le cluster *crt* de *S. mediolani* n'a pas été identifié. On dispose cependant de plusieurs études sur le cluster *crt* de *S. griseus* [59 , 106]. *S. griseus* est une bactérie qui ne produit pas de caroténoïde en condition naturelle, elle possède un cluster *crt* cryptique [106]. Le remplacement du promoteur contrôlant les gènes impliqués dans les étapes primaires de la caroténogénèse (*crt E*, *crt B*, *crt I*) permet l'expression complète de tous les gènes du cluster et ainsi mène à la synthèse d'isoréniératène. L'analyse fonctionnelle de ce cluster montre la présence des gènes *crt E*, *crt B*, *crt I*, *crt Y* et *crt U* nécessaires à cette

synthèse (Fig. 25) [59]. La délétion des deux autres gènes *crt T* et *crt V* n'affecte pas la cette voie de biosynthèse.



**Figure 25** : Cluster *crt* de *S. griseus* présenté dans la publication de Krügel *et al* [59].

*Streptomyces mediolani* est aussi connue sous le nom de *Streptomyces griseus sbp. griseus*. On peut alors considérer que *S. mediolani* puisse être un mutant caroténogène de *S. griseus* ou inversement, et ainsi supposer la présence d'un cluster *crt* similaire chez *S. mediolani*. Dans ce cas les gènes *crt T* et *crt V* n'ayant pas de fonction pour *S. griseus* pourrait peut être trouver un rôle dans la synthèse des dérivés hydroxylés de l'isoréniératène.

La voie de biosynthèse de l'isoréniératène est la même que celle présentée pour *B. linens*. Etant donné que *S. griseus* et *S. mediolani* sont des bactéries très proches, on peut supposer que cette voie de biosynthèse est la même pour *S. mediolani*.

#### 4.3- *Mycobacterium aurum*

*M. aurum* est une mycobactérie issue du sol. Elle est en forme de bâtonnet, à Gram positif, immobile, non sporulante et aérobie. Toutes les mycobactéries produisent des

caroténoïdes. Certaines espèces n'en accumulent que quelques traces, elles sont dites non chromogènes, d'autres synthétisent des caroténoïdes après induction par la lumière ce sont des espèces photochromogènes comme *M. vaccae* [49 , 122]. Enfin il existe des espèces qui produisent ces pigments de manière constitutive, elles sont alors qualifiées d'espèces scotochromogènes comme *M. aurum*.

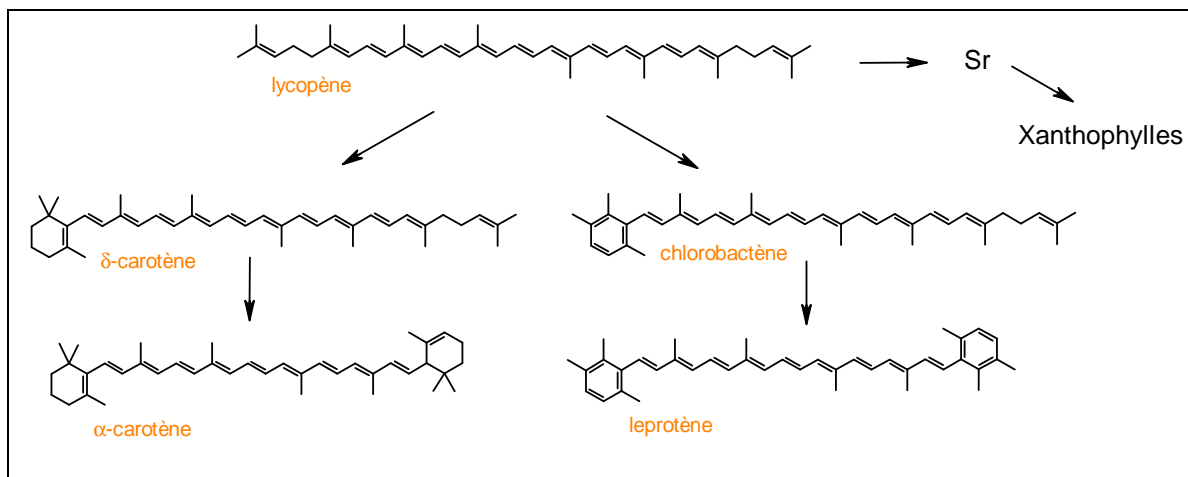
Les travaux sur l'identification des caroténoïdes produits et l'étude de leur voie de biosynthèse chez *M. aurum* ont fait l'objet de nombreux travaux pouvant être divisés en deux groupes. Chacun de ces groupes mène à une voie de biosynthèse différente:

Première voie :

- Levy-Frebault *et al.* en 1979 [65] induisent des mutations chez *M. aurum* A<sup>+</sup> en utilisant le N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG). Les mutants de pigmentations sont isolés et le contenu en caroténoïdes est analysé. Parmi les mutants obtenus, on trouve un mutant (A<sub>13</sub>) qui produit les mêmes caroténoïdes que le sauvage mais en quantité supérieure. Cette observation permet de déduire que la synthèse de pigments chez *M. aurum* est soumise à une régulation. Cette étude a permis de surcroît d'isoler 15 pigments différents mais tous ne sont pas identifiés notamment les xanthophylles. Il apparaît que le pigment majoritaire chez *M. aurum* est le leprotène. Ce dernier avec le  $\alpha$ -carotène semble être les produits finaux de la caroténogénèse. Le leprotène a été identifié par la suite comme étant identique à l'isoréniératène [69]. Il semblerait que les xanthophylles produits ne dériveraient pas du produit final (leprotène) mais d'un produit issu d'une étape plus précoce dans la biosynthèse ou bien seraient issus d'une réaction non enzymatique avec les carotènes.
- Une carte physique et fonctionnelle partielle de l'opéron caroténogène de *Mycobacterium aurum* a été établie en 1993 [49] . Les gènes nécessaires à la synthèse des carotènes sont dans un cluster de 11 kb. Le carotène majoritaire formé par *M. aurum* est le leprotène mais cette bactérie accumule des xanthophylles toujours non identifiés. Un intermédiaire de la synthèse des xanthophylles semblent avoir été isolé, ce pigment non identifié est nommé Sr.

Les travaux de Houssaini-Iraqi *et al.* tendent à confirmer l'hypothèse selon laquelle les xanthophylles ne dérivent pas du leprotène, ils proposent alors un autre

point de départ à la synthèse des xanthophylles. Les xanthophylles chez *M. aurum* seraient synthétisés à partir du lycopène. La voie de biosynthèse des caroténoïdes proposée chez *M. aurum* [49] est présentée dans la figure 26.



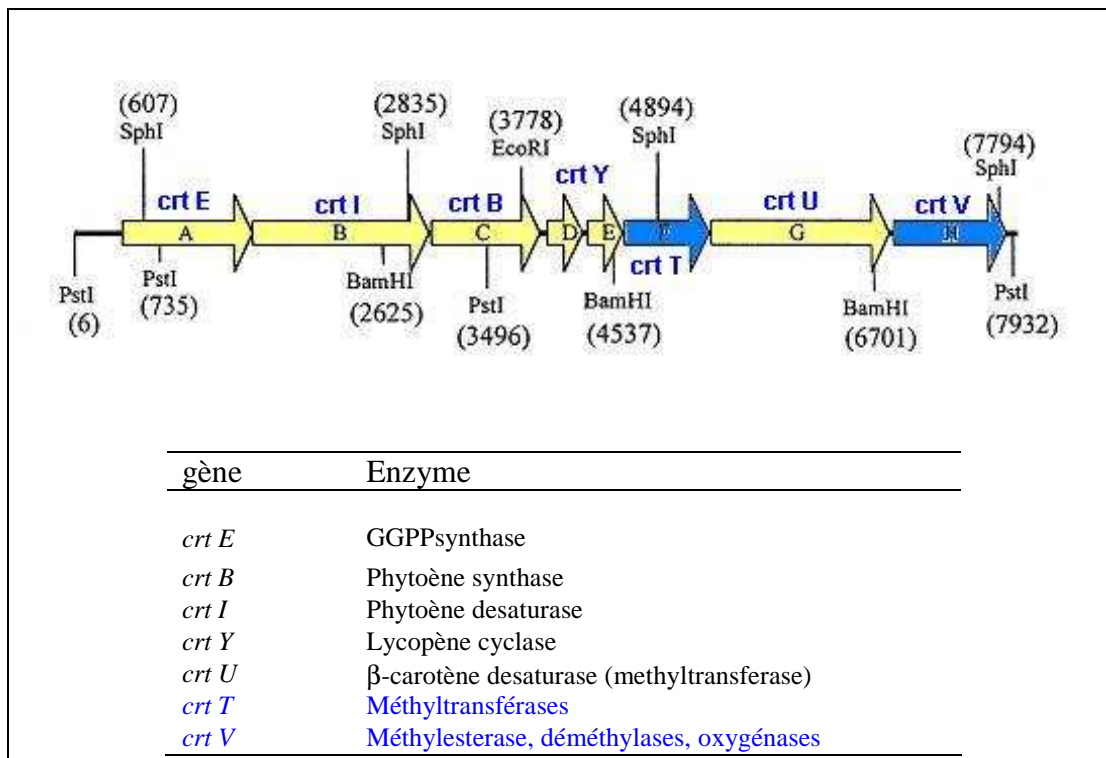
**Figure 26** : Voie de biosynthèse des caroténoïdes chez *M. aurum*, d'après Houssaini-Iraqi *et al.* [49].

- En 1993, Houssaini-Iraqi *et al.* [50] ont localisé 3 gènes intervenant dans la caroténogénèse :

*crt I* : permettant la formation du lycopène à partir du phytoène,  
*car α* : permettant la formation de α carotène à partir du lycopène,  
*car Lep* : permettant la formation du leprotène à partir du lycopène.

#### Deuxième voie :

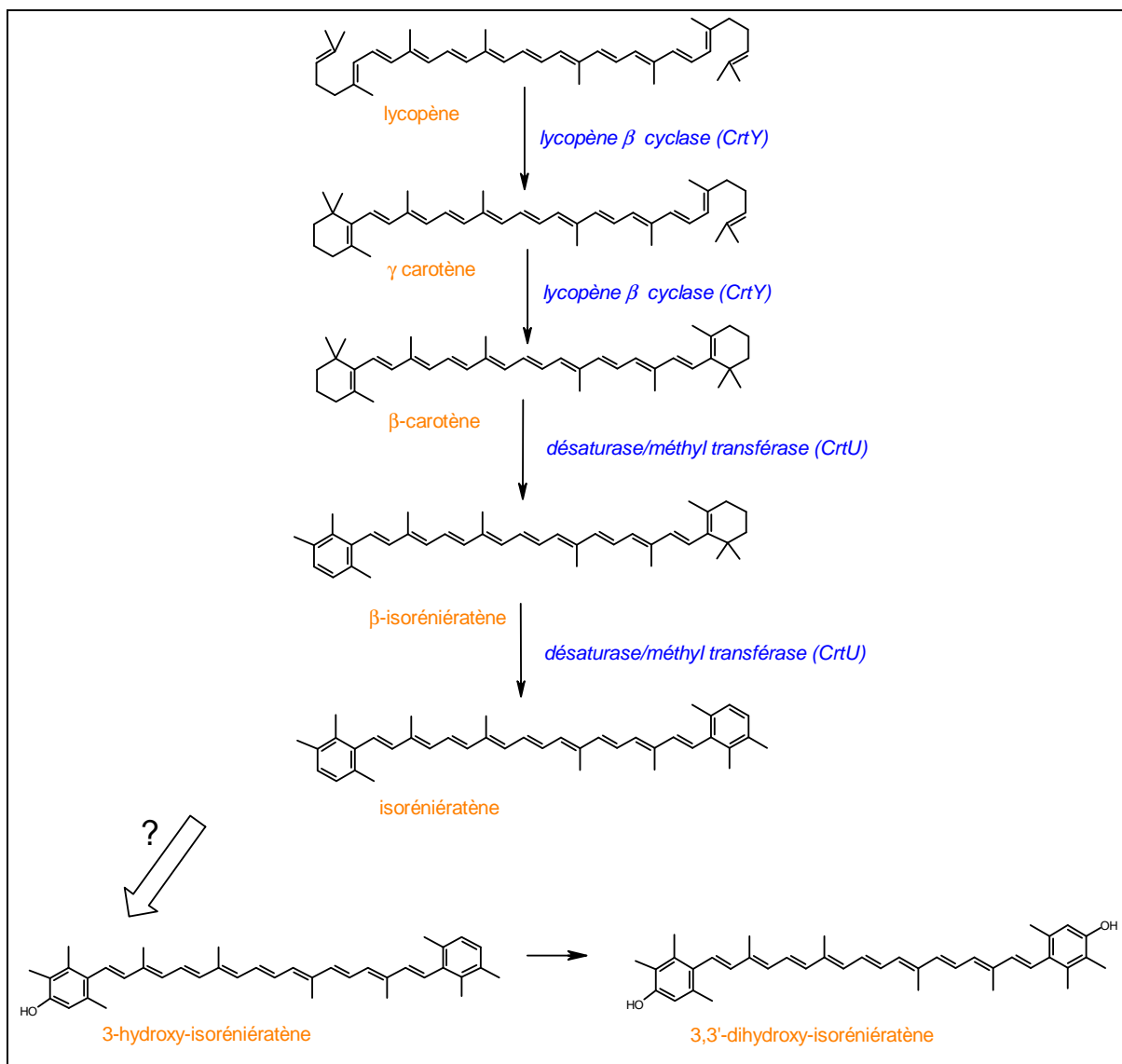
- Les récents travaux de Viveiros *et al.* [129] sur la caroténogénèse de *M. aurum* remettent totalement en cause la voie de biosynthèse des caroténoïdes précédemment proposée. L'étude complète du cluster *crt* de *M. aurum* A<sup>+</sup>, a permis de montrer qu'il contient 8 gènes organisés en deux opérons (Fig. 27).



**Figure 27** : Cluster *crt* de *M. aurum* présenté dans la publication de Viveiros *et al.* [129].

Ce cluster est similaire à celui de *S. griseus*. L'analyse fonctionnelle de ce cluster montre que les gènes *crt E*, *crt B*, *crt I*, *crt Y* et *crt U* sont nécessaire à la synthèse d'isoréniératène. Tandis que les gènes *crt T* et *crt V* ne semble pas intervenir dans cette voie de biosynthèse. La voie de biosynthèse de l'isoréniératène proposée ici est la même que celle de *B. linens* et *S. griseus*. Dans cette voie, le lycopène est cyclisé en β-carotène, ce dernier subit ensuite une désaturation pour obtenir l'isoréniératène (Fig. 28).

Dans ce schéma on remarque que le chlorobactène n'apparaît plus, c'est le β-carotène (carotène jamais identifié chez *M. aurum* jusqu'alors) qui serait le précurseur de l'isoréniératène (leprotène). Cette étude est la première à évoquer l'identité des xanthophylles produits : 3-hydroxy-isoréniératène et de 3,3'-di-hydroxy-isoréniératène. Ces travaux proposent une caroténogénèse très différente de celle précédemment envisagée. Cependant des points restent à éclaircir, notamment au sujet des dérivés hydroxylés de l'isoréniératène qui n'avaient pas encore été identifiés jusqu'alors. De plus la nouvelle voie de biosynthèse ne fait pas part de ces xanthophylles.



**Figure 28** : Voie de biosynthèse de caroténoïdes aromatiques chez *B. linens*, *S. mediolani* et *M. aurum*.

Les trois bactéries étudiées produisent donc toutes l'isoréniératène et ses dérivés hydroxylés. La connaissance de la voie de biosynthèse de ces caroténoïdes s'arrête à la formation d'isoréniératène (Fig. 28).

On précise que dans le cas de *S. mediolani*, il s'agit d'une hypothèse émise suite à l'étude du cluster *crt* de *S. griseus*.

Pour connaître la totalité de la voie de biosynthèse des caroténoïdes aromatiques chez *B. linens*, *S. mediolani* et *M. aurum*, il reste à identifier la réaction qui permet la synthèse des xanthophylles cycliques : dérivés hydroxylés de l'isoréniératène.

A la différence des réactions primaires de la caroténogénèse, on dispose de peu d'information sur la formation des xanthophylles. Nous avons vu que les réactions d'hydroxylations dans la caroténogénèse pouvaient être réalisées par deux types d'enzymes : dans la plupart des cas il s'agit d'une monooxygénase à fer non hémique (Crt Z) mais on voit récemment l'apparition de monooxygénases à fer hémique (P450) dans ces voies de biosynthèse. Cependant nous n'avons pas connaissance d'enzyme permettant l'hydroxylation de caroténoïdes aromatiques. Est-ce alors le  $\beta$ -carotène, le substrat de l'hydroxylation dans cette voie de biosynthèse ? Mais dans ce cas la désaturase Crt U peut-elle agir sur un cycle  $\beta$ -ionone hydroxylé ?

Dans ce travail nous proposons d'identifier le substrat de la réaction d'hydroxylation ainsi que le type d'enzyme impliquée dans la formation des dérivés hydroxylés de l'isoréniératène.



# *Matériel et Méthodes*

## 1- Les souches bactériennes

Les souches *Brevibacterium linens* ATCC 9175 et *Streptomyces mediolani* ATCC 33021 proviennent de l' « American Type Culture Collection » (Manassas, VA, USA). Quant à la souche *Mycobacterium aurum* A<sup>+</sup>, elle a été gracieusement fournie par le Dr.Viveiros, (Université de Lisbonne, Portugal). Ces trois souches sont stockées dans des cryotubes stériles Nalgène de 2mL contenant 0,8 mL de glycérol à 20% et 0,8 mL d'un milieu de culture liquide spécifique à chaque souche. Les cryotubes sont ensuite placés dans l'azote liquide.

## 2- Milieux et conditions de culture

### Les milieux

Les trois souches étudiées sont cultivées dans des erlenmeyers de 250 mL contenant 50 mL de milieu de culture liquide.

- Milieu liquide pour *B .linens*

D(+) glucose (Carlo Erba) .....	20 g/L
Casamino acides (Difco) .....	5 g/L
Extrait de levure (Biokar) .....	1 g/L
Chlorure de sodium (Carlo Erba) .....	10 g/L
Potassium phosphate di-basique (Sigma) .....	5 g/L

*B. linens* peut aussi être cultivée sur Bouillon nutritif (Merck) à 8g/L.

- Milieu liquide pour *S. mediolani*
  - D(+) glucose (Carlo Erba) ..... 4 g/L
  - Extrait de malt (Merck) ..... 10 g/L
  - Extrait de levure (Biokar) ..... 4 g/L
  - CaCO<sub>3</sub> (Carlo Erba) ..... 2 g/L
  
- Milieu liquide pour *M. aurum*
  - Bouillon nutritif (Merck) ..... 8 g/L
  - Glycérol 20% (Sigma) ..... 20 ml/L

Les erlens sont ensuite autoclavés à 120°C pendant 20 minutes.

#### Les conditions de culture :

Les erlens sont ensemencés avec 1mL de préculture (préculture : un erlen de 250 mL contenant 50 mL de milieu de culture ensemencé avec le contenu d'un cryotube). Les cultures sont alors agitées à 150 rpm (table d'agitation thermostatée Unitron, Infors). Selon la souche étudiée la température, comme la durée de culture, varient ainsi ; *B. linens* est cultivée à 25°C pendant 5 jours, *S. mediolani* est cultivée à 29°C pendant 5 jours et *M. aurum* est cultivée à 37°C pendant 12 jours.

### **3- Détermination de la quantité de biomasse**

L'objectif est de déterminer la quantité de matière sèche sur 15mL de culture. Pour effectuer cette mesure, il est nécessaire de laver la biomasse (enlever le milieu nutritif), puis de la sécher avant de la peser.

Les cultures sont homogénéisées à l'ultra-turax pendant 20 secondes à puissance moyenne. 15 mL de culture homogénéisée sont introduits dans un tube à centrifugation et centrifugés 15 minutes à 3800 g. A l'issue de cette centrifugation, le surnageant est jeté et le culot est repris dans 15 mL d'eau osmosée. Une nouvelle centrifugation est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. Le surnageant est éliminé, le culot repris dans 2 à 3 mL d'eau osmosée et versé dans une coupelle d'aluminium sèche et pesée ( $m_1$ ). La

coupelle est alors introduite dans une étuve à 105°C pendant au moins 24 heures, puis refroidie au dessiccateur avant d'être pesée ( $m_2$ ).

La quantité de biomasse est enfin déterminée par la formule suivante :

$$m = \frac{(m_2 - m_1) \times 1000}{15}$$

$m$  : biomasse (matière sèche) en g/L.

Les quantités de biomasse sont toujours estimées en g de poids sec par litre de culture.

#### 4- Extraction des pigments

L'extraction est pratiquée sur un culot cellulaire préalablement lavé, les pigments sont ensuite dissous dans un solvant approprié.

La culture bactérienne est homogénéisée à l'ultra-turax. 15 mL sont prélevés et versés dans un tube à centrifugation. Pendant 15 minutes on centrifuge à 3800 g. Le surnageant obtenu est alors éliminé (absence de pigments extracellulaires). Le culot repris dans 5mL d'eau osmosée. Une nouvelle centrifugation dans les mêmes conditions est réalisée. Le culot est repris dans 7 à 8 mL de méthanol (Chromanorm, Prolabo). Le tube est enveloppé dans du papier aluminium, afin de protéger les pigments de la lumière, et agité à 100 rpm à 60°C pendant 2 heures. A l'issue de l'extraction dans le méthanol, on centrifuge à 10000 g pendant 15 minutes. Le surnageant est récolté et son volume mesuré. Si le culot n'est pas totalement décoloré une deuxième extraction cette fois dans l'acétone est nécessaire. Le culot est alors repris dans 5 mL d'acétone (Carlo Erba), le tube est enveloppé dans du papier aluminium, agité à 100 rpm à température ambiante pendant 24 heures. Le tube est centrifugé à 10000 g pendant 15 minutes. Le surnageant est récolté et son volume mesuré. Précisons que l'étape d'extraction dans l'acétone est inutile pour l'extraction des pigments de *B. linens*.

L'absorbance des extraits pigmentaires ainsi récupérés est mesurée, à 450 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre (Helios  $\beta$ ). Les extraits sont stockés à -20°C, à l'obscurité dans des flacons en verre brun.

La quantité de pigments est calculée par application de la loi de Beer-Lambert, en considérant la valeur du coefficient d'absorption spécifique  $A_{1cm}^{1\%}$  de  $2080 \text{ g}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$  (isoréniératène dans l'éther de pétrole) [93]. La quantité de pigments est alors calculée de la façon suivante :

$$Q_{\text{pigments}} = \frac{A(450\text{nm}) \times Y \times 1000}{A_{1cm}^{1\%} \times 100}$$

$Q_{\text{pigments}}$  : Quantité de pigments en mg,  
Y : Volume d'extrait récupéré en mL,  
A (450nm) : Absorbance à 450nm.

La quantité de pigments doit être rapportée au litre, ce qui permet ensuite de calculer la production spécifique exprimée en mg de pigments par g de matière sèche.

## 5- Réaction phénolate

La réaction phénolate observée chez *B. linens* est attribuée à la présence de caroténoïdes phénoliques [31 , 53].

L'ajout de quelques gouttes d'une base forte (NaOH ou KOH à 5M) sur des colonies bactériennes produisant des caroténoïdes phénoliques (couleur orange) entraîne l'apparition immédiate d'une couleur rouge intense. Cette réaction est spécifique des caroténoïdes phénoliques qui en milieu basique présentent une augmentation de leur  $\lambda_{\text{max}}$  (shift bathochromique) [20].

Cette réaction peut être réalisée directement sur des colonies bactériennes. Dans ce cas, on prélève à l'aide d'une anse stérile plusieurs colonies de la souche étudiée. Elles sont déposées ensuite sur du papier Wathman. Quelques gouttes de KOH à 5M sont ajoutées. Dans le cas d'une réponse positive à ce test, signe de la présence de caroténoïde phénolique, on observe un changement rapide de la couleur de la biomasse qui passe du orange au rouge.

Pour plus de précisions, cette réaction peut être effectuée sur des extraits pigmentaires. Dans ce cas, on réalise le spectre d'absorbance de 350 nm à 650 nm, de 1 mL d'extraits pigmentaires, à l'aide d'un spectrophotomètre (Hitachi U-2001). Ensuite 100  $\mu$ L de KOH à 5M sont ajoutés à cet extrait. Le spectre d'absorbance est à nouveau effectué. Si l'ajout de la base forte implique une augmentation de  $\lambda_{\text{max}}$  d'environ 20 nm, alors la réaction phénolate est positive et indique la présence de caroténoïdes phénoliques dans les extraits pigmentaires.

## 6- Méthode d'analyse en HPLC

### Préparation des échantillons

Afin d'éliminer les éventuels débris cellulaires, les extraits de pigments sont centrifugés pendant 10 minutes à 9000 g.

### Le système chromatographique

L'analyse des pigments solubilisés dans le méthanol ou dans l'acétone est effectuée par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) en phase inverse, sur une colonne LichroCART 250-4 RP-18 (Merck), de dimensions 250 x 4 mm, avec un diamètre des sphères de 5 $\mu$ m. Cette colonne équipe une chaîne de chromatographie Waters (pompe 600 et détecteur d'absorbance à barrette de diodes 996). La phase mobile est composée de méthanol (Qualité HPLC, Chromanorm, Prolabo) et de chloroforme (qualité HPLC, Carlo Erba) répartis selon les gradients présentés dans le tableau 3.

Gradient GA				Gradient GB			
temps min	Débit mL/min	% Méthanol	% Chloroforme	temps min	Débit mL/min	% Méthanol	% Chloroforme
0	0.5	100	0	0	1	100	0
35	0.5	100	0	20	1	100	0
70	0.5	80	20	40	1	80	20
85	0.5	80	20	50	1	80	20
100	0.5	100	0	51	1	100	0

Tableau 3 : Gradients GA et GB utilisés pour les analyses HPLC des caroténoïdes.

Les premières analyses HPLC ont été effectuées avec le gradient GA, méthode utilisée pour l'étude des profils HPLC des pigments de différentes souches de *B. linens* [42]. Cette méthode a ensuite fait l'objet d'une amélioration pour aboutir au gradient GB. La boucle d'injection utilisée est de 200  $\mu$ L. Les volumes d'extraits pigmentaires injectés sont de 100 ou 200 $\mu$ L.

Le système est géré par le logiciel Millénium (version 2.15.01, Waters). Il permet d'obtenir les chromatogrammes [absorbance = f (temps de rétention)]. Ce logiciel fournit également les spectres d'absorption correspondants à chaque pic (spectre UV /visible). Ces derniers peuvent nous apporter des informations complémentaires sur la nature des caroténoïdes présents dans les échantillons.

#### Caroténoïdes Standard

Les standards de caroténoïdes utilisés après dissolution dans l'acétone sont : le  $\beta$ -carotène, l'astaxanthine, la zéaxanthine, la canthaxanthine, le lycopène et l'isoréniératène. Tous ces standards sauf l'isoréniératène ont été offerts par les laboratoires Hoffman-LaRoche (Basel, Suisse). L'isoréniératène quant à lui a été synthétisé par le laboratoire Chimie et Biologie des Substances Naturelles, CNRS, FRE 2125, à Quimper.

Pour la purification des caroténoïdes de *M. aurum*, d'autres types de colonnes HPLC ont été utilisés :

- colonne C18 semi préparative (250 x 10 mm/Nucléosil),
- colonne C18 semi préparative à compression radiale (8x10, phase Deltapack C18, 15  $\mu$ m),
- colonne C30- YMC analytique (250x4.6 mm/porosité 5 $\mu$ m).

Dans chacun des cas, le gradient utilisé est le gradient GB et la boucle d'injection est de 1 mL afin d'injecter 1 mL par analyse. La purification nécessite la concentration des extraits pigmentaires avant l'injection en HPLC. Ces extraits sont concentrés 10 fois à l'aide d'un évaporateur-concentrateur (Heto Maxi Dry Plus) réglé à 35°C.

## 7- Méthode d'analyse en LCMS

Les extraits pigmentaires ont été analysés par LCMS à l'institut de chimie alimentaire et de chimie analytique de l'université de Hohenheim à Stuttgart. Ces analyses sont effectuées par le Dr D. Breithaupt.

Les conditions d'analyses utilisées sont présentées dans la publication, Breithaupt *et al.* 2002 [19].

Le matériel LCMS est composé d'un module HPLC (HP1100, Hewlett-Packard) couplé à un spectromètre de masse (Micromass VG platform II quadripôle)

- La séparation HPLC est effectuée sur une colonne analytique YMC C30 (250 x 4,6 mm ; 5µm) associée à une pré-colonne C18 (10 x 4,6 mm, Nucléosil 5 µm). L'analyse est effectuée à 35°C, la phase mobile est composée d'un mélange de méthanol /*tert*-butyl methyl ether / H<sub>2</sub>O. Le gradient utilisé est présenté dans le tableau 4 Le volume d'injection est de 20 µL.

temps min	Débit mL/min	% A	% B
0	1	100	0
10	1	100	0
40	1	50	50
50	1	0	100
55	1	100	0
60	1	100	0

**Tableau 4** : LCMS : gradient utilisé pour la séparation HPLC.

La phase mobile est composé d'un mélange de méthanol /*tert*-butyl methyl ether / H<sub>2</sub>O dans les proportions 81 :15 :4 v/v/v pour (A) et 6 :90 :4 v/v/v (B).

### Les paramètres du spectromètre de masse

La source APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) est chauffée à 150°C et la sonde APCI est maintenue à 400°C. La décharge corona est optimisée à 3,7 kV, la lentille HV à 0,5 kV et le voltage du cône à 30V. L'azote est utilisé comme gaz réactant et gaz de séchage à 75 et 300 L/h respectivement. Le spectromètre de masse est calibré en mode ion positif avec une gamme de balayage de m/z allant de 80 à 1200.

L'absorbance est enregistrée à 450 nm à l'aide d'un détecteur à barrette de diodes (DAD : Diode Array Detector).

## 8- Préparation et utilisation des inhibiteurs et inducteur enzymatique

Différents composés sont testés afin d'observer une interaction possible avec une enzyme de la caroténogénèse. Dans ces expériences, nous avons eu recours à des inhibiteurs de cytochrome P450 (métyrapone, tetcyclacis, 1-aminobenzotriazole), un inhibiteur de monooxygénase flavinique (méthimazole) et un inducteur de cytochrome P450 (phénobarbital). Chaque composé est ajouté au milieu de culture avant ensemencement. Après la croissance des bactéries sur ces milieux de culture modifiés, les cellules sont récoltées, la biomasse produite est quantifiée, les pigments sont extraits et analysés.

Les différents effecteurs sont préparés de la manière suivante :

*Le métyrapone*, 2-méthyl 1,2-di-3-pyridyl propanone (Aldrich) est un inhibiteur de cytochrome P450 [98], sa masse molaire est de  $226,27 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Le métyrapone n'étant pas soluble dans l'eau, il est dissous dans du DMSO (Di-Méthyl Sulfoxyde, Merck). La concentration finale en DMSO dans le milieu de culture doit être inférieure à 0,4% v/v afin de ne pas être toxique pour la bactérie (un témoin DMSO est donc réalisé pour s'en assurer). Dans un premier temps, une solution mère est préparée, puis filtrée stérilement à l'aide de filtre stérile (Millex-GP) adapté à une seringue stérile de 2 mL (Terumo). La quantité désirée en inhibiteur est ajoutée dans chaque erlen contenant 50 mL de milieu de culture. Cet inhibiteur est testé dans une gamme de concentration allant de 0,25 mM à 10 mM.

*Le tetcyclacis* est produit BASF (non commercial) fourni par le Dr. Rademacher (centre d'agriculture BASF, Limburgerhof). Il s'agit d'un inhibiteur de cytochrome P450 [91], de masse molaire  $276,45 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Le tetcyclacis, insoluble dans l'eau, est solubilisé dans de l'acétone (Carlo Erba). La concentration finale en acétone dans le milieu de culture ne doit pas excéder 1% v/v pour éviter des problèmes de toxicité (pour s'en assurer on



réalise un témoin acétone). De la même manière que pour le métyrapone, une solution mère est préparée, puis filtrée stérilement. La quantité désirée en inhibiteur est ajoutée à chaque erlen avant l'ensemencement. Les concentrations testées vont de 0,01mM à 1mM.

*Le 1-aminobenzotriazole (ABT)* (Sigma), est un inhibiteur de cytochrome P450 [84] a une masse molaire de 134,1 g. mol<sup>-1</sup>. Le ABT est solubilisé dans l'acétone, il est alors préparé de la même manière que le tetcyclacis. Ce composé est utilisé dans les cultures de *M. aurum* à des concentrations allant de 1 à 10 mM.

*Le Methimazole, 2-Mercapto-1-methylimidazole* (Sigma) composé de masse molaire égale à 114,16 g. mol<sup>-1</sup> est un inhibiteur de monooxygénase flavinique (FMO) [121]. Ce composé est soluble dans l'eau. La solution mère est préparée avec de l'eau stérile puis filtrée et ajoutée au milieu de culture comme précédemment détaillé. Ce composé est utilisé dans les cultures de *M. aurum* à des concentrations allant de 1 à 10 mM.

*Le phénobarbital* (sel de sodium, Fluka) a une masse molaire de 254,22 g.mol<sup>-1</sup> et est un inducteur de cytochrome P450 [77]. Ce composé est solubilisé dans l'eau, puis filtré stérilement et ajouté au milieu de culture avant ensemencement. La gamme de concentration testée s'étend de 2 mM à 8mM.

#### Remarques sur les inhibitions et inductions in vivo

Chaque concentration est testée soit en triplicata soit en duplicata. De plus, à chaque expérience un témoin sans inhibiteur (en duplicata) est réalisé. Pour les inhibiteurs insolubles dans l'eau, nécessitant l'utilisation d'un solvant, on réalise également un témoin solvant : culture ne contenant pas d'inhibiteur, uniquement le solvant utilisé en quantité maximale.

Dans le cas d'obtention d'une inhibition de la caroténogénèse par un de ces inhibiteurs, une expérience de réversibilité est effectuée. Cette expérience a pour but d'établir sans aucun doute possible un lien de cause à effet entre la présence d'inhibiteur dans le milieu de culture et l'inhibition d'une étape de la caroténogénèse. Pour ce faire, on ensemence les bactéries sur un milieu de culture contenant l'inhibiteur à une concentration

où l'inhibition a pu être observée. A l'issue de la période de croissance, on récupère toutes les cultures. La moitié est utilisée pour quantifier la biomasse et analyser les pigments produits afin de vérifier que l'inhibition a bien eu lieu. Pour l'autre moitié des cultures, la biomasse est récupérée, lavée stérilement pour enlever toute trace d'inhibiteur et remise sur milieu minimum pour empêcher la croissance *de novo* des bactéries (Tryptone sel, Merck) pendant 70 heures. Enfin les bactéries sont récupérées, la biomasse quantifiée, les pigments extraits et analysés.

## 9- Etude des P450 *in vitro*

On cherche à mettre en évidence la présence de P450 dans des extraits acellulaires issus des bactéries étudiées, le protocole utilisé est inspiré de celui présenté dans [102].

### 9.1- Préparation des extraits acellulaires

On utilise 40 mL de culture bactérienne en fin de croissance. Après une centrifugation à 8 000 g pendant 10 min à 4°C, le surnageant est jeté et le culot repris dans 30 ml de tampon phosphate (100 mM ; pH=7,4). Une nouvelle centrifugation est effectuée à 8 000 g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est jeté et le culot repris dans 4,2 ml de tampon phosphate contenant 20 % de glycérol, 0,3 mM de PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride, Sigma préparé dans du n-propanol) et 10 mM de  $\beta$ -mercaptoéthanol (Sigma, préparé dans du tampon phosphate). Les cellules sont ensuite maintenues dans la glace pendant le reste de la manipulation. Les cellules sont lysées par 6 cycles de 30 s. de sonication et 30 s. de pause où la sonde est refroidie dans la glace. Puis les lysats sont centrifugés à 28 000 g pendant 25 min à 4°C. Enfin le surnageant (extraits acellulaires) est récupéré et stocké à -20 °C.

### 9.2- Spectre d'absorbance différentiel de P450 réduits en présence de CO

On utilise un spectrophotomètre à double faisceau (Hitachi U-2001), l'extrait acellulaire est réparti dans deux cuves en quartz. On ajoute dans chaque cuve quelques

grains de dithionite de sodium, composé réducteur, puis on fait buller du CO dans la cuve d'essai pendant 30 secondes. On réalise ensuite le spectre d'absorbance de 390 à 500 nm. La présence d'un pic d'absorbance à 450 nm indique la présence de P450.

## 10- Méthodes de mutagénèse

### 10.1- Mutagénèse aléatoire, aux U.V.

*B. linens* est cultivée sur bouillon et gélose nutritifs. Les cultures exposées aux U.V. sont des cultures en phase exponentielle de croissance. Afin de connaître le moment où *B. linens* atteint cette phase on réalise une cinétique de croissance suivie par lecture de DO à 600 nm. La cinétique est réalisée sur des cultures de 50 ml de bouillon nutritif,ensemencées par 1 ml d'une préculture de 5 jours. Les erlens sont agités à 100 rpm à 25°C. Au bout de 12h, la culture est au milieu de la phase exponentielle.

Pour les expériences de mutation U.V., on utilisera donc des cultures âgées de 12 h.

On prélève 1 mL d'une culture de 12h, puis on réalise des dilutions en cascade. On étale au rateau 100 µL de la dilution  $10^{-5}$  sur des géloses nutritives. Ces géloses seront ensuite exposées aux U.V (boîtes ouvertes) sous une hotte à flux laminaire (Heraeus Kendro HS 12). Le temps d'exposition aux U.V. varie de 1 min à 25 min. Les boites sont ensuite incubées dans une étuve à 25°C pendant 5 jours. A l'issue des 5 jours, la couleur des colonies est observée. Les clones présentant une couleur différente de celle de la souche sauvage (orange) sont répiquées afin d'effectuer le test des phénolates.

### 10.2- Electroporation

Le protocole utilisé est tiré de la publication de Leret *et al.* [64]

#### Préparation des cellules compétentes

*B. linens* ATCC 9175 est cultivée sur un milieu LB avec 10% de succinate de sodium et 2% de glycine. Les cultures sont incubées à 30°C et agitées à 150 rpm. Quand les cultures atteignent une DO à 570 nm de 0,5, la pénicilline G (Sigma) est ajoutée à 0,3

$\mu\text{g/mL}$ . Les cellules sont récupérées lorsque les cultures ont une DO à 570 nm égale à 1. Les cultures sont centrifugées à 6000 rpm pendant 10 min, à 4°C. Le surnageant est jeté et le culot repris par du saccharose à 8 mM (volume correspondant à 0,1 fois le volume de culture). Après avoir renouvelé l'étape de lavage par le saccharose, les cellules sont resuspendues dans cette solution de manière à être concentré 60 fois. Les cellules ainsi préparées sont aliquotées par fractions de 200  $\mu\text{L}$  et conservées à -80°C.

### Electroporation

40  $\mu\text{L}$  de cellules compétentes sont mélangées à 10  $\mu\text{L}$  d'ADN dans une cuve d'électroporation de 0,2 cm de trajet (Bio-Rad). Les cellules sont soumises à une implusion électrique sous l'action de l'électroporateur (Micropulser, BioRad) réglé avec les paramètres suivants : 25 $\mu\text{F}$ , 2,5kV et 400  $\Omega$ . Après l'électroporation les cellules sont diluées avec 0,95 mL de milieu LB supplémenté par 0,5 M de saccharose, elles sont ensuite incubées à 90 °C pendant 90 min. Les cellules sont ensuite mélangées à 9 mL de bouillon nutritif. Après plusieurs dilutions en cascade on étale, sur des géloses nutritives, 100  $\mu\text{L}$  de la dilution  $10^{-4}$ . Les géloses sont incubées à 25°C pendant 5 jours. A l'issue de cette période d'incubation, la couleur des colonies est observée. Le test phénolate est effectué sur les clones présentant une couleur différente de sauvage.

## **11- Extraction ADN bactérien**

Les différentes souches de *B. linens* sont cultivées sur bouillon nutritif. Après 24 h de culture, on dépose 1,3 mL de culture en tube eppendorf. Après une centrifugation de 5 min à 5000 g, le surnageant est éliminé et le culot repris dans 200  $\mu\text{L}$  de tampon TE (Trisma Base 48,5g + EDTA 7,5g + eau qsp 1000 mL à pH=8). On ajoute ensuite 500  $\mu\text{L}$  de solution de lyse (Trisma Base 0,6g + SDS 3g + eau qsp 100 mL + 2 mL NaOH 4M), et on mélange par inversion répétée des tubes. Les tubes sont incubés pendant 30 min à 55°C, puis 700  $\mu\text{L}$  de Phénol - Chloroforme (Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol 25:24:1, Sigma) sont ajoutés. Après une centrifugation de 15 min à 10 000g, on récupère 600  $\mu\text{L}$  de la phase aqueuse supérieure. On ajoute ensuite 200  $\mu\text{L}$  de la solution d'Acétate de sodium à 3M, pH = 5,2 puis 600  $\mu\text{L}$  d'alcool isopropylique et on mélange par inversion répétée des tubes. Les tubes sont incubés 30 min à -20°C. Après une centrifugation de 10 min à 10 000g, le culot est repris par 500  $\mu\text{L}$  d'éthanol à 70%. Une nouvelle centrifugation est

réalisée (10 min, 10 000 g). Le culot est séché à l'évaporateur-concentrateur (Heto Maxi Dry Plus) pendant 30 min et repris par 200 µL d'eau stérile. La solution d'ADN ainsi obtenue est conservée à -20°C. Un spectre d'absorbance est réalisé afin d'estimer la concentration de la solution d'ADN. On considère que 20 unités DO à 260 nm correspondent à 1mg/mL.

