Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier
Centre de Microbiologie et Biotechnologie

INGÉNIERIE DE LA DIOXYGÉNASE DU BIPHÉNYLE PAR LE PROCÉDÉ DE RECOMBINAISON ALÉATOIRE *IN VITRO* SUR UNE RÉGION CIBLÉE DE *bphA*

Par
Marie-Michèle Plante

Mémoire présenté
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)
en Microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Régean Beaudet INRS-Institut Armand-Frappier
Examinateur externe	Yves Hurtubise Recherche et Développement Laboratoire Choisy Ltée
Directeur de recherche	Michel Sylvestre INRS-Institut Armand-Frappier

© Droits réservés de Marie-Michèle Plante, 2001

RÉSUMÉ

Les biphényles polychlorés (BPC) fortement substitués sont reconnus comme étant très résistants au catabolisme oxydatif bactérien particulièrement lors de l'attaque effectuée par la biphényle 2,3-dioxygénase (BPDO). La biodégradation des BPC dépend de l'habileté d'oxygénation de la BPDO. La séquence des gènes *bphAEFG*, codant respectivement pour chacun des constituants de la dioxygénase est connue, les enzymes correspondantes ont déjà été purifiées et caractérisées. Des études antérieures ont montré que des modifications structurelles dans la portion C-terminale de la sous-unité α de la composante oxygénase, une région comprise entre les résidus Tyr295 et Glu449, influence les propriétés catalytiques de l'enzyme envers des congénères BPC. Cependant, à ce jour, dans le cas de la BPDO, nous ignorons si le fait d'accroître sa réactivité envers un congénère BPC précis peut accroître son potentiel d'action envers un spectre de congénères BPC élargi qu'aucune souche bactérienne ne peut dégrader ou si les modifications apportées à l'enzyme réduiront son spectre d'action. L'objectif du projet a été de modifier la structure de la région C-terminale de la sous-unité α par le procédé de recombinaison aléatoire *in vitro* afin de sélectionner des dioxygénases variantes possédant une réactivité accrue envers un congénère ciblé : le 2,2'-dichlorobiphényle. Pour atteindre cet objectif, nous avons mis au point un nouveau protocole de criblage de BPDO hybrides qui est basé sur l'observation selon laquelle le catéchol résultant de l'oxygénation du substrat peut s'oxyder à l'air ambiant pour donner une coloration brunâtre. La région C-terminale de la sous-unité α, que nous avons choisie, correspondait à un fragment d'ADN délimité par les sites *Mlu*I et *Avr*II de *bphA*. Nous avons donc appliqué le procédé d'évolution *in vitro* dans la portion *MluI*/*Avr*II de *bphA* des souches *Comamonas testosteroni* B-356 et *Burkholderia sp.* LB400 qui présentent une homologie de séquence génétique de 75% et dont les dioxygénases possèdent des spécificités différentes envers des congénères BPC. La capacité catalytique des hybrides obtenus fut analysée sur l'Aroclor 1242 et sur un mélange de congénères BPC ciblés permettant l'identification d'une spécialisation ou d'un accroissement d'activité. Ces travaux ont permis d'isoler plusieurs hybrides d'intérêt présentant une activité accrue, à la fois, envers des congénères BPC fortement chlorés difficilement dégradés par les souches parentales ainsi qu'envers certains BPC, comme le 2,6-dichlorobiphényle qu'aucune souche bactérienne connue, à ce jour, ne peut dégrader. L'analyse de leur séquence a révélé que les variants les plus prometteurs présentaient des substitutions dans la région III de la portion C-terminale de la sous-unité α confirmant l'importance de cette région sur la spécificité de la dioxygénase. Ces résultats démontrent donc de manière évidente que le procédé de recombinaison aléatoire *in vitro* constitue une approche des plus intéressantes et efficace dans le but de générer de nouvelles dioxygénases pour la biodégradation des BPC.

Marie-Michèle Plante

Michel Sylvestre

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche, Michel Sylvestre, pour son appui, sa disponibilité en tout temps, ses précieux conseils et, avant tout, pour m'avoir transmis le goût de la recherche.

De plus, j'aimerais remercier de façon toute particulière, Diane Barriault, pour son aide si précieuse et grandement appréciée ainsi que pour sa patience, mais aussi pour la belle complicité que nous avons partagée ces deux années.

Par la même occasion, j'aimerais adresser un remerciement particulier à la Fondation Armand-Frappier pour leur appui financier par l'octroi de «la Bourse La Presse» au cours des deux années de ma maîtrise.

Un gros merci également à toute l'équipe du laboratoire que j'ai côtoyée pendant ces deux années : Annie, Catherine, Henriette, Kathleen, Rémi et Bruno pour votre support moral et votre bonne humeur.

Je remercie également pour leurs disponibilités, Mme Lise Forget pour le séquençage des recombinants à l'Institut Armand-Frappier à Laval ainsi que Mme Carole Glavicich pour m'avoir permis d'utiliser le GC-MS au cours de mes recherches.

Finalement, le plus chaleureux des remerciements s'adresse à ma famille : Renée, Simon et Mathieu ainsi qu'à mes amis les plus fidèles : Marc, Steve et André pour leur présence et sans qui, je n'aurais pas pu garder le sourire chaque jour. Je vous aime!

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ ..... **III**
REMERCIEMENTS ..... **IV**
TABLE DES MATIÈRES ..... **V**
LISTES DES FIGURES ..... **X**
LISTES DES TABLEAUX ..... **XIII**
INTRODUCTION **1**

CHAPITRE 1 – REVUE DE LITTÉRATURE **5**

1.1 Les biphényles polychlorés (BPC) 5
1.1.1 Chimie des BPC 5
1.1.2 Propriétés physico-chimiques des BPC 6
1.1.3 Applications industrielles 7
1.1.4 Niveau de BPC dans l'environnement 7
1.1.5 Aspect toxicologique des BPC 8
1.1.6 Procédés de décontamination des BPC dans l'environnement 10
1.1.6.1 Incinération 10
1.1.6.2 Biorestauration 11

1.2 Disposition des BPC dans l'environnement 12
1.2.1 Introduction 12
1.2.2 Voie catabolique oxydative du biphényle 13
1.2.3 Caractéristiques des souches bactériennes isolées 16

1.3 Ingénierie de la dioxygénase du bipnényle 19
1.3.1 Introduction 19
1.3.2 Enzymes hybrides 19

1.3.3 Régions impliquées dans la spécificité de la BPDO 21
1.3.3.1 Travaux de mutagénèse dirigée sur la BPDO 21
1.3.3.2 Acquisition d'activité d'hydroxylation en position 3,4 par des hybrides 24
1.3.3.3 Recombinaison entre des fragments de *bphA* de LB400 et B-356 24
1.3.4 Rôle de la sous-unité β 26
1.3.5 Structure tridimentionnelle de la dioxygénase du naphtalène 28
1.3.6 Caractérisation d'hybrides obtenus par «évolution moléculaire *in vitro*» ... 30
1.3.6.1 Introduction 30
1.3.6.2 Travaux de DNA shuffling sur la dioxygénase du biphényle 32

CHAPITRE 2 – MATÉRIEL ET MÉTHODES 35

2.1 Souches bactériennes et plasmides 35

2.2 Milieux et conditions de culture et produits chimiques 37

2.3 Protocoles généraux de biologie moléculaire 38
2.3.1 Préparation d'ADN plasmidique 38
2.3.2 Réactions d'endonucléases de restriction 38
2.3.3 Procédure d'élution sur gel d'ADN plasmidique digéré 38
2.3.4 Réaction de remplissage d'extrémités franches par l'ADN polymérase I (Klenow) 38
2.3.5 Ligation vecteur-insert 39
2.3.6 Production et transformation des cellules *E. coli* compétentes 39
2.3.7 Purification des produits de PCR 39
2.3.8 Conception des oligonucléotides et séquençage d'ADN des hybrides 39

2.4 Construction du plasmide pQE51 [LB400-*bphFGB*] 40

2.5 Protocoles et stratégies pour la recombinaison aléatoire *in vitro* (DNA shuffling) 42
2.5.1 Première génération de recombinaison 42
2.5.2 Seconde génération de recombinaison 45
2.5.3 Troisième génération de recombinaison 46
2.5.4 Recombinaison aléatoire *in vitro* de fragments digérés par des enzymes de restriction 47

2.6 Méthode de criblage des hybrides en milieu solide 48

2.7 Procédure d'expression et de purification des enzymes de la voie catabolique du biphényle 49

2.8 Méthode de production de lysats cellulaires exprimant la ISP_{BPH} de la dioxygénase du biphényle 50

2.9 Caractérisation des protéines 51

2.10 Protocole d'essais enzymatiques 51
2.10.1 Conversion des congénères BPC en dérivés hydroxylés 51
2.10.2 Conversion des congénères BPC en HOPDA correspondant 52
2.10.3 Essais en présence de la catalase et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) 52

2.11 Procédures d'extraction des métabolites et d'analyse par GC-MS 53
2.11.1 Méthode d'extraction des métabolites 53
2.11.2 Analyse par GC-MS 53

2.12 Évaluation de la dégradation de l'Aroclor 1242 ou d'un mélange synthétique de 18 congénères BPC par des recombinants exprimant les BPDO hybrides 54
2.12.1 Méthode de culture des recombinants et d'extraction des produits de la réaction 54

2.12.2 Analyse par GC-ECD 55

CHAPITRE 3 – RÉSULTATS 57

3.1 Développement d'une méthode de criblage comme stratégie de sélection 57

3.2 Stratégie utilisée pour l'évolution *in vitro* de la BPDO et caractérisation des BPDO variantes obtenues 58

3.3 Caractérisation des hybrides de première génération 60

3.3.1 Détermination de la fréquence des hybrides actifs 60

3.3.2 Analyse du spectre d'activité envers des congénères BPC de cellules entières de *E. coli* exprimant des BPDO hybrides 61