- Pour *B. linens* ATCC 9175, la solution d'ADN obtenue est à 2,32 mg/mL,
- Pour le mutant BLMJ, la solution d'ADN obtenue est à 2,35 mg/mL,
- Pour le mutant BLE7J, la solution d'ADN obtenue est à 1,31 mg/mL.

## 12- PCR et Electrophorèse

### PCR

On dispose de 12 amorces s'hybridant sur l'*orf 10* du cluster *crt* pour amplifier ce gène. Ces amorces synthétisées par Qbiogene sont présentées dans le tableau 5.

N°	Nom de l'oligo	séquence 5'-3'	MW g/mol	Tm1 °C (2AT+4GC)	Tm2 °C (%GC)	Conc µM
1	Fw P450-1:	GTT GAG CAA CCA GCT GAT	5524	54	47	100
2	Fw P450-2:	CAA CCA GCT GAT CCA ACT	5413	54	47	100
3	Rev P450-1:	GTT CGA GAG GAA GCG TAA	5613	54	47	100
4	Rev P450-2:	GAG GAA GCG TAA TCA GCA	5582	54	47	100
5	Fw P450c-1:	CAT CGA AGT CTC AGA CAA	5477	52	45	100
6	Fw P450c-2:	GGA GAC GGT CAT CCC T	4882	52	47	100
7	Fw P450c-3:	AGC GAC GGA GCC CAC A	4885	54	49	100
8	Fw P450c-4:	CTT TCG GCA ACA CCC CAT A	5693	58	49	100
9	Rev P450c-1:	TAG AGA GCC AAT GGT TGA	5588	52	45	100
10	Rev P450c-2:	GTT GAC CCG GGC ACG T	4898	54	49	100
11	Rev P450c-3:	CAC GTG TGG GCT CCG T	4889	54	49	100
12	Rev P450c-4:	GCA GAT GCG AGA GCA CA	5254	54	48	100

**Tableau 5 :** Amorces de l'*orf 10* du cluster *crt* de *B. linens*. Rev : amorce reverse ; Fw : amorce forward.

Pour la réaction de PCR, ces amorces sont utilisées à une concentration de 10 µM tandis que les solutions d'ADN matrice sont utilisées à une concentration de 50µg/mL.

Le volume réactionnel est de 50  $\mu$ L, il est composé de :

- 25  $\mu$ L de PCR master mix, 2X (Promega),
- 5  $\mu$ L d'ADN matrice à 50  $\mu$ g/mL,
- 10  $\mu$ L d'eau pure (sans nucléase) (Promega),
- 5  $\mu$ L d'amorce forward à 10  $\mu$ M (QBiogene),
- 5  $\mu$ L d'amorce reverse à 10  $\mu$ M (QBiogene).

L'ensemble du volume réactionnel est déposé dans des tubes PCR de 0,2 mL. Les tubes sont placés dans un thermocycleur (Flexigene Techne). Il effectue une dénaturation initiale de 5 min à 94°C puis 30 cycles de 2 min. Chaque cycle est constitué d'une phase de dénaturation de 30 s à 93°C suivie d'une phase d'hybridation de 30 s à 50°C et enfin une phase l'élongation d'1 min à 72°C. A la fin des 30 cycles, l'appareil maintient les tubes à 72°C pendant 10 min.

### Electrophorèse

A l'issue de l'amplification, une analyse par électrophorèse des produits PCR est réalisée. Le dépôt est composé de 10  $\mu$ l de produits PCR mélangés à 3 $\mu$ L de 6X (Blue/Orange 6X Loading Dye, Promega). On dépose alors 12  $\mu$ L de ce mélange par puits. On dépose également 20  $\mu$ L de marqueur de taille : DNA ladder 1kb (Promega) et marqueur Lambda (DNA / EcoRI + HindIII ; Promega). L'électrophorèse est effectuée sur un gel d'agarose à 1,2% (2ml TAE : Tris Acetate EDTA 50x + 1,2g d'agarose + eau qsp 100ml) dans un tampon TAE 1x. La migration dure 2h à 100 V. Le gel est révélé aux U.V. après une coloration de 30 min dans une solution de Bromure d'éthidium.

L'ADN utilisé pour l'électroporation correspond à des amplimères de l'*orf 10* de BLMJ. Avant d'être utilisé, les amplimères sont purifiés à partir des bandes découpées sur le gel d'agarose. La purification est réalisée à l'aide d'un kit de purification (QIAquick Gel extraction kit).

## ***Résultats Discussion***

### **1- Caractérisation des pigments produits par les bactéries étudiées**

Différentes études menées sur les trois bactéries retenues ont permis d'identifier les caroténoïdes accumulés. Il est donc connu qu'elles produisent toutes du 3,3' di-hydroxy-isoréniératène. Cependant les profils pigmentaires ainsi que les niveaux de productions sont encore à détailler notamment pour *S. mediolani* et *M. aurum*. Dans cette partie nous étudierons les productions de pigments et de biomasse chez ces trois bactéries. Puis nous procéderons à la caractérisation des pigments produits selon les approches suivantes : études des spectres d'absorbance, analyses HPLC et LCMS.

#### **1.1- Etudes de la production de biomasse et de pigments**

##### **1.1.1 Production de pigments et de biomasse chez *B. linens***

Les quantités de biomasse et de pigments produites par cette bactérie diffèrent selon le milieu de culture utilisé. Les premières études sur cette bactérie ont été réalisées sur un milieu complexe. Les données obtenues avec ce milieu sont les suivantes :

- production de biomasse : 1,26 g/L,
- production de pigments : 0,97 mg/L,
- production spécifique (atteinte en phase stationnaire) : 0,77 mg/g.

L'utilisation d'un milieu classique riche comme le bouillon nutritif permet d'augmenter sensiblement tous ces niveaux de production. Les valeurs obtenues avec ce type de milieu sont les suivantes :

- production de biomasse : 1,7 g/L,

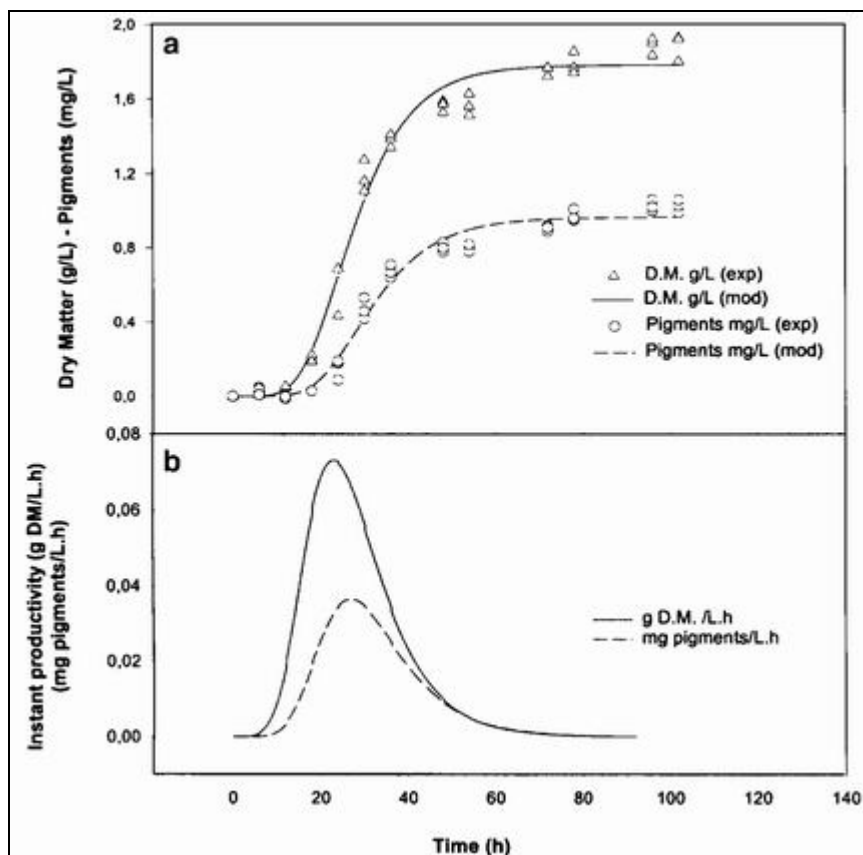
- production des pigments : 1,53 mg/L,
- production spécifique : 0,91mg/g.

Ce deuxième milieu est utilisé pour les expériences présentées dans le paragraphe 2.4 de cette partie. Toutes ces valeurs sont obtenues sur des cultures de 5 jours.

*B. linens* est la première bactérie productrice de caroténoïdes aromatiques étudiée au laboratoire. Les cinétiques présentées dans ce paragraphe sont issues de travaux antérieurs (Fig. 29) [42].

La figure 29 présente les courbes de croissance et de production de pigments ajustées au modèle de croissance microbienne de Gompertz [136].

La figure 29.b correspondant aux dérivées des courbes de la figure 29.a. Cette présentation permet d'avoir accès aux productivités instantanées. Le maximum de productivité de biomasse coïncide avec le maximum de production de biomasse et est atteint après 20 h de culture. Chez *B. linens* la biomasse et les pigments sont produits en même temps. Ces deux productions sont liées. Les auteurs en concluent l'appartenance de la caroténogénèse au métabolisme primaire.



**Figure 29** : Courbes de croissance et de production de pigments par *B. linens*.  
 a) données expérimentales (exp) et courbe de Gompertz ajustée (mod).  
 b) dérivées des courbes de Gompertz ajustées. Issue de la publication [42].



Après 5 jours, les productions de biomasse et de pigments sont en phase stationnaire chez *B. linens*. De cette manière nous sommes assurés d'utiliser de cellules dont la caroténogénèse est arrivée à son terme.

Nous avons effectué des travaux similaires à ceux effectués par Guyomarc'h *et al.* [42] appliqués à *S. mediolani* et *M. aurum*.

### 1.1.2- Production de pigments et de biomasse chez *S. mediolani*

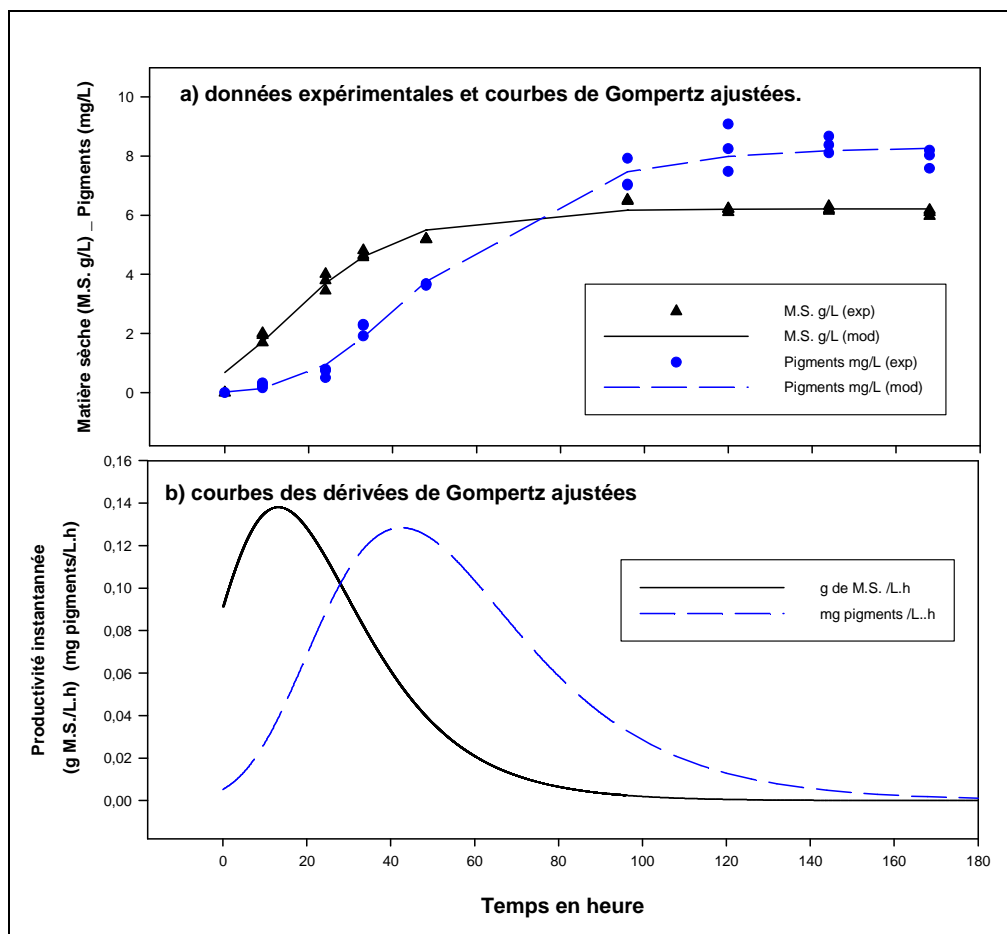
Nous avons déterminé les quantités de biomasse et de pigments produites. Les valeurs obtenues sont les suivantes:

- production de biomasse : 4,69 g/L ,
- production de pigments : 6,49 mg/ L,
- production spécifique : 1,38 mg/g.

Ces valeurs sont nettement supérieures à celle obtenues pour *B. linens*. *S. mediolani* s'avère être meilleure productrice de caroténoïdes.

Les cinétiques des productions de biomasse et de pigments chez *S. mediolani* ont été l'objet du stage de magistère d'Anne Postec encadré par M. Dufossé. Ces données sont présentées dans la figure 30.

Ces cinétiques apparaissent décalées dans le temps. Les productions de biomasse et de pigments n'atteignent pas la phase stationnaire en même temps. La production de biomasse se stabilise avant celle des pigments. Ce retard est clairement représenté par les courbes de productivité instantanée (Fig. 30.b). La productivité maximale de biomasse est à 13,2 h alors que la productivité des pigments atteint son maximum à 42,4 h. Il existe un décalage de 29,2 h entre ces deux maxima de productivité. La production de caroténoïdes chez *S. mediolani* appartient donc au métabolisme secondaire.



**Figure 30** : Courbes de croissance et de production de pigments par *S. mediolani*.  
 a) données expérimentales (exp) et courbe de Gompertz ajustée (mod).  
 b) dérivées des courbes de Gompertz ajustées.

Après 5 jours de culture, les productions de biomasse et de pigments sont en phase stationnaire. De cette manière nous sommes certains d'utiliser des bactéries ayant réalisées une production maximale de caroténoïdes.

### 1.1.3- Production de pigments et de biomasse chez *M. aurum*

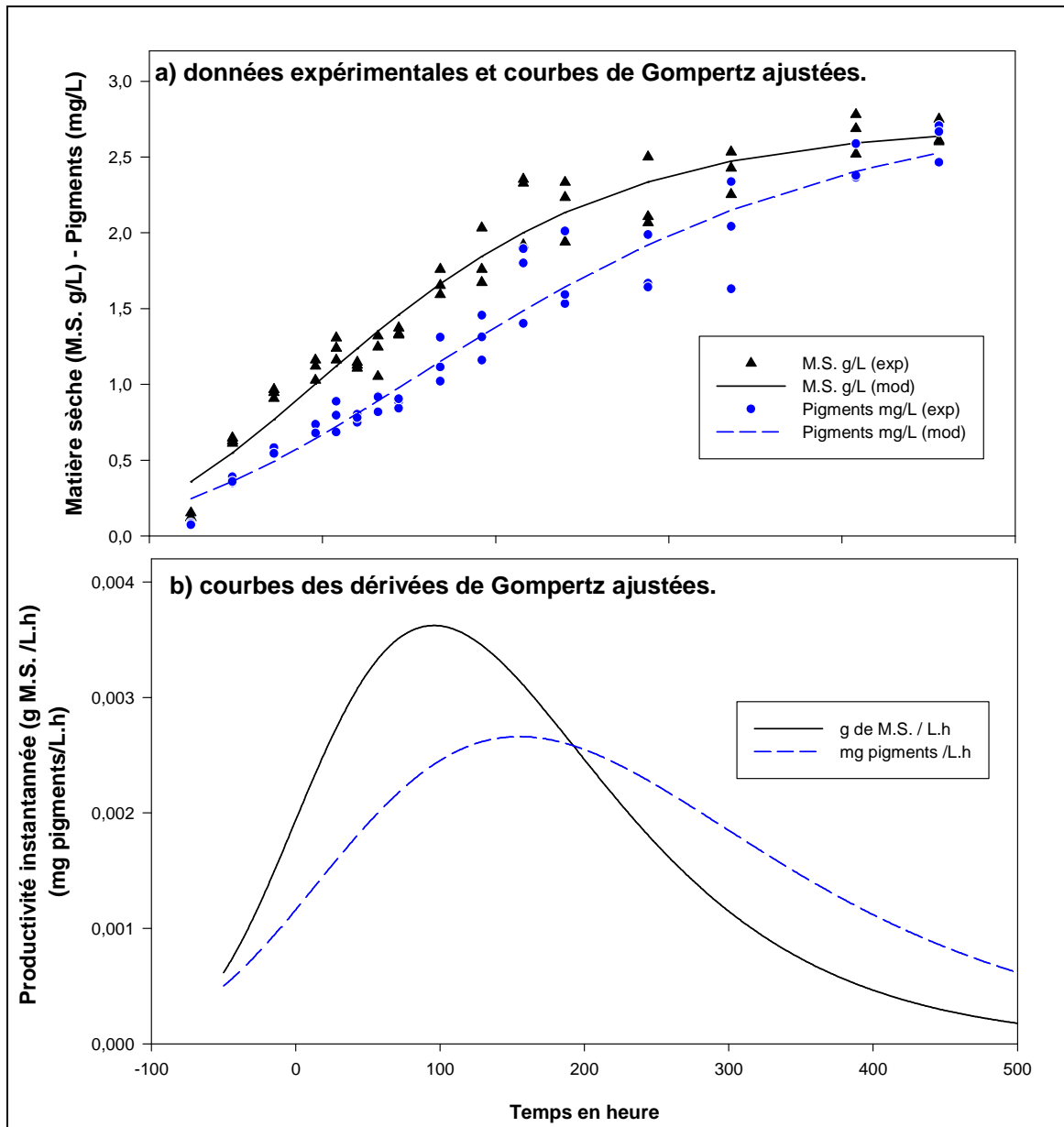
Les productions de biomasse et de pigments par *M. aurum* ont des valeurs intermédiaires à celles obtenues pour *B. linens* et *S. mediolani*. Ces valeurs obtenues après 408 heures de culture sont les suivantes :

- production maximale de biomasse : 2,66 g/L,
- production maximale de pigments : 2,44 mg/L,
- production spécifique : 0,92 mg/g.

Les courbes relatives aux productions de biomasse et de pigments par *M. aurum* sont présentées dans la figure 31. La phase stationnaire de croissance apparaît tardivement, après de 400 h de culture. Cette croissance est très lente par rapport aux deux autres espèces bactériennes précédemment présentées. Chez certaines espèces de Mycobactéries, la croissance peut prendre plusieurs mois.

Les dérivées des courbes de Gompertz (Fig 31.b) montrent un léger décalage entre le maximum de productivité de biomasse et celui des pigments. On ne peut cependant pas définir la production de caroténoïdes chez *M. aurum* comme un métabolisme secondaire. A la différence de *S. mediolani*, les deux courbes de productivité instantanée chez *M. aurum* ne sont pas totalement séparées.

Les cultures de *M. aurum* utilisées dans la suite des expériences sont âgées de 14 jours. Après ce temps de culture, la culture n'a pas atteint la phase plateau, cependant le contenu pigmentaire (d'un aspect qualitatif) ne varie plus. Afin de limiter les risques de contamination, nous préférons donc arrêter les cultures avant l'arrivée au plateau.



**Figure 31** : Courbes de croissance et de production de pigments par *M. aurum*.  
 a) données expérimentales (exp) et courbe de Gompertz ajustée (mod).  
 b) dérivées des courbes de Gompertz ajustées.

### 1.1.4- Bilan des données obtenues

Les différentes données relatives aux productions de biomasse et de pigments des trois bactéries de notre étude sont rassemblées dans le tableau 6.

Bactérie	Production Biomasse g/L	Production Pigments mg /L	Production spécifique mg/ g.	Temps d'arrivée au plateau*	Caroténogénèse métabolisme
<i>B. linens</i>	1,26	0,97	0,77	80 h	primaire
<i>S. mediolani</i>	4,69	6,49	1,38	120 h	secondaire
<i>M. aurum</i>	2,66	2,44	0,92	408 h	non définie

**Tableau 6** : Production de biomasse et de pigments chez les *B. linens* ; *S. mediolani* et *M. aurum*. \*Le temps d'arrivée au plateau correspond aux temps auxquels les productions de biomasse et de pigments sont stabilisées.

*B. linens* produit peu de pigment comparé aux deux autres bactéries, mais c'est la bactérie qui se développe le plus vite. De plus, la caroténogénèse chez *B. linens* est mise en place dès le début de la croissance.

*S. mediolani* est la bactérie dont la caroténogénèse est la plus importante.

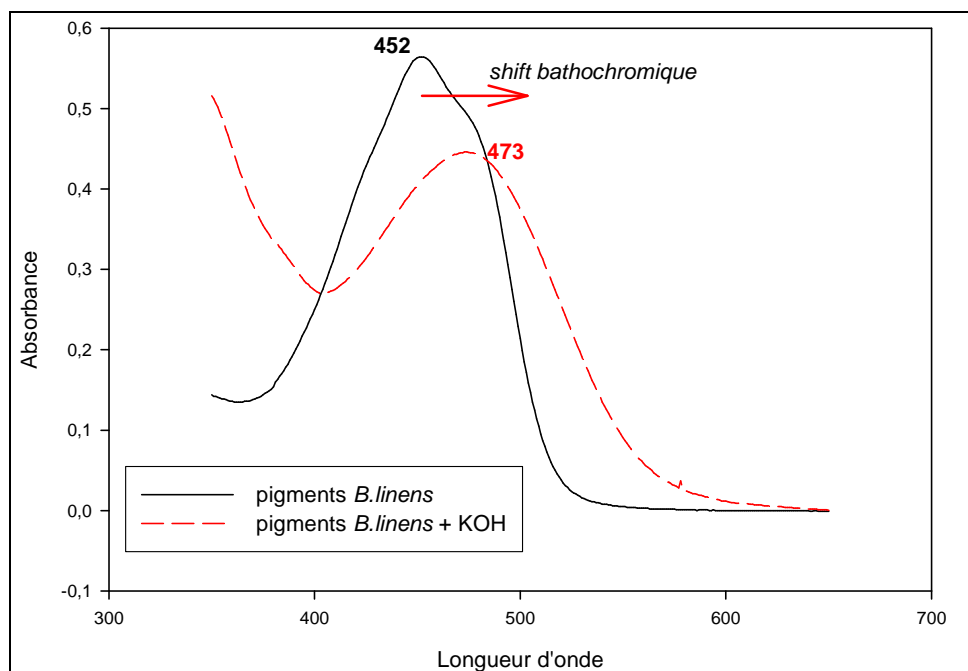
Pour *M. aurum*, les valeurs de production de biomasse et de pigments ainsi que le type de métabolisme placent cette bactérie à un niveau intermédiaire entre *B. linens* et *S. mediolani*.

Aux vues des cinétiques présentées, nous avons choisis d'utiliser des cultures âgées de 5 jours pour *B. linens* et *S. mediolani* dans les études qui vont suivre. En effet à ce stade la caroténogénèse semble arrivée à son terme. Dans le cas de *M. aurum*, des cultures de âgées de 14 jours sont employées. En effet, à ce stade, la composition pigmentaire ne varie plus qualitativement.

## 1.2- Effet d'une base forte sur le spectre d'absorbance des pigments : Réaction phénolate

### 1.2.1- Spectre d'absorbance des pigments de *B. linens*

Les pigments de *B. linens* ont un maximum d'absorbance à 452 nm (Fig. 32).

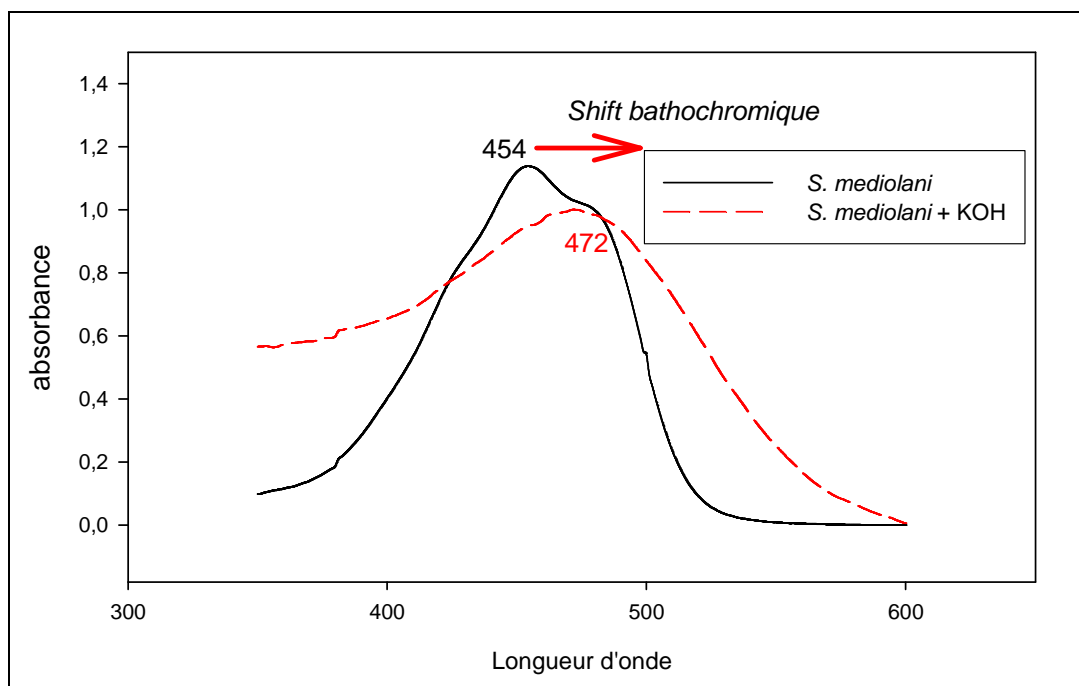


**Figure 32** : Spectres d'absorbance des pigments de *B. linens* avec et sans KOH.

L'ajout d'une base forte entraîne un glissement (shift) de  $\lambda_{\max}$  vers 473 nm. Ce shift de 21 nm est attribué à la présence de caroténoïdes phénoliques comme le di-hydroxy-isoréniératène. En effet le  $\lambda_{\max}$  des caroténoïdes phénoliques augmente lorsqu'ils sont en milieu basique [20].

### 1.2.2- Spectre d'absorbance des pigments de *S. mediolani*

L'absorbance maximale des pigments de *S. mediolani* se situe à 454 nm (Fig. 33). L'ajout de KOH se caractérise également par un shift bathochromique de 18 nm attribué lui aussi à la présence de caroténoïdes phénoliques.



**Figure 33** : Spectres d'absorbance des pigments de *S. mediolani* avec et sans KOH.

### 1.2.3- Spectre d'absorbance des pigments de *M. aurum*

Ce test a été pratiqué sur les extraits totaux, sur les extraits méthanoliques puis acétoniques (Fig. 34). L'ajout de KOH sur les pigments totaux de *M. aurum* semble entraîner un shift bathochromique. Ce shift est toutefois plus faible que ceux observés précédemment. Cependant, ce phénomène n'est pas retrouvé avec les pigments de *M. aurum* issus de la fraction méthanolique seule, ni même sur ceux issus de la fraction acétonique seule.

On ne peut donc pas conclure sur la présence ou non de caroténoïdes phénoliques. Ce test constitue une première interrogation quant à la véritable identité des pigments synthétisés par *M. aurum*.

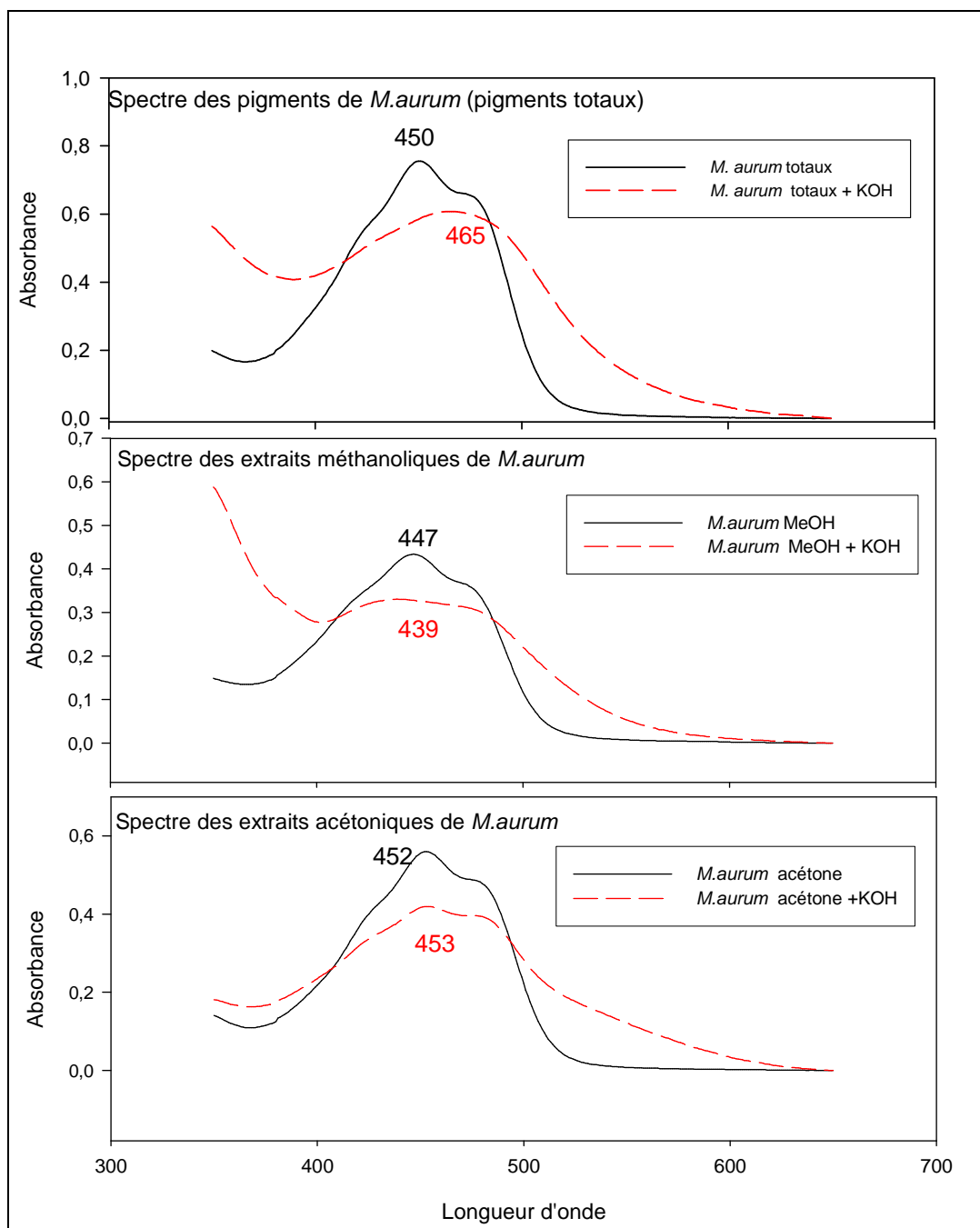


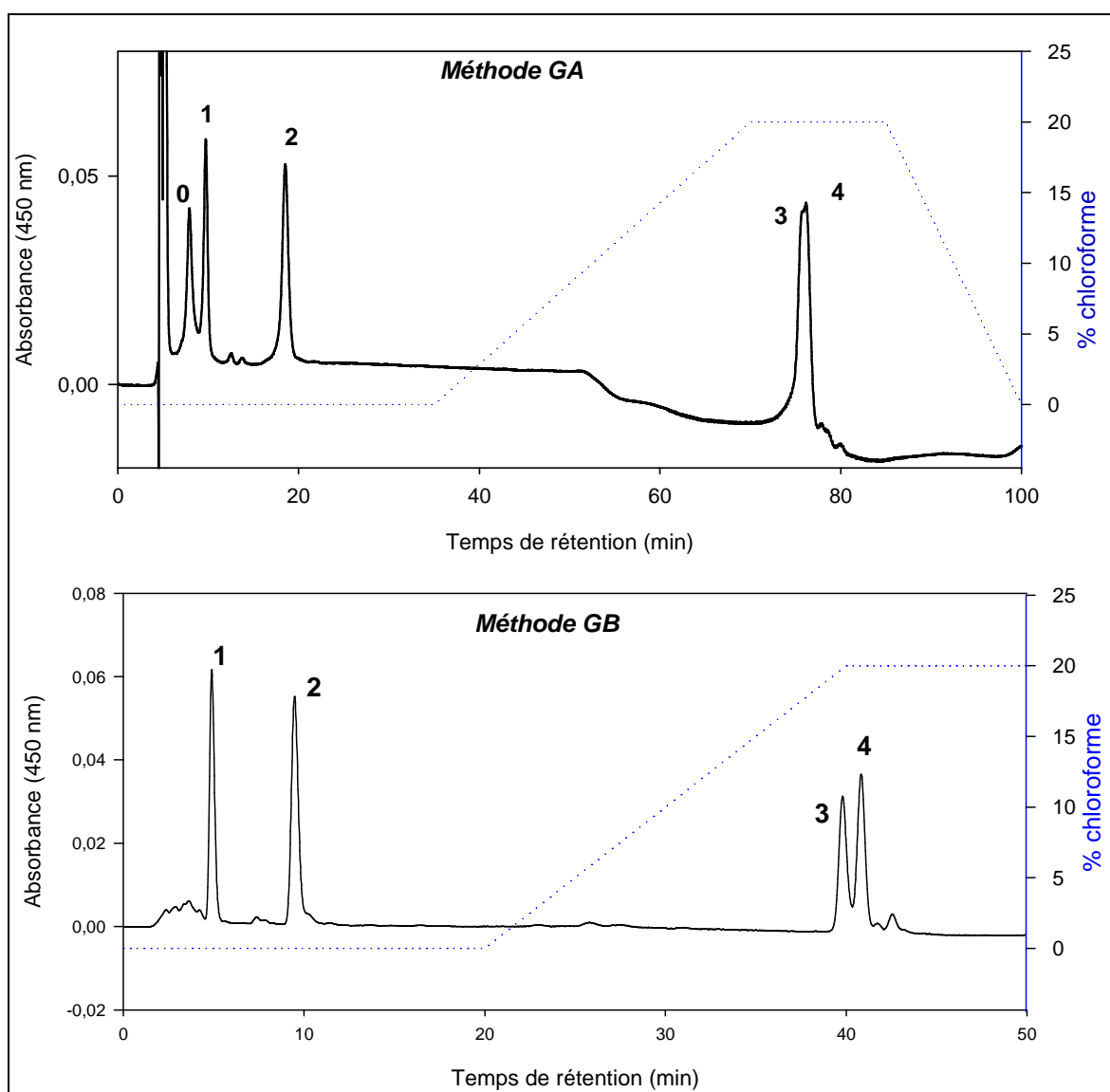
Figure 34 : Spectres d'absorbance des pigments de *M. aurum* avec et sans KOH.



## 1.3- Caractérisation des caroténoïdes par HPLC

### 1.3.1- Les standards

Au cours de ces travaux deux types de méthodes HPLC ont été utilisés. La première méthode utilisée (appelée GA), est celle présentée dans l'étude portant sur la production de caroténoïdes par différentes souches de *B. linens* [42]. Nous avons ensuite mis au point un nouveau gradient d'élution appelé GB, aussi performant en séparation et beaucoup moins long. L'élution de différents caroténoïdes standard avec ces deux méthodes est



**Figure 35** : Séparation de caroténoïdes standard selon 2 méthodes HPLC.

**0** : Astaxanthine ; **1** : Zéaxanthine ; **2** : Canthaxanthine ; **3** : Lycopène et **4** : β-carotène.

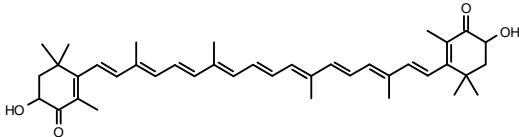
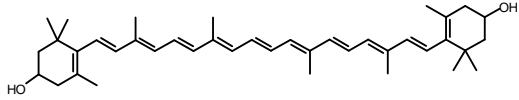
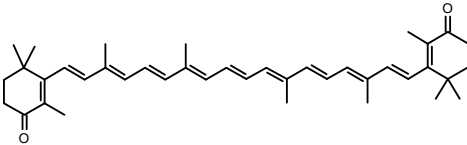
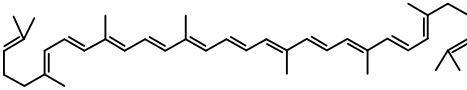
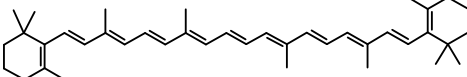
présentée dans la figure 35.

L'utilisation de la méthode GB, bien que plus rapide, n'affecte pas la qualité de la séparation des caroténoïdes. Au contraire elle semble meilleure pour séparer les carotènes (lycopène et  $\beta$ -carotène sont élués séparément). L'utilisation de la méthode GB sera donc privilégiée. Ainsi la présence de chromatogramme HPLC de 100 min (relatif à la méthode GA), correspond à des expériences antérieures à l'amélioration de la méthode HPLC.

La séparation des caroténoïdes se fait selon des critères de polarité. Ils sont élués dans l'ordre décroissant de leur polarité. En début d'analyse, la phase mobile est uniquement constituée de méthanol à 100 %. Elle permet alors l'élution des caroténoïdes polaires comme l'astaxanthine, la zéaxanthine et la canthaxanthine (Tableau 7).

Ensuite, la polarité de la phase mobile est modifiée par un gradient de chloroforme qui permet l'élution des caroténoïdes apolaires. Lorsque la phase mobile atteint 20% de chloroforme, le lycopène et le  $\beta$ -carotène sont élués.

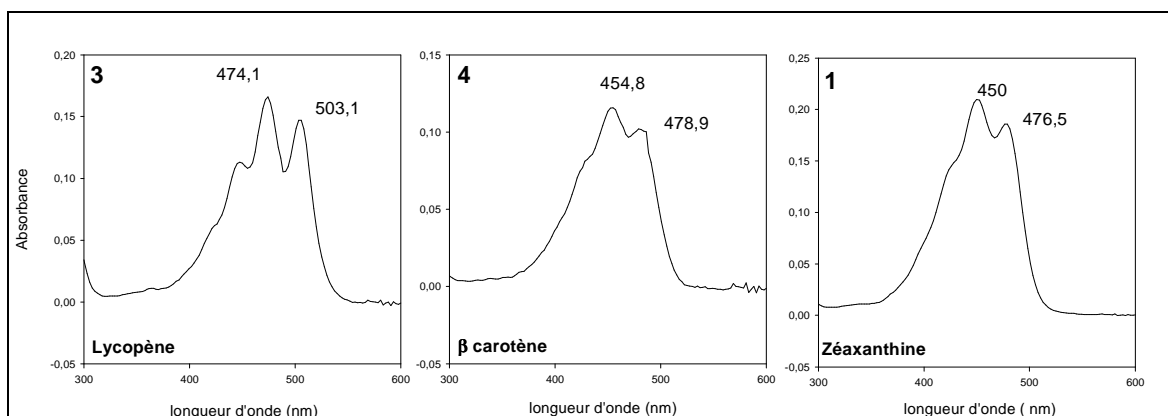
L'analyse de caroténoïdes selon cette méthode HPLC, permet d'apprécier la polarité de la molécule étudiée. L'élution d'un caroténoïde entre 0 et 20 min (cas de GB), indiquera la nature polaire du composé, signe de présence d'au moins un atome d'oxygène dans sa structure (xanthophylle). Un temps de rétention supérieur à 20 min, montrera la présence d'un composé apolaire.

Nom	Formule	TR <sub>(GA)</sub> (min)	TR <sub>(GB)</sub> (min)	λ <sub>max</sub> (nm)
0 Astaxanthine		7,92	non testé	476,5
1 Zéaxanthine		9,73	5	450 476,5
2 Canthaxanthine		18,53	9,58	476,5
3 Lycopène		75,5	39,9	474,1 503,1
4 β-carotène		76,16	40,93	454,8 478,9

**Tableau 7** : Caroténoïdes standard utilisés pour les analyses HPLC. TR<sub>(GA)</sub>: temps de rétention avec la méthode GA. TR<sub>(GB)</sub>: temps de rétention avec la méthode GB.