3.3.2.1 Activité envers l'Aroclor 1242 61

3.3.2.2 Activité envers un mélange de 18 congénères BPC ciblés 63

3.3.3 Caractérisation biochimique des BPDO hybrides purifiées 68

3.3.3.1 Identification des métabolites de chlorobiphényles produits par les BPDO hybrides 68

3.3.3.1.1 Métabolites du 2,2'-CB 69

3.3.3.1.2 Métabolites du 2,2',5,5'-CB 73

3.3.3.1.3 Métabolites du 2,6-CB 77

3.3.3.2 Métabolites du 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle produit par l'hybride MA9 79

3.3.3.3 Cinétique de conversion du biphényle et du 4-CB en HOPDA par le BPDO hybrides 82

3.3.3.4 Conversion du 2,2'-CB en chloro-HOPDA par les BPDO hybrides 84

3.3.3.5 Mise en évidence du phénomène de découplage au cours de l'activité d'oxygénation par la BPDO de l'hybride MA9 87

3.3.4 Analyse des séquences des BPDO hybrides de première génération 89

3.4 Caractérisation des hybrides de seconde génération 91
3.4.1 Analyse de la fréquence des variants 92

3.5 Caractérisation des hybrides de troisième génération 92
3.5.1 Analyse de la fréquence des variants 93

3.5.2 Analyse du spectre d'activité avec des cellules entières des hybrides envers des congénères BPC 94
3.5.2.1 Activité envers l'Aroclor 1242 94
3.5.2.2 Activité envers un mélange de 18 congénères BPC ciblés 96
3.5.3 Analyse de la séquence de l'hybride MD8 97

CHAPITRE 4 – DISCUSSION 99

4.1 Analyse de la méthode colorimétrique de criblage comme stratégie de sélection 99

4.2 Analyse de l'activité catabolique des BPDO hybrides issus du procédé de recombinaison aléatoire *in vitro* sur une région ciblée de *bphA* 101

CONCLUSION 107

BIBLIOGRAPHIE 109

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Structure chimique des biphényles polychlorés 5

Figure 1.2 Présentation de la structure chimique des dibenzo-*p*-dioxines et des dibenzofurannes 9

Figure 1.3 Schéma illustrant la transformation d'un congénère BPC au niveau des cellules hépatiques suite à l'induction de la monooxygénase de type cytochrome P-450 9

Figure 1.4 Voie catabolique oxydative du biphényle 14

Figure 1.5 Composantes de la dioxygénase du biphényle 15

Figure 1.6 Représentation des différents congénères dégradés par les souches LB400, B-356 et KF707 17

Figure 1.7 Organisation génétique des gènes *bph* des souches LB400, KF707 et B-356 qui sont impliqués au niveau du catabolisme du biphényle 18

Figure 1.8 Comparaison des régions (I-IV) situées en position C-terminale de la sous-unité α des dioxygénases des souches LB400 et KF707 22

Figure 1.9 Présentation des gènes *bphA* et *bphE* ainsi que les sites communs de restriction entre les deux souches LB400 et B-356 qui ont permis de générer les fragments A, B, C et D qui sont représentés par des encadrés 25

Figure 1.10 Présentation des BPDO hybrides LB400/B-356 ayant conservé l'activité de la dioxygénase ainsi que des fragments respectifs échangés entre les deux souches 26

Figure 1.11 Structure tridimentionnelle de la composante oxygénase de la dioxygénase du naphtalène 29

Figure 1.12 Schéma du procédé de recombinaison aléatoire *in vitro* tel qu'élaboré par Stemmer 31

Figure 1.13 Comparaison des régions (I-IV) situées en C-terminale de la sous-unité α de la dioxygénase entre les souches LB400, KF707 et B-356 33

Figure 2.1 Construction du plasmide pQE51 [LB400-*bphFGB*] 41

Figure 2.2 Stratégie de DNA shuffling employée pour les hybrides de première génération 44

Figure 3.1 Colonies induites d'un mélange de clones de *E. coli* pDB31 [*bphAE* *Avr*II$^+$]/pQE51 [*bphFGB*] exprimant des BPDO actives et inactives lorsqu' exposées aux vapeurs de 2,2'-CB..... 59

Figure 3.2 Dégradation d'un mélange de 18 congénères BPC ciblés par des cellules induites de *E. coli* DH11S/pDB31 [*bphAE* *Avr*II$^+$]/pQE51 [*bphFGB*] exprimant la BPDO de LB400 comparée à celles exprimant les BPDO hybrides MA3-4-7-9-10 et 11 68

Figure 3.3 Analyse des métabolites résultant de l'oxygénation catalytique du 2,2'-CB par ht-ISP$_{BPH}$ purifiée de LB400..... 71

Figure 3.4 Profil des métabolites du 2,2'-CB produits par la BPDO de LB400 ou celles des hybrides, MA3-4-7-9-10 et 11, d'après le chromatogramme obtenu par chromatographie en phase gazeuse..... 73