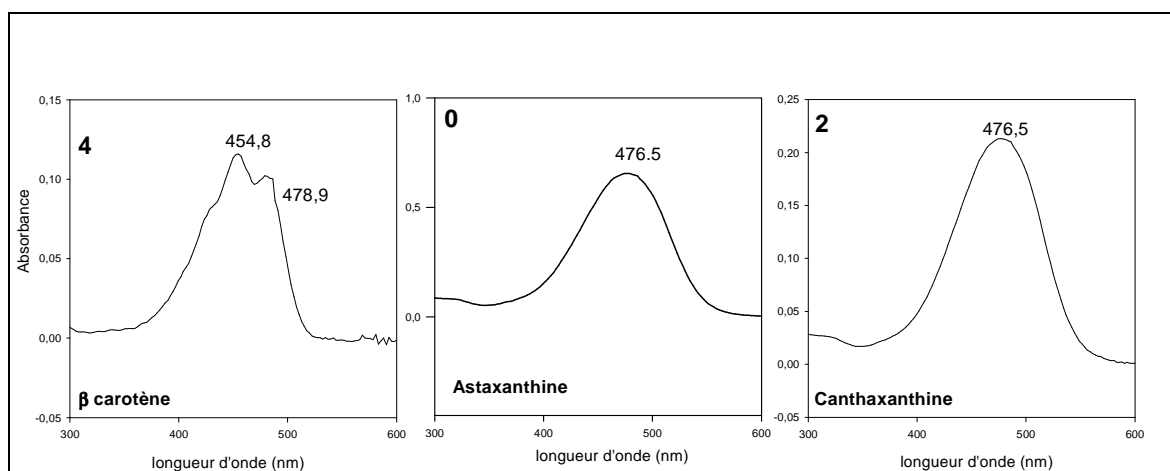
La séparation de différents caroténoïdes d'un mélange par HPLC permet également d'accéder au spectre d'absorbance spécifique à chaque composé. L'observation du spectre d'absorbance apporte des informations importantes sur la structure du caroténoïde [20].

La comparaison des spectres d'absorbance du lycopène d'une part et du β-carotène ou de la zéaxanthine d'autre part (Fig. 36) met en évidence l'effet lissant de la cyclisation sur l'allure du spectre. Les deux pics bien marqués dans le spectre du lycopène sont nettement moins proéminents dans les spectres des caroténoïdes à structures cycliques comme le β-carotène et la zéaxanthine. En revanche les spectres du β-carotène et de la zéaxanthine montrent que l'addition d'une fonction hydroxyle n'induit pas de modification de l'allure générale du spectre d'absorbance.



**Figure 36** : Spectres d'absorbance des caroténoïdes standard : Lycopène ;  $\beta$ -carotène et Zéaxanthine.

L'allure des spectres est également modifiée par la présence de cycle cétone. Dans ce cas, l'effet observé est encore plus important. L'astaxanthine et la canthaxanthine voient leur spectre d'absorbance s'arrondir considérablement. Les spectres ne présentent alors qu'un seul pic d'absorbance (Fig. 37).



**Figure 37** : Spectres d'absorbance des caroténoïdes standard :  $\beta$ -carotène , Astaxanthine et Canthaxanthine.

D'une part, la méthode de séparation par HPLC en phase inverse permet d'apprécier la polarité des caroténoïdes. D'autre part, l'utilisation d'un détecteur à barrette de diodes couplée à l'HPLC s'avère être un outil très utile pour obtenir des informations sur la structure des caroténoïdes (présence de cycle et état d'oxygénation).

### 1.3.2- Profil HPLC des pigments de *B. linens*

Le chromatogramme issu de l'analyse HPLC des pigments de *B. linens* est présenté dans la figure 38. Tous les pigments sont élués entre 7 et 10 min. L'éluion en début d'analyse, témoigne de la polarité des pigments de *B. linens*.

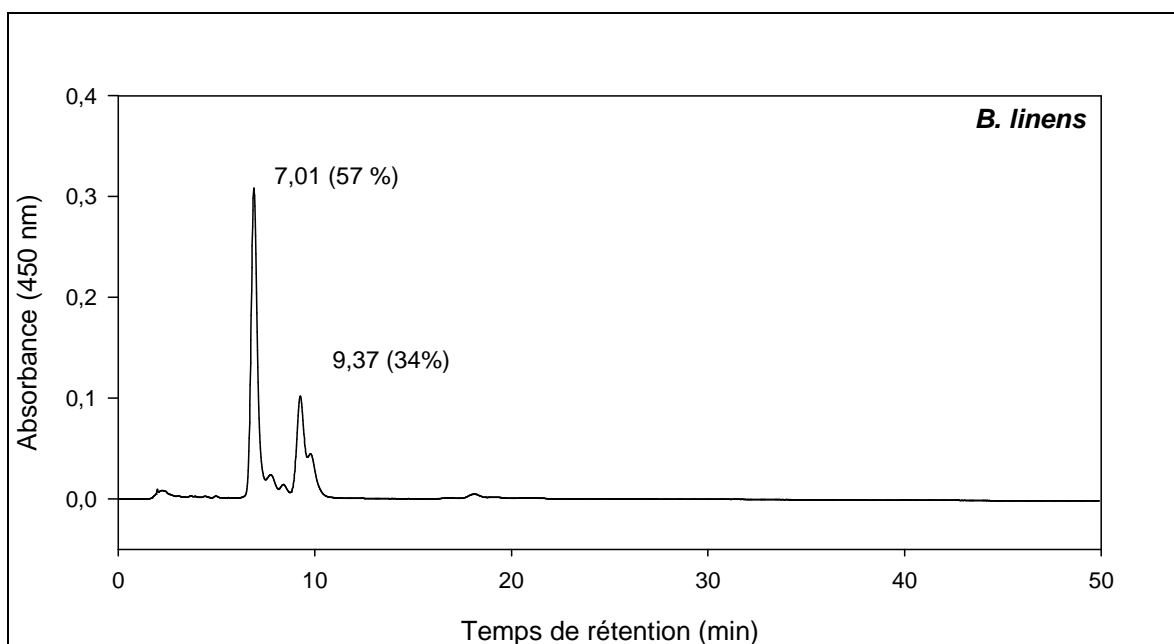


Figure 38 : Chromatogramme des pigments de *B. linens*.

Le caroténoïde majoritaire, élué à 7 min représente 57 % de l'ensemble des caroténoïdes. L'autre pigment prédominant est élué à 9,37 min et correspond à 34 % des pigments totaux. Cette bactérie accumule exclusivement des caroténoïdes oxygénés : des xanthophylles.

Les spectres d'absorbance des composés majoritaires sont présentés dans la figure 39.

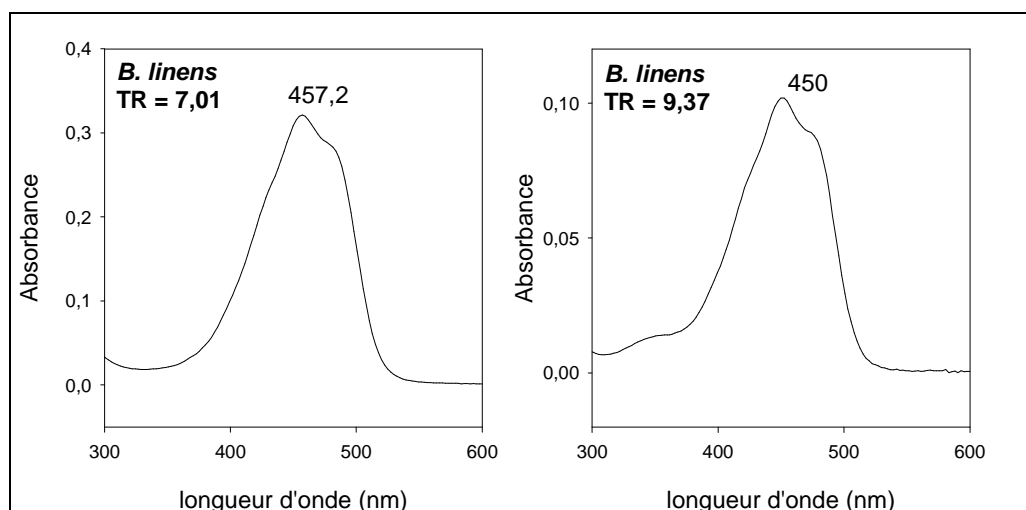


Figure 39 : Spectres d'absorbance des pigments majoritairement accumulés par *B. linens*.

Bien que les  $\lambda_{\max}$  des deux composés majoritaires soient différents, l'allure des spectres d'absorbance des deux composés est similaire. Le shift de  $\lambda_{\max}$  de quelques nanomètres peut correspondre à des isomères *cis/trans*. De plus le spectre du composé élué à 9,37 min laisse entrevoir un pic d'absorbance de faible amplitude aux environs de 340nm. En effet, ce type de pic, qui apparaît généralement 142 nm avant le plus grand  $\lambda_{\max}$ , correspond aux structures tout *trans*. Ce phénomène est surtout observé dans l'hexane [20].

Ces spectres ne correspondent pas à des structures linéaires. Ils ne présentent qu'un seul pic d'absorbance. Cependant l'allure des spectres n'est pas totalement arrondie comme dans le cas des caroténoïdes à cycle cétone. L'allure des spectres semble correspondre à une structure intermédiaire entre celle des caroténoïdes comportant un cycle  $\beta$  et celle des caroténoïdes comportant un cycle cétone. Les composés accumulés par *B. linens* peuvent être des caroténoïdes à structure cyclique, mais dont le type de cycle ne peut être identifié ici.

L'étude HPLC présentée ici permet d'établir la présence de deux pigments majoritaires chez *B. linens*, probablement des isomères *cis/trans*. Elle permet de préciser que ces pigments sont des xanthophylles à structure cyclique. La nature du cycle reste à définir.

### 1.3.3- Profil HPLC des pigments de *S. mediolani*

Le chromatogramme HPLC représentant le profil pigmentaire de *S. mediolani* (Fig. 40) comporte trois types de caroténoïdes séparés en trois groupes A, B, C.

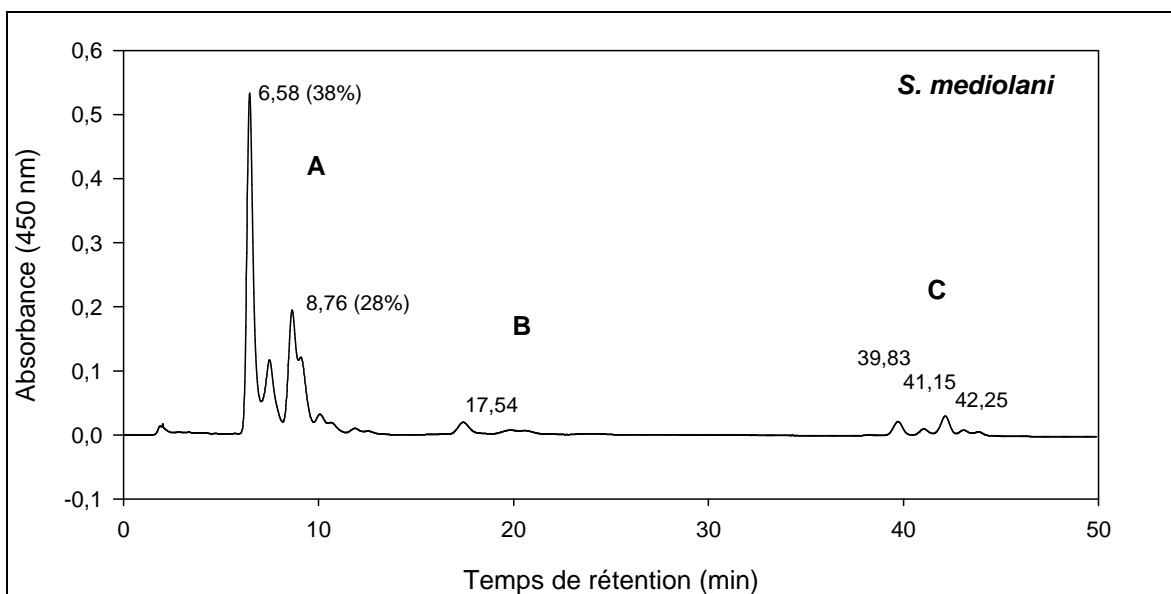
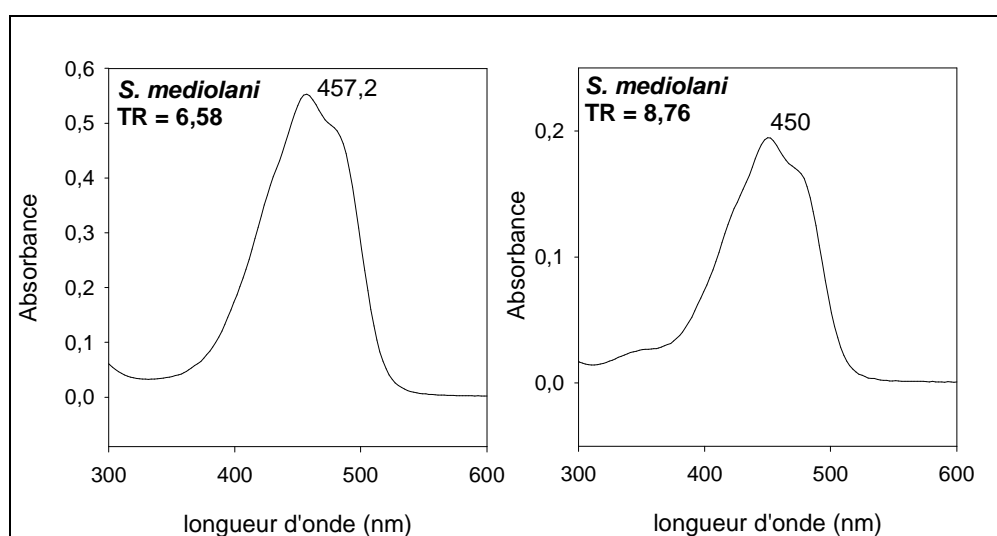


Figure 40 : Chromatogramme des pigments de *S. mediolani*.

- Le premier groupe de caroténoïdes (A) rassemble tous les composés élués entre 6 et 10 min, il s'agit de caroténoïdes polaires. Ce groupe représente 86 % des pigments totaux.
- Le deuxième groupe (B) comprend les caroténoïdes élués entre 17 et 22 min. Ces caroténoïdes sont dits de polarité intermédiaire et représentent 5% des pigments totaux.
- Enfin le troisième groupe (C) rassemble les trois pigments élués par une phase mobile apolaire, entre 39 et 43 min. Ce groupe correspond aux caroténoïdes apolaires et constitue 9% des pigments totaux.

Ces deux derniers groupes sont peu représentés. Ils peuvent correspondre à des traces de caroténoïdes intermédiaires dans la voie de biosynthèse.

Les pigments majoritairement accumulés par *S. mediolani* sont des xanthophylles. Le profil des caroténoïdes polaires de *S. mediolani* est similaire à celui de *B. linens*. Les deux composés principaux élués à 6,58 et 8,76 min représentent respectivement 38 et 28% des caroténoïdes totaux de *S. mediolani*. Les spectres d'absorbance de ces composés majoritaires (Fig. 41) sont identiques à ceux de *B. linens*.



**Figure 41** : Spectres d'absorbance des pigments majoritairement accumulés par *S. mediolani*.

Les pigments accumulés par *S. mediolani* ont donc les mêmes caractéristiques que ceux de *B. linens*. On peut en déduire que *S. mediolani* accumule principalement deux pigments, probablement des isomères *cis/trans*. Ces pigments sont des xanthophylles à structure cyclique. On notera néanmoins la présence de traces de caroténoïdes

intermédiaires à la caroténogénèse dans le profil pigmentaire de *S. mediolani*, caroténoïdes absents dans le profil pigmentaire de *B. linens*.

### 1.3.4- Profil HPLC des pigments de *M. aurum*

Le profil pigmentaire de *M. aurum* est très différent de ceux observés jusqu'ici (Fig. 42).

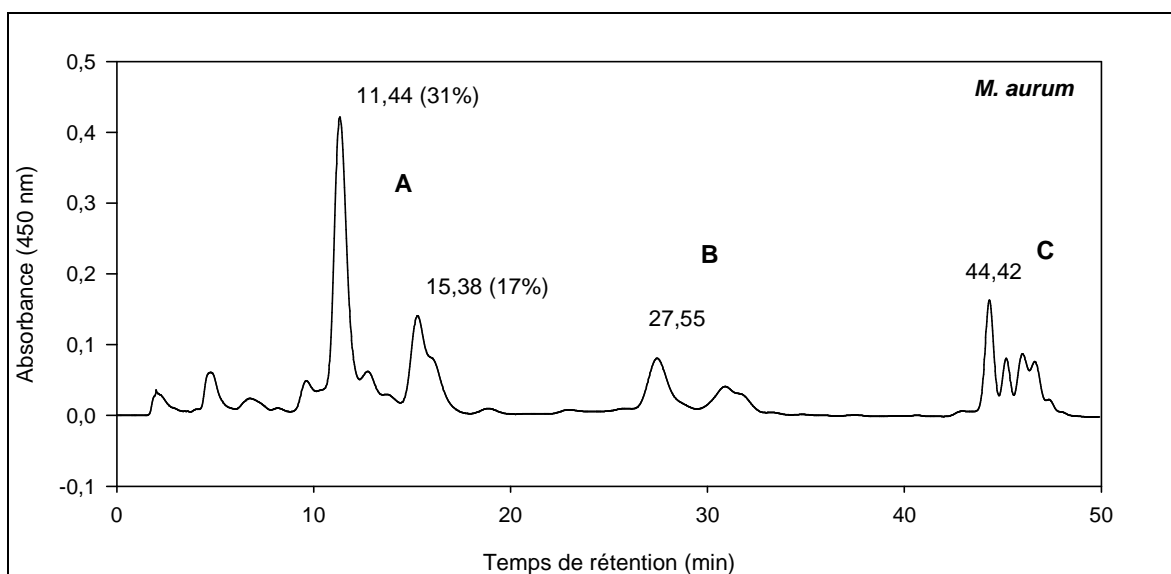


Figure 42 : Chromatogramme des pigments de *M. aurum*.

Il présente beaucoup de pigments différents. Ces pigments peuvent être divisés en trois groupes :

- A : pigments polaires (élus entre 5 et 16 min) représentant 64% des pigments totaux
- B : pigments de polarité intermédiaire (élus entre 27 et 31 min) représentant 13% des pigments totaux
- C : pigments apolaires (élus entre 44 et 47 min) représentant 23% des pigments totaux

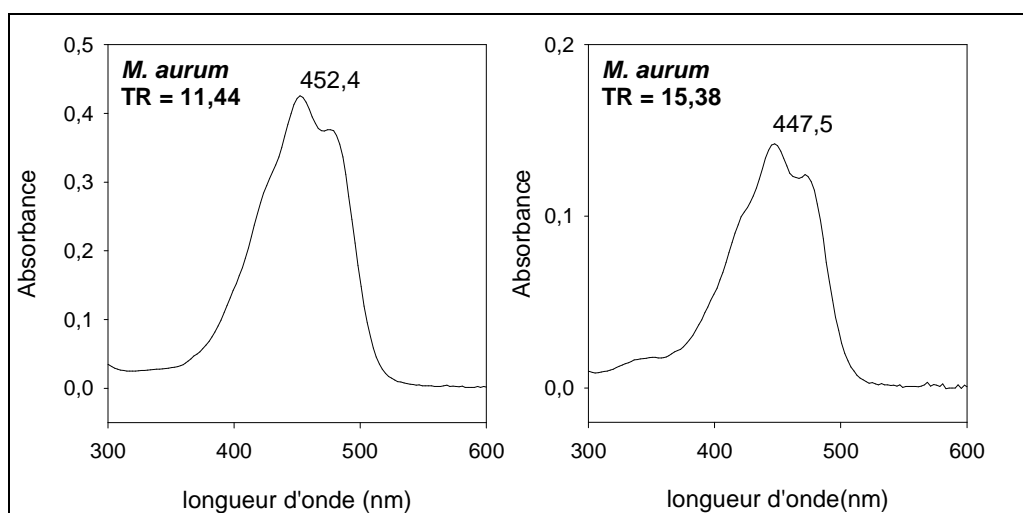
Les pigments des groupes B et C sont probablement des caroténoïdes intermédiaires dans la biosynthèse. Ces formes intermédiaires sont beaucoup plus représentées que chez *S. mediolani*.

Les pigments polaires sont majoritaires et possèdent deux formes prédominantes. Les composés élués à 11,44 min et 15,38 min représentant respectivement 31 et 17 % des



pigments totaux. Les temps de rétention de ces composés sont supérieurs à ceux des caroténoïdes accumulés par *B. linens* et *S. mediolani*. La polarité des pigments majoritaires accumulés par *M. aurum* est donc inférieure à celle des pigments principaux de *B. linens* et *S. mediolani*.

Les spectres d'absorbance (Fig. 43) des composés élués à 11,44 min et 15,38 min possèdent des  $\lambda_{\max}$  différents. L'allure globale des deux spectres est la même, elle s'apparente à celle des caroténoïdes à structure cyclique. Les deux composés seraient des isomères *cis/trans*. Cependant ces spectres sont différents de ceux observés pour *B. linens* et *S. mediolani*.



**Figure 43** : Spectres d'absorbance des pigments majoritairement accumulés par *M. aurum*.

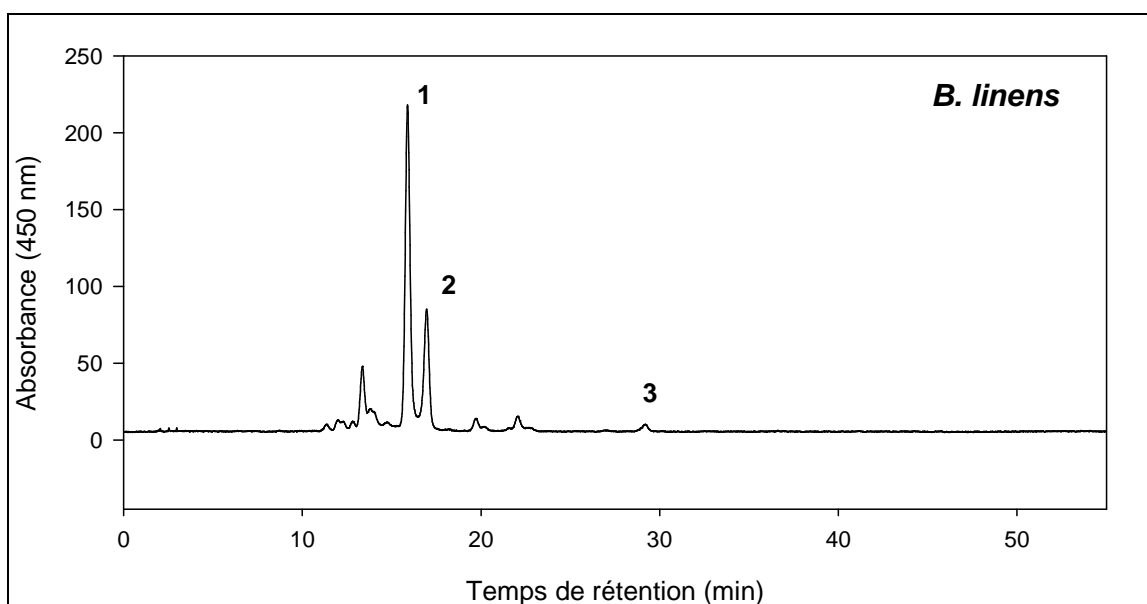
*M. aurum* accumule plusieurs types de caroténoïdes, parmi eux deux composés majoritaires correspondant certainement au produit final de la caroténogénèse. Ces deux pigments seraient des isomères *cis/trans* d'un xanthophylle à structure cyclique mais différent de celui rencontré chez les deux autres bactéries.

#### 1.4- Analyses LCMS des caroténoïdes extraits

Les analyses des pigments en LCMS ont été réalisées à l'institut de chimie alimentaire et de chimie analytique de l'université de Hohenheim par le Dr Breithaupt spécialisé dans la caractérisation de caroténoïdes en LCMS [16 , 18].

### 1.4.1- Analyse des pigments de *B. linens* en LCMS

Le chromatogramme obtenu par le Dr Breithaupt est présenté dans la figure 44. Les composés 1 et 2 élués à 15,90 et 16 min sont les plus importants. Le spectre de masse correspondant à ces temps de rétention, donne un m/z de 561. En retirant la masse du proton à ce m/z, on obtient une masse molaire de 560 g.mol<sup>-1</sup> correspondant à celle du di-hydroxy-isoréniératène. *B. linens* accumule du di-hydroxy-isoréniératène comme décrit dans la littérature [56].



**Figure 44** : Chromatogramme des pigments de *B. linens*, issu de l'analyse LCMS.

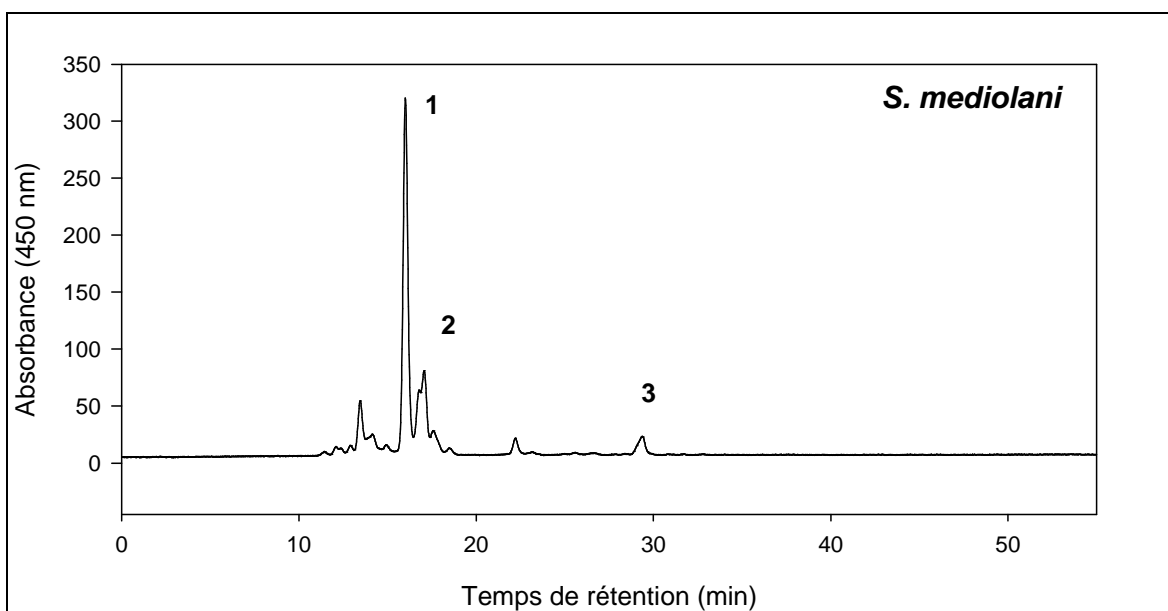
Le composé 3 est en trop faible quantité pour déterminer sa masse avec certitude. Cependant le composé 3 pourrait correspondre à l'isoréniératène.

### 1.4.2- Analyse des pigments de *S. mediolani* en LCMS

Le chromatogramme correspondant à la séparation des pigments de *S. mediolani* en HPLC est présenté par la figure 45. Le profil pigmentaire obtenu ici est très similaire à celui obtenu pour les pigments de *B. linens*. Les composés 1 (élué à 16 min) et 2 (élué à 17,06 min) ont un m/z identique de 561 soit une masse molaire de 560 g.mol<sup>-1</sup>.

Ces composés sont des isomères du di-hydroxy-isoréniératène. *S. mediolani* accumule majoritairement du di-hydroxy-isoréniératène ce qui correspond bien aux

données présentées dans la littérature [1]. Le composé 3 a un  $m/z$  de 529, sa masse molaire est donc de  $528 \text{ g.mol}^{-1}$  et correspond à l'isoréniératène.



**Figure 45** : Chromatogramme des pigments de *S. mediolani*, issu de l'analyse LCMS.

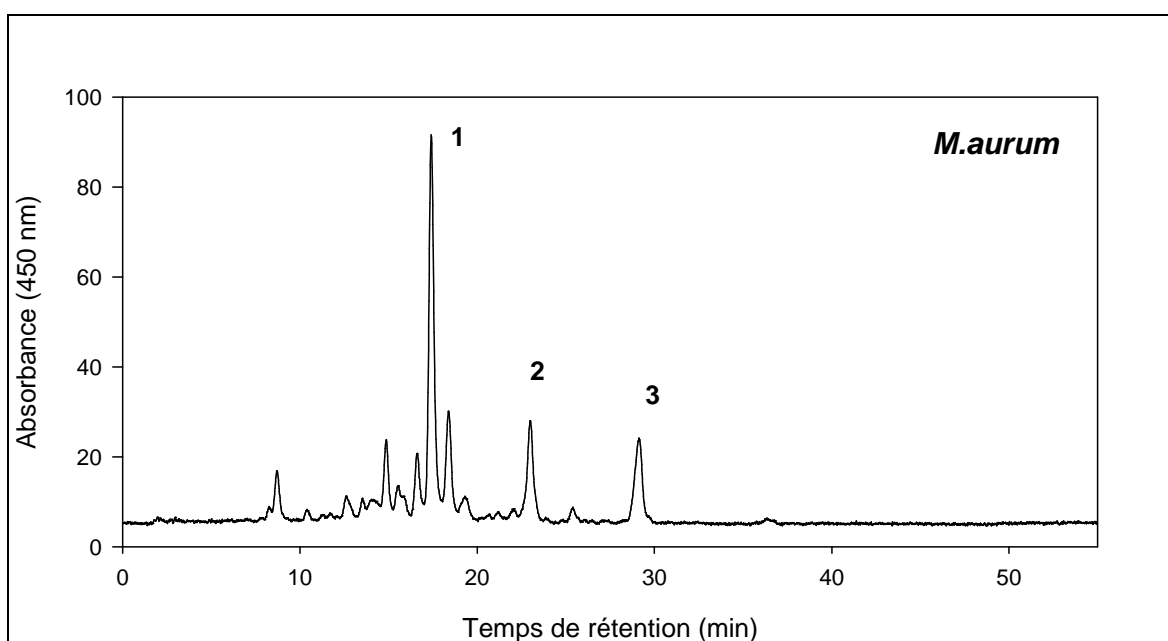
### 1.4.3- Analyse des pigments de *M. aurum* en LCMS

Le chromatogramme des pigments de *M. aurum* apparaît ici aussi différent de ceux obtenus pour les deux autres bactéries (Fig. 46).

Le  $m/z$  des trois composés numérotés a été déterminée :

- le composé 1 élué à 17,41 min, a un  $m/z$  de 589
- le composé 2 élué à 22,99 min, a un  $m/z$  de 559
- le composé 3 élué à 29,13 min, a un  $m/z$  de 529

Seul le composé 3 est identifié comme étant de l'isoréniératène. Les autres composés ont des masses molaires inattendues. Le composé 1 a une masse molaire de  $588 \text{ g.mol}^{-1}$  et le composé 2 a une masse molaire de  $558 \text{ g.mol}^{-1}$ .



**Figure 46** : Chromatogramme des pigments de *M. aurum*, issu de l'analyse LCMS.

Ces composés ne peuvent pas être des dérivés hydroxylés de l'isoréniératène contrairement à ce qui peut être trouvé dans la littérature [129].

## 1.5- Conclusion

### 1.5.1- Etudes des xanthophylles produits par *M. aurum*

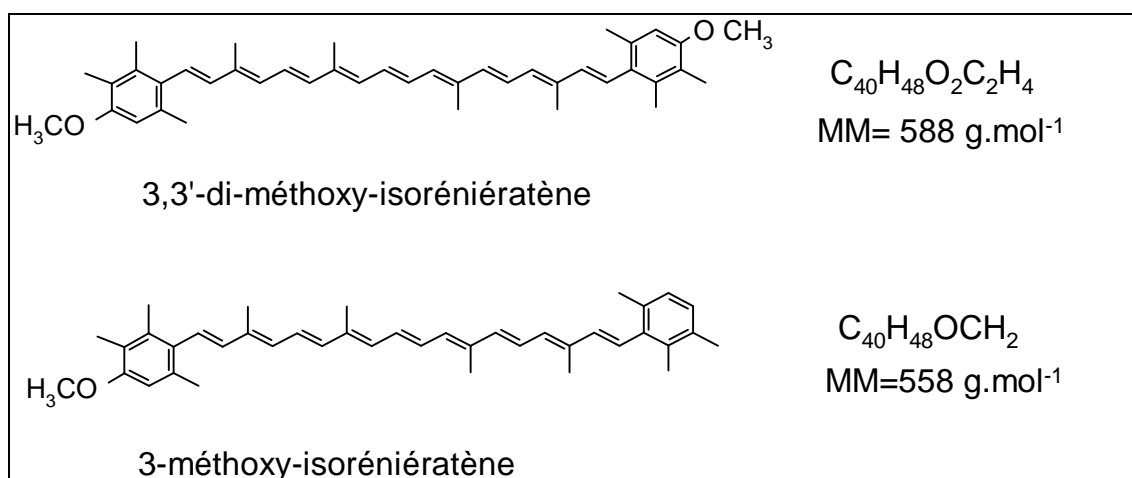
La bibliographie sur les pigments de *M. aurum* présentée dans l'introduction renferme peu d'étude sur l'identification des xanthophylles produits par cette bactérie. Seule l'étude de Viveiros *et al.* [129] indique la synthèse de dérivés hydroxylés de l'isoréniératène. Cependant les résultats présentés dans cette partie nous conduisent à infirmer cette hypothèse. Face à cette contradiction, nous avons réalisé des expériences supplémentaires afin d'identifier ces pigments.

#### 1.5.1.1 L'hypothèse du di-méthoxy-isoréniératène

Suite aux différentes études nous disposons d'indices sur la structure du xanthophylle accumulé majoritairement par *M. aurum* :

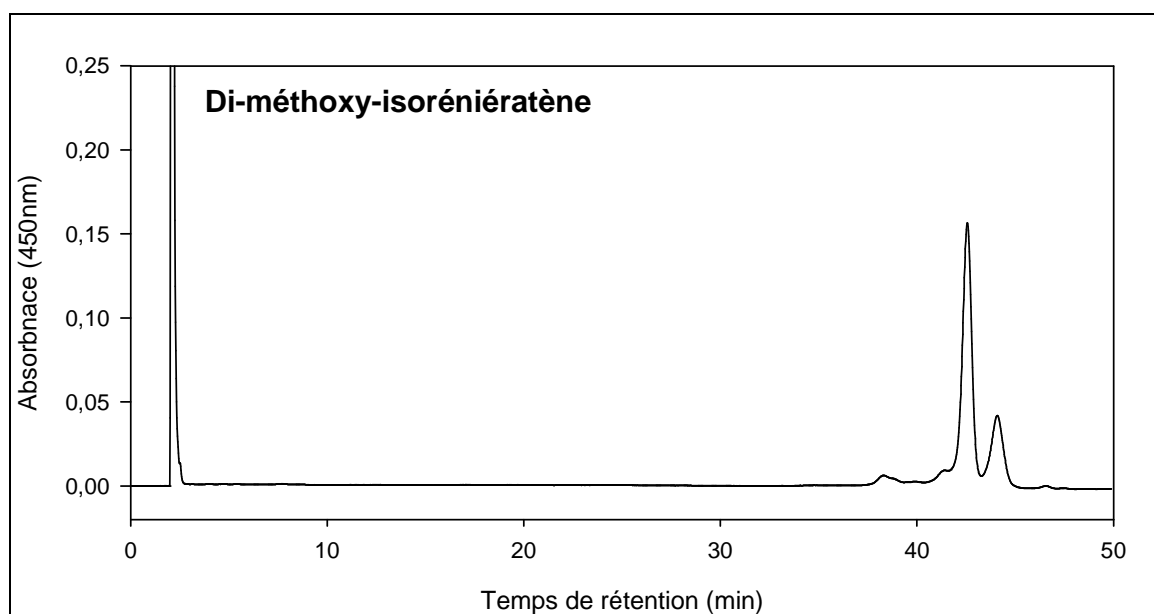
- une structure cyclique différente d'un phénol,
- une nature moins polaire que le di-hydroxy-isoréniératène,
- une MM  $588 \text{ g.mol}^{-1}$  et  $558 \text{ g.mol}^{-1}$ ,
- et pourrait être synthétisé à partir de l'isoréniératène.

L'ensemble de ces indications nous a mené à proposer une structure répondant à ces caractéristiques (Fig. 47).



**Figure 47** : Caroténoïdes hypothétiques proposés pour *M. aurum*.

Nous avons pu vérifier rapidement cette hypothèse en analysant par HPLC du di-méthoxy-isoréniératène synthétisé par le laboratoire CNRS de Chimie des substances naturelles de Quimper [124]. Le chromatogramme obtenu (Fig. 48) montre l'élution de ce composé en condition apolaire, son temps de rétention est supérieur à 40 min. Le xanthophylle synthétisé par *M. aurum* ne peut pas être le di-méthoxy-isoréniératène.



**Figure 48** : Chromatogramme HPLC du di-méthoxy-isoréniératène de synthèse.

Une purification du composé majoritairement accumulé par *M. aurum* a été entreprise, en vue d'une détermination de sa structure par RMN et spectrométrie de masse.

#### 1.5.1.2- Purification des pigments pour une analyse en RMN

La détermination de la structure d'un composé en RMN, nécessite l'utilisation d'un composé purifié en quantité de l'ordre du mg. A partir de 12,5 g de biomasse lyophilisée nous avons extrait 6,8 mg de pigments de *M. aurum*.

Différents types de colonnes ont été testés : C18 semi préparative, C18 semi préparative à compression radiale, C18 analytique et C30 analytique. Les colonnes semi préparatives n'offraient pas une séparation convenable des pigments. Les tentatives de purification à l'aide de colonnes analytiques C18 puis C30 n'ont hélas pas aboutit. En effet, les faibles quantités purifiées, le niveau de pureté ainsi que les isomérisations

provoquées par les évaporations successives n'ont pas permis d'obtenir un signal RMN exploitable.

Nous avons montré que *M. aurum* ne produit pas de dérivés hydroxylés de l'isoréniératène mais un xanthophylle de 588 g.mol<sup>-1</sup> dont la structure demeure inconnue à ce jour.

### 1.5.2 Caractérisation des pigments produits par *B. linens* et *S. mediolani*

*B. linens* et *S. mediolani* sont connues pour synthétiser des caroténoïdes aromatiques : l'isoréniératène et ses dérivés hydroxylés. Dans cette partie, différentes approches ont été utilisées pour caractériser les caroténoïdes aromatiques produits. Les conclusions sont les suivantes :

*B. linens* accumule exclusivement du di-hydroxy-isoréniératène. Ce caroténoïde est présent à 91% dans les extraits pigmentaires sous la forme de deux isomères principaux élués à 7 min et 9,37 min avec la méthode HPLC GB. Avec la méthode HPLC GA on retrouvera ces isomères élués à des temps supérieurs : 12,2 et 16,4 min.

Le di-hydroxy-isoréniératène est présent à 86 % dans les pigments produits par *S. mediolani*. Deux isomères principaux de ce caroténoïde sont élués à 6,58 min et 8,76 min avec la méthode HPLC GB, l'autre méthode HPLC permet l'élution de ces pigments à 12,6 et 16,52 min. Des traces de caroténoïdes intermédiaires à la biosynthèse sont observés : le composé élué à 17,54 min (GB) pourrait être le mono-hydroxy-isoréniératène. L'isoréniératène est retrouvé parmi les composés élués après 39 min (GB).

## 2- Biosynthèse des caroténoïdes aromatiques

Les analyses des caroténoïdes produits par les 3 bactéries étudiées ont confirmé la synthèse de 3,3'-di-hydroxy-isoréniératène chez *B. linens* et *S. mediolani*. La connaissance de la voie de biosynthèse chez ces microorganismes s'arrête à la synthèse de l'isoréniératène. Cette partie est consacrée à l'étude de la formation des dérivés hydroxylés de ce carotène.

*M. aurum* fera également l'objet de telles investigations, bien qu'elle ne synthétise pas les mêmes pigments. Ces études pourraient fournir des indices quant à la nature du composé accumulé.

Dans une première partie, nous recherchons dans les 3 clusters *crt* la présence d'un gène pouvant être responsable de la réaction d'hydroxylation des caroténoïdes étudiés. Ensuite nous procédons à des inhibitions *in vivo* de cette réaction. La troisième partie porte sur l'étude *in vitro* de P450. Enfin la dernière partie sera consacrée à la mutagenèse chez *B. linens*.