Figure 3.5 Analyse du métabolite résultant de l'oxygénation catalytique du 2,2',5,5'-CB par ht-ISP$_{BPH}$ purifiée de LB400 75

Figure 3.6 Profil des métabolites produits par la transformation du 2,2',5,5'-CB par dihydroxylation catalysée par les BPDO hybrides, MA3-4-7-9-10 et 11, en comparaison avec la souche LB400 d'après le chromatogramme obtenu par chromatographie en phase gazeuse..... 77

Figure 3.7 Transformation du 2,6-CB par dihydroxylation catalysée par la dioxygénase du biphényle de l'hybride MA9..... 78

Figure 3.8 Profil des métabolites produits par la transformation du 2,3-dihydroxybiphényle par les BPDO de LB400 et de l'hybride MA9 d'après le chromatogramme obtenu par chromatographie en phase gazeuse..... 80

Figure 3.9 Analyse des métabolites résultant de l'oxygénation catalytique du 2,3-dihydroxybiphényle par la dioxygénase du biphényle de l'hybride MA9 82

Figure 3.10 Activité des enzymes ht-ISP$_{BPH}$ purifiées des hybrides MA envers le biphényle et le 4-chlorobiphényle 83

Figure 3.11 Production de chloro-HOPDA par la BPDO hybride MA9 en présence du 2,2'-CB dans une réaction couplée sans BphB en comparaison avec la BPDO de LB400..... 85

Figure 3.12 Détermination de la production de chloro-HOPDA à partir du 2,2'-CB par des lysats de *E. coli* exprimant la BPDO de LB400 ou celle de l'un des hybrides MA4, MA7 ou MA9 86

Figure 3.13 Influence du peroxide et de la catalase sur l'activité de conversion du 2,2'-CB en chloro-HOPDA par la réaction couplée de BPDO et bphC 88

Figure 3.14 Séquence protéique de 288 acides aminés (Arg164 à Glu451) de la portion C-terminale de la sous-unité α des hybrides MA3, MA4, MA9, MA10 et MA11 en comparaison avec les séquences protéiques correspondantes des souches parentales LB400 et B-356 91

Figure 3.15 Pourcentage de dégradation de congénères BPC sélectionnés de l'Aroclor 1242 par des cellules induites de *E. coli* DH11S/pDB31 [*bphAE AvrII*$^+$] plus pQE51 [*bphFGB*] exprimant la BPDO hybride MD8 obtenue par recombinaison *in vitro* 95

Figure 3.16 Dégradation d'un mélange de 18 congénères BPC ciblés par des cellules induites de *E. coli* DH11S/pDB31 [*bphAE AvrII*$^+$]/pQE51 [*bphFGB*] exprimant la BPDO de LB400 comparée à celle exprimant la BPDO de l'hybride MD8 96

Figure 3.17 Séquence protéique de 288 acides aminés (Arg164 à Glu451) de la portion C-terminale de la sous-unité α de l'hybride MD8 en comparaison avec les séquences protéiques correspondantes des souches parentales LB400 et B-356 98

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 Caractéristiques génétiques des vecteurs plasmidiques utilisés pour le projet 36

Tableau 2.2 Congénères BPC ciblés présents dans le mélange 18 BPC conçu au laboratoire 55

Tableau 3.1 Pourcentage de dégradation de congénères BPC sélectionnés de l'Aroclor 1242 par des cellules induites de *E. coli* DH11S/pDB31 [*bphAE Avr*II$^+$] plus pQE51 [*bphFGB*] exprimant des BPDO hybrides obtenues par recombinaison *in vitro* 62

INTRODUCTION

Les biphényles polychlorés (BPC) sont des composés aromatiques chlorés synthétiques constitués de deux noyaux aromatiques formant le noyau biphényle auxquels peuvent se rattacher, par des liaisons covalentes, jusqu'à dix atomes de chlore autour de la molécule. On retrouve donc, théoriquement, 209 congénères différents selon le nombre et l'arrangement de ces atomes de chlore. Toutefois, seulement la moitié de ces composés sont synthétisés dû aux phénomènes d'encombrement stérique (Hutzinger *et al.*, 1974). L'intérêt manifesté envers ces xénobiotiques pour diverses applications industrielles provient des propriétés physico-chimiques que présentent ces composés organiques, principalement, de leur stabilité chimique et thermique (Hutzinger *et al.*, 1974). Les BPC furent commercialisés à partir de 1929 jusqu'à la fin des années 70 et ces composés furent largement employés comme huile isolante dans les transformateurs et les condensateurs électriques (Carrier, 1991 ; Furukawa, 1982 ; Hutzinger *et al.*, 1972). À ce jour, on estime jusqu'à 1,5 millions de tonnes, la production totale de BPC en Amérique du Nord (Programme des Nations Unies sur l'Environnement. L'inventaire des Capacités Mondiales de Destruction des PCB. 1999). Les BPC se sont avérés les polluants les plus persistants et les plus répandus dans l'écosystème y compris dans des régions peu industrialisées (MacDonal *et al.*, 2000). En effet, par leur caractère lipophile, les BPC ont tendance à s'accumuler dans des tissus adipeux et ce, à tous les niveaux de la chaîne alimentaire (Furukawa, 1982 ; Risebrough *et al.*, 1968). De plus, des études ont rapporté de multiples effets toxicologiques reliés à une exposition aux BPC (Aoki, 2001 ; Safe, 1992).