### 2.1- Recherche de gène codant une hydroxylase dans le cluster *crt*

Les clusters *crt* des 3 bactéries étudiées renferment des gènes dont la fonction n'est pas encore déterminée. *S. griseus* et *M. aurum* possèdent chacun 2 gènes dans ce cas : *crt T* et *crt V*. Dans le cluster *crt* de *B. linens*, 4 gènes n'ont pas de fonction connue. Parmi eux un gène, l'*orf 10*, qui coderait un cytochrome P450. On cherche à obtenir des informations relatives aux fonctions de ces gènes. Pour ce faire nous procédons à des recherches de séquences homologues à celles d'intérêt.



### 2.1.1- Etude des séquences de gènes *crt T* et *crt V* de *S. griseus* et *M. aurum*

Les séquences des gènes présents dans le cluster *crt* sont disponibles sur NCBI avec les numéros d'accès X95596 pour *S. griseus* et AJ133724 pour *M. aurum*.

L'analyse fonctionnelle du cluster *crt* de *S. griseus* [59] révèle que les gènes *crt T* et *crt V* ne sont pas utiles à la synthèse d'isoréniératène. Dans le cas où le cluster *crt* de *S. mediolani* serait similaire à celui de *S. griseus*, on peut se demander si ces deux gènes pourraient être impliqués dans la réaction d'hydroxylation à l'origine de la formation des dérivés hydroxylés de l'isoréniératène chez *S. mediolani*. L'analyse de la séquence en acides aminés des protéines d'intérêts est effectuée avec le programme BLAST-p du site NCBI. Cette analyse confirme l'appartenance de *Crt T* à la famille des méthyltransférases. L'analyse de la séquence de *Crt V* montre qu'elle possède un domaine conservé nommé Rieske. Ce domaine possède un centre à deux atomes de fer et deux atomes de soufre [2 Fe<sub>2</sub>S]. *Crt V* possède alors des similarités avec des méthylesterase, dioxygénase et ferredoxine. *Crt V* aurait peut être un rôle de transfert d'électron, mais en aucun cas n'est retrouvé la présence de gènes codant des carotènes oxygénases connues. L'étude du cluster *crt* de *S. griseus* ne nous fournit donc pas de piste sur l'identité de l'enzyme responsable de l'hydroxylation dans la synthèse de di-hydroxy-isoréniératène.

L'analyse fonctionnelle du cluster *crt* de *M. aurum* [129] a également montré la présence de 2 gènes *crt T* et *crt V* dont on ne connaît pas exactement la fonction. Les protéines codées par ces gènes sont environ 50 % identiques à celles de *S. griseus*. L'étude des séquences mène aux mêmes conclusions que celles émises pour *S. griseus*. Nous savons que *M. aurum* ne synthétise pas de dérivés hydroxylés de l'isoréniératène. Cette analyse ne donne pas plus d'information sur les réactions postérieures à la formation de l'isoréniératène et la nature de xanthophylles produits chez *M. aurum*.

### 2.1.2- Recherche de séquences homologues à celle de l' ORF 10 de *B. linens*

La séquence de l'ORF 10 du cluster *crt* de *B. linens* ATCC 9175 publiée [57] est disponible sur NCBI avec le numéro d'accès AAF65589 (séquence en acide aminé). Le gène (*orf 10*) fait 1230 paires de bases et code une protéine (ORF 10) de 409 acides aminés (annexe 1). On utilisera la notation suivante :

*orf 10* : pour le gène ,

ORF 10 : pour la protéine.

Le tableau 8 regroupe les séquences les plus proches de celle l'ORF 10 obtenues à la suite d'un BLAST-p sur NCBI.

N° Accès	Organisme	Définition	Score	E	% identité	%positif
NP_733733	<i>S. coelicolor</i>	P 450 putatif	195	$2.10^{-48}$	34%	51%
NP_302391	<i>M. leprae TN</i>	P 450 putatif	60,5	$8.10^{-08}$	24%	39%
NP_918024	<i>O. sativa</i>	P 450 putatif	54,3	$5.10^{-06}$	26%	42%
CAA15483	<i>M. leprae</i>	P 450	53,9	$6.10^{-06}$	26%	38%
Q55080	<i>S. solfataricus</i>	P450, CYP 119	53,9	$7.10^{-06}$	23%	40%

**Tableau 8:** Séquences similaires à l'ORF 10 de *B. linens* après BLAST-p sur NCBI.

Toutes les séquences qui présentent une similarité avec l'ORF 10 sont des cytochromes P450. Ce BLAST confirme l'appartenance de l'ORF 10 à la famille des P450. Les P450 présentent dans leur partie carboxy-terminale une séquence consensus plus ou moins conservée correspondant au domaine principal de liaison de l'hème. Cette séquence consensus [78]est la suivante :

[FW]-[SGNH]-x-[GD]-x-[RKHPT]-x-C-[LIVMFAP]-[GAD].

La cystéine de cette séquence est le seul acide aminé directement lié à l'hème par une liaison covalente. La liaison s'effectue avec le fer de hème, il s'agit une liaison fer-soufre. Cette cystéine joue un rôle essentiel dans le processus catalytique du P450.

Un alignement multiple de ces séquences les plus proches est réalisé avec la fonction clustalW du logiciel BioEdit©. Cet alignement permet de repérer clairement la séquence consensus du principal domaine de liaison de l'hème. Ce motif est considéré comme la signature d'un P450 (Fig.49).

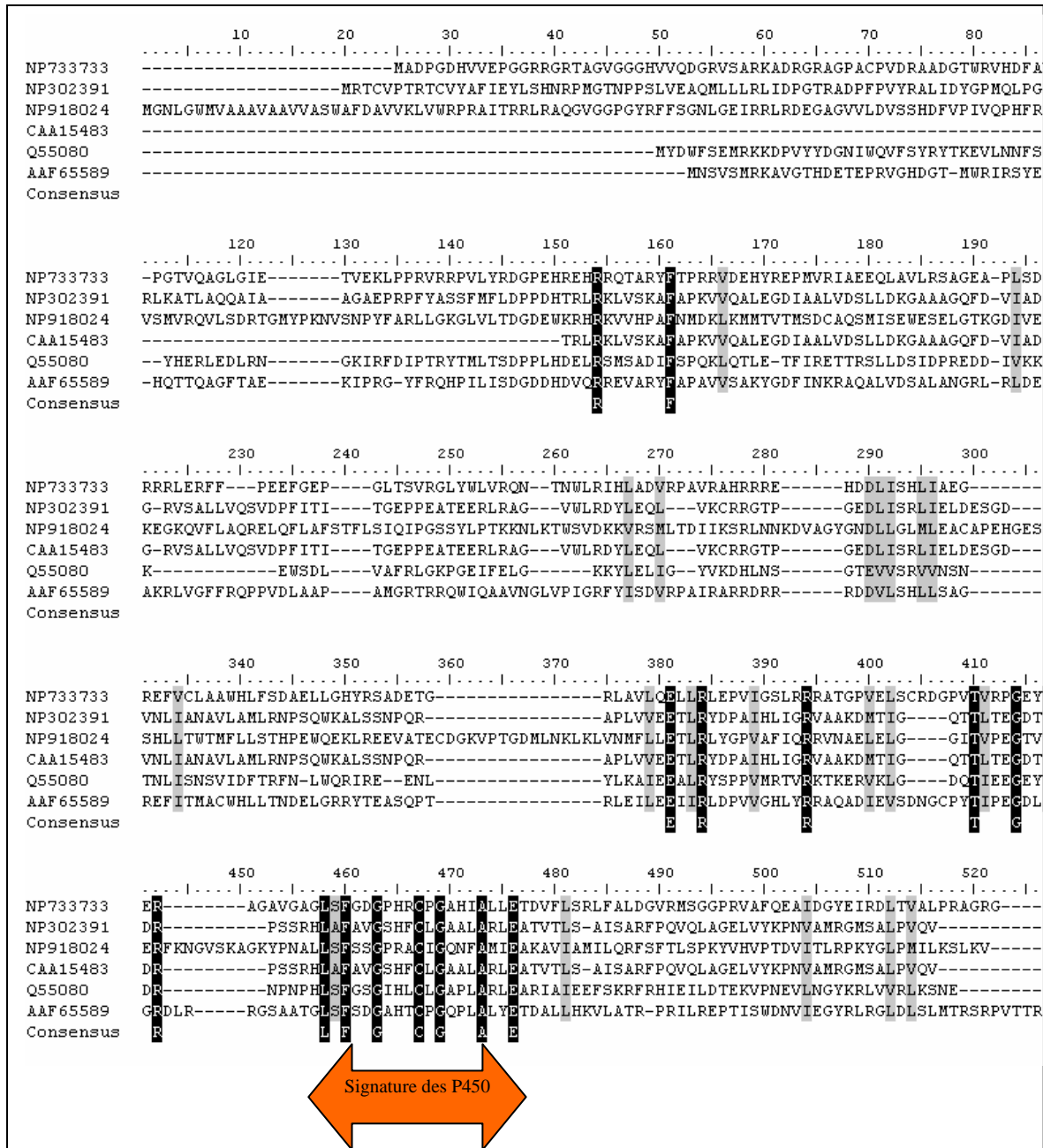


Figure 49 : Alignement des séquences les plus proches de l'ORF 10 de *B. linens* avec le logiciel BioEdit®, matrice protéique utilisée : BLOSUM 62.

Les lettres soulignées correspondent aux acides aminés appartenant à cette séquence consensus (Fig. 50).

```
>Seq_ORF10 cluster crt B. linens ATCC 9175//409 aa (AAF65589)
  1 MNSVSMRKAV GTHDETEPRV GHDGTMWRIR SYEAATTVLR ARHQTTQAGF TAEKIPRGYF
  61 RQHPILISDG DDHDVQRREV ARYFAPAVVS AKYGDFINKR AQUALVDSALA NGRRLRDEAA
 121 LNYSVEVTAE IVGLTDSPID AMAKRLVGFF RQPPVDLAAP AMGRTRRQWI QAAVNGLVPI
 181 GRFYISDVRP AIRARRDRR DDVLSHLLSA GYSTADILVE CVTYGTAGMV TTREFITMAC
 241 WHLLTNDELG RRYTEASQPT RLEILEEIIR LDPVVGHLR RAQADIEVSD NGCPYTIPEG
 301 DLIDVCVRQT NTDPQAMGAA PETVIPGRDL RRGSAATGLS FSDGAHTCPG QPLALYETDA
 361 LLHKVLATRP RILREPTISW DNVIEGYRLR GLDLSLMTRS RPVTTRMTT
```

**Figure 50** : Séquence protéique de l'ORF 10 du cluster *crt* de *B. linens*.

Dans le cas de l'ORF 10 étudié on remarque aisément que ce motif est très bien conservé. Tous les acides aminés de la séquence consensus sont présents dans la séquence de l'ORF 10 :

[FW]-[SGNH]-x-[GD]-x-[RKHPT]-x-C-[LIVMFAP]-[GAD].

Cette conservation est un premier élément laissant envisager que l'enzyme codée par ce gène est un P450 fonctionnel. La fonction de l'ORF 10 est inconnue. En effet, les séquences les plus proches de l'ORF 10 correspondent elles aussi à des P450 de fonction inconnue. Sachant qu'un P450 peut catalyser des réactions de mono-oxygénation comme l'hydroxylation, il pourrait être responsable de la formation de dérivés hydroxylés de l'isoréniératène.

On notera toutefois que ce P450 ne possède aucune similarité significative avec les trois P450, CYP 175 A1, CYP 97A3 et CYP 97 C1 impliqués dans la caroténogénèse chez *Thermus thermophilus* [11] et *Arabidopsis thaliana* [120] présentés dans l'introduction bibliographique.

## 2.2- Inhibitions *in vivo*

Dans cette partie, nous cherchons à connaître la nature de l'enzyme impliquée dans la réaction d'hydroxylation à l'origine de la formation des dérivés hydroxylés de l'isoréniératène. Pour ce faire, nous étudions l'influence de différents inhibiteurs enzymatiques sur la production de caroténoïdes. Sachant que le cluster *crt* de *B. linens* possède un gène codant une monooxygénase de type P450, nous utilisons préférentiellement de inhibiteurs de cytochrome P450.

### 2.2.1- Inhibitions chez *M. aurum*

Plusieurs types d'inhibiteurs sont utilisés dans cette partie, des inhibiteurs de cytochromes P450 comme le métyrapone, le tetcyclacis et le 1-aminobenzotriazole ainsi qu'un inhibiteur de monooxygénase flavinique (FMO) comme le méthimazole. Chacun de ces composés est ajouté à concentrations croissantes dans le milieu de culture. La concentration maximale utilisée correspond à la concentration entraînant une disparition de la croissance bactérienne. A l'issue de la période de croissance les pigments produits sont extraits et analysés par HPLC.

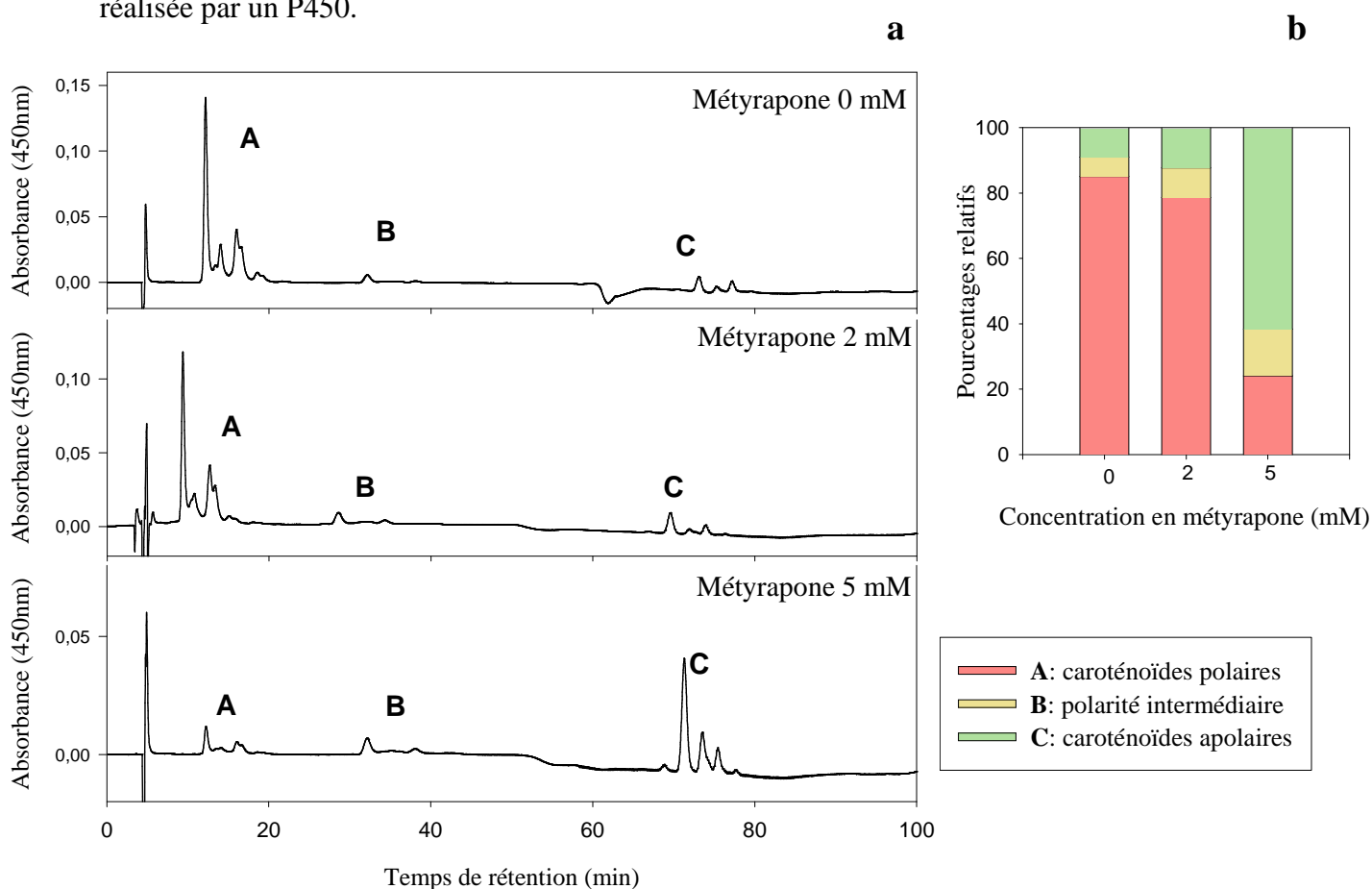
Ces inhibiteurs utilisés à concentration élevée ont occasionné une diminution de la production globale de biomasse et de pigment. Cependant aucun n'a entraîné de modification du profil pigmentaire de *M. aurum* (Fig. 42). L'enzyme responsable de la transformation des carotènes en xanthophylles chez *M. aurum* n'est pas sensible aux composés testés.

Après avoir déterminé que *M. aurum* ne synthétisait pas de di-hydroxy-isoréniératène nous avons souhaité étudier les étapes tardives de la voie de biosynthèse. Cependant l'analyse du cluster *crt* ainsi que ces expériences d'inhibition *in vivo* n'ont pas apporté de réponses quant à l'identité de l'enzyme responsable de l'oxygénation des carotènes.

## 2.2.2- Effecteurs chez *S. mediolani*

### 2.2.2.1- Métyrapone

Le métyrapone est ajouté à différentes concentrations dans le milieu de culture de *S. mediolani*, les résultats de l'analyse des pigments produits dans ces conditions sont présentés par la figure 51. Ces résultats montrent que le métyrapone est peu efficace à 2mM. A 5mM, une inhibition partielle de l'hydroxylation est obtenue, les caroténoïdes apolaires deviennent majoritaires. Le métyrapone est connu pour inhiber les cytochromes P450 [98], ce qui suggère que l'hydroxylation des caroténoïdes chez *S. mediolani* est réalisée par un P450.



**Figure 51** : a : Chromatogrammes des extraits méthanoliques et acétoniques combinés de *Streptomyces mediolani* cultivée en présence de différentes concentrations de métyrapone.  
b : Pourcentages relatifs des trois classes de caroténoïdes extraits de *Streptomyces mediolani* cultivée en présence de différentes concentrations en Métyrapone (mM).

Parallèlement une expérience de réversibilité est effectuée. Cette expérience consiste à laver la biomasse inhibée précédemment par le métyrapone et à la remettre sur milieu minimum (pour empêcher la croissance de nouvelles bactéries) pendant quelques jours. A

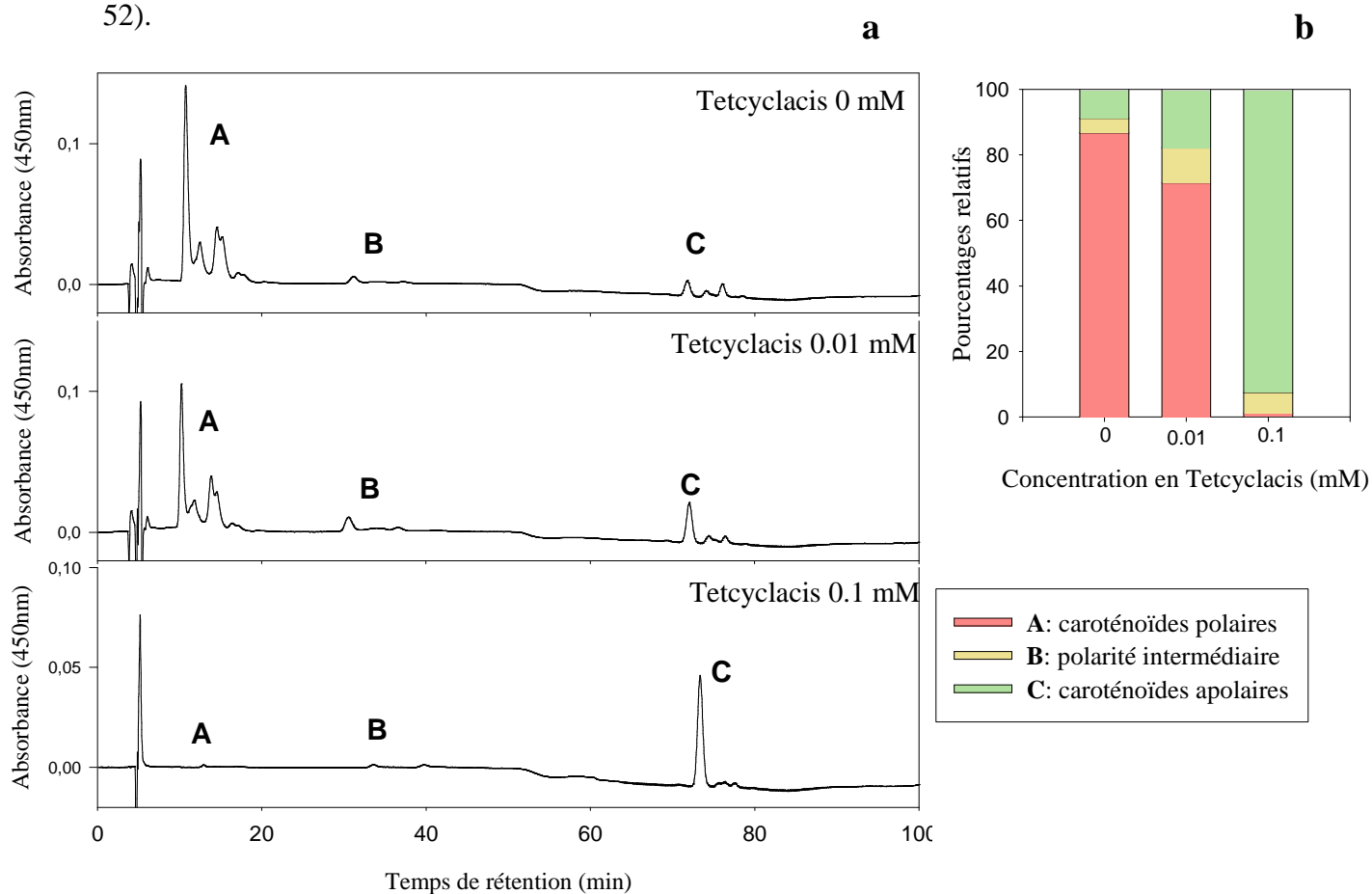
l'issue de cette manipulation on retrouve un profil pigmentaire quasi normal (c.à.d. une majorité de caroténoïdes di-hydroxylés) ce qui indique que l'accumulation de carotène apolaire en présence de métyrapone est uniquement due à la présence de ce composé.

### 2.2.2.2- Tetcyclacis

#### Différentes concentrations

Le profil pigmentaire de *S. mediolani* est modifié par l'action du tetcyclacis (Fig.

52).



**Figure 52** : a : Chromatogrammes des extraits méthanoliques et acétoniques de *Streptomyces mediolani* cultivée en présence de différentes concentrations en tetcyclacis.

b : Pourcentages relatifs des trois classes de caroténoïdes extraits de *Streptomyces mediolani* cultivée en présence de différentes concentrations en tetcyclacis (mM).

Le tetcyclacis à 0.1 mM inhibe presque totalement l'hydroxylation, les caroténoïdes polaires disparaissent au profit des caroténoïdes apolaires. L'implication d'un P450 dans l'hydroxylation des caroténoïdes chez *S. mediolani* semble se confirmer. Le tetcyclacis

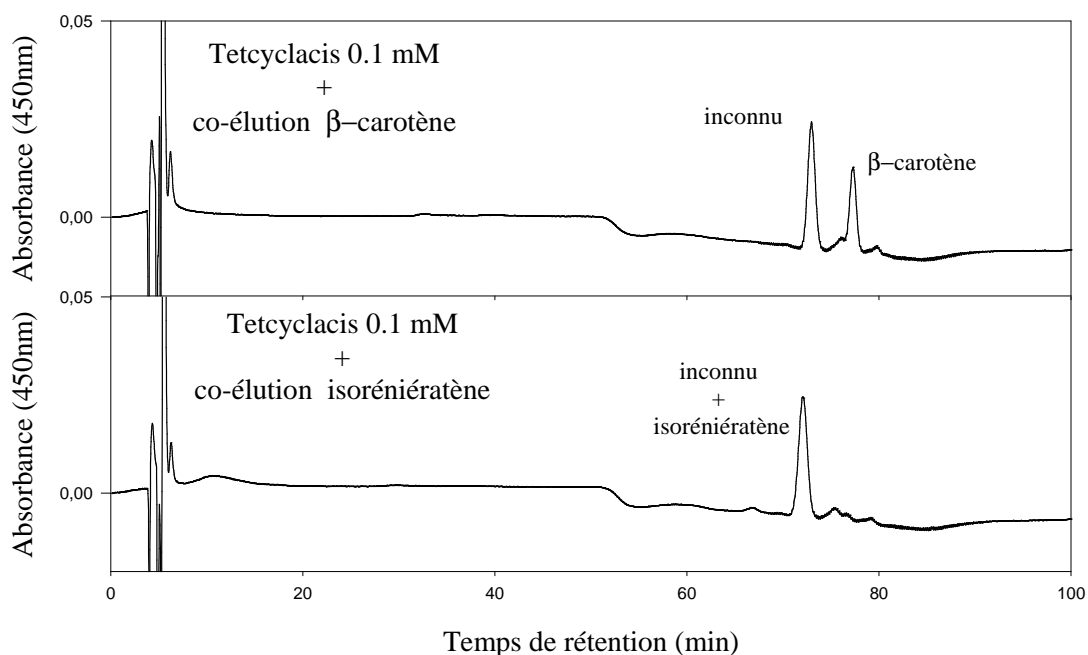
opère à des concentrations plus basses que le métyrapone, il semble donc plus spécifique du cytochrome P450 impliqué et donc plus efficace. Parmi les trois pics qui représentent les caroténoïdes apolaires, un seul paraît augmenter. Ce pic est le précurseur des formes hydroxylées de l'isoréniératène.

Une expérience de réversibilité a également été réalisée et a permis de confirmer que la modification du profil pigmentaire obtenue en présence de tetcyclacis est uniquement liée à ce composé.

### Co élutions

Pour identifier le composé apolaire accumulé lors de l'inhibition par le tetcyclacis nous avons réalisé une expérience de co-élution. Elle consiste à injecter simultanément les pigments de *S. mediolani* produit en présence de tetcyclacis avec un caroténoïde standard.

Comme le montre la figure 53, l'isoréniératène est le composé accumulé lors de l'inhibition par le tetcyclacis. L'isoréniératène est donc le substrat de l'hydroxylation.

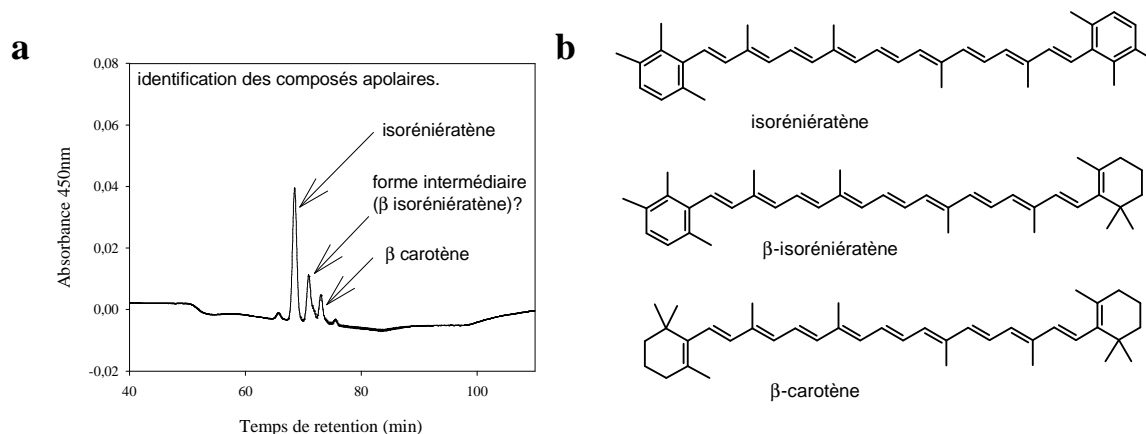


**Figure 53 :** Co-élution des extraits méthanoliques et acétoniques de *Streptomyces mediolani* avec des caroténoïdes standards:  $\beta$ -carotène TR= 76.57 min (a) ou isoréniératène TR= 72.83 min (b).

Le chromatogramme des pigments de *S. mediolani* présente trois caroténoïdes apolaires, deux d'entre eux sont identifiés par l'expérience ci-dessus : le  $\beta$ -carotène



possédant deux cycles  $\beta$ -ionone et l'isoréniératène possédant deux cycles aromatiques. Quant au troisième pic, il s'agirait d'une forme intermédiaire, le  $\beta$ -isoréniératène avec un cycle  $\beta$ -ionone et un cycle aromatique (Fig. 54).



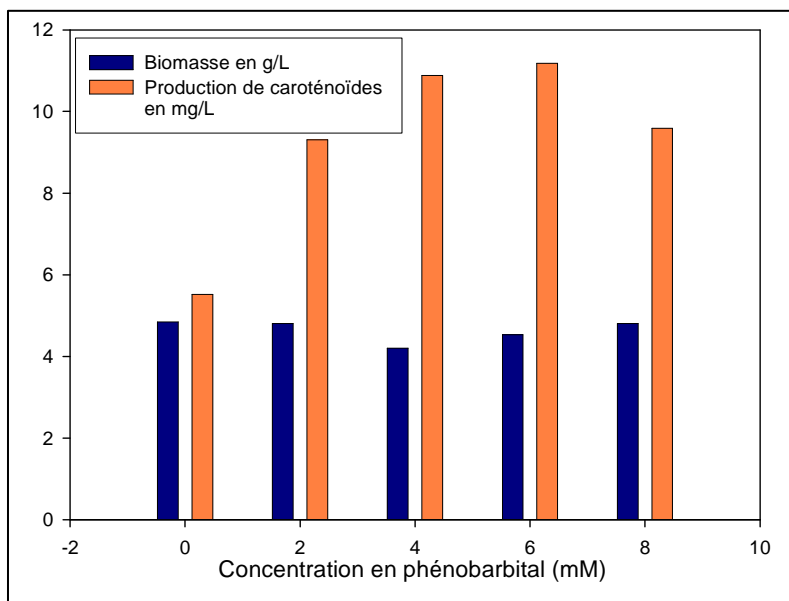
**Figure 54 :** a- Identification des composés apolaires présents chez *S. mediolani*  
b- Formules chimiques des composés identifiés ( $\beta$ -carotène et isoréniératène) et du composé suspecté ( $\beta$ -isoréniératène).

Ces expériences semblent indiquer que l'isoréniératène est hydroxylé par un cytochrome P450 pour donner le 3-hydroxy-isoréniératène et le 3,3'-di-hydroxy-isoréniératène. Le P450 impliqué est sensible à l'action du métyrapone et du tetcyclacis. Cependant, le tetcyclacis agit à des concentrations plus faibles que le métyrapone et entraîne une inhibition presque totale de l'hydroxylation. Le tetcyclacis paraît être un inhibiteur plus spécifique de ce cytochrome P450.

Le cluster des gènes de la caroténogénèse de *S. mediolani* n'est pas connu. En revanche, Krügel *et al* [59] ont identifié les gènes du cluster *crt* chez *Streptomyces griseus*. Bien que présents, ces gènes ne sont pas exprimés (le promoteur du premier opéron est inactif). *S. mediolani* pourrait être un mutant caroténogène de *S. griseus*. Elle pourrait donc porter le même cluster *crt*. L'étude du cluster *crt* de *S. griseus* révèle la présence de tous les gènes nécessaires à la synthèse de l'isoréniératène plus deux autres gènes (*crt T* et *crt V*) n'intervenant pas dans cette biosynthèse. Les études de séquences montre que ces gènes ne codent pas pour des monooxygénase de type P450. Ainsi si *S. mediolani* porte le même cluster *crt* que *S. griseus*, on peut déduire que tous les gènes nécessaires à la biosynthèse des caroténoïdes chez *S. mediolani* ne sont pas présents dans le cluster *crt*. Le P450 responsable de l'hydroxylation de l'isoréniératène se situerait en dehors du cluster *crt*.

### 2.2.2.3- Phénobarbital

Des expériences d'induction *in vivo* ont également été menées. Le phénobarbital est connu pour induire la biosynthèse de certains cytochromes P450. L'ajout de ce composé dans le milieu de culture provoque une augmentation de la production de caroténoïdes par *S. mediolani* (Fig. 55). La production de di-hydroxy-isoréniératène est doublée en présence de ce composé.



**Figure 55** : Influence du Phénobarbital sur la production de biomasse et de caroténoïdes chez *S. mediolani*.

Cette induction de la caroténogénèse par le phénobarbital confirme d'une part l'implication d'un P450 dans cette voie de biosynthèse et d'autre part, elle suggère l'existence d'un phénomène de régulation. En effet, l'augmentation du nombre de P450 ne peut entraîner une augmentation globale de la quantité de di-hydroxy-isoréniératène que si le substrat est disponible en proportion suffisante. Le phénobarbital par un mécanisme inconnu pourrait agir sur les enzymes en amont dans la voie de biosynthèse pour augmenter la production totale de caroténoïdes.

### 2.2.3- Inhibitions chez *B. linens*

#### 2.2.3.1- Métyrapone

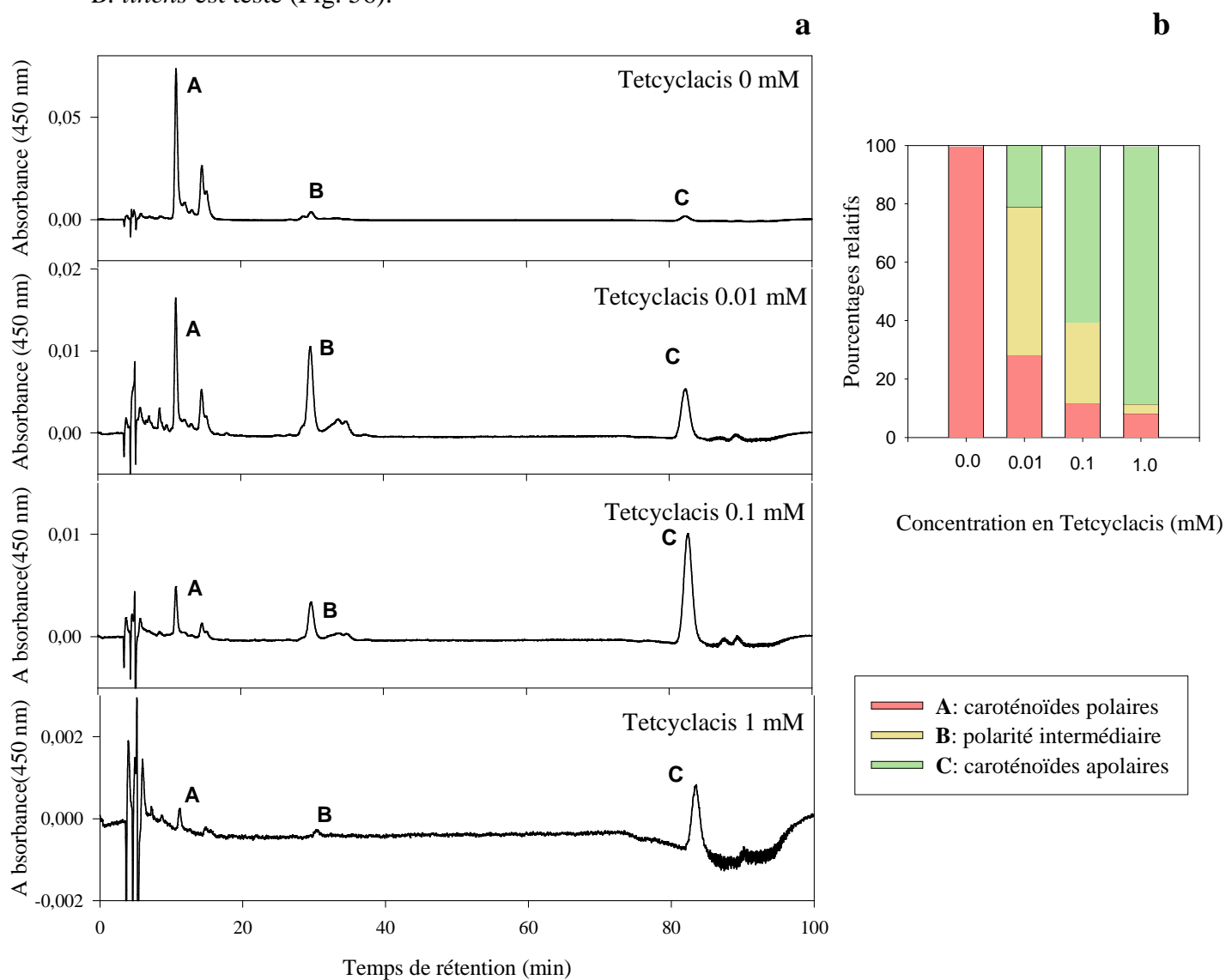
Le métyrapone, inhibiteur de cytochrome P450 est ajouté au milieu de culture de *B. linens*. Après quelques jours, les pigments synthétisés dans ces conditions sont analysés.

Plusieurs concentrations en métyrapone (de 0.25mM à 10mM) ont été testées, aucune ne s'est montrée efficace pour inhiber l'hydroxylation des caroténoïdes de *B. linens*.

### 2.2.3.2- Tetcyclacis

#### Différentes concentrations

L'effet de plusieurs concentrations en tetcyclacis sur la synthèse des caroténoïdes par *B. linens* est testé (Fig. 56).



**Figure 56 :** a : Chromatogrammes des extraits méthanoliques de *Brevibacterium linens* cultivée en présence de différentes concentrations en tetcyclacis.

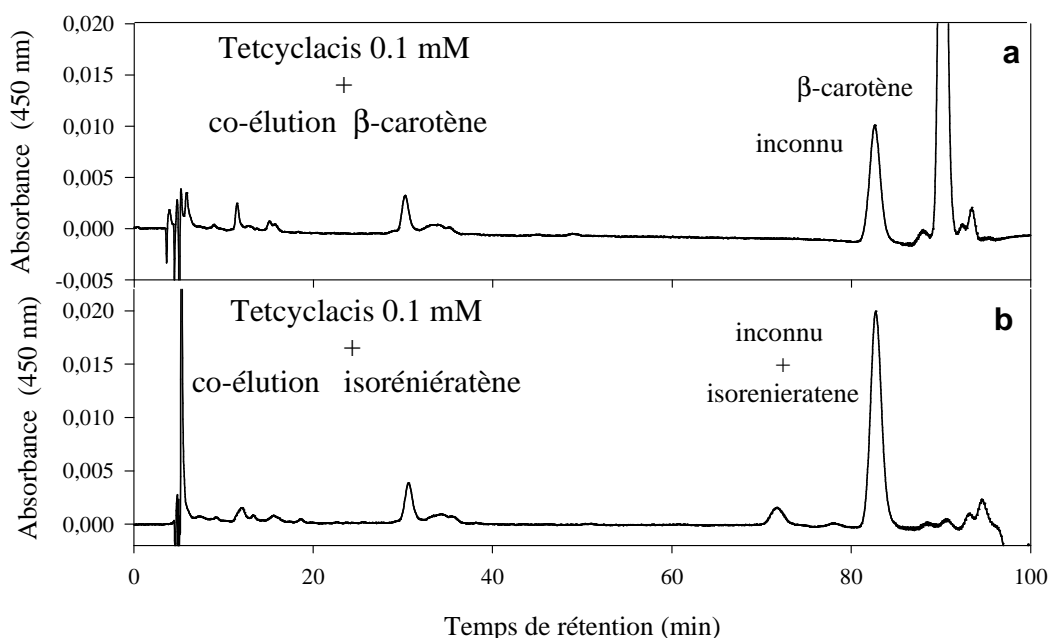
b : Pourcentages relatifs des trois classes de caroténoïdes extraits de *Brevibacterium linens* cultivée en présence de différentes concentrations en tetcyclacis (mM).

Le tetcyclacis modifie profondément le profil pigmentaire de *B. linens* : dans un premier temps, les caroténoïdes de polarité intermédiaire sont les plus représentés, puis la forme apolaire devient majoritaire. Ainsi le tetcyclacis entraîne une diminution des caroténoïdes polaires (hydroxylés) au profit des formes apolaires (non hydroxylés). L'étape d'hydroxylation a donc été inhibée. Cette expérience suggère fortement qu'un cytochrome P450 est responsable de l'hydroxylation des caroténoïdes de *B. linens*.

Une expérience de réversibilité a également été réalisée et a permis de confirmer que la modification du profil pigmentaire obtenue en présence de tetcyclacis est uniquement liée à la présence de ce composé.

### Co élutions

Dans le cadre de l'inhibition obtenue avec le tetcyclacis, on cherche à savoir quelle est la nature du composé apolaire accumulé. Une co-élution est réalisée : les extraits de pigments de *B. linens* (synthétisés en présence de 0.1mM de tetcyclacis) sont injectés simultanément avec un caroténoïde standard apolaire ( $\beta$ -carotène ou isoréniératène). La figure 57 montre que l'isoréniératène est le composé accumulé lors de l'inhibition de l'hydroxylation par le tetcyclacis. Il apparaît ainsi que l'isoréniératène est le précurseur des caroténoïdes hydroxylés de *B. linens*.