Suite aux inconvénients inhérents rapportés par la production et l'utilisation des BPC, la commercialisation des BPC cessa vers la fin des années 70 suite à l'instauration de sévères législations par les gouvernements des pays industrialisés (CCREM, 1987 ; United States Environmental Protection Agency (EPA)). Plusieurs méthodes physico-chimiques sont employées en vue d'éliminer les chlorobiphényles présents dans l'environnement (Chiarenzelli *et al.*, 1995 ; Johnston, 1985 ; Piver et Lindstrom, 1985).

La méthode la plus utilisée est l'incinération à haute température (Anonyme (EPA), 1993). Cette mesure présente l'avantage d'être efficace, cependant, il peut en résulter une production secondaire de dioxines et de furanes hautement toxiques (Hutzinger *et al.*, 1985 ; Kitamura *et al.*, 2000). Afin d'éliminer les biphényles polychlorés des eaux et des terres contaminées, la science privilégie l'étude de procédés de bioréhabilitation des BPC.

La biorestauration consiste en la dégradation des BPC à l'aide de microorganismes par une succession d'étapes enzymatiques menant à leur minéralisation complète (Neilson, 1990). Certaines bactéries, par exemple les souches *Burkholderia sp.* LB400 (Bopp, 1986), *Comamonas testosteroni* B-356 (Ahmad *et al.*, 1990) et *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 (Taira *et al.*, 1992), possèdent les gènes codant pour les différentes enzymes de la voie catabolique du biphényle qui permettent la biodégradation des BPC. La dioxygénase du biphényle (BPDO) catalyse la première réaction de la voie catabolique oxydative des BPC. L'enzyme comprend trois composantes : une réductase, une ferrédoxine et une oxygénase terminale (α et β), où la ferrédoxine et l'oxygénase sont des protéines fer-soufre. Les gènes *bphAEFG* codent respectivement pour chacun de ces constituants (Bergeron *et al.*, 1994 ; Erickson et Mondello, 1992 ; Taira *et al.*, 1992 ; Hurtubise *et al.*, 1995).

Les gènes codant pour les enzymes de la voie catabolique du biphényle ont été localisés et séquencés (Erickson et Mondello, 1992 ; Sylvestre *et al.*, 1996). Ces composantes ont été exprimées chez *Escherichia coli* en tant que protéine de fusion portant l'étiquette Histidine et les protéines ont été purifiées par chromatographie d'affinité pour reconstituer une enzyme active *in vitro* (Hurtubise *et al.*, 1995). Des études antérieures ont montré que la portion C-terminale de la sous-unité α de la composante oxygénase de LB400 influence grandement la spécificité de l'enzyme envers les congénères BPC (Kimura *et al.*, 1997 ; Mondello *et al.*, 1997). En particulier, une région comprise entre les résidus Tyr295 et Glu449 semble critique pour cette fonction. Récemment, le procédé de recombinaison aléatoire *in vitro* fut utilisé afin de produire des hybrides entre les gènes *bphA* de LB400 et *bphA1* de KF707. Certaines des enzymes hybrides obtenues ont démontré un potentiel accru d'activité envers des congénères BPC

sélectionnés comparativement aux enzymes parentales (Brühlmann et Chen, 1999 ; Kumamaru *et al.*, 1998).

Cependant, au commencement de ce travail, dans le cas de la BPDO, nous ignorions si le fait d'augmenter sa réactivité envers un congénère BPC précis pouvait accroître son potentiel d'action envers des congénères BPC qu'aucune souche bactérienne ne peut dégrader ou si les modifications apportées à l'enzyme réduiraient son spectre d'action. L'objectif principal du projet était de modifier la structure de la sous-unité α par le procédé de recombinaison aléatoire *in vitro* et de vérifier si ce procédé peut s'appliquer efficacement pour augmenter le potentiel catalytique de la BPDO en ciblant une portion seulement de l'enzyme. Par conséquent, nous avons ciblé la partie C-terminale de la chaîne α qui est directement impliquée dans l'activité catalytique de l'enzyme et qui, en se basant sur la structure tridimensionnelle de la dioxygénase du naphtalène qui lui est apparentée (Kauppi *et al.*, 1998 ; Carredano *et al.*, 2000), porterait des sites importants de reconnaissance du substrat. La région de la protéine que nous avons choisie correspondait à un fragment d'ADN de 688 pb qui se trouve à l'extrémité distale du gène *bphA* qui code pour la sous-unité α.