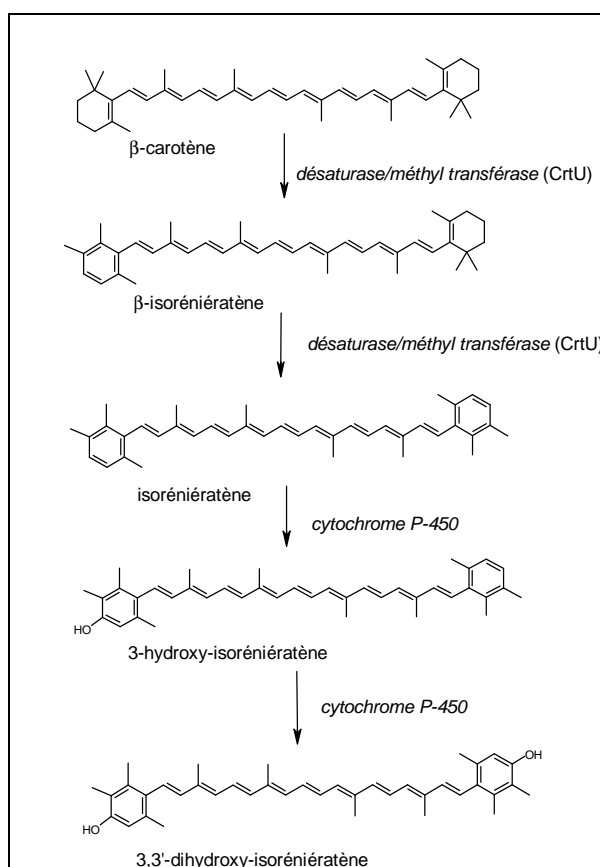
**Figure 57:** Co-élution des extraits méthanoliques de *Brevibacterium linens* avec des caroténoïdes standards:  $\beta$ -carotène TR= 81.21 min (a) ou isoréniératène TR= 89.43 min (b).

Ces expériences nous informent sur l'identité de l'enzyme et du substrat impliqués dans l'étape d'hydroxylation. Ainsi, il semble que chez *B. linens*, l'isoréniératène soit hydroxylé en 3-hydroxy-isoréniératène et 3,3'-di-hydroxy-isoréniératène par un cytochrome P450.

Krubasik et Sandmann [57] ont identifié les gènes du cluster de la caroténogénèse de *B. linens*. Ce cluster comprend tous les gènes nécessaires à la transformation de l'IPP en isoréniératène. Mais aucun gène n'a été identifié comme étant responsable de l'hydroxylation de l'isoréniératène. Cependant ce cluster possède l'*orf 10* qui code un cytochrome P450. Les auteurs évoquent l'éventuelle responsabilité de ce dernier dans l'étape d'hydroxylation, sans exclure l'implication d'une autre enzyme. A ce jour, ni le rôle de ce P450 ni même celui d'une enzyme de type P450 n'a été démontré dans cette caroténogénèse. Les résultats de nos expériences, apportent plus de poids à l'hypothèse selon laquelle ce P450 pourrait être impliqué dans l'hydroxylation de l'isoréniératène.

#### 2.2.4- Conclusion

Les inhibitions *in vivo* ont permis d'identifier la dernière étape dans la voie de biosynthèse du di-hydroxy-isoréniératène chez *B. linens* et *S. mediolani* (Fig. 58). Dans les deux cas l'isoréniératène est hydroxylé en position 3 et 3' du cycle aromatique par un cytochrome P450. Cependant les P450 apparemment responsables de l'hydroxylation répondent différemment aux inhibiteurs utilisés. Celui de *B. linens* n'est sensible qu'au tetcyclacis tandis que celui de *S. mediolani* est sensible à la fois au métyrapone et au tetcyclacis.



**Figure 58** : Voie de biosynthèse proposée de l'isoréniératène et ses dérivés hydroxylés chez *B. linens* et *S. mediolani*.

Une structure différente au niveau du site de fixation du substrat du P450 peut être envisagée pour expliquer ce phénomène. Cette différence de structure doit être légère puisque ces deux cytochromes P450 réalisent une hydroxylation du même substrat à savoir l'isoréniératène.

Le P450 de *S. mediolani* contrairement à celui de *B. linens*, est capable de fixer le métyrapone. De plus il est probable que le P450 de *S. mediolani* ne soit pas présent dans le cluster *crt* (si elle possède de même cluster *crt* que *S. griseus*). Ces éléments laissent envisager la non spécificité du P450 de *S. mediolani* à la voie de biosynthèse des caroténoïdes aromatiques.

### 2.3- Cytochrome P450 *in vitro*

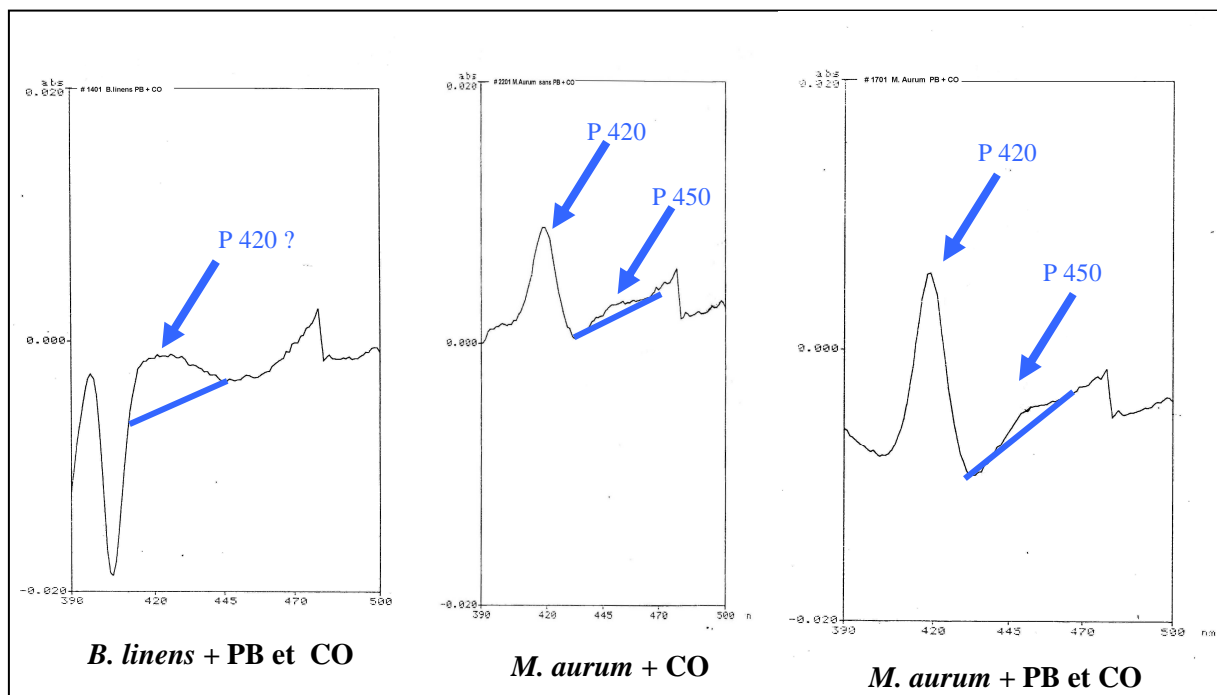
Les inhibitions *in vivo* semblent indiquer qu'un cytochrome P450 est responsable de l'hydroxylation de l'isoréniératène chez *B. linens* et *S. mediolani*. Pour vérifier la présence de cytochrome P450 on propose de réaliser le spectre d'absorbance d'extraits acellulaires en présence de CO.

Le spectre d'absorbance d'un cytochrome P450 présente 3 bandes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  entre 390 et 550 nm. La bande la plus intense est la bande  $\gamma$  (aux environs de 400 nm) connue sous le nom de bande de Soret. Ce spectre change en fonction de l'état d'oxydoréduction du cytochrome P450. En effet lorsqu'il est réduit, un P450 peut réagir avec le CO au niveau du fer hémique. La liaison CO-cytochrome P450 réduit entraîne un fort déplacement de la bande de Soret de 420 nm à 450 nm [66]. Ce changement est mis en évidence par la réalisation d'un spectre différentiel, au moyen d'un spectrophotomètre à double faisceau. Si aucun complexe ne s'est formé, le spectre reste plat. Sinon, il apparaît une bande dans la région de 450 nm. L'observation d'une bande à 420 nm, peut correspondre à la présence de formes dénaturées de P450.

La détection de ce type d'enzyme par cette méthode est une première étape en vue d'une caractérisation biochimique complète de l'enzyme.

Si les échantillons contiennent des quantités suffisamment importantes en P450, on pourra ensuite ajouter le substrat (isoréniératène) aux extraits acellulaires et vérifier si cet ajout modifie le spectre d'absorbance. Dans ces conditions, un P450 en présence de son substrat (en quantités croissantes) présente une modification de son spectre d'absorbance [102].

Afin d'augmenter les quantités de P450, les bactéries ont été cultivées en présence d'un inducteur de P450 : le phénobarbital [54]. Après culture, les bactéries sont lysées par ultra-sons afin de récupérer des extraits acellulaires. On réalise ensuite un spectre d'absorbance de ces extraits concentrés en présence de dithionite et de CO (Fig. 59).



**Figure 59** : Spectres d'absorbance d'extraits acellulaires bactériens en présence de CO.  
(le pic à 420 nm pourrait correspondre à des P450 dégradés)

### 2.3.1- *M. aurum*

Les études portant sur la caroténogénèse chez *M. aurum* ont été interrompues. Cependant nous avons choisi de réaliser cette dernière expérience afin de vérifier la validité de notre méthode expérimentale. En effet il est connu que les bactéries du genre *Mycobacterium* possèdent beaucoup de cytochromes P450, on citera notamment l'exemple de *Mycobacterium tuberculosis* dont le séquençage complet du génome a révélé la présence d'un vingtaine de gènes différents codant des P450 [113].

Les expériences *in vitro* montrent la présence de P450 dans les extraits acellulaires de *M. aurum*. Le spectre d'absorbance des extraits acellulaires en présence de CO présente un pic intense à 420 nm et un pic de faible intensité à 450 nm. Ce signal est plus intense pour l'extrait traité avec du phénobarbital. Ces expériences semblent montrer la présence de P450 chez *M. aurum* mais leur implication dans la caroténogénèse n'est pas prouvée.



### **2.3.2- *S. mediolani***

Le spectre d'absorbance (de 390 à 500 nm) en présence de CO des extraits acellulaires de *S. mediolani* n'est pas exploitable. L'intense coloration des extraits interfère fortement avec la réalisation du spectre.

### **2.3.3- *B. linens***

Le spectre d'absorbance des extraits acellulaires en présence de CO est complexe. Il est possible qu'il révèle la présence d'un P 420 (P450 dénaturé) mais le pic n'est pas net. On ne peut déterminer s'il s'agit de P420 ou bien d'interférences.

### **2.3.4- Conclusion**

Les expériences sur les P450 n'ont pas abouties. Les inhibitions *in vivo* avaient révélées l'implication de P450 chez *B. linens* et *S. mediolani* mais ils ne semblent pas être en quantité suffisamment importantes pour réaliser des expériences sur les P450 *in vitro*.

## 2.4- Mutagenèse chez *B. linens*

Le cluster de la caroténogénèse (*crt*) de *B. linens* [57] possède un gène (*orf 10*) qui code un cytochrome P450 dont la fonction est inconnue. Les expériences d'inhibition de l'hydroxylation de l'isoréniératène ont révélé l'implication d'un P450 dans cette réaction. Dans cette partie, on cherche à savoir si cet *orf 10* correspond au gène codant le P450 nécessaire à l'hydroxylation de l'isoréniératène en 3,3'-di-hydroxy-isoréniératène.

### 2.4.1- Mutagenèse aléatoire

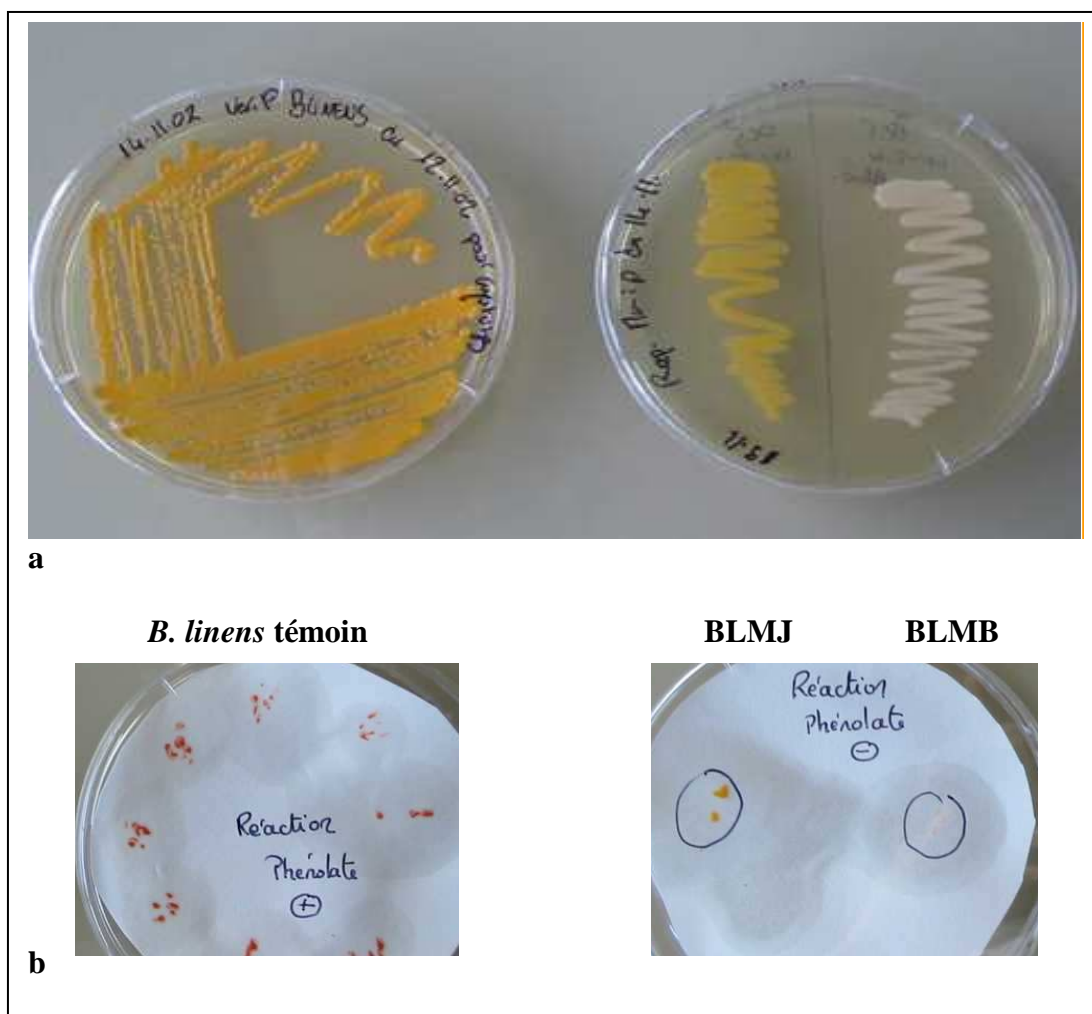
On souhaite obtenir des souches de *B. linens* mutées au niveau de la caroténogénèse. Nous avons choisi d'utiliser les rayons UltraViolet comme agent mutagène. Les bactéries en phase exponentielle de croissance sont soumises à un rayonnement U.V. (traitement de 1 à 25 min). Après ce traitement, on laisse les colonies se développer en milieu solide pendant 5 jours. Sur chaque boîte, toutes les colonies isolées sont récupérées une à une pour effectuer le test des phénolates. Les colonies réagissant négativement au test, preuve d'une mutation au niveau de la caroténogénèse, sont récupérées.

Sur les 3500 clones récupérés, deux se sont avérées être phénolate négatif. Ces expériences ont permis d'obtenir deux mutants de la caroténogénèse : un blanc (BLMB) et un jaune (BLMJ).

Le séquençage de l'ARN 16S de ces souches mutantes a été réalisé par l'Institut Pasteur afin de s'assurer qu'il ne s'agissait pas de contaminants.

#### 2.4.1.1- Description des mutants obtenus

Les mutants BLMB et BLMJ ont répondu négativement au test phénolate (Fig. 60) indiquant une modification du contenu pigmentaire des mutants.



**Figure 60 :** *B. linens* et ses mutants U.V. Culture sur boîtes de Pétri (a) et réaction au test phénolate (b).

Les pigments des différentes souches de *B. linens* ont été extraits. Les valeurs obtenues sont présentées dans le tableau 9.

Contrairement à *B. linens* sauvage, l'extraction des pigments de BLMJ dans le méthanol n'est pas totale. Une deuxième extraction est alors effectuée dans l'acétone. Ces deux extraits sont rassemblés avant analyse.

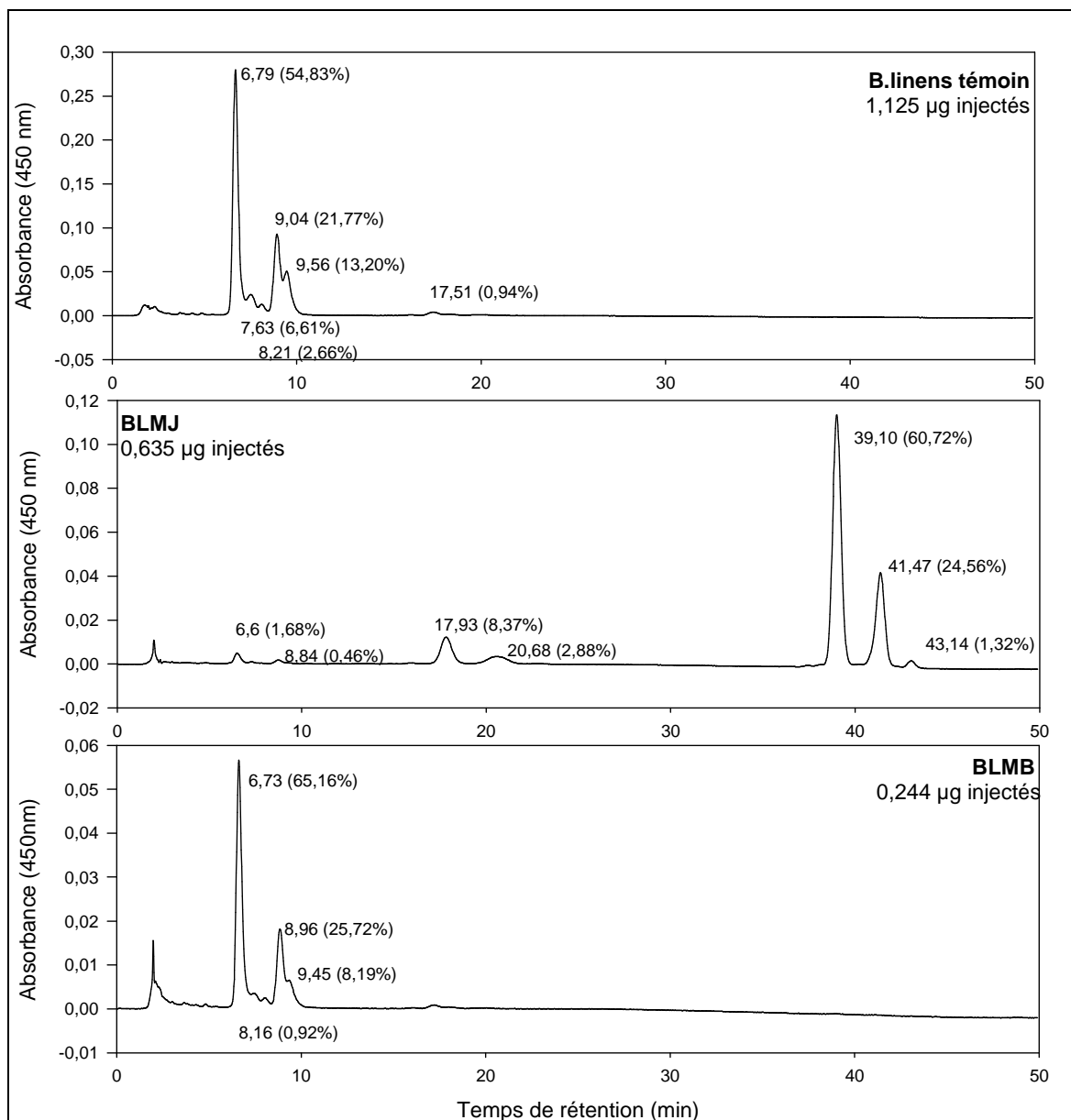
Souche	Quantité biomasse en g /L	Quantité pigment en mg./L	Production spécifique en mg /g
<i>B. linens</i> sauvage	1,6667	1,566	0,939
BLMJ	1,5767	1,535	0,975
BLMB	1,7467	0,283	0,162

**Tableau 9 :** Quantification de la biomasse et des pigments produits par *B. linens* sauvage et les mutants BLMJ, BLMB.

Les quantités de biomasse et de pigments produites par le mutant jaune BLMJ sont comparables à celles produites par la souche sauvage. BLMJ n'est pas affecté dans sa capacité de croissance et de production totale de pigments. La synthèse de pigments par BLMJ est différente d'un point de vue qualitatif (réaction phénolate négative) et non quantitatif.

On n'observe pas de différence non plus sur la production de biomasse par le mutant blanc BLMB. En revanche, la production de caroténoïdes par BLMB est très inférieure à celle des autres souches. Ce dernier malgré sa couleur apparente blanche synthétise néanmoins quelques caroténoïdes.

Pour connaître la nature des pigments produits par les mutants, 200  $\mu$ L d'extrait pigmentaire de chaque mutant ont été analysés par HPLC. Les chromatogrammes issus de l'analyse HPLC sont présentés dans la figure 61. Le chromatogramme des pigments de *B. linens* témoin, déjà détaillé aux paragraphes 1.3 et 1.4 de cette partie, montre l'élution du 3,3'-di-hydroxy-isoréniératène et ses isomères en début d'analyse. Les temps de rétention de ces composés sont compris entre 6,79 et 9,56 min. Un profil similaire est observé pour les pigments de BLMB. Le mutant blanc, malgré sa faible quantité de caroténoïdes produits, semble synthétiser les mêmes pigments que la souche sauvage. Il ne peut vraisemblablement pas être muté au niveau des enzymes de la caroténogénèse. La faible production de caroténoïdes par BLMB pourrait être expliquée par une anomalie dans le système de régulation de la caroténogénèse.



**Figure 61** : Chromatogrammes HPLC des pigments produits par *B. linens* témoin, BLMJ et BLMB

BLMJ synthétise très peu de pigments polaires, la majorité de ses pigments (environ 86%) sont élués à partir de 39 min (en condition apolaire). Il apparaît clairement que BLMJ ne synthétise pas les mêmes pigments que *B. linens* sauvage. La caroténogénèse chez ce mutant n'est pas complète, elle est bloquée au niveau d'une étape. L'identification du composé accumulé permettra de connaître l'enzyme mutée. La partie suivante est consacrée à la caractérisation des pigments de BLMJ.

### 2.4.1.2- Caractérisation des pigments produits par le mutant jaune

Pour cette caractérisation, nous avons recours à 2 méthodes. La première repose sur des co-élutions des pigments de BLMJ avec des caroténoïdes standard en HPLC. Dans la seconde, la masse de ces pigments sera déterminée par une analyse en LCMS.

Les expériences menées dans le paragraphe précédent sont réalisées sur le mélange des deux extraits méthanoliques et acétoniques. Ce mélange a l'avantage d'étudier en une seule fois tous les pigments synthétisés par la bactérie. Cependant pour des études plus approfondies, notamment pour les expériences de co-élution, il est préférable d'utiliser des extraits pigmentaires concentrés et issus d'un même solvant. Pour les raisons évoquées dans le paragraphe 1.5.1, nous évitons au maximum d'avoir recours à l'évaporation puis concentration des pigments. Nous procédons donc à l'analyse HPLC de chacun des extraits pigmentaires afin de choisir le plus adapté.

#### Etude des différents extraits pigmentaires de BLMJ

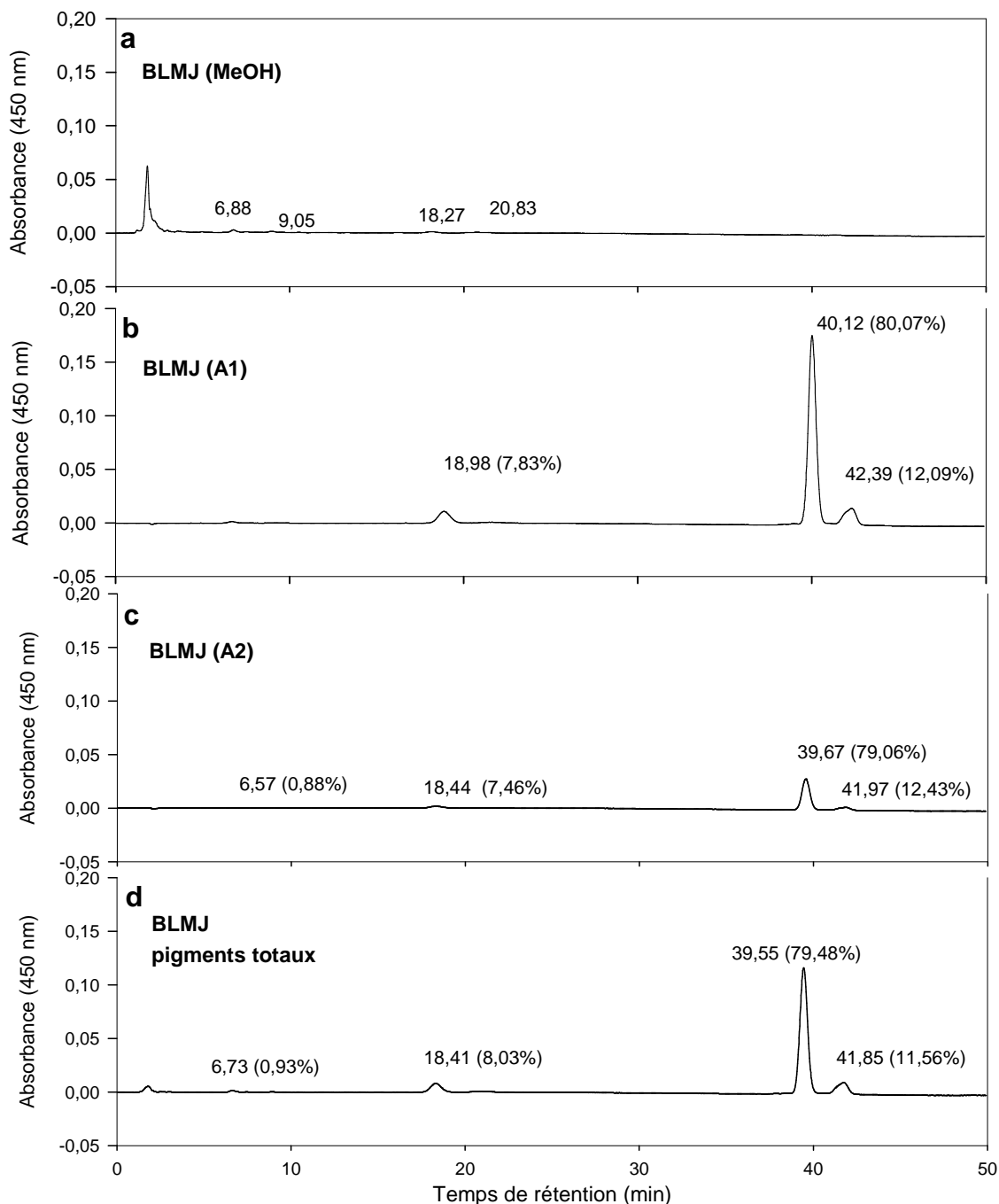
Afin d'obtenir suffisamment de pigments, une culture de BLMJ de 800 mL est réalisée. La totalité de cette culture est employée pour l'extraction des pigments. Plusieurs extractions sont nécessaires pour récupérer la totalité des pigments. La première s'effectue dans le méthanol et les deux suivantes dans l'acétone. On dispose donc de 3 fractions pigmentaires de concentrations différentes. Les quantités de pigments récupérées par extraction sont présentées dans le tableau 10.

Extrait	Volume (mL)	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Quantité de pigment ( $\mu\text{g}$ )
Méthanolique (MeOH)	49	0,98	48
Acétonique 1 (A1)	50	15	750
Acétonique 2 (A2)	27,5	3,05	84

**Tableau 10** : Concentrations en caroténoïdes des différents extraits pigmentaires de BLMJ.

La majorité des pigments sont présents dans la fraction acétonique 1. Cette fraction paraît la plus intéressante puisque plus concentrée. On s'assure que son profil pigmentaire est représentatif des pigments totaux.

La répartition des différents pigments au sein des fractions est étudiée par HPLC. On injecte séparément chacune de ces fractions (Fig. 62.a, 62.b, 62.c). Afin d'avoir un chromatogramme représentatif des pigments totaux extraits, on injecte également un mélange respectant les proportions de chacune (Fig. 62.d).



**Figure 62 :** Chromatogrammes HPLC des extraits pigmentaires de BLMJ

- a) fraction MeOH, 0,197 µg injectés ; b) fraction A1, 0,750 µg injectés ; c) fraction A2, 0,84 µg injectés
- d) Injection de 50µl du mélange des trois fractions (0,49µg MeOH +7,5µg A1+0,84µg A2)

Le méthanol permet d'extraire les pigments les plus polaires. BLMJ ne synthétise quasiment pas de pigment de cette nature, la fraction méthanolique renferme donc très peu de pigments. Les pigments de cette fraction sont négligeables. La répartition des différents pigments dans les fractions acétoniques est la même que celle retrouvée pour l'injection des pigments totaux. Dans les trois cas les pigments élués à 18 min, 40 min et 42 min représentent respectivement 8%, 80% et 12% des pigments totaux. La fraction acétonique 1 (BLMJ A1) étant la plus concentrée, elle sera utilisée pour la détermination des pigments synthétisés par BLMJ.

#### Expériences de co-élution en HPLC

Ces expériences se déroulent en trois étapes :

- La première étape est l'analyse HPLC des pigments de BLMJ A1

Les pigments de BLMJ sont analysés en HPLC. Le chromatogramme obtenu après injection de 0,469 µg de pigments est présenté dans la figure 63.a et repris dans les figures 64.a et 65.a. Le pigment majoritaire de BLMJ (80%) est élué à 42 min. Sur ce graphique est également présenté le spectre d'absorbance de ce caroténoïde. Les pics d'absorbance de ce composé sont à 452,4 nm et 481,4 nm.

- La deuxième étape est l'analyse HPLC du caroténoïde standard seul

Il existe trois caroténoïdes intermédiaires entre le phytoène (non coloré) et les dérivés hydroxylés de l'isoréniératène. Ces 3 caroténoïdes : le lycopène, le β-carotène et l'isoréniératène ont été retenus pour ces expériences. Pour être dans la même phase que les pigments de BLMJ, les standards sont solubilisés dans l'acétone.

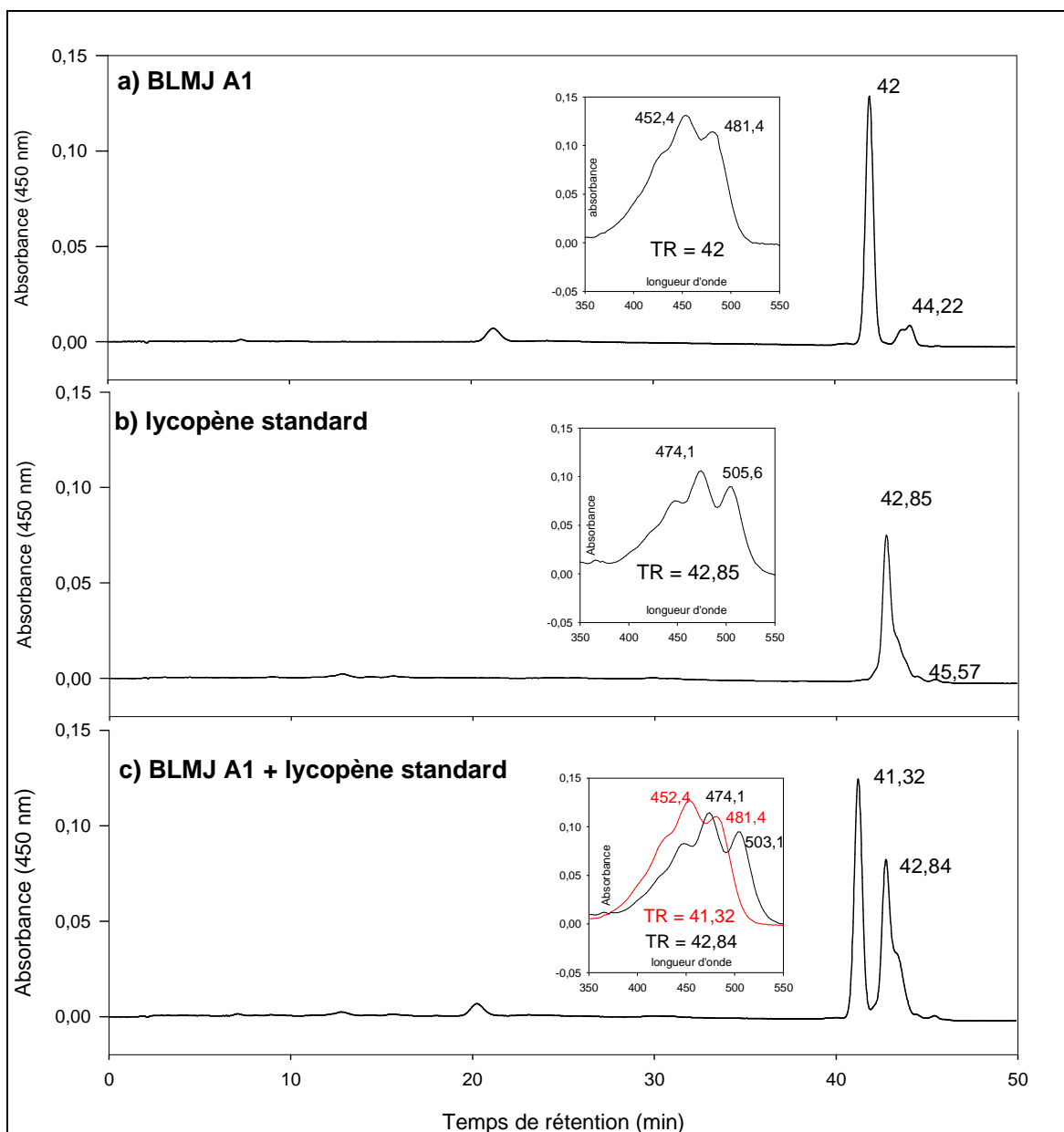
- La dernière étape est l'analyse HPLC d'un mélange des pigments de BLMJ et du caroténoïde standard. Afin d'observer le signal de chacun des composés du mélange, ceux-ci sont apportés dans des proportions équivalentes.

Pour chaque chromatogramme on trouvera le spectre d'absorbance des composés majoritaires.



*Co-élution des pigments de BLMJ avec du lycopène (Figure 63)*

Le lycopène est élué à 42,85 min, ce temps de rétention est supérieur au composé



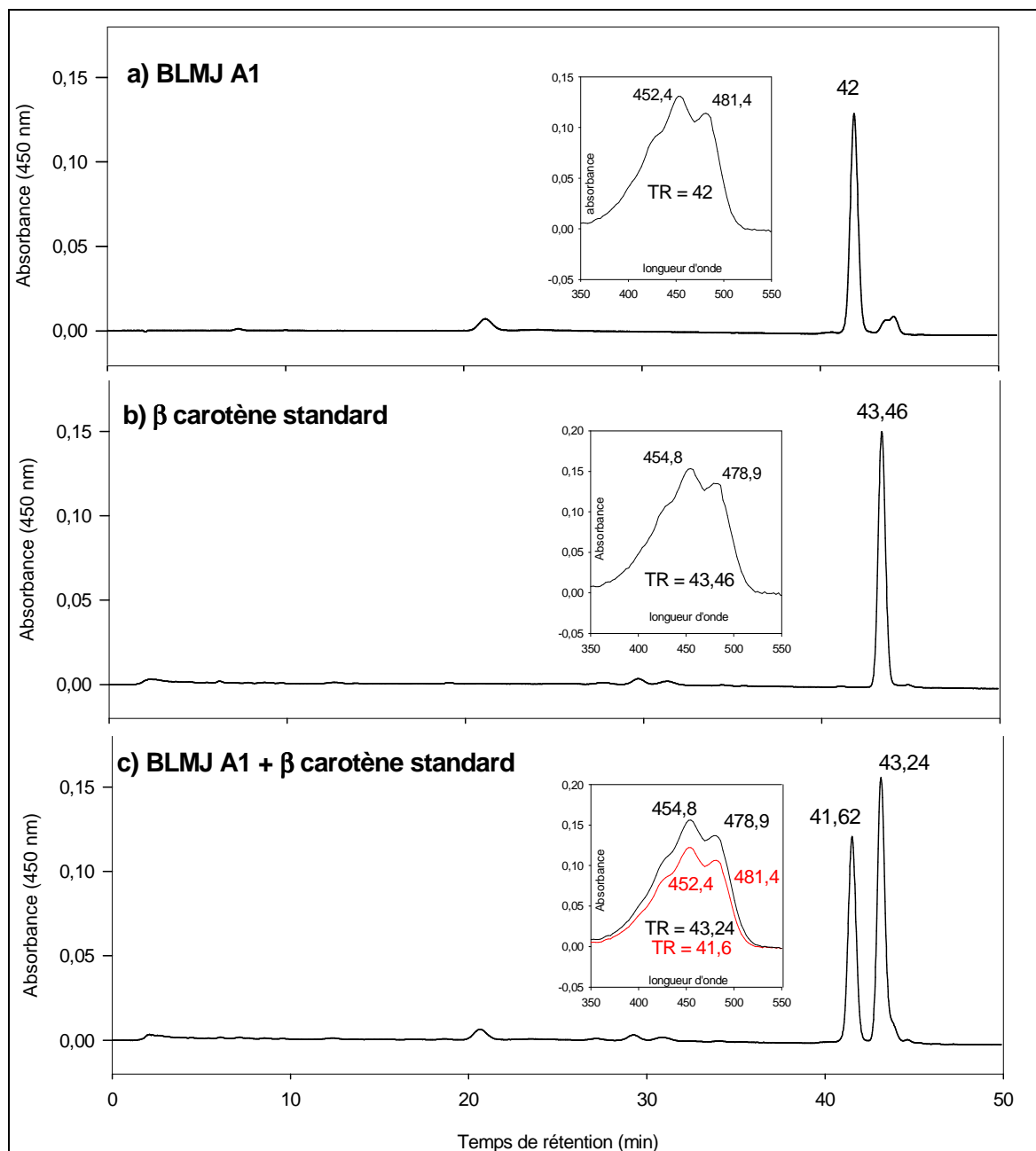
**Figure 63** : Co-élution des pigments de BLMJ avec du lycopène standard.

a) chromatogramme des pigments de BLMJ (0,469  $\mu\text{g}$ ) ; b) Chromatogramme du lycopène standard (0,369 $\mu\text{g}$ ) ; c) chromatogramme issu de la co-élution des pigments de BLMJ (0,469  $\mu\text{g}$ ) avec le lycopène standard (0,326  $\mu\text{g}$ ).

majoritaire de BLMJ. On retrouve le spectre d'absorbance caractéristique du lycopène avec des pics d'absorbance à 474, 1 nm et 505,6 nm. Ce spectre est très différent de celui de BLMJ. Le chromatogramme de la co-élution de pigments de BLMJ et du lycopène présente 2 pics importants à 41,32 min et 42,84 min, les deux pigments ne sont pas élués ensemble. Sur les critères de temps de rétention et de spectre d'absorbance, on attribue le

premier pic au caroténoïde de BLMJ et le second au lycopène. BLMJ n'accumule pas le lycopène, il semble réaliser la cyclisation de ce composé. BLMJ n'est donc pas muté au niveau du gène *crt Y* codant la lycopène cyclase.