Les gènes *bphA* des souches B-356 et LB400 ont servi de parents dans cette étude. Ces deux gènes présentent environ 75% d'homologie génétique et codent chacun pour une dioxygénase qui présente des propriétés catalytiques très différentes envers des congénères BPC. Cette étude visait à rechercher parmi la progéniture, des BPDO hybrides capables d'oxyder un éventail de congénères plus large que les enzymes parentales. La sélection des hybrides d'intérêt parmi la progéniture fut effectuée en criblant pour des variants capables de dégrader le 2,2'-dichlorobiphényle (2,2'-CB) plus efficacement que la BPDO de LB400, qui est le seul des deux parents possédant la capacité de le dégrader. Une méthode de criblage sur milieu solide a dû être développée au cours du projet afin de repérer les clones d'intérêt parmi la progéniture. La méthode de criblage est basée sur la transformation du 2,2'-CB en 2,3-dihydroxybiphényle, un dérivé catéchol qui par oxydation spontanée confère une coloration brunâtre aux colonies capables d'effectuer la transformation ce qui permet de les distinguer sur un milieu solide.

Ce protocole de criblage a permis de repérer quelques clones variants dont l'intensité de la coloration des colonies en présence du 2,2'-CB était supérieure à celle de clones exprimant la BPDO de LB400. Dans ce travail, nous avons évalué les capacités catalytiques de quelques BPDO variantes envers des congénères BPC et caractérisé sommairement les propriétés biochimiques des enzymes. Finalement, nous avons mis en perspective les analyses séquentielles des hybrides d'intérêts pour tenter de mettre en relation les régions modifiées sur la séquence de *bphA* avec les activités cataboliques obtenues par les BPDO hybrides envers différents congénères BPC.

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Les biphényles polychlorés (BPC)

1.1.1 Chimie des BPC

Les mélanges commerciaux de biphényles polychlorés (BPC) sont synthétisés à partir d'un mélange de molécules de biphényle et d'atomes de chlore anhydre en présence d'un catalyseur métallique. Les divers arrangements de chloration, en position *ortho*, *meta* ou *para* autour des noyaux aromatiques du biphényle, permettent, théoriquement, la formation de 209 congénères BPC distincts, puisque jusqu'à 10 atomes de chlore peuvent être substitués aux atomes d'hydrogène sur la molécule de biphényle (Figure 1.1). Toutefois, à cause de l'encombrement stérique des atomes de chlore et de l'instabilité de certains congénères, seul la moitié d'entre eux sont produits et se retrouvent dans l'environnement (Hutzinger *et al.*, 1974).

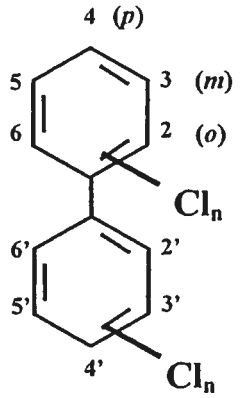


Figure 1.1 : Structure chimique des biphényles polychlorés. Cette figure indique la numérotation des positions possibles des atomes de chlore sur la molécule ainsi que des positions *ortho* (*o*), *meta* (*m*) et *para* (*p*). Le nombre total d'atomes de chlore (n) pouvant être compris entre 0 et 10.

Les BPC furent synthétisés pour la première fois en Allemagne, en 1881. Ceux-ci furent, par la suite, produits à des fins commerciales et industrielles à partir de 1929. Les principales appellations commerciales sont : Aroclor (États-Unis, Canada), Clophen (Allemagne), Fenclor (Italie), Kanechlor (Japon) et Phenoclor (France) (Carrier, 1991 ; Hutzinger *et al.*, 1974). La compagnie Monsanto Chemical avait le monopole des ventes en Amérique du Nord. Elle a produit, jusqu'à la fin des années soixante-dix, divers mélanges complexes de BPC qui étaient vendus sous le nom d'Aroclor. Leurs ventes ont cessé suite à la mise en place de sévères législations par les gouvernements industrialisés (Furukawa, 1982).

L'appellation commerciale des mélanges d'Aroclor s'identifie par un nombre de quatre chiffres. Par exemple, pour l'Aroclor 1242, le chiffre 12 désigne le nombre d'atomes de carbone qui constitue la molécule de biphényle et les deux derniers chiffres spécifient le pourcentage en masse de chlore dans le mélange (Hutzinger *et al.*, 1974).

1.1.2 Propriétés physico-chimiques des BPC

D'après le nombre et les divers arrangements de chloration autour des noyaux aromatiques, la molécule de biphényle peut présenter diverses propriétés physico-chimiques. Les BPC ont plusieurs propriétés d'intérêt pour des applications industrielles. Entre autres, ces molécules présentent une grande stabilité thermique, une inertie chimique, une résistance à l'hydrolyse acide-base ainsi qu'à l'oxydation et d'excellentes propriétés diélectriques (Furukawa, 1982 ; Hutzinger *et al.*, 1974). De plus, les BPC étant hydrophobes, ils peuvent se dissoudre aisément dans les hydrocarbures et les graisses. En effet, le caractère lipophile des congénères BPC augmente selon le nombre d'atomes de chlore autour des noyaux aromatiques. Cependant, les biphényles polychlorés sont faiblement solubles dans l'eau et cette solubilité est inversement proportionnelle au nombre d'atomes de chlore présents sur la molécule (Hutzinger *et al.*, 1974).