*Co-élution des pigments de BLMJ avec du β-carotène (Figure 64)*

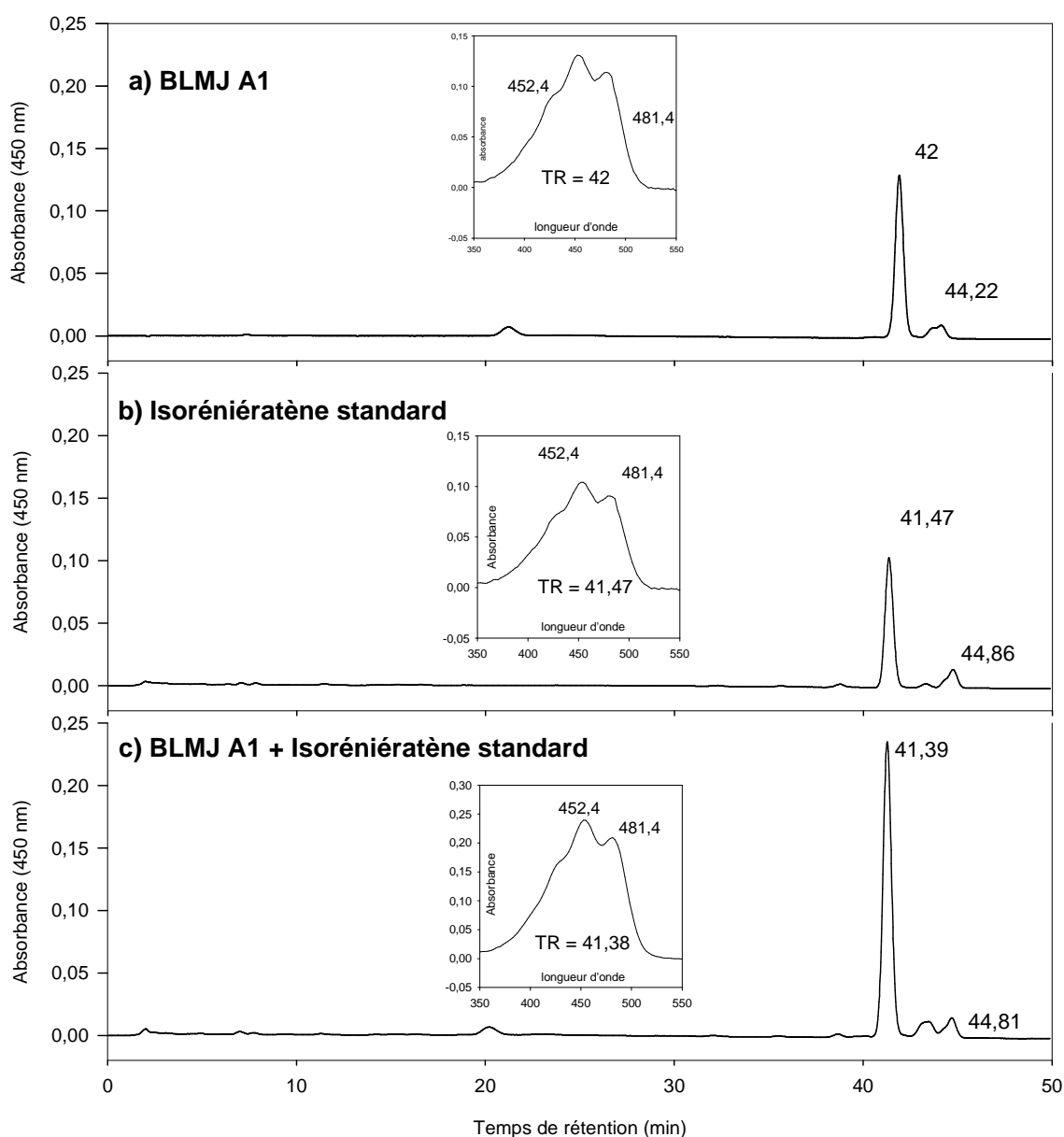


**Figure 64 :** Co-élution des pigments de BLMJ avec du β-carotène standard.

a) chromatogramme des pigments de BLMJ (0,469 µg) ; b) Chromatogramme du β-carotène standard (0,505µg) ; c) chromatogramme issu de la co-élution des pigments de BLMJ (0,469 µg) avec le β-carotène standard (0,505 µg).

Le  $\beta$ -carotène élué à 43,46 min possède un spectre d'absorbance assez semblable à celui du caroténoïde de BLMJ. Toutefois les  $\lambda_{\max}$  des deux composés sont différentes. Lors de la co-élution les deux pigments sont élués séparément. Le caroténoïde accumulé par BLMJ et le  $\beta$ -carotène standard sont respectivement élués à 41,62 min et 43,24 min. Le caroténoïde accumulé par BLMJ n'est pas le  $\beta$ -carotène. L'absence d'accumulation de ce carotène signifie que la désaturation effectuée par la  $\beta$ -carotène désaturase (Crt U) est efficace chez BLMJ. Le mutant jaune ne peut donc pas être muté au niveau du gène *crt U*.

Co-élution des pigments de BLMJ avec de l'isoréniératène de synthèse (Figure 65)



**Figure 65:** Co-élution des pigments de BLMJ avec de l'isoréniératène standard.

a) chromatogramme des pigments de BLMJ (0,469  $\mu\text{g}$ ) ; b) Chromatogramme de l'isoréniératène standard (0,514  $\mu\text{g}$ ) ; c) chromatogramme issu de la co-élution des pigments de BLMJ (0,469  $\mu\text{g}$ ) avec l'isoréniératène standard (0,514  $\mu\text{g}$ ).

L'isoréniératène de synthèse est élué à 41,47 min, son spectre d'absorbance est identique à celui du caroténoïde accumulé par BLMJ. Dans les deux cas les spectres présentent des pics d'absorbance à 452,4 nm et 481,4 nm. Le chromatogramme issu de l'injection du mélange de ces pigments présente un seul pic à 41,39 min dont le spectre possède des pics d'absorbance à 452,4 nm et 481,4 nm. Ces deux pigments sont élués en même temps. Il semblerait que le caroténoïde accumulé par BLMJ soit l'isoréniératène. Cette identification a été réalisée sur des critères de polarité et de spectre d'absorbance. La masse du caroténoïde accumulé par BLMJ permettra d'identifier ce composé avec certitude.

#### Analyse LCMS du caroténoïde accumulé par BLMJ.

L'analyse LCMS est réalisée dans un laboratoire de chimie de l'université de Hohenheim à Stuttgart, par le Dr D. Breithaupt.

La chromatographie liquide des pigments de BLMJ réalisée dans ce laboratoire permet de séparer 5 caroténoïdes différents. La masse de ces caroténoïdes est ensuite déterminée par l'analyse du spectre de masse au temps de rétention correspondant (Fig. 66).

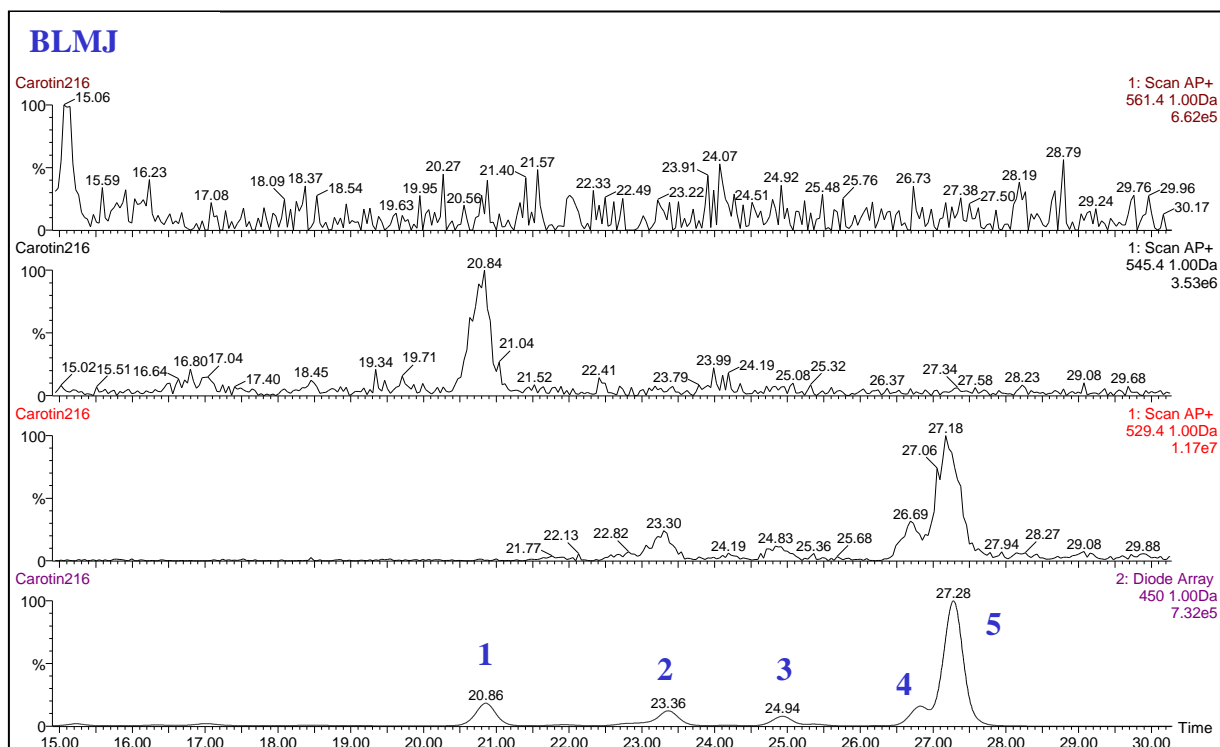


Figure 66 : Chromatogrammes issus de l'analyse LCMS des pigments de BLMJ.

Le composé élué au niveau du pic 1 ( $m/z = 545$ ) possède une masse molaire de  $544 \text{ g.mol}^{-1}$ . Cette masse correspond à celle du mono-hydroxy-isoréniératène.

Les composés élués au niveau des pics 2, 3, 4 et 5 ont un  $m/z$  de 529 soit une masse molaire de  $528 \text{ g.mol}^{-1}$  ce qui correspond à l'isoréniératène. Le pic majoritaire, le n°5 élué à 27,28 min serait le tout-*trans* isoréniératène et les pics n°2, 3 et 4 seraient des isomères *cis* de l'isoréniératène.

Si les analyses LCMS montrent la présence de mono-hydroxy-isoréniératène en faible quantité, il apparaît clairement que BLMJ accumule majoritairement de l'isoréniératène.

On peut identifier les 3 pics d'éluion représentés sur le chromatogramme HPLC des pigments de BLMJ (Fig. 62.d). Le composé élué à 18 min et représentant 8% des caroténoïdes totaux de BLMJ correspond au 3-mono-hydroxy-isoréniératène. Le pigment majoritaire élué à 40 min et représentant 80 % des pigments totaux correspond au *trans* isoréniératène. Enfin le pic présent à 42 min est attribué à un isomère de l'isoréniératène (isomère *cis*) représentant 12% des caroténoïdes totaux.

On peut conclure que 92 % des pigments synthétisés par BLMJ correspondent à l'isoréniératène.

L'enzyme réalisant l'hydroxylation de l'isoréniératène est quasiment inactive. On suppose l'implication de l'*orf 10* du cluster *crt* de *B. linens* dans la réaction d'hydroxylation des caroténoïdes aromatiques. Pour vérifier s'il existe un lien de cause à effet entre l'hydroxylation de l'isoréniératène et ce gène, nous procédons à l'analyse de la séquence de l'ORF 10 de BLMJ.

#### 2.4.1.3- Etude de l'*orf 10* du cluster *crt* de BLMJ

Les produits d'amplification PCR de l'*orf 10* sont utilisés pour le séquençage. La séquence obtenue est ensuite analysée.

PCR et séquençage de l'orf 10.

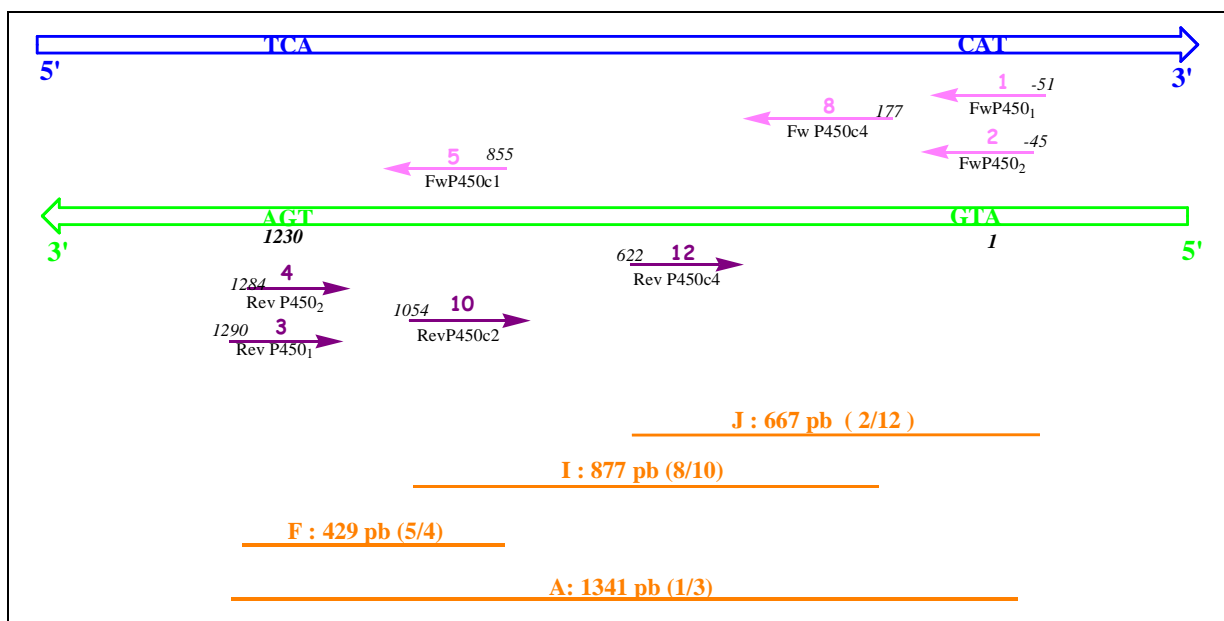
Le séquençage prévu est de  $550 \pm 50$  pb. La taille du gène (1230 pb) ne permet pas un séquençage unique. La PCR doit générer des fragments de ce gène d'environ 550 pb.

Au total quatre couples d'amorces ont été utilisés (tableau 11). Le premier permet d'amplifier le gène complet (amplimère A). Les trois autres couples génèrent des fragments du gène dont les tailles sont comprises entre 429 pb et 877 pb.

N°	Nom de l'amorce	Orientation de l'amorce	Séquence 5'-3'	Amplimère	Taille du fragment
1	Fw P450-1:	Forward	GTT GAG CAA CCA GCT GAT	A	1341 pb
3	Rev P450-1:	Reverse	GTT CGA GAG GAA GCG TAA		
2	Fw P450-2:	Forward	CAA CCA GCT GAT CCA ACT	J	667 pb
12	Rev P450c-4:	Reverse	GCA GAT GCG AGA GCA CA		
8	Fw P450c-4:	Forward	CTT TCG GCA ACA CCC CAT A	I	877 pb
10	Rev P450c-2:	Reverse	GTT GAC CCG GGC ACG T		
5	Fw P450c-1:	Forward	CAT CGA AGT CTC AGA CAA	F	429 pb
4	Rev P450-2:	Reverse	GAG GAA GCG TAA TCA GCA		

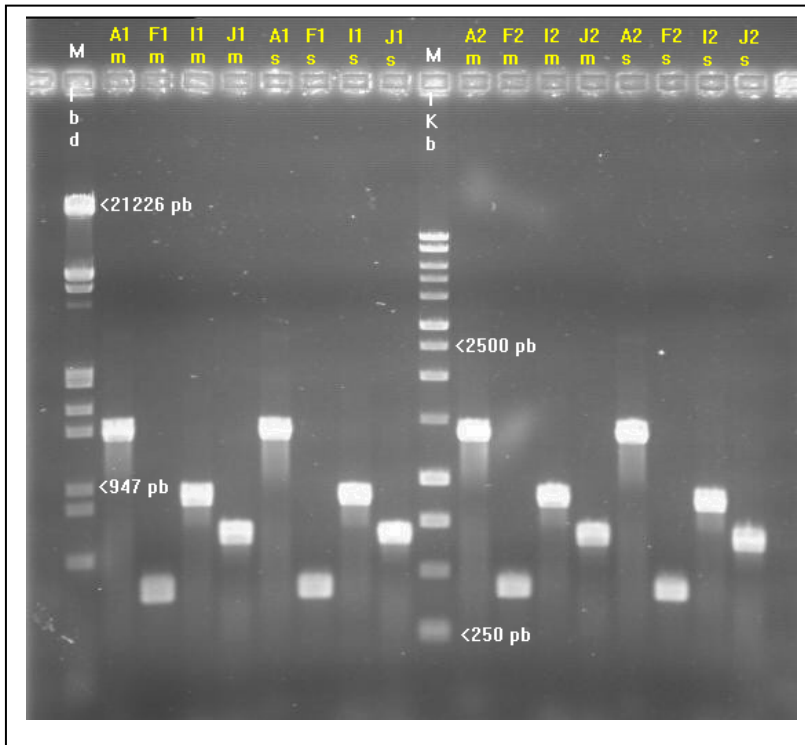
**Tableau 11** : amorces et amplimères de la PCR de l'orf 10.

La figure 67 représente la disposition des amorces utilisées sur le gène et les fragments obtenus.



**Figure 67** : Représentation des amorces et des produits PCR de l'orf 10.

Au total, nous obtenons 4 amplimères différents (A, F, I et J). Pour le séquençage chaque amplimère est fourni en deux exemplaires : un est séquencé avec l’amorce *forward* et l’autre séquencé avec l’amorce *reverse*. On effectue 8 réactions PCR avec l’ADN matrice de BLMJ (amplimères notés m) et 8 autres avec l’ADN matrice de *B. linens* sauvage (amplimères notés s). L’analyse par électrophorèse des 16 amplimères est présentée dans la figure 68.

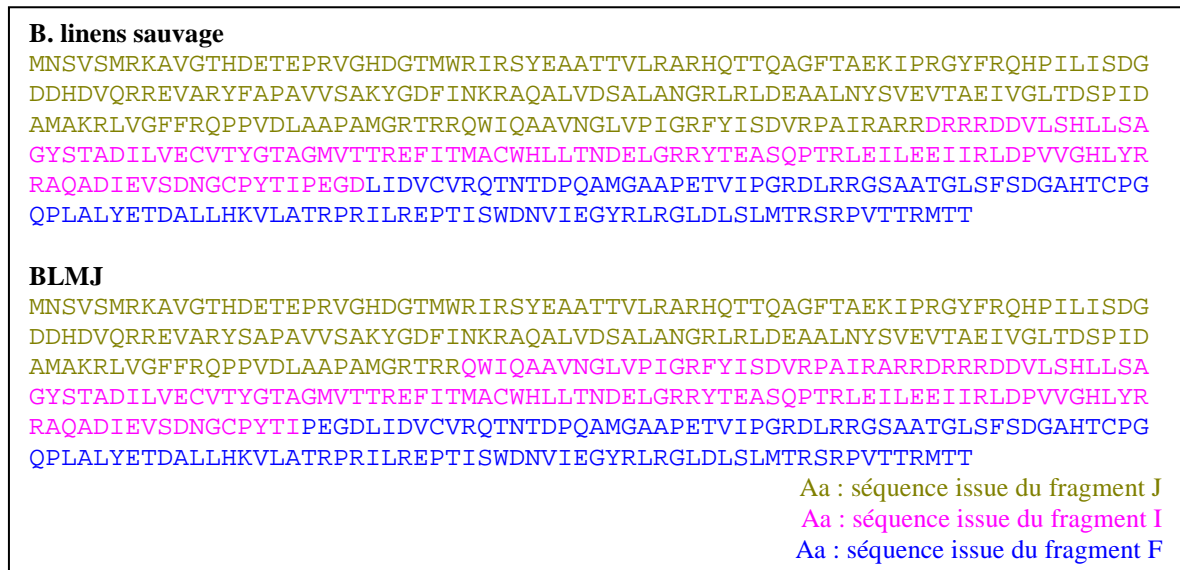


**Figure 68 :**  
 Electrophorèse des produits PCR de l’*orf 10*.  
 M1bd et M1kb :marqueur de taille lambda et 1kb.  
 A,F,I,J correspondent aux différents amplimères.  
 Avec (m) les produits PCR de BLMJ et (s) pour les produits PCR de la souche sauvage.

Les 16 produits PCR présents sur l’électrophorèse sont purifiés et séquencés par la société Biofidal. A partir de 40 µl de chaque produit PCR, un séquençage simple brin est réalisé sur une longueur de 550 ± 50 pb.

Les amplimères (A, F, I, J) 2 sont séquencés avec les amorces *forward* tandis que les amplimères (A, F, I, J) 1 sont séquencés avec les amorces *reverse*.

La séquence complète du gène est déterminée après avoir rassemblé les séquences des différents amplimères (figure 69)



**Figure 69** : Séquences protéiques de l'ORF 10 de *B. linens* sauvage et BLMJ.

La séquence de l'ORF 10 de *B. linens* sauvage obtenue est comparée avec celle disponible dans les bases de données sous le n° AAF65589. Les deux séquences sont identiques à 100%. La méthode utilisée a permis d'amplifier et de séquencer le bon gène. On peut alors procéder à l'analyse de la séquence de l'ORF 10 de BLMJ.

#### Analyse de la séquence de l'ORF 10 de BLMJ.

La séquence complète de l'*orf 10* et sa traduction sont présentées dans la figure 70.



M N S V S M R K A V G T H D E T E P	18
ATG AAC TCG GTG AGC ATG CGA AAG GCG GTG GGG ACA CAT GAT GAG ACC GAA CCC	54
R V G H D G T M W R I R S Y E A A T	36
CGA GTC GGC CAC GAC GGA ACC ATG TGG AGG ATA CGC TCC TAC GAG GCC GCC ACA	108
T V L R A R H Q T T Q A G F T A E K	54
ACT GTG CTG CGT GCG CGT CAT CAG ACT ACT CAG GCA GGG TTC ACC GCC GAA AAG	162
I P R G Y F R Q H P I L I S D G D D	72
ATC CCG CGC GGG TAC TTT CGG CAA CAC CCC ATA CTG ATC TCC GAC GGC GAC GAT	216
H D V Q R R E V A R Y S A P A V V S	90
CAC GAT GTA CAG CGC AGA GAA GTC GCC CGC TAC TCC GCC CCC GCC GTG GTG TCT	270
A K Y G D F I N K R A Q A L V D S A	108
GCG AAG TAC GGG GAT TTC ATC AAC AAG CGT GCT CAA GCC CTC GTC GAC TCC GCC	324
L A N G R L R L D E A A L N Y S V E	126
CTC GCA AAC GGT CGA CTG CGC CTC GAC GAG GCA GCT CTG AAC TAT TCG GTC GAA	378
V T A E I V G L T D S P I D A M A K	144
GTC ACA GCC GAA ATC GTG GGC CTC ACG GAC TCC CCC ATC GAC GCG ATG GCC AAG	432
R L V G F F R Q P P V D L A A P A M	162
CGT CTC GTC GGG TTC TTC AGA CAG CCA CCT GTC GAC CTC GCC GCC CCC GCG ATG	486
G R T R R Q W I Q A A V N G L V P I	180
GGC CGA ACG CGT CGC CAA TGG ATC CAG GCG GCC GTC AAC GGC CTC GTG CCC ATC	540
G R F Y I S D V R P A I R A R R D R	198
GGC CGG TTC TAC ATC AGC GAT GTG CGC CCG GCG ATT CGC GCC CGG CGC GAC CGA	594
R R D D V L S H L L S A G Y S T A D	216
CGC CGC GAC GAT GTG CTC TCG CAT CTG CTG TCC GCC GGT TAC AGC ACC GCT GAC	648
I L V E C V T Y G T A G M V T T R E	234
ATC CTG GTC GAA TGC GTA ACC TAC GGC ACA GCC GGC ATG GTG ACC ACT CGC GAA	702
F I T M A C W H L L T N D E L G R R	252
TTC ATC ACC ATG GCA TGC TGG CAT CTG CTG ACG AAC GAC GAG CTT GGC CGT CGC	756
Y T E A S Q P T R L E I L E E I I R	270
TAC ACC GAA GCC TCG CAG CCC ACC CGC CTG GAG ATC CTC GAA GAG ATC ATC CGC	810
L D P V V G H L Y R R A Q A D I E V	288
CTC GAC CCA GTC GTC GGC CAC CTC TAC CCG CGG GCC CAA GCC GAC ATC GAA GTC	864
S D N G C P Y T I P E G D L I D V C	306
TCA GAC AAC GGC TGC CCC TAC ACC ATC CCC GAA GGC GAC CTG ATC GAT GTG TGC	918
V R Q T N T D P Q A M G A A P E T V	324
GTG AGA CAG ACC AAC ACC GAC CCG CAG GCG ATG GGG GCA GGC CCG GAG ACG GTC	972
I P G R D L R R G S A A T G L S F S	342
ATC CCT GGG CGC GAC CTG AGA CCG GGA AGC GCC GCG ACA GGG CTG AGC TTC AGC	1026
D G A H T C P G Q P L A L Y E T D A	360
GAC GGA GCC CAC ACG TGC CCG GGT CAA CCA TTG GCT CTC TAC GAA ACC GAT GCC	1080
L L H K V L A T R P R I L R E P T I	378
CTT CTG CAC AAG GTC CTG GCT ACT CGC CCA CGC ATC CTT CGG GAG CCC ACC ATC	1134
S W D N V I E G Y R L R G L D L S L	396
AGC TGG GAC AAC GTC ATT GAA GGA TAC CGT CTG CGT GGC TTG GAC CTG AGT CTG	1188
M T R S R P V T T R M T T *	410
ATG ACG AGA TCA CGC CCT GTC ACA ACG AGA ATG ACA ACA TGA	1230

**Figure 70 :**  
Séquences de l'ORF 10 du cluster *crt* de BLMJ.

A l'aide du logiciel Alignn disponible sur le site d'infobiogen (<http://www.infobiogen.fr>) on réalise un alignement des séquences nucléiques de l'*orf 10* de BLMJ avec celui de *B. linens* sauvage. Cet alignement montre l'existence d'une mutation unique au niveau de la séquence de BLMJ. Cette mutation ponctuelle apparaît au niveau du nucléotide 251, où la thymine du gène sauvage est remplacée par une cytosine (Fig.71).

	250	260	270	280	290	300
/WT//	GCCCGCTACTTCGCCCCCGCCGTGGTGTCTGCGAAGTACGGGGATTTTCATCAACAAGCGT					
	.....	.....	.....	.....	.....	.....
blmj	GCCCGCTACTTCGCCCCCGCCGTGGTGTCTGCGAAGTACGGGGATTTTCATCAACAAGCGT					
	250	260	270	280	290	300

**Figure 71** : Extrait de l’alignement des séquences nucléiques de l’orf 10 de BLMJ avec celui du *B. linens* sauvage (WT).

On remarque la présence d’une autre thymine au niveau du nucléotide 250. On sait que les U.V. peuvent créer une liaison covalente entre deux thymines adjacentes (dimère de thymine). Les dimères de thymines ainsi formés entraînent une distorsion locale de l’hélice d’ADN. La cellule doit mettre en place un système de réparation de l’ADN. Mais il arrive que le système commette une erreur créant ainsi une mutation ponctuelle. Le gène sauvage a pu, sous l’effet des U.V. réaliser un dimère entre la thymine 250 et 251. Ces évènements seraient à l’origine de la transition observée chez BLMJ au niveau du nucléotide 251.

La présence d’une mutation au niveau de la séquence nucléique n’est pas suffisante pour conclure à une mutation de la protéine. On se place alors au niveau de la séquence protéique correspondant au gène étudié pour savoir s’il s’agit ou non d’une mutation silencieuse. A l’aide du logiciel Alignp d’infobiogen on réalise un alignement de la séquence protéique de l’ORF 10 de BLMJ avec celle du sauvage. L’alignement (Fig. 72) permet de repérer facilement la mutation de l’ORF 10 de BLMJ au niveau de l’acide aminé 84. La mutation n’est pas silencieuse puisque la phénylalanine est remplacée par une sérine.

	70	80	90	100	110	120
/WT//	RQHPILISDGDHDVQRREVARYFAPAVVSAKYGDFINKRAQALVDSALANGRLRLDEAA					
	.....	.....	.....	.....	.....	.....
blmj	RQHPILISDGDHDVQRREVARYSAPAVVSAKYGDFINKRAQALVDSALANGRLRLDEAA					
	70	80	90	100	110	120

**Figure 72** : Extrait de l’alignement des séquences protéiques de l’ORF 10 de BLMJ avec celui du *B. linens* sauvage (WT).

La transition observée au niveau du nucléotide 251 se traduit par le remplacement de la phénylalanine 84 en sérine. La phénylalanine est un acide aminé possédant une chaîne latérale hydrophobe alors que la sérine est un acide aminé hydrophile et de volume plus faible (Fig. 73). On peut supposer qu’un tel changement entraîne une modification



Cette conservation correspond elle a une réalité biologique comme dans le cas du motif de liaison de l'hème ou est ce seulement le fruit de hasard ?

Pour répondre à cette question nous avons choisi d'élargir l'investigation au delà de ces cinq P450.

On utilise l'application NCBI-BLASTp et la méthode d'alignement multiple [23] proposées par le site PRODOM (<http://prodes.toulouse.inra.fr/prodom.html>). Dans un premier temps le programme BLAST permet de retrouver les domaines Pro Dom (PD) que possède la séquence étudiée (tableau 12).

La saisie de la séquence de l'ORF 10 de *B. linens* sauvage révèle la présence de 7 domaines différents. Tous ces domaines sont retrouvés dans des séquences de P450.

	Position	Pro Dom domain	Nombre de protéines possédant ce domaine
1	1 - 210	PD 827289	1
2	211 - 328	PD 710089	2
3	329 - 409	PD 322695	1
4	63 - 182	PD 800555	1
5	264 - 328	PD 866822	37
6	339 - 367	PD 570616	227
7	72 - 166	PD 000936	255

**Tableau 12** : Résultat du BLAST de la séquence protéique de l'ORF 10 avec les domaines ProDom.

- Les trois premiers domaines (PD827289, PD710089, PD322695) ne sont pas utiles ici car ils correspondent à des fragments de l'ORF 10 de *B. linens* sauvage lui-même. Le PD827289 correspond à la séquence de l'ORF 10 de *B. linens* sauvage de l'acide aminé 1 à 210. Ce domaine s'aligne à 100 % avec la séquence donnée mais ce domaine n'est retrouvé dans aucune autre séquence protéique de la base. Il en est de même pour les domaines PD710089 et PD 322695 qui correspondent respectivement à la séquence de l'ORF 10 de *B. linens* sauvage de l'acide aminé 211 à 328 et de l'acide aminé 329 à 409.
- Le 4<sup>ème</sup> domaine le PD800555 n'apporte pas beaucoup d'information car il ne comprend qu'une seule protéine dans cette famille. Il s'agit d'un P450 bactérien du genre *Bradyrhizobium*.

- Le 5<sup>ème</sup> domaine, PD866822 est retrouvé entre les acides aminés 264 et 328. On compte 37 P450 comportant ce domaine.
- Le 6<sup>ème</sup> domaine le PD570616 est très fréquent chez les P450 (227 cytochromes P450).

Pour chaque domaine PD, on peut réaliser avec ProDom un alignement multiple de toutes les séquences possédant ce domaine. Cet alignement local de la région concernée par le domaine permet de repérer les acides aminés conservés.

Cet alignement effectué pour le PD 570616 permet de repérer le motif principal de liaison de l'hème (annexe 2). Les acides aminés conservés issus de cet alignement sont ceux impliqués dans la liaison de l'hème à l'apoprotéine. Le niveau d'implication de ces résidus n'est pas le même pour tous. Le résidu cystéine de ce motif est le seul à établir une liaison covalente avec l'hème. Les autres résidus interviennent uniquement par le biais de liaisons non covalentes.

- La séquence allant de l'acide aspartique 72 à l'arginine 166 correspond au PD 000936. 255 cytochromes P450 possèdent ce domaine. Une telle représentation au sein de la famille des cytochromes P450 semble indiquer que cette séquence correspond à une réalité biologique. Tout comme dans le cas du domaine n°6, on peut penser que les acides aminés conservés de ce domaine jouent un rôle important dans le fonctionnement de l'enzyme.

Un BLAST-p sur ProDom est à nouveau réalisé mais cette fois avec la séquence protéique de l'ORF 10 de BLMJ. Par ce BLAST on veut savoir si le changement de la phénylalanine 84 en sérine a une répercussion sur les domaines ProDom. En effet, ce BLAST permet d'identifier 6 domaines PD dans la séquence de BLMJ. La mutation de cette phénylalanine se traduirait par la disparition d'un domaine, le PD000936. Non seulement le PD 000936 semble être un domaine important dans la famille des P450 mais la phénylalanine 84 semble être un acide aminé clé de ce domaine. On vérifie si ce résidu est un acide aminé conservé dans ce domaine. Pour ce faire un alignement des 255 P450 au niveau du domaine PD000936 est effectué (Fig. 75). Après cet alignement, la phénylalanine 84 est retrouvée dans la séquence consensus (résidu entouré sur la figure 75). La phénylalanine en position 84 dans le P450 de *B. linens* sauvage semble être un acide aminé conservé.

La disparition du domaine PD 000936 dans l'ORF 10 de BLMJ ainsi que la conservation de la phénylalanine 84 dans ce domaine, sont des éléments convergents indiquant l'importance de cet acide aminé.



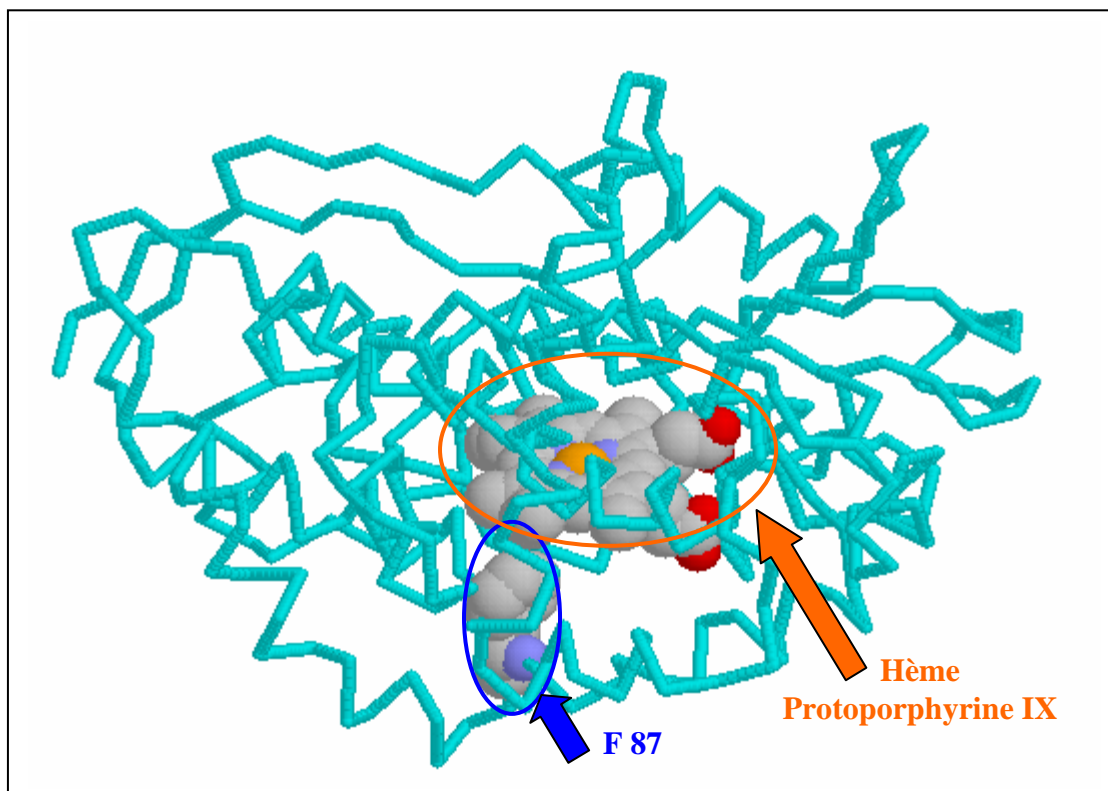
Figure 75 : Représentation d'une partie de l'alignement du PD 000936 car, il existe en tout 255 protéines qui présentent ce domaine.

Pour obtenir des informations concernant le rôle de cet acide aminé, on s'intéresse aux structures 3D disponibles. Le P450 de *B. linens* (codé par l'orf 10) a été découvert lors du séquençage de cluster de la caroténogénèse [57]. Depuis ce P450 n'a fait l'objet d'aucune autre étude, ni d'un point de vue fonctionnel ni structural. Par conséquent aucune structure 3D de ce P450 n'est disponible. Parmi les 255 protéines possédant le domaine PD000936, 11 P450 ont fait l'objet d'études cristallographiques. On dispose alors de 11 structures 3D possédant ce domaine. Les P450 en questions sont présentés dans le tableau 13.

Code Align Locus swissprot	N° Accès	N° PDB	Définition	Organisme	Nb résidus	Zone PD000936	aa eq F 84
CPXJ_SACER	Q00441	1EUP	CYP107A1	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	404	96-210	F 109
Q9KIZ4_POLCB	Q9KIZ4	1Q5D	CYP 167A1	<i>Polyangium cellulorum</i>	419	102-220	F 114
CPXL_PSESP	P33006	1CPT	CYP 108	<i>Pseudomonas sp.</i>	428	108-244	F 121
CPXW_SULSO	Q55080	1IO7	CYP 119	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	368	74-181	F 87
C121_MYCTU	Q59571	1N40	CYP 121	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	396	94-174	I 102
CPXA_PSEPU	P00183	1DZ4	CYP 101	<i>Pseudomonas putida</i>	415	106-221	V 119
Q9KZR7_STRCO	Q9KZR7	1ODO	CYP154A1	<i>Streptomyces coelicolor A3(2)</i>	408	93-209	F 106
Q9L142_STRCO	Q9L142	1GWI	CYP 154C1	<i>Streptomyces coelicolor A3(2)</i>	407	100-212	L 111
NOR_FUSOX	P23295	1EHE	CYP 55A1	<i>Fusarium oxysporum</i>	403	92-214	F 105
Q8RN03_AMYOR	Q8RN03	1UED	CYP 165C4	<i>Amycolatopsis orientalis</i>	406	103-224	F116
Q8RN04_AMYOR	Q8RN04	1LFK	CYP 165B3	<i>Amycolatopsis orientalis</i>	398	94-214	F 107

**Tableau 13** : 11 Cytochromes P450 dont les structures 3D sont connues ayant le PD 000936.

Dans la dernière colonne de ce tableau figure l'acide aminé équivalent à la phénylalanine 84 de l'ORF 10 de *B. linens* sauvage. Ces acides aminés correspondent à l'acide aminé aligné au niveau de la phénylalanine 84 dans l'alignement des 255 séquences présentant le domaine PD000936. Pour la plupart il s'agit également d'une phénylalanine. Seules 3 séquences possèdent un résidu différent. Pour les CYP 121, 101 et 154 C1, il s'agit respectivement d'une isoleucine, d'une valine et d'une leucine. Dans ces trois cas ce sont des acides aminés hydrophobes, tout comme la phénylalanine et d'un volume moléculaire sensiblement voisin. On considère l'importance d'un acide aminé hydrophobe à ce niveau de la séquence. L'ensemble des structures 3D a été étudié et représenté à l'aide du logiciel en ligne Protein Explorer<sup>®</sup>. On détaillera dans cette partie la structure 1IO7, les autres sont présentées dans l'annexe 3. Cette structure appartient au CYP 119 d'une archaebactérie : *Sulfolobus solfataricus*. D'après Swiss Model la séquence du CYP 119 est la plus proche de celle de l'ORF 10 de *B. linens* sauvage sur une zone allant du résidu 57 au résidu 139. Sur cette région ces deux séquences sont à 26,9% d'identité. Nous extrapolons donc la structure 1IO7 à l'ORF 10 de *B. linens*.



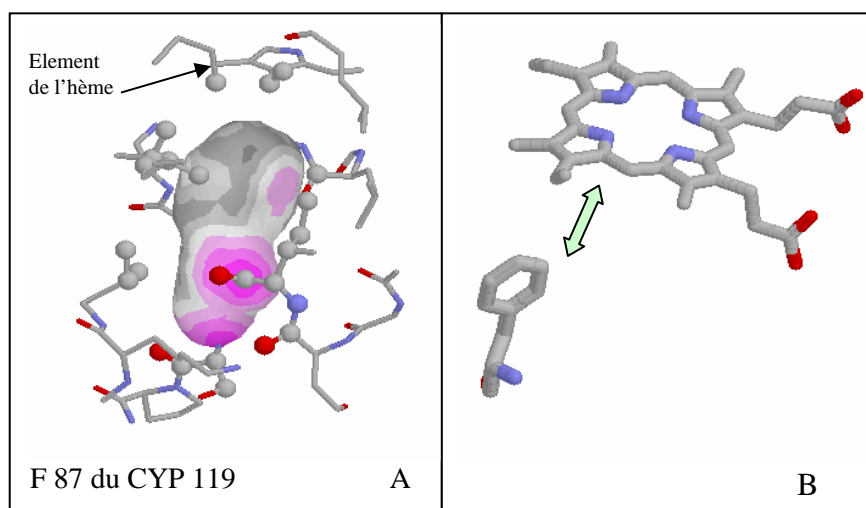
**Figure 76 :** Structure 3D du CYP 119 (n°PDB 1I07).

La figure 76 représente la structure 3D du CYP 119. La phénylalanine 87 entourée en bleu correspondrait à la phénylalanine 84 du P450 de *B. linens* sauvage. Le groupement prosthétique est entouré en orange. D’après cette représentation, le résidu étudié montre une grande proximité avec l’hème.