1.1.3 Applications industrielles

Les biphényles polychlorés furent largement employés à des fins industrielles notamment comme fluides diélectriques au niveau des condensateurs et des transformateurs, mais aussi comme fluides hydrauliques et isolant thermique. Les BPC furent également utilisés dans la conception de plusieurs produits comme, par exemple, des lubrifiants, des pesticides, des résines synthétiques, de l'encre d'imprimerie, des agents anti-corrosifs et adhésifs et des plastiques (Hutzinger *et al.*, 1972).

1.1.4 Niveau de BPC dans l'environnement

La production totale mondiale des BPC par les industries depuis 1929 est estimée à près de deux millions de tonne. Environ 1% de cette production se retrouverait, actuellement, dans l'environnement (Furukawa, 1982 ; Lauber, 1986). La bioaccumulation des BPC dans la chaîne alimentaire fut mise en évidence suite à l'identification, en 1966, de résidus de BPC découverts à partir d'échantillons provenant d'organismes vivants (Jensen, 1966). On retrouve des BPC au niveau de l'air, de l'eau et des sédiments ainsi qu'à tous les niveaux de la chaîne trophique de la biosphère particulièrement dans le lait maternel et les tissus adipeux (Furukawa, 1982 ; Risebrough *et al.*, 1968). L'omniprésence de ces xénobiotiques dans l'environnement est due au fait que les mélanges commerciaux furent largement utilisés pour des applications industrielles de 1930 à 1976, mais aussi à cause d'une mauvaise gestion des déchets contaminés (Fuoco *et al.*, 1996).

Leurs caractéristiques physico-chimiques responsables de la persistance des BPC dans l'environnement et leurs effets toxiques sur la biosphère obligent les gouvernements à intervenir par des législations au niveau de leur gestion. Par exemple, aux États-Unis, la vente des BPC fut bannie en 1977 par la « Toxic Substances Control Act » (United States Environmental Protection Agency (EPA)). Au Canada, l'utilisation restreinte des BPC est en vigueur depuis 1980 (CCREM, 1987).

En dépit de ces lois, les BPC sont encore présents dans les eaux nord-américaines principalement au niveau des Grands Lacs et dans le fleuve St-Laurent (Kaiser *et al.*, 1990a ; L'Italien et Hedley, 1992). Les BPC apparaissent comme étant le contaminant organochloré majeur du fleuve St-Laurent avec une concentration moyenne de 1,33 ng/L (Quémerais *et al.*, 1994a). La contamination de cet effluent par ces composés toxiques a permis, par exemple, d'établir une relation causale entre les troubles de santé et de reproduction observés chez les bélugas et la concentration élevée de congénères BPC présents dans leur organisme (Béland *et al.*, 1993).

1.1.5 Aspect toxicologique des BPC

En raison de l'ubiquité des BPC dans l'écosystème et de leur caractère lipophile, ceux-ci peuvent s'accumuler dans la chaîne alimentaire touchant tous les niveaux trophiques. Dans les pays industrialisés, le taux de BPC observé dans les tissus adipeux humains varie de 0,6 à 10 ppm dans la population en générale et jusqu'à 100 ppm chez des individus couramment exposés à ces composés (Brown *et al.*, 1991).

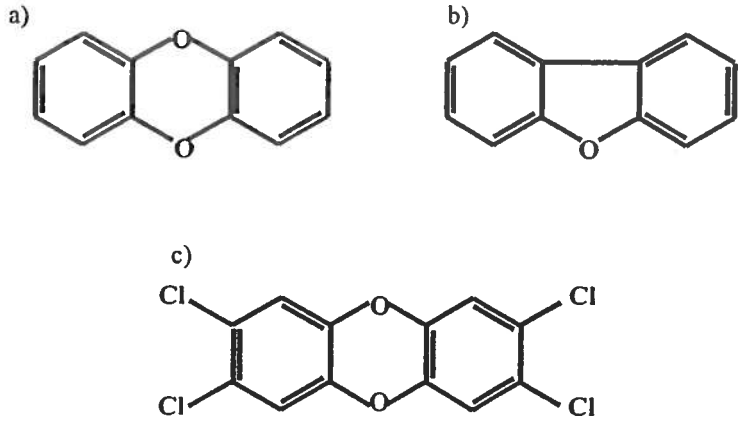


Figure 1.2 : Présentation de la structure chimique des dibenzo-*p*-dioxines et des dibenzofurannes. a) dibenzo-*p*-dioxine, b) dibenzofuranne, c) 2,3,7,8-tétrachloro-dibenzodioxine.