En sélectionnant l’acide aminé d’intérêt dans la séquence, Protein Explorer<sup>®</sup> est capable de montrer tous les éléments en interaction avec ce résidu. La figure suivante (Fig. 77) montre la représentation obtenue avec cette fonction.

**Figure 77.A :**  
Représentation de tous les éléments du CYP 119 établissant des interactions avec la phénylalanine 87.  
Éléments figurants : HEME ; L322; P321; G319; L318; I133; I130; L92; S88; I86; D85.

**Figure 77.B :**  
Représentation de l’interaction existante entre F87 et l’hème du CYP 119





Il semble que la phénylalanine 87 interagisse avec une partie de l'hème par une interaction hydrophobe. La structure du CYP 119 n'est pas la seule à montrer cette caractéristique.

L'étude globale des 11 structures possédant le PD000936 (annexe 3) montre que tous les acides aminés équivalents à la phénylalanine 84 se retrouvent au même niveau de la molécule (sous l'hème). Tous ces acides aminés interagiraient avec l'hème (tableau 14) par le biais d'une interaction hydrophobe.

N° PDB	Définition	aa eq F 84	Substrat	Liaisons avec aa eq F 84
1EUP	CYP107A1	F 109	Androstenedione	HEME /G 353 / M 352/L 238 / L 211/L 156 / V 114/T 110 / E 108/S 106 / V 105
1Q5D	CYP167A1	F 114	Epothilone	HEME /L 370 / G 367/P 366 / I 251/L 161 / I 119/T 115 / S 113/P 112 / N 111/V 110
1CPT	CYP 108	F 121	nr	HEME /L 382 / G 379/L 378 / I 264/V 238 / I 126/Q 122 / W 120/N 119 / L 118/T 117
1IO7	CYP 119	F 87	nr	HEME /L 322 / P 321/G 319 / L 318/I 133 / I 130/L 92 / S 88/I 86 / D 85
1N40	CYP 121	I 102	nr	HEME /L 350 / G 347/P 346 / F 230/L 202 / V 149/T 103 / A 101/K 100 / M 99/V 98
1DZ4	CYP 101	V 119	Camphre	HEME/G 359 / L 358/L 245 / V 123/G 120 / V 118/A 115
1ODO	CYP154A1	F 106	4-phényl-imidazole	HEME/L 359 / G 356/L 355 / M 239/L 156 / V 111/S 107 / A 105/P 104 / A 103/V 102
1GWI	CYP154C1	L 111	nr	HEME/P 356 / M 239/L 213 / L 159/V 116 / T 112/A 110 / V 107
1EHE	CYP 55A1	F 105	nr	HEME/L 357 / A 354/I 353 / L 236/I 210 / V 110/T 106 / T 104/P 103 / E 102/V 101
1UED	CYP165C4	F116	nr	HEME/L 361 / G 358/V 357 / L 242/L 218 / L 164/I 121 / T 117/E 115 / T 113/L 112
1LFLK	CYP165B	F 107	nr	HEME/G 349 / L 348/V 233 / M 209/L 155 / M 112/T 108 / G 106/P 105 / T 104/L 103

**Tableau 14** : Informations concernant la structure 3D des 11 P450 possédant le PD 000936 (nr : substrats non représentés).

Cet acide aminé apparaît déterminant dans la stabilisation de l'hème. Le remplacement de ce résidu par une sérine entraînerait de graves conséquences quand à l'activité du P450. La sérine étant un résidu polaire, elle ne peut établir d'interaction hydrophobe avec l'hème. Ce dernier adopterait alors une conformation inappropriée, la réaction de mono-oxygénation ne pourrait plus avoir lieu.

L'analyse de la séquence de l'ORF 10 a montré l'importance et le rôle de la phénylalanine 84 dans la structure du P450.

Ces résultats issus de considérations bioinformatiques nous laissent penser que la mutation de l'*orf 10* de BLMJ est suffisante pour expliquer l'inactivation de ce P450. L'absence d'hydroxylation de caroténoïdes aromatiques peut être reliée à la présence de ce P450 muté chez BLMJ. Ces résultats semblent indiquer que l'*orf 10* du cluster *crt* code le P450 responsable de la formation du di-hydroxy-isoréniératène chez *B. linens*.

### 2.4.2- Mutagenèse « dirigée » sur *B. linens* sauvage

La mutation de la phénylalanine 84 en sérine (F84S) de l'ORF 10 est vraisemblablement à l'origine de l'absence d'hydroxylation de l'isoréniératène chez BLMJ. Cependant ce mutant est issu d'une mutagenèse aléatoire aux U.V. Si ces rayonnements ont entraînés une mutation sur l' ORF 10, ils ont probablement causé la mutation d'autres gènes. On souhaite s'assurer que l'absence d'hydroxylation de l'isoréniératène chez BLMJ est due uniquement à la mutation observée sur l'ORF 10.

Afin d'obtenir une souche uniquement mutée sur ce gène, on électropore des cellules de *B. linens* sauvage avec l' *orf 10* muté de BLMJ.

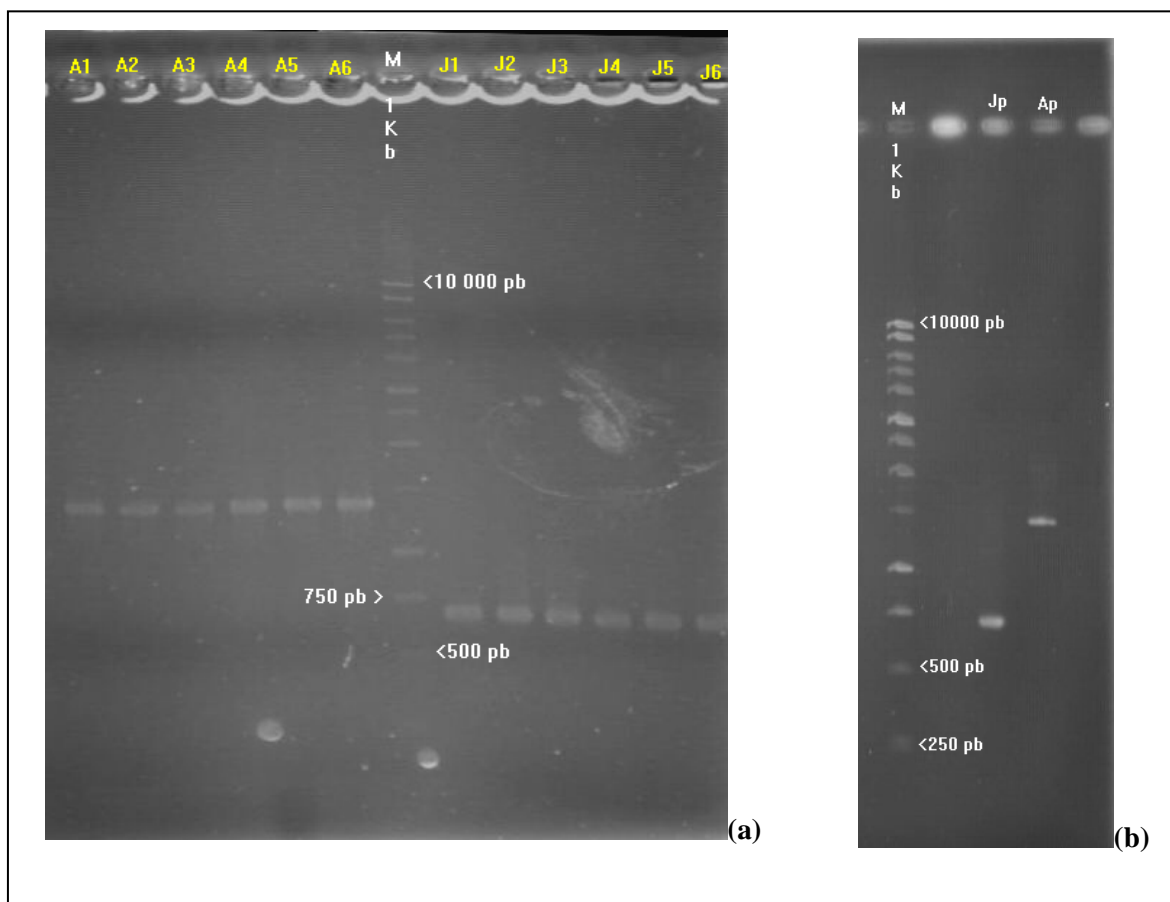
#### 2.4.2.1- Electroporation de *B. linens* sauvage

L'électroporation est une méthode de pénétration d'ADN dans des cellules, basée sur l'utilisation d'impulsions électriques qui augmentent la perméabilité membranaire.

Les électroporations sont réalisées sur des cellules *B. linens* ATCC 9175. Pour ces expériences deux types de fragments d'ADN de BLMJ sont utilisés, un correspondant à l'*orf 10* complet et l'autre correspondant à un fragment du gène portant la mutation correspondant à F84S. Par un phénomène de recombinaison homologue on espère insérer la mutation correspondant à F84S dans l'*orf 10* de *B. linens* sauvage et ainsi obtenir une bactérie possédant cette unique mutation.

L'ADN destiné à l'électroporation est issu de produits PCR purifiés. Par une nouvelle PCR sur l'*orf 10* de BLMJ on génère des amplimères de 2 tailles différentes (Fig. 67) :

- le A de 1341 pb correspond à l'*orf 10* entier,
- le J de 667 pb correspond au fragment de l'*orf 10* de la base – 45 à 622. La mutation correspondant à F84S est portée par ce fragment.



**Figure 78** : Electrophorèse des produits PCR de l'*orf 10* de BLMJ. (a) 6 amplimères A et 6 amplimères J non purifié. Volume déposé 20  $\mu$ l. (b) produits purifiés Jp : amplimère J purifié et Ap : amplimère A purifié.

L'électrophorèse des produits PCR obtenus est présentée dans la figure 78.a. Les bandes correspondant aux l'amplimères A et J sont découpées sur le gel d'agarose puis purifiées. La pureté de l'ADN obtenu est contrôlée par une deuxième électrophorèse (Fig. 78.b). L'ADN ainsi obtenu est utilisé pour les expériences d'électroporation.

Les cellules compétentes et l'ADN purifié sont mélangées puis électroporées. Les cellules issues de l'électroporation sontensemencées sur un milieu nutritif ne contenant pas de facteur de sélection. Sachant que les cellules n'ont pas reçu de gène rapporteur l'utilisation d'un tel facteur est inutile. Nous n'avons donc aucun moyen de limiter la croissance aux clones ayant effectivement reçu le fragment d'ADN de BLMJ. La sélection se fait, après croissance par examen visuel des colonies. Dès qu'un clone présente une couleur différente, il est repiqué et testé à la réaction phénolate. Seuls les clones phénolate négatif sont intéressants et conservés. Les résultats des différentes électroporations sont présentés dans le tableau 15.

	Cellules compétentes	ADN	Nombre total de clones	Nombre de clones phénolate -
E2	<i>B. linens</i> 9175	Fragment J <i>blmj db</i>	1264	0
E3	<i>B. linens</i> 9175	Fragment A <i>blmj db</i>	73320	0
E4	<i>B. linens</i> 9175	Fragment J <i>blmj db</i>	4400	0
E5	<i>B. linens</i> 9175	Fragment J <i>blmj dilué 1/10</i>	4860	0
E6	<i>B. linens</i> 9175	Fragment J <i>blmj sb</i>	3860	0
E7	<i>B. linens</i> 9175	Fragment J <i>blmj sb dilué 1/10</i>	7820	1

**Tableau 15** : Résultats des électroporations pratiquées sur *B. linens* sauvage.  
(Sb : simple brin et db : double brin).

De ces expériences un seul clone noté (BLE7J) s'est révélé être phénolate négatif. Cette réponse montre que BLE7J ne produit pas les mêmes pigments que la souche sauvage. La caroténogénèse chez BLE7J n'est donc pas complète. BLE7J est le résultat de l'électroporation de *B. linens* sauvage avec le fragment J de l'*orf 10* de BLMJ. La suite de ces expériences est destinée à étudier les pigments produits ainsi que la séquence de l'ORF 10 de BLE7J.

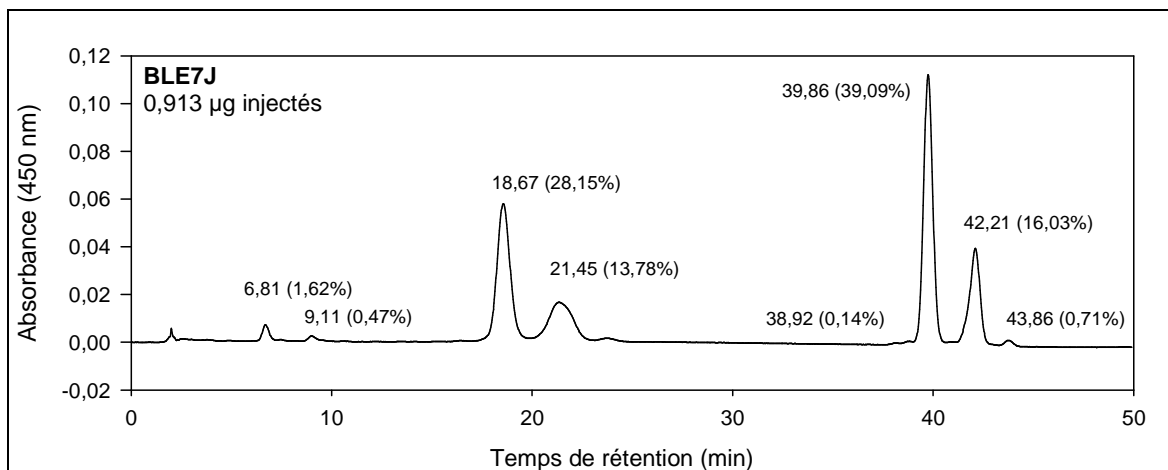
**Remarque :** Cette bactérie est connue pour être difficile à transformer (communication personnelle). On notera que l'électroporation de cette souche est peu efficace. En effet sur les 95 000 clones obtenus un seul semble avoir reçu l'ADN muté.

#### 2.4.2.2- Description du mutant BLE7J

La couleur des colonies des BLE7J est comparable à celle du mutant BLMJ. Tout comme BLMJ, la couleur des colonies n'est pas modifiée par l'ajout d'une base forte. BLE7J ne semble pas accumuler de di-hydroxy-isoréniératène

Après culture on obtient 1,68 g de biomasse (matière sèche) par litre de culture. L'extraction des pigments de BLE7J est pratiquée en deux fois, la première à l'aide de méthanol et la seconde à l'aide d'acétone. 1,72 mg de pigments par litre de culture sont récoltés, ce qui correspond à une production spécifique de 1,02 mg de pigment par g de matière sèche. Les quantités de biomasse et de pigments produits sont comparables à celle produites par le mutant BLMJ et la bactérie sauvage. La mutation portée par BLE7J n'affecte pas ces paramètres.

Le chromatogramme (Fig. 79) correspond au profil pigmentaire de BLE7J suite à l'injection en HPLC de 0,913 µg de pigments totaux.



**Figure 79** : Chromatogramme HPLC des pigments de BLE7J.

Le profil pigmentaire de BLE7J ressemble à celui de BLMJ (Fig. 62). 55% des pigments produits par BLE7J sont apolaires. Le pigment le plus représenté est élué à 40 min. Les pigments élués à 18,8 et 21,5 min, sont de polarité intermédiaire. Ces espèces pigmentaires sont plus présentes chez BLE7J que chez BLMJ. Le mutant obtenu suite à l'électroporation semble produire les mêmes pigments que BLMJ mais leur répartition est différente.

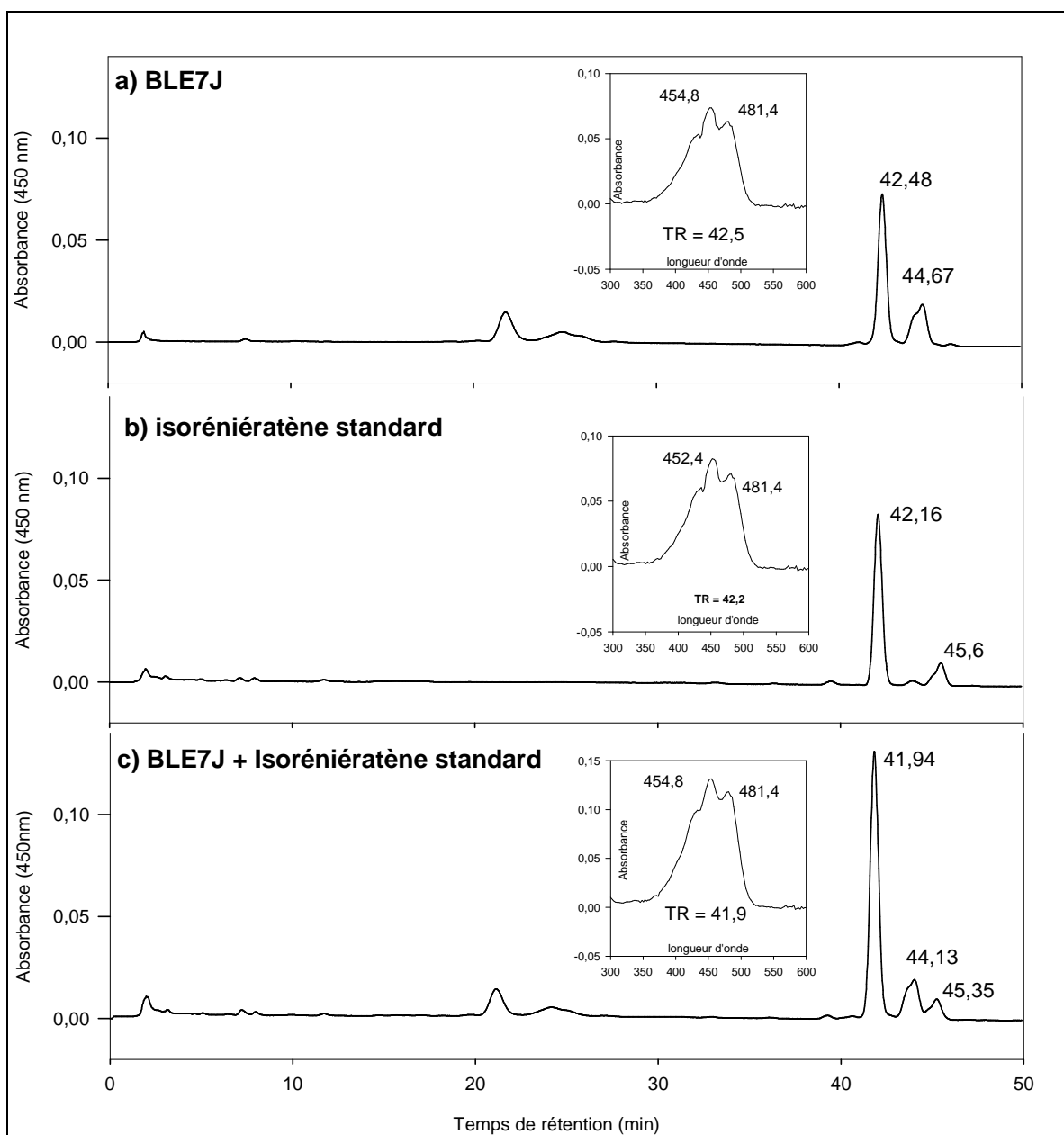
La caractérisation de pigments de BLE7J développée dans la partie suivante est réalisée sur des extraits pigmentaires totaux. En effet contrairement à BLMJ, les pigments extraits par le méthanol chez BLE7J ne sont pas négligeables. Cette fraction apporte principalement les pigments de polarité intermédiaire. Pour obtenir une analyse représentative de toutes les espèces pigmentaires nous devons utiliser l'extrait pigmentaire total.

#### 2.4.2.3- Caractérisation des pigments produits par le mutant BLE7J

Comme pour le mutant BLMJ, cette caractérisation est effectuée en 2 temps avec en premier une expérience de co-élution en HPLC et ensuite l'analyse LCMS des pigments.

*Expériences de Co-élution en HPLC (figure 80)*

On sait que BLE7J possède un profil pigmentaire similaire à celui de BLMJ. Connaissant l'origine de la souche BLE7J, on peut penser que le pigment majoritairement accumulé par BLE7J est l'isoréniératène.



**Figure 80** : Co-élution des pigments de BLE7J avec l'isoréniératène standard.

a) chromatogramme des pigments de BLE7J (0,463 μg) ;

b) chromatogramme de l'isoréniératène standard (0,400 μg) ;

c) chromatogramme issu de la co-élution des pigments de BLE7J (0,463 μg) avec l'isoréniératène standard (0,400 μg).

Ainsi dans l'expérience de co-élution un seul caroténoïde standard, l'isoréniératène sera utilisé. On injecte d'abord les pigments totaux de BLE7J puis l'isoréniératène standard et enfin un mélange des pigments de BLE7J avec l'isoréniératène standard (Fig. 80).

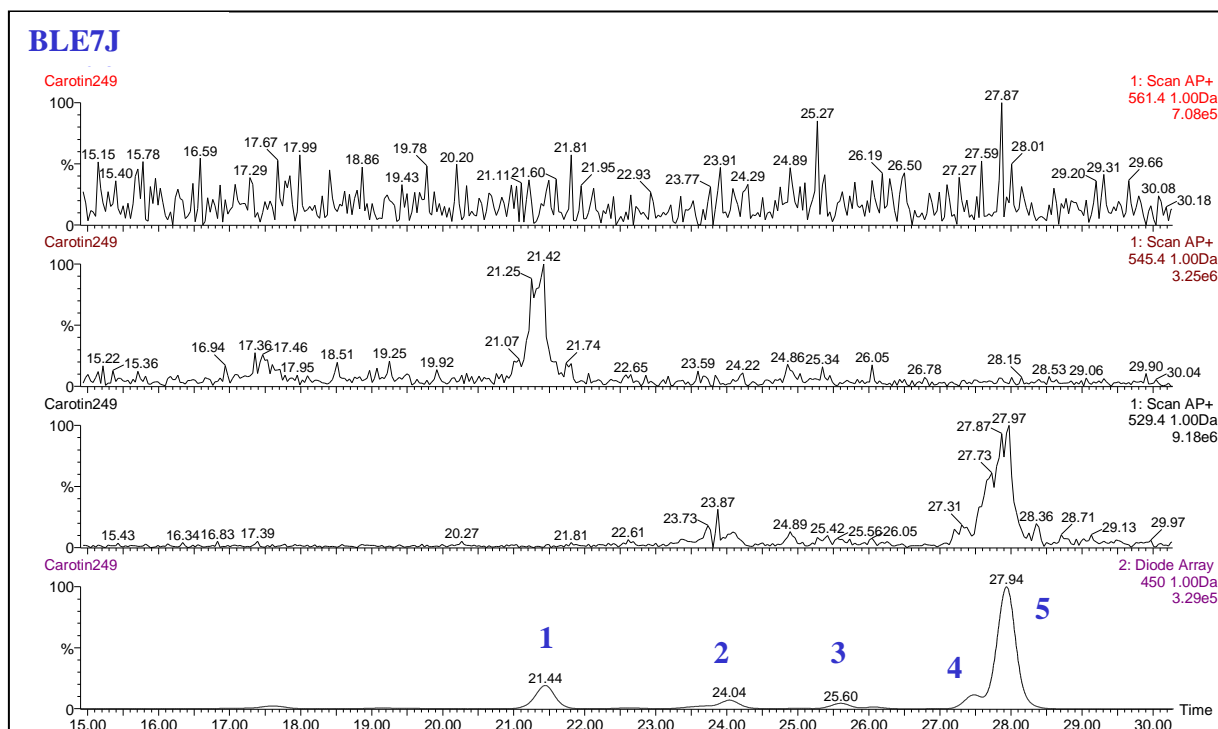
Le caroténoïde majoritaire de BLE7J est élué à 42,5 min. Son spectre présente des pics d'absorbance à 454,8 et 481,4 nm. Le temps de rétention de l'isoréniératène standard est de 42,2 min, les pics d'absorbance de ce standard sont observés à 452,4 et 481,4 nm. Ces valeurs sont très proches de celles du pigment de BLE7J.

Lors de l'injection de mélange des pigments de BLE7J et d'isoréniératène standard en proportion équivalentes, une co-élution du pigment majoritaire de BLE7J et de l'isoréniératène standard est observée.

BLE7J semble accumuler principalement de l'isoréniératène. Afin de le vérifier nous procédons à l'analyse LCMS de ses pigments.

#### Analyse LCMS des pigments de BLE7J (figure 81)

Les fractions méthanoliques et acétoniques des pigments de BLE7J sont analysées en LCMS. Cette analyse est effectuée par le Dr D. Breithaupt de l'université de Hohenheim.



**Figure 81** : Chromatogrammes issus de l'analyse LCMS des pigments de BLE7J.



La chromatographie liquide permet de séparer 5 caroténoïdes (Fig. 81). Le composé n°1 élué à 21,44 min a un m/z de 545. La masse molaire de ce composé est donc de 544 g.mol<sup>-1</sup> ce qui correspond au mono hydroxy-isoréniératène. Le composé majoritaire est élué à 27,94 min, son m/z est de 529 ce qui correspond à la masse molaire de l'isoréniératène (528 g.mol<sup>-1</sup>). Les autres composés représentés par les pics 2, 3 et 4 semblent être des isomères de l'isoréniératène. BLE7J produits les mêmes pigments que BLMJ.

L'analyse LCMS a montré la présence de deux caroténoïdes différents : l'isoréniératène et le mono-hydroxy-isoréniératène. On peut alors identifier les pics d'éluion présents sur le chromatogramme HPLC (Fig. 79).

Les deux composés élués à partir de 39 min sont des caroténoïdes apolaires. Le composé majoritaire élué à 40 min correspond à l'isoréniératène. Un isomère *cis/trans* de ce caroténoïde se trouve élué à 42 min. Ces deux pics correspondent à l'isoréniératène. Ce caroténoïde représente ainsi 55 % des pigments de BLE7J.

Les composés élués à 18,7 et 21,45 min sont de polarité intermédiaire. Ils sont attribués au mono-hydroxy-isoréniératène, l'autre pigment détecté en LCMS. Ainsi 42 % des pigments de BLE7J correspondent au mono- hydroxy-isoréniératène.

L'absence de di-hydroxy-isoréniératène chez BLE7J semble indiquer une mutation au niveau de l'enzyme responsable de l'hydroxylation de l'isoréniératène. La synthèse de mono- hydroxy-isoréniératène chez BLE7J révèle toutefois la présence d'activité d'hydroxylase. La mutation affectant l'hydroxylase de BLE7J semble moins importante que dans le cas de BLMJ.

#### 2.4.2.4- Etude de l'*orf 10* du cluster *crt* de BLE7J

L'objectif de cette étude est l'identification de la mutation portée par BLE7J.

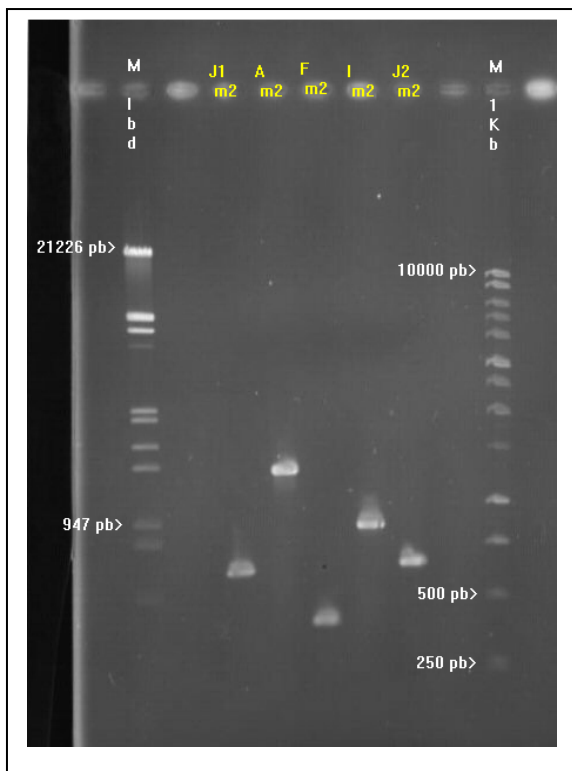
##### PCR et séquençage de l'*orf 10*

L'ADN de BLE7J est extrait et ensuite utilisé pour l'amplification de l'*orf 10* du cluster *crt*. Les amorces utilisées sont celles ayant servit pour la PCR de l'ORF 10 de BLMJ (voir le paragraphe 2.4.1.3).

On obtient alors 4 produits PCR différents :

- le produit A de 1341 pb, issu de la PCR avec les amorces 1 et 3,
- le produit J de 667 pb, issu de la PCR avec les amorces 2 et 12,
- le produit I de 877 pb, issu de la PCR avec les amorces 8 et 10,
- le produit F de 429 pb, issu de la PCR avec les amorces 5 et 4,

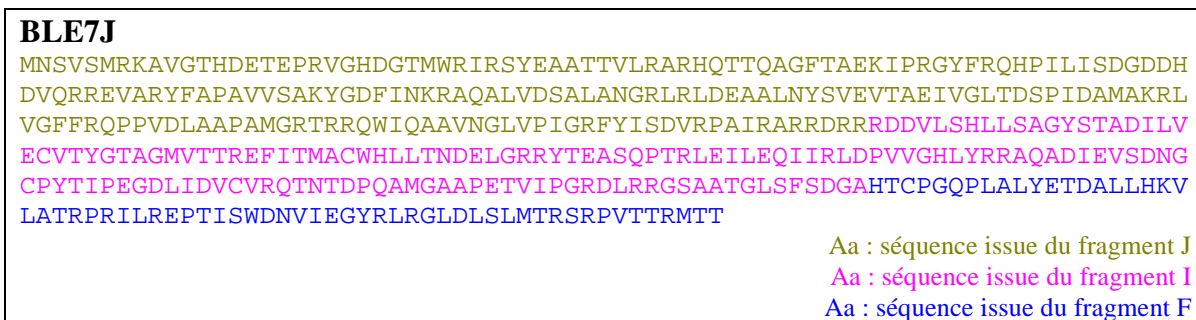
L'électrophorèse de ces produits est présentée dans la figure 82.



**Figure 82 :**  
 Electrophorèse des produits PCR de BLE7J.  
 Mlbd : marqueur lambda  
 M1kb : marqueur 1Kb  
 J1 m2 et J2 m2 : amplimères J de BLE7J  
 Am2 , Fm2 et Im2  
 amplimères A, F et I de BLE7J.

Ces produits PCR sont purifiés et séquencés par la société Biofidal. Pour chaque produit PCR, la séquence est déterminée sur un cadre de lecture de 550 pb ± 50 avec l'amorce *forward* correspondante puis l'amorce *reverse* (comme précédemment effectué pour l'*orf 10* de BLMJ).

La séquence complète de l'ORF 10 de BLE7J est déterminée après avoir rassemblé les séquences des différents amplimères (Fig. 83)



**Figure 83 :** Séquence protéique de l'ORF 10 de BLE7J.

L'étude de la séquence ainsi obtenue est réalisée dans la partie suivante.

Analyse de la séquence de l'ORF 10 de BLE7J.

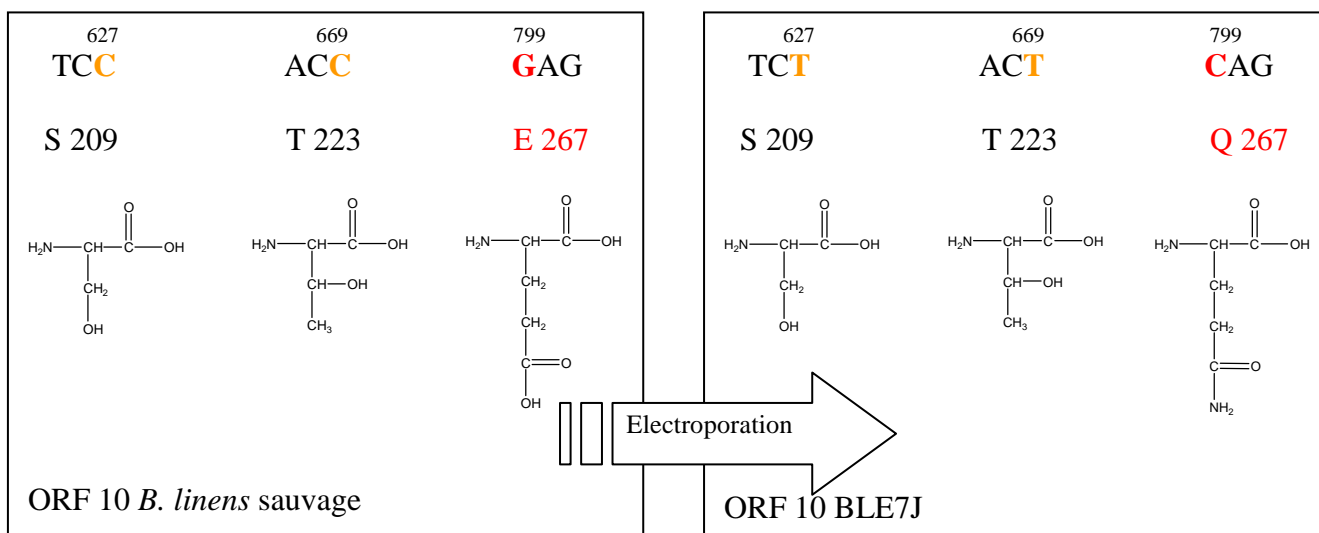
Les séquences nucléiques et protéiques relatives à l'orf 10 de BLE7J sont présentées dans la figure 84.

M	N	S	V	S	M	R	K	A	V	G	T	H	D	E	T	E	P	18
ATG	AAC	TCG	GTG	AGC	ATG	CGA	AAG	GCG	GTG	GGG	ACA	CAT	GAT	GAG	ACC	GAA	CCC	54
R	V	G	H	D	G	T	M	W	R	I	R	S	Y	E	A	A	T	36
CGA	GTC	GGC	CAC	GAC	GGA	ACC	ATG	TGG	AGG	ATA	CGC	TCC	TAC	GAG	GCC	GCC	ACA	108
T	V	L	R	A	R	H	Q	T	T	Q	A	G	F	T	A	E	K	54
ACT	GTG	CTG	CGT	GCG	CGT	CAT	CAG	ACT	ACT	CAG	GCA	GGG	TTC	ACC	GCC	GAA	AAG	162
I	P	R	G	Y	F	R	Q	H	P	I	L	I	S	D	G	D	D	72
ATC	CCG	CGC	GGG	TAC	TTT	CGG	CAA	CAC	CCC	ATA	CTG	ATC	TCC	GAC	GGC	GAC	GAT	216
H	D	V	Q	R	R	E	V	A	R	Y	F	A	P	A	V	V	S	90
CAC	GAT	GTA	CAG	CGC	AGA	GAA	GTC	GCC	CGC	TAC	TTC	GCC	CCC	GCC	GTG	GTG	TCT	270
A	K	Y	G	D	F	I	N	K	R	A	Q	A	L	V	D	S	A	108
GCG	AAG	TAC	GGG	GAT	TTC	ATC	AAC	AAG	CGT	GCT	CAA	GCC	CTC	GTC	GAC	TCC	GCC	324
L	A	N	G	R	L	R	L	D	E	A	A	L	N	Y	S	V	E	126
CTC	GCA	AAC	GGT	CGA	CTG	CGC	CTC	GAC	GAG	GCA	GCT	CTG	AAC	TAT	TCG	GTC	GAA	378
V	T	A	E	I	V	G	L	T	D	S	P	I	D	A	M	A	K	144
GTC	ACA	GCC	GAA	ATC	GTG	GGC	CTC	ACG	GAC	TCC	CCC	ATC	GAC	GCG	ATG	GCC	AAG	432
R	L	V	G	F	F	R	Q	P	P	V	D	L	A	A	P	A	M	162
CGT	CTC	GTC	GGG	TTC	TTC	AGA	CAG	CCA	CCT	GTC	GAC	CTC	GCC	GCC	CCC	GCG	ATG	486
G	R	T	R	R	Q	W	I	Q	A	A	V	N	G	L	V	P	I	180
GGC	CGA	ACG	CGT	CGC	CAA	TGG	ATC	CAG	GCG	GCC	GTC	AAC	GGC	CTC	GTG	CCC	ATC	540
G	R	F	Y	I	S	D	V	R	P	A	I	R	A	R	R	D	R	198
GGC	CGG	TTC	TAC	ATC	AGC	GAT	GTG	CGC	CCG	GCG	ATT	CGC	GCC	CGG	CGC	GAC	CGA	594
R	R	D	D	V	L	S	H	L	L	S	A	G	Y	S	T	A	D	216
CGC	CGC	GAC	GAT	GTG	CTC	TCG	CAT	CTG	CTG	TCT	GCC	GGT	TAC	AGC	ACC	GCT	GAC	648
I	L	V	E	C	V	T	Y	G	T	A	G	M	V	T	T	R	E	234
ATC	CTG	GTC	GAA	TGC	GTA	ACT	TAC	GGC	ACA	GCC	GGC	ATG	GTG	ACC	ACT	CGC	GAA	702
F	I	T	M	A	C	W	H	L	L	T	N	D	E	L	G	R	R	252
TTC	ATC	ACC	ATG	GCA	TGC	TGG	CAT	CTG	CTG	ACG	AAC	GAC	GAG	CTT	GGC	CGT	CGC	756
Y	T	E	A	S	Q	P	T	R	L	E	I	L	E	Q	I	I	R	270
TAC	ACC	GAA	GCC	TCG	CAG	CCC	ACC	CGC	CTG	GAG	ATC	CTC	GAA	CAG	ATC	ATC	CGC	810
L	D	P	V	V	G	H	L	Y	R	R	A	Q	A	D	I	E	V	288
CTC	GAC	CCA	GTC	GTC	GGC	CAC	CTC	TAC	CGG	CGG	GCC	CAA	GCC	GAC	ATC	GAA	GTC	864
S	D	N	G	C	P	Y	T	I	P	E	G	D	L	I	D	V	C	306
TCA	GAC	AAC	GGC	TGC	CCC	TAC	ACC	ATC	CCC	GAA	GGC	GAC	CTG	ATC	GAT	GTG	TGC	918
V	R	Q	T	N	T	D	P	Q	A	M	G	A	A	P	E	T	V	324
GTG	AGA	CAG	ACC	AAC	ACC	GAC	CCG	CAG	GCG	ATG	GGG	GCA	GCC	CCG	GAG	ACG	GTC	972
I	P	G	R	D	L	R	R	G	S	A	A	T	G	L	S	F	S	342
ATC	CCT	GGG	CGC	GAC	CTG	AGA	CGG	GGA	AGC	GCC	GCG	ACA	GGG	CTG	AGC	TTC	AGC	1026
D	G	A	H	T	C	P	G	Q	P	L	A	L	Y	E	T	D	A	360
GAC	GGA	GCC	CAC	ACG	TGC	CCG	GGT	CAA	CCA	TTG	GCT	CTC	TAC	GAA	ACC	GAT	GCC	1080
L	L	H	K	V	L	A	T	R	P	R	I	L	R	E	P	T	I	378
CTT	CTG	CAC	AAG	GTC	CTG	GCT	ACT	CGC	CCA	CGC	ATC	CTT	CGG	GAG	CCC	ACC	ATC	1134
S	W	D	N	V	I	E	G	Y	R	L	R	G	L	D	L	S	L	396
AGC	TGG	GAC	AAC	GTC	ATT	GAA	GGA	TAC	CGT	CTG	CGT	GGC	TTG	GAC	CTG	AGT	CTG	1188
M	T	R	S	R	P	V	T	T	R	M	T	T	*					410
ATG	ACG	AGA	TCA	CGC	CCT	GTC	ACA	ACG	AGA	ATG	ACA	ACA	TGA					1230

**Figure 84 :**  
Séquences de  
l'ORF 10 du  
cluster *crt* de  
BLE7J



Une seule substitution est retrouvée au niveau de la séquence protéique. L'acide glutamique 267 est remplacé par une glutamine, cette mutation correspond à la transversion du nucléotide 799. Les deux autres mutations observées sur la séquence nucléiques s'avèrent être des mutations silencieuses (Fig. 87).



**Figure 87** : Schéma représentant les différentes modifications survenues sur l'ORF 10 de BLE7J.

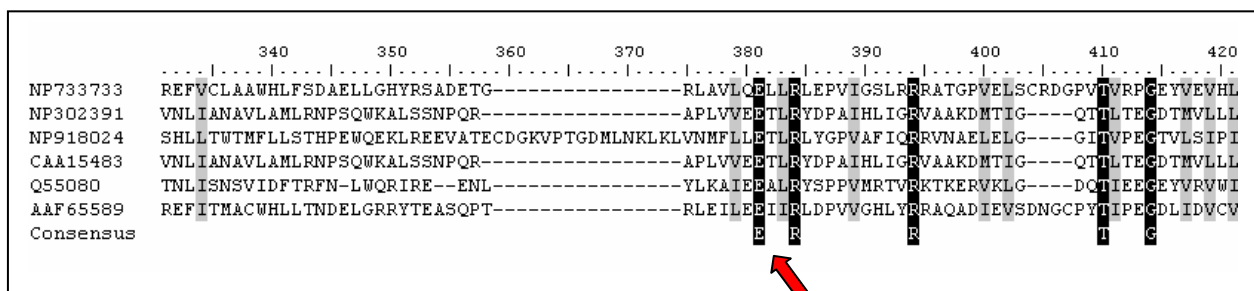
Nous observons des mutations sur l'*orf 10* de BLE7J différentes de celle portée par l'*orf 10* de BLMJ (Fig. 73). Le fragment d'ADN inséré par l'électroporation, nommé fragment J de BLMJ de 667 bases s'étend du nucléotide -45 au nucléotide 622 et porte la mutation T251C (correspondant à F84S). Dans le cas de BLE7J, non seulement la mutation T251C n'est pas retrouvée, mais les mutations portées par l'*orf 10* de BLE7J apparaissent au delà du fragment J (après le nucléotide 622). On peut penser que l'ADN de BLMJ est bien entré dans les cellules compétentes de *B. linens* sauvage puisque l'*orf 10* de BLE7J est muté. Cependant la recombinaison homologue attendue ne s'est pas produite, générant ainsi un nouveau mutant sur l'*orf 10*. Même si BLE7J ne porte pas la mutation escomptée, il n'en demeure pas moins un mutant de l'*orf 10* du cluster *crt*.

La présence d'une mutation sur l'*orf 10* de BLE7J (ajouté à la mutation observée chez BLMJ) peut suffire à établir un lien entre le P450 codé par l'*orf 10* et l'hydroxylation des caroténoïdes aromatiques. On préfère toutefois s'assurer que la mutation E267Q de l'ORF 10 de BLE7J intervient bien sur un acide aminé important pour la structure ou l'activité du P450.

Dans la mutation portée par BLE7J, un acide aminé polaire (acide glutamique) est remplacé par un acide aminé polaire (glutamine). La nature hydrophile du résidu est conservée. Cependant BLE7J apparaît incapable de synthétiser du 3,3'-di-hydroxy-isoréniératène Il semble donc que l'acide glutamique en position 267 soit important pour l'activité du P450.

### Rôle de l'acide glutamique 267

Dans l'objectif de montrer l'importance de l'acide glutamique 267, nous effectuons l'alignement des P450 les plus proches de celui de *B. linens* (Fig. 88), on retrouve le glutamate 267 dans la séquence consensus.

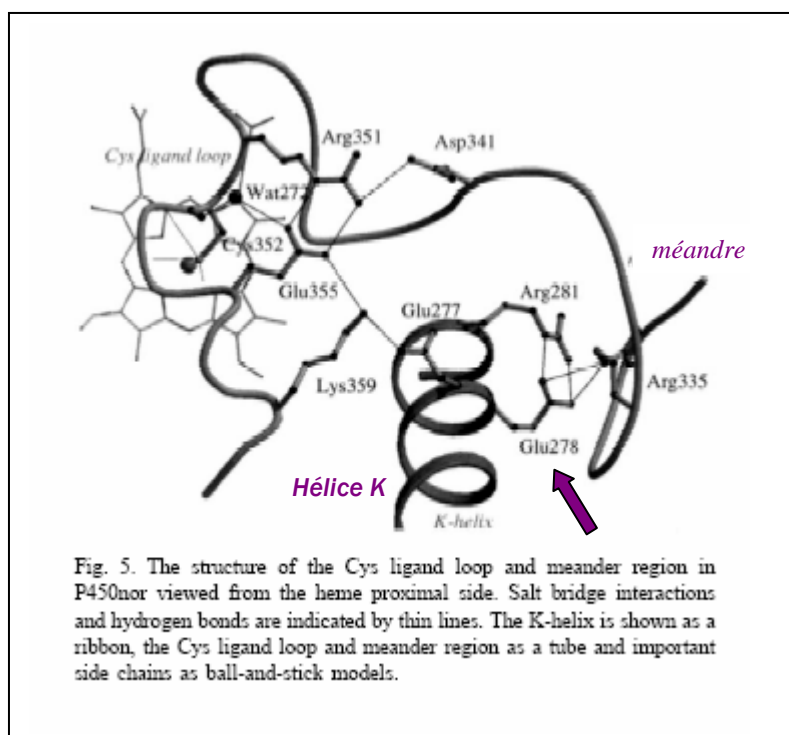


**Figure 88** : Extrait de l'alignement des cinq P450 les plus proches de celui de *B. linens* sauvage présenté dans le paragraphe 2.1.2 de cette partie.

L'alignement des séquences met en évidence un motif très conservé (E-x-x-R) chez les P450. Ce motif est présent au niveau de l'hélice K appartenant au noyau structural commun à tous les P450 [38 , 39]. Ce motif (E-x-x-R) semble impliqué dans la stabilisation du noyau structural. En effet, plusieurs études ont montré l'importance des résidus de ce motif :

- Une étude sur les domaines fonctionnels du P450 aromatasase humaine présente 2 mutants au niveau de l'arginine 365, résidu correspondant à l'arginine du motif E-x-x-R. Les mutants R365K et R365A ne présente plus aucune activité aromatasase [22].
- Une autre étude portant sur l'importance des résidus lysines et arginines du P450 d [111] montre que le remplacement de l'arginine du motif E-x-x-R par une leucine ou un tryptophane entraîne une disparition de l'activité enzymatique. Des études spectroscopiques montrent que ces mutants sont incapables de lier l'hème.

- La prostacycline synthase enzyme appartenant à la famille des cytochromes P450, a fait l'objet de mutagenèse dirigée [44]. Les mutations portaient sur la cystéine impliquée dans la liaison de l'hème ainsi que sur les résidus glutamate (E347) et arginine (R350) du motif E-x-x-R. Les mutants E347A et R350A possèdent une activité enzymatique très faible démontrant le rôle crucial des résidus glutamate et arginine du motif E-x-x-R dans l'activité du P450.
- Dans leur étude sur le P450<sub>nor</sub> [110], Shimirzu *et al.* montrent les liaisons établies par les résidus conservés de l'hélice K. La figure 89 correspond à la représentation de la région d'intérêt dans la structure 3D du P450 nor. Dans cette figure sont présentés les différents résidus qui interagissent avec la cystéine 352 (acide aminé liant le fer hémique) ainsi que différents éléments permettant la stabilisation de la structure de l'hème coté proximal via des liaisons salines. En plus de ces éléments, on distingue le glutamate 278 et l'arginine 281 du motif E-x-x-R de l'hélice K. Ces 2 résidus ainsi que l'arginine 355 situé au niveau du « méandre » interagissent entre eux pour participer à la stabilisation de la structure proximale de l'hème. Cette caractéristique correspond à la triade conservée E-R-R retrouvée chez les cytochromes P450.



**Figure 89** : Structure du P450 nor dans les régions du ligand cystéine, du « méandre » et de l'hélice K issue de [110].

Il apparaît clairement que la conservation du motif E-x-x-R dans les séquences de P450 correspond à une caractéristique structurale importante puisque ces résidus sont impliqués dans la stabilisation de l'hème. La mutation de ces résidus entraîne de graves conséquences sur l'activité du P450.

L'acide glutamique 267 de l'ORF 10 est un acide aminé conservé, impliqué dans la stabilisation de l'hème coté proximal. Sa mutation chez BLE7J entraîne une déstabilisation de l'hème amoindrissant l'activité enzymatique du P450. Cependant la mutation de cet acide aminé en glutamine maintient la nature hydrophile du résidu ce qui limite l'effet déstabilisant. La déstabilisation de l'hème n'est pas totale et permettrait une activité réduite du P450.

Que ce soit BLE7J ou BLMJ, dans les deux cas l'*orf 10* est muté et l'hydroxylation de l'isoréniératène ne se fait pas correctement. De ces expériences il semblerait que le P450 réalisant l'hydroxylation de l'isoréniératène est codé par le gène *orf 10*. Ainsi chez *B. linens* tous les gènes de la caroténogénèse seraient effectivement regroupés dans le même cluster.



## *Conclusion et Perspectives*

Ces travaux ont permis de mieux appréhender l'étape d'hydroxylation chez *S. mediolani* et *B. linens*.

Les résultats obtenus concernant la caractérisation des pigments sont, pour *Brevibacterium linens* et *Streptomyces mediolani*, conformes aux données bibliographiques. Elles synthétisent toutes les deux des dérivés hydroxylés de l'isoréniératène. En revanche, pour *Mycobacterium aurum*, les expériences que nous avons menées montrent que *M. aurum* ne synthétise pas les mêmes caroténoïdes. Le xanthophylle accumulé possède une masse molaire supérieure au 3,3'-di-hydroxy-isoréniératène. L'identification de ce dernier n'a pas été possible.

Dans un premier temps l'étude des clusters de la caroténogénèse a montré que seul le cluster *crt* de *B. linens* présentait un gène codant pour une oxygénase. Ce gène, l'*orf 10*, code pour une enzyme de type cytochrome P450.

L'utilisation *in vivo* d'inhibiteur de P450 indique qu'un P450 serait impliqué dans l'étape d'hydroxylation. L'isoréniératène s'avère être le substrat de cette réaction. La dernière étape de la voie de biosynthèse correspondrait à l'hydroxylation de l'isoréniératène par un P450 en 3-mono-hydroxy-isoréniératène et 3,3'-di-hydroxy-isoréniératène.

Les P450 de *S. mediolani* et *B. linens* répondent différemment aux inhibiteurs. Chez *S. mediolani*, l'inhibition par plusieurs inhibiteurs semble indiquer une moindre spécificité

que chez *B. linens*. De plus, il est probable que le P450 de *S. mediolani* ne soit pas présent dans le cluster *crt* et laisse envisager une fonction non restreinte à la caroténogénèse.

La mutagénèse entreprise chez *B. linens* nous a permis d'obtenir un mutant, BLMJ, incapable d'hydroxyler l'isoréniératène. L'analyse de l'ORF 10 de ce mutant a révélée la présence d'une mutation au niveau de l'acide aminé 84 où une phénylalanine est remplacée par une sérine. Les comparaisons de séquences et les analyses de structures 3D connues ont révélées que cet acide aminé pouvait être déterminant dans la stabilisation de l'hème du P450. Ainsi la mutation de cette phénylalanine pourrait expliquer la perte d'activité hydroxylase chez BLMJ.

De plus, l'introduction de l'*orf 10* muté de BLMJ dans les cellules sauvage nous a permis d'obtenir un autre mutant BLE7J. L'étape d'hydroxylation des caroténoïdes est affectée chez ce mutant mais de manière moins sévère que chez BLMJ.

L'analyse de l'ORF 10 de ce mutant a révèle une nouvelle mutation : l'acide glutamique 267 est remplacé par une glutamine. L'acide glutamique 267 appartient à un motif conservé E-x-x-R particulièrement important dans la stabilisation de l'hème.

Nous avons donc obtenus deux mutants BLMJ et BLE7J, tous deux affectés dans leur caroténogénèse au niveau de l'étape d'hydroxylation et tous deux mutés au niveau de l'*orf 10*. Dans les deux cas, les mutations observées semblent suffisamment importantes pour expliquer la perte d'activité du cytochrome P450. L'ensemble de ces données constitue un faisceau convergeant vers la désignation de l'*orf 10* comme gène codant le P450 impliqué dans l'étape finale de la caroténogénèse chez *B. linens*. Ainsi, le cluster *crt* de cette bactérie renfermerait effectivement tous les gènes permettant la synthèse des caroténoïdes : des carotènes aux xanthophylles.

Il s'agit du premier P450 impliqué dans la caroténogénèse chez les organismes non photosynthétiques. C'est aussi la première fois que l'on rapporte l'identité d'une enzyme hydroxylant un caroténoïde aromatique.

La surproduction de caroténoïdes chez *S. mediolani* en présence de phénobarbital d'une part et la sous production de caroténoïdes observée avec le mutant blanc BLMB d'autre part montrent que la caroténogénèse chez *S. mediolani* et *B. linens* est soumise à un phénomène de régulation qui serait intéressant d'approfondir dans des études prochaines. Pour le cas de BLMB une piste est à étudier, celle des trois autres gènes présents dans le cluster *crt* de *B. linens* qui n'ont, à ce jour, pas de fonction connue.

Les mutants de *B. linens* apparaissent comme un outil intéressant pour une étude comparative des activités antioxydantes (relation structure-activité). Ils permettent, en effet, de mettre en évidence l'importance de la fonction hydroxyle sur le cycle aromatique. Une étude préliminaire a été initiée, il semblerait que l'effet du cycle aromatique soit prépondérant sur celui de la fonction hydroxyle.



## Références

## Bibliographiques

- [1] Arcamone, F., Camerino, B., Cotta, E., Franceschi, G., Grein, A., Penco, S. and Spalla, C. (1969) New carotenoids from *Streptomyces mediolani n.sp.* *Experientia* 25, 241-242.
- [2] Armstrong, G.A. (1999) Carotenoid genetics and biochemistry. In: *Comprehensive natural products chemistry*. (Barton, D.H.R. and Nakanishi, K., Eds.), pp. 321-352. Elsevier.
- [3] Armstrong, G.A. (1994) *Eubacteria* show their true colors : genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants. *J. Bacteriol.* 176, 4795-4802.
- [4] Armstrong, G.A. (1997) Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis : a colorful tale. *Annu. Rev. Microbiol.* 51, 629-659.
- [5] Armstrong, G.A. and Hearst, J.E. (1996) Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB J.* 10, 228-237.
- [6] Arrach, N., Fernandez-Martin, R., Cerda-Olmedo, E. and Avalos, J. (2001) A single gene for lycopene cyclase, phytoene synthase, and regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 1687-1692.
- [7] Arrach, N., Schmidhauser, T.J. and Avalos, J. (2002) Mutants of the carotene cyclase domain of *al-2* from *Neurospora crassa*. *Mol. Genet. Genomics* 266, 914-921.
- [8] Bast, A., Haenen, G.R., van den Berg, R. and van den Berg, H. (1998) Antioxidant effects of carotenoids. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* 68, 399-403.
- [9] Bauernfeind, J.C. (1981) *Carotenoids as colorants and vitamin A precursors.*, 938 pp. Academic Press, New York.
- [10] Bianchi, M.L., Grein, A., Julita, P., Marnati, M.P. and Spalla, C. (1970) *Streptomyces mediolani* (Arcamone *et al.*) emend. Bianchi *et al.* and its production of carotenoids. *Z. Allg. Mikrobiol.* 10, 237-244.
- [11] Blasco, F., Kauffmann, I. and Schmid, R.D. (2004) CYP175A1 from *Thermus thermophilus* HB27, the first  $\beta$ -carotene hydroxylase of the P450 superfamily. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 671-674.

- [12] Bouvier, F., d'Harlingue, A. and Camara, B. (1997) Molecular analysis of carotenoid cyclase inhibition. *Arch. Biochem. Biophys.* 346, 53-64.
- [13] Bouvier, F., D'Harlingue, A., Huguene, P., Marin, E., Marion-Poll, A. and Camara, B. (1996) Xanthophyll biosynthesis: cloning, expression, functional reconstitution, and regulation of  $\beta$ -cyclohexenyl carotenoid epoxidase from pepper (*Capsicum annuum*). *J. Biol. Chem.* 271, 28861-28867.
- [14] Bouvier, F., Keller, Y., d'Harlingue, A. and Camara, B. (1998) Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (*Capsicum annuum L.*). *Biochim. Biophys. Acta* 1391, 320-328.
- [15] Boyaval, P. and Desmazeaud, M.J. (1983) Le point des connaissances sur *Brevibacterium linens*. *Lait* 63, 187-216.
- [16] Breithaupt, D.E. and Bamedi, A. (2001) Carotenoid esters in vegetables and fruits: a screening with emphasis of  $\beta$ -cryptoxanthin esters. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2064-2070.
- [17] Breithaupt, D.E. and Schwack, W. (2000) Determination of free and bound carotenoids in paprika (*Capsicum annuum L.*) by LC/MS. *Eur. Food Res. Technol.* 211, 52-55.
- [18] Breithaupt, D.E., Schwack, W., Wolf, G. and Hammes, W.P. (2001) Characterization of the triterpenoid 4,4'-diaponeurosporene and its isomers in food-associated bacteria. *Eur. Food Res. Technol.* 213, 231-233.
- [19] Breithaupt, D.E., Wirt, U. and Bamedi, A. (2002) Differentiation between lutein monoester regioisomers and detection of lutein diesters from marigold flowers (*Tagetes erecta L.*) and several fruits by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 50, 66-70.
- [20] Britton, G., Liaasen-Jensen, S. and Pfander, H. (1995) Carotenoids. Volume 1B : spectroscopy., 360 pp. Birkhäuser, Basel.
- [21] Cane, D.E. (1999) Isoprenoid biosynthesis: overview. In: *Comprehensive natural products chemistry*. (Barton, D.H.R. and Nakanishi, K., Eds.), pp. 1-13. Elsevier.
- [22] Chen, S. and Zhou, D. (1992) Functional domains of aromatase cytochrome P450 inferred from comparative analyses of amino acid sequences and substantiated by site-directed mutagenesis experiments. *J. Biol. Chem.* 267, 22587- 22594.
- [23] Corpet, F., Servant, F., Gouzy, J. and Kahn., D. (2000) ProDom and ProDom-CG: Tools for protein domain analysis and whole genome comparisons. *Nucleic Acids Res.* 28, 267-269.
- [24] Cunningham-Jr, F.X. and Gantt, E. (2000) One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene  $\epsilon$ - cyclases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 2905-2910.
- [25] Cunningham-Jr, F.X., Pogson, B., Sun, Z., McDonald, K.A., DellaPenna, D. and Gantt, E. (1996) Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell* 8, 1613-1626.

- [26] Cunningham-Jr, F.X., Sun, Z., Chamovitz, D., Hirschberg, J. and Gantt, E. (1994) Molecular structure and enzymatic function of lycopene cyclase from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942. *Plant Cell* 8, 1107-1121.
- [27] Cunningham-Jr., F.X. and Gantt, E. (1998) Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 557-583.
- [28] De Mot, R. and Parret, A.H. (2002) A novel class of self-sufficient cytochrome P450 monooxygenases in prokaryotes. *Trends Microbiol.* 10.
- [29] Disch, A. and Rohmer, M. (1998) On the absence of the glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate pathway for isoprenoid biosynthesis in fungi and yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 168, 201-208.
- [30] Eisenreich, W., Rohdich, F. and Bacher, A. (2001) Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Sci.* 6, 78-84.
- [31] Fautz, E. and Reichenbach, H. (1980) A simple test for flexirubin-type pigments. *FEMS Microbiol. Lett.* 8, 87-91.
- [32] Fraser, P.D. and Bramley, P.M. (2004) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog. Lipid Res.* 43, 228-265.
- [33] Fraser, P.D., Misawa, N., Linden, H., Yamano, S., Kobayashi, K. and Sandmann, G. (1992) Expression in *Escherichia coli*, purification, and reactivation of the recombinant *Erwinia uredovora* phytoene desaturase. *J. Biol. Chem.* 267, 19891-19895.
- [34] Fraser, P.D., Miura, Y. and Misawa, N. (1997) In vitro characterization of astaxanthin biosynthetic enzymes. *J. Biol. Chem.* 272, 6128-6135.
- [35] Fulco, A.J. (1991) P-450 BM-3 and other inducible bacterial P450 cytochromes: Biochemistry and Regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 31, 177-203.
- [36] Garfinkel, D. (1958) Studies on pig liver microsomes. I. enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch. Biochem. Biophys.* 77, 493-509.
- [37] Goodwin, T.W. (1980) The biochemistry of the carotenoids. Vol.I : Plants., 377 pp. Chapman & Hall, London.
- [38] Graham, S.E. and Peterson, J.A. (1999) How similar are P450s and what can their differences teach us? *Arch. Biochem. Biophys.* 369, 24-29.
- [39] Graham-Lorence, S. and Peterson, J.A. (1996) P450s: structural similarities and functional differences. *FASEB J.* 10, 206-214.
- [40] Grecz, N. and Dack, G.M. (1961) Taxanomically significant color reactions of *Brevibacterium linens*. *J. Bacteriol.* 82, 241-246.
- [41] Guengerich, F.P. and McDonald, T.L. (1990) Mechanisms of cytochrome P-450 catalysis. *FASEB J.* 4, 2453-2459.
- [42] Guyomarc'h, F., Binet, A. and Dufosse, L. (2000) Production of carotenoids by *Brevibacterium linens*: variation among strains, kinetic aspects and HPLC profiles. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 24, 64-70.

- [43] Haines, D.C., Tomchick, D.R., Machius, M. and Peterson, J.A. (2001) Pivotal role of water in the mechanism of P450BM-3. *Biochemistry* 40, 13456-13465.
- [44] Hatae, T., Hara, S., Yokoyama, C., Yabuki, T., Inoue, H., Ullrich, V. and Tanabe, T. (1996) Site-directed mutagenesis of human prostacyclin synthase: Alteration of Cys441 of the Cys-pocket, and Glu347 and Arg350 of the EXXR motif. *FEBS Lett.* 389, 268-272.
- [45] Hausmann, A. and Sandmann, G. (2000) A single five-step desaturase is involved in the carotenoid biosynthesis pathway to  $\beta$ -carotene and torulene in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* 30, 147-153.
- [46] Hays, A.M.A., Dunn, A.R., Chiu, R., Gray, H.B., Stout, C.D. and Goodin, D.B. (2004) Conformational States of Cytochrome P450cam Revealed by Trapping of Synthetic Molecular Wires. *J. Mol. Biol.* 344, 455-469.
- [47] Hecht, S., Eisenreich, W., Adam, P., Amslinger, S., Kis, K., Bacher, A., Arigoni, D. and Rohdich, F. (2001) Studies on the nonmevalonate pathway to terpenes: The role of the GcpE (IspG) protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 14837-14842.
- [48] Hemmi, H., Ikejiri, S., Nakayama, T. and Nishino, T. (2003) Fusion-type lycopene  $\beta$ -cyclase from a thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 586-591.
- [49] Houssaini-Iraqi, M., Clavel-Seres, S., Rastogi, N. and David, H.L. (1993) Partial physical and functional map of a *Mycobacterium aurum* carotenogenesis operon. *Curr. Microbiol.* 26, 65-74.
- [50] Houssaini-Iraqi, M., David, H.L., Clavel-Seres, S., Hilali, F. and Rastogi, N. (1993) Characterization of *car*  $\alpha$ , *car* *Lep*, and *Crt I* genes controlling the biosynthesis of carotenenes in *Mycobacterium aurum*. *Curr. Microbiol.* 27, 317-322.
- [51] Hundle, B., Alberti, M., Nievelstein, V., Beyer, P., Kleinig, H., Armstrong, G.A., Burke, D.H. and Hearst, J.E. (1994) Functional assignment of *Erwinia herbicola* Eho10 carotenoid genes expressed in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 245, 406-416.
- [52] Hundle, B., O'Brien, D.A., Beyer, P., Kleinig, H. and Hearst, J.E. (1993) In vitro expression and activity of lycopene cyclase and  $\beta$ -carotene hydroxylase from *Erwinia herbicola*. *FEBS Lett.* 315, 329-334.
- [53] Jones, D., Watkins, J. and Erickson, S.K. (1973) Taxonomically significant colour changes in *Brevibacterium linens* probably associated with a carotenoid-like pigment. *J. Gen. Microbiol.* 77, 145-150.
- [54] Kim, B.H. and Fulco, A.J. (1983) Induction by barbiturates of a cytochrome P-450 dependent fatty acid monooxygenase in *Bacillus megaterium*: relationship between barbiturate structure and inducer activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116, 843-850.
- [55] Klingenberg, M. (1958.) Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 75, 376-386.
- [56] Kohl, W., Achenbach, H. and Reichenbach, H. (1983) The pigments of *Brevibacterium linens* : aromatic carotenoids. *Phytochemistry* 22, 207-210.



- [57] Krubasik, P. and Sandmann, G. (2000) A carotenogenic gene cluster from *Brevibacterium linens* with novel lycopene cyclase genes involved in the synthesis of aromatic carotenoids. *Mol. Gen. Genet.* 263, 423-432.
- [58] Krubasik, P. and Sandmann, G. (2000) Molecular evolution of lycopene cyclases involved in the formation of carotenoids with ionone end groups. *Biochem. Soc. Trans.* 28, 806-810.
- [59] Krügel, H., Krubasik, P., Weber, K., Saluz, H.P. and Sandmann, G. (1999) Functional analysis of genes from *Streptomyces griseus* involved in the synthesis of isorenieratene, a carotenoid with aromatic end groups, revealed a novel type of carotenoid desaturase. *Biochim. Biophys. Acta* 1439, 57-64.
- [60] Kuzuyama, T., Takagi, M., Takahashi, S. and Seto, H. (2000) Cloning and Characterization of 1-Deoxy-d-Xylulose 5-Phosphate Synthase from *Streptomyces* sp. Strain CL190, Which Uses both the Mevalonate and Nonmevalonate Pathways for Isopentenyl Diphosphate Biosynthesis. *J. Bacteriol.* 182, 891-897.
- [61] Laber, B., Usunow, G., Wiecko, E., Franke, W., Franke, H. and Köhn, A. (1999) Inhibition of *Narcissus pseudonarcissus* Phytoene Desaturase by Herbicidal 3-Trifluoromethyl-1,1'-biphenyl Derivatives. *Pestic. Biochem. Physiol.* 63, 173-184.
- [62] Lagarde, D. and Vermaas, W. (1999) The zeaxanthin biosynthesis enzyme b-carotene hydroxylase is involved in myxoxanthophyll synthesis in *Synechocystis* sp. PCC6803. *FEBS Lett.* 454, 247-251.
- [63] Lang, H.P., Cogdell, R.J., Takaichi, S. and Hunter, N. (1995) Complete DNA sequence, specific TN5 Insertion map, and gene assignment of carotenoid biosynthesis pathway of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 177, 2064-2073.
- [64] Leret, V., Trautwetter, A., Rince, A. and Blanco, C. (1998) pBLA8, from *Brevibacterium linens*, belongs to a gram-positive subfamily of ColE2-related plasmids. *Microbiology.* 144, 2827-2836.
- [65] Levy-Frebault, V. and David, H.L. (1979) Mutations affecting pigment synthesis in *Mycobacterium aurum*. *J. Gen. Microbiol.* 115, 317-323.
- [66] Lewis, D.F.V. (1996) *Cytochromes P450: structure, function and mechanism.*, 348 pp. Taylor & Francis, Bristol, USA.
- [67] Lewis, D.F.V. and Hlavica, P. (2000) Interactions between redox partners in various cytochrome P450 systems: functional and structural aspects. *Biochim. Biophys. Acta* 1460, 353-374.
- [68] Liaaen-Jensen, S. and Andrewes, A.G. (1972) Microbial carotenoids. *Annu. Rev. Microbiol.* 26, 227-247.
- [69] Liaaen-Jensen, S. and Weedon, B.C.L. (1964) The structure of leprotene. *Die Naturwissenschaften* 51, 482.
- [70] Lichtenthaler, H.K., Schwender, J., Disch, A. and Rohmer, M. (1997) Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett.* 400, 271-274.

- [71] Linden, H. (1999) Carotenoid hydroxylase from *Haematococcus pluvialis*: cDNA sequence, regulation and functional complementation. *Biochim. Biophys. Acta* 1446, 203-212.
- [72] Lotan, T. and Hirschberg, J. (1995) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding b-C-4-oxygenase, that converts  $\beta$ -carotene to the ketocarotenoid canthaxanthin in *Haematococcus pluvialis*. *FEBS Lett.* 364, 125-128.
- [73] Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K. and Harashima, K. (1990) Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172, 6704-6712.
- [74] Misawa, N., Satomi, Y., Kondo, K., Yokoyama, A., Kajiwarra, S., Saito, T., Ohtani, T. and Miki, W. (1995) Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. *J. Bacteriol.* 177, 6575-6584.
- [75] Modi, S., Primrose, W.U., Boyle, J.M., Gibson, C.F., Lian, L.Y. and Roberts, G.C. (1995) NMR studies of substrate binding to cytochrome P450 BM3: comparisons to cytochrome P450 cam. *Biochemistry* 34, 8982-8988.
- [76] Mulder, E.G., Adamse, A.D., Antheunisse, J., Deinema, M.H., Woldendorp, J.W. and Zevenhuizen, L.P. (1966) The relationship between *Brevibacterium linens* and bacteria of the genus *Arthrobacter*. *J. Appl. Bacteriol.* 29, 44-71.
- [77] Narhi, L.O. and Fulco, A.J. (1982) Phenobarbital Induction of a Soluble Cytochrome P-450- dependent Fatty Acid Monooxygenase in *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.* 257, 2147-2150.
- [78] Nebert, D. and Gonzalez, F. (1987) P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 945-993.
- [79] Nelson, D.R., Kamataki, T., Waxman, D.J., Guengerich, F.P., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Gonzalez, F.J., Coon, M.J., Gunsalus, I.C., Gotoh, O., Okuda, K. and Nebert, D.W. (1993) The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* 12.
- [80] Neudert, U., Martinez-Ferez, I.M., Fraser, P.D. and Sandmann, G. (1998) Expression of an active phytoene synthase from *Erwinia uredovora* and biochemical properties of the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 1392, 51-58.
- [81] Olson, J.A. and Krinsky, N.I. (1995) Introduction: the colorful, fascinating world of the carotenoids: important physiologic modulators. *FASEB J.* 9, 1547-1550.
- [82] Omura, T. and Sato, R. (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* 239, 2370-2378.
- [83] Ortiz de Montellano, P.R. (1986) Oxygen activation and transfer. In: *Cytochrome P450*. (Ortiz de Montellano, P.R., Ed.), pp. 217-272. Plenum Press.

- [84] Ortiz de Montellano, P.R. and Correia, M.A. (1995) Inhibition of cytochrome P450 enzymes. In: *Cytochrome P450. Structure, mechanism, and biochemistry.* (Ortiz de Montellano, P.R., Ed.), pp. 305-364. Plenum Press, New York.
- [85] Pallett, K.E., Little, J.P., Sheekey, M. and Veerasekaran, P. (1998) The Mode of Action of Isoxaflutole, : I. Physiological Effects, Metabolism, and Selectivity. *Pestic. Biochem. Physiol.* 62, 113-124.
- [86] Pasamontes, L., Hug, D., Tessier, M., Hohmann, H.-P., Schierle, J. and van Loon, A.P. (1997) Isolation and characterization of the carotenoid biosynthesis genes of *Flavobacterium sp.* strain R 1534. *Gene* 185, 35-41.
- [87] Peck, R.F., Johnson, E.A. and Krebs, M.P. (2002) Identification of a lycopene beta-cyclase required for bacteriorhodopsin biogenesis in the archaeon *Halobacterium salinarum*. *J. Bacteriol.* 184, 2889-2897.
- [88] Pinta, V., Ouchane, S., Picaud, M., Takaichi, S., Astier, C. and Reiss-Husson, F. (2003) Characterization of unusual hydroxy- and ketocarotenoids in *Rubrivivax gelatinosus*: involvement of enzyme CrtF or CrtA. *Arch. Microbiol.* 179, 354-362.
- [89] Poulos, T.L., Finzel, B.C., Gunsalus, I.C., Wagner, G.C. and Kraut, J. (1985) The 2.6-Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* 260, 16122-16130.
- [90] Rademacher, W. (2000) Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51, 501-531.
- [91] Rademacher, W., Fritsch, H., Graebe, J.E., Sauter, H. and Jung, J. (1987) Tetcyclacis and triazole-type plant growth retardants: their influence on the biosynthesis of gibberellins and other metabolic processes. *Pestic. Sci.* 21, 241-252.
- [92] Raisig, A. and Sandmann, G. (2001) Functional properties of diapophytoene and related desaturases of C30 and C40 carotenoid biosynthetic pathways. *Biochim. Biophys. Acta* 1533, 164-170.
- [93] Ritter, E.d. and Purcell, A.E. (1981) Carotenoid analytical methods. In: *Carotenoids as colorants and vitamin A precursors.* (Bauerfeind, J.C., Ed.), pp. 815-923. Academic Press, New York.
- [94] Rohdich, F., Hecht, S., Gärtner, K., Adam, P., Krieger, C., Amslinger, S., Arigoni, D., Bacher, A. and Eisenreich, W. (2002) Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: Metabolic role of IspH (LytB) protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 1158-1163.
- [95] Rohmer, M. (1999) A mevalonate-independent route to isopentenyl diphosphate. In: *Comprehensive natural products chemistry.* (Barton, D.H.R. and Nakanishi, K., Eds.), pp. 45-67. Elsevier.
- [96] Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B. and Sahn, H. (1993) Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.* 295, 517-524.
- [97] Rohmer, M., Seemann, M., Horbach, S., Bringer-Meyer, S. and Sahn, H. (1996) Glyceraldehyde 3-Phosphate and Pyruvate as Precursors of Isoprenic Units in an Alternative Non-mevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 2564 - 2566.

- [98] Rossi, M. (1983) Structural studies of metyrapone: a potent inhibitor of cytochrome P-450. *J. Med. Chem.* 26, 1246-1252.
- [99] Sandmann, G. (2001) Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. *Arch. Biochem. Biophys.* 385, 4-12.
- [100] Sandmann, G. and Bramley, P.M. (1985) The in vitro biosynthesis of  $\beta$ -cryptoxanthin and related xanthophylls with *Aphanocapsa* membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 843, 73-77.
- [101] Sandmann, G., Woods, W.S. and Tuveson, R.W. (1990) Identification of carotenoids in *Erwinia herbicola* and in a transformed *Escherichia coli* strain. *FEMS Microbiol. Lett.* 71, 77-82.
- [102] Schenkman, J.B. and Ingela, I. (1998) Spectral Analyses of Cytochromes P450. In: *Cytochrome P450 Protocols*. (Phillips, I.R.S., Elizabeth A., Ed.), pp. 25-34. Humana press.
- [103] Schneider, C., Böger, P. and Sandmann, G. (1997) Phytoene Desaturase: Heterologous Expression in an Active State, Purification, and Biochemical Properties. *Protein Expr. Purif.* 10, 175-179.
- [104] Schnurr, G., Misawa, N. and Sandmann, G. (1996) Expression, purification and properties of lycopene cyclase from *Erwinia uredovora*. *Biochem J.* 315, 869-874.
- [105] Schoefs, B., Rmiki, N.E., Rachadi, J. and Lemoine, Y. (2001) Astaxanthin accumulation in *Haematococcus* requires a cytochrome P450 hydroxylase and an active synthesis of fatty acids. *FEBS Lett.* 500, 125-128.
- [106] Schumann, G., Nürnberger, H., Sandmann, G. and Krügel, H. (1996) Activation and analysis of cryptic crt genes for carotenoid biosynthesis from *Streptomyces griseus*. *Mol. Gen. Genet.* 252, 658-666.
- [107] Schwender, J., Seemann, M., Lichtenthaler, H.K. and Rohmer, M. (1996) Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Biochem. J.* 316, 73-80.
- [108] Scolnik, P.A., Walker, M.A. and Marrs, B.L. (1980) Biosynthesis of carotenoids derived from neurosporene in *Rhodospseudomonas capsulata*. *J. Biol. Chem.* 255, 2427-2432.
- [109] Segall, M.D. (1997) *An ab Initio Study of Biological Systems*. In: University of Cambridge.
- [110] Shimizu, H., Park, S.Y., Lee, D.S., Shoun, H. and Shiro, Y. (2000) Crystal structures of cytochrome P450<sub>nor</sub> and its mutants in the ferric resting state at cryogenic temperature: a comparative analysis with monooxygenase cytochrome P450<sub>s</sub>. *J. Inorg. Biochem.* 81, 191-205.
- [111] Shimizu, T., Tateishi, T., Hatano, M. and Fujii-Kuriyama, Y. (1990) Probing the role of lysines and arginines in the catalytic function of cytochrome P450<sub>d</sub> by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 266, 3372-3375.

- [112] Sieiro, C., Poza, M., Miguel, T.d. and Villa, T.G. (2003) Genetic basis of microbial carotenogenesis. *Int. Microbiol.* 6, 11-16.
- [113] Souter, A., McLean, K.J., Smith, W.E. and Munro, A.W. (2000) The genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* reveals cytochromes P 450 as novel anti-TB drug targets. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 75, 933-941.
- [114] Stickforth, P., Steiger, S., Hess, W.R. and Sandmann, G. (2003) A novel type of lycopene epsilon-cyclase in the marine cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* MED4. *Arch. Microbiol.* 179, 409-415.
- [115] Straub, O. (1987) Key to carotenoids, 296 p pp. Birkhäuser Verlag, Basel.
- [116] Sueyoshi, T. and Negishi, M. (2001) Phenobarbital response elements of cytochrome P450 genes and nuclear receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 123-143.
- [117] Tabata, K., Ishida, S., Nakahara, T. and Hoshino, T. (1994) A carotenogenic gene cluster exists on a large plasmid in *Thermus thermophilus*. *FEBS Lett.* 341, 251-255.
- [118] Tian, L. and DellaPenna, D. (2004) Progress in understanding the origin and functions of carotenoid hydroxylases in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 430, 22-29.
- [119] Tian, L., Magallanes-Lundback, M., Musetti, V. and DellaPenna, D. (2003) Functional Analysis of  $\beta$ - and  $\epsilon$ -Ring Carotenoid Hydroxylases in Arabidopsis. *Plant Cell* 15, 1320-1332.
- [120] Tian, L., Musetti, V., Kim, J., Magallanes-Lundback, M. and DellaPenna, D. (2004) The Arabidopsis LUT1 locus encodes a member of the cytochrome p450 family that is required for carotenoid epsilon-ring hydroxylation activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 402-407.
- [121] Tomasi, I., Artaud, I., Bertheau, Y. and Mansuy, D. (1995) Metabolism of polychlorinated phenols by *Pseudomonas cepacia* AC1100: determination of the first two steps and specific inhibitory effect of methimazole. *J. Bacteriol.* 177, 307-311.
- [122] Tsukamura, M. (1966) Adansonian classification of Mycobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 45, 253-273.
- [123] Umeno, D., Tobias, A.V. and Arnold, F.H. (2002) Evolution of the C30 carotenoid synthase crtM for function in a C40 pathway. *J. Bacteriol.* 184, 6690-6699.
- [124] Valla, A.R., Cartier, D.L., Valla, B.G., Guillou, R.Y.L., Andriamialisoa, Z.R., Labia, R., Breithaupt, D.E., Savy, S.M., Binet, A. and Dufosse, L.H. (2003) New Synthesis of Natural Carotene Isorenieratene ( $\phi, \phi'$ -Carotene) and its 3,3'-Dimethoxy Analogue. *Helv. Chim. Acta* 86, 3314-3319.
- [125] Velayos, A., Eslava, A.P. and Iturriaga, E.A. (2000) A bifunctional enzyme with lycopene cyclase and phytoene synthase activities is encoded by the carRP gene of *Mucor circinelloides*. *Eur. J. Biochem.* 267, 5509-5519.

- [126] Verdoes, J.C., Krubasik, K.P., Sandmann, G. and van Ooyen, A.J. (1999) Isolation and functional characterisation of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Mol. Gen. Genet.* 262, 453-461.
- [127] Verdoes, J.C., Sandmann, G., Visser, H., Diaz, M., van Mossel, M. and van Ooyen, A.J. (2003) Metabolic Engineering of the Carotenoid Biosynthetic Pathway in the Yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3728-3738.
- [128] Visser, H., van Ooyen, A.J. and Verdoes, J.C. (2003) Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *FEMS Yeast Res.* 4, 221-231.
- [129] Viveiros, M., Krubasik, P., Sandmann, G. and Houssaini-Iraqi, M. (2000) Structural and functional analysis of the gene cluster encoding carotenoid biosynthesis in *Mycobacterium aurum* A+. *FEMS Microbiol. Lett.* 187, 95-101.
- [130] Werck-Reichhart, D. and Feyereisen, R. (2000) Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol.* 1, 3003.3009.
- [131] Wieland, B., Feil, C., Gloria-Maercker, E., Thumm, G., Lechner, M., Bravo, J.M., Poralla, K. and Gotz, F. (1994) Genetic and biochemical analyses of the biosynthesis of the yellow carotenoid 4,4'-diaponeurosporene of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 176, 7719-7726.
- [132] Yamaguchi, M. (1957) On carotenoids of a sponge "*Reniera japonica*". *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 30, 111-114.
- [133] Yeliseev, A.A. and Kaplan, S. (1997) Anaerobic carotenoid biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: H<sub>2</sub>O is a source of oxygen for the 1-methoxy group of spheroidene but not for the 2-oxo group of spheroidenone. *FEBS Lett.* 403, 10-14.
- [134] Yokoyama, A. and Miki, W. (1995) Composition and presumed biosynthetic pathway of carotenoids in the astaxanthin-producing bacterium *Agrobacterium aurantiacum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 128, 139-144.
- [135] Yokoyama, A., Shizuri, Y., Hoshino, T. and Sandmann, G. (1996) Thermocryptoxanthins: novel intermediates in the carotenoid biosynthetic pathway of *Thermus thermophilus*. *Arch. Microbiol.* 165, 342-345.
- [136] Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M. and van 't Riet, K. (1990) Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1875-1881.