La toxicité des mélanges commerciaux de biphényles polychlorés est généralement associée à la présence de composés toxiques tels que les polychlorodibenzo-*p*-dioxines (PCDD) et les polychlorodibenzofurannes (PCDF) (Figure 1.2) (Safe, 1990). Les congénères de BPC, de dioxines et de furannes les plus toxiques correspondent à ceux qui tiennent une conformation coplanaire, portant des atomes de chlore aux positions *meta* et *para* sur les noyaux aromatiques (Safe *et al.*, 1985). Le composé le plus toxique de cette catégorie est le 2,3,7,8-tétrachlorodibenzodioxine (Figure 1.2) (Safe *et al.*, 1985). Au niveau du foie, les congénères ayant cette conformation coplanaire présentent une affinité de liaison envers les récepteurs cellulaires hépatiques, qui sont impliqués dans certains mécanismes de détoxification, et stimulent l'activité métabolique d'enzymes, les monooxygénases de type cytochrome P-450.

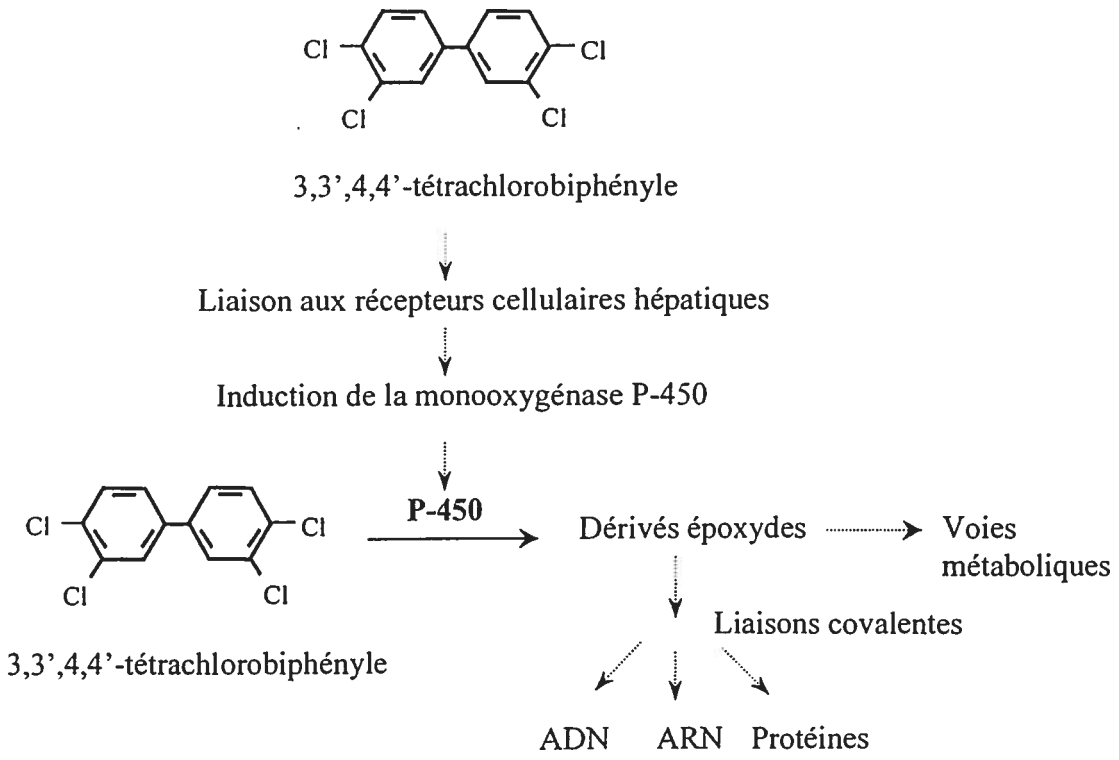


Figure 1.3 : Schéma illustrant la transformation d'un congénère BPC au niveau des cellules hépatiques suite à l'induction de la monooxygénase de type cytochrome P-450.

En présence de ces xénobiotiques, il y a induction des cytochromes P-450 et ces composés sont ainsi modifiés en dérivés époxydes réactifs et mutagènes pouvant former des liens covalents avec les constituants cellulaires (ADN, ARN et protéines) ou être métabolisés par diverses voies métaboliques (Figure 1.3) (Safe, 1990 et 1992 ; Safe *et al.*, 1985) .

Plusieurs études épidémiologiques furent effectuées sur des travailleurs exposés aux BPC. Pour l'instant, les résultats suggèrent qu'il n'y aurait pas d'incidence du taux de mortalité ou de cancers chez une population plus fortement exposés à un environnement contaminé. Toutefois, la persistance de congénères organochlorés dans le système pourrait prédisposer ces personnes à des risques de maladies plus importants (Kimbrough, 1995 ; Safe, 1992). De plus, l'hypothèse d'une implication des BPC, des dioxines et des furannes en tant que modulateurs endocriniens fut émise suite à l'observation de problèmes de développement et de reproduction chez des personnes exposées à un environnement contaminé aux BPC (Aoki, 2001 ; Mukerjee, 1998). D'ailleurs, les dioxines furent reconnus récemment comme étant un modulateur endocrinien (Aoki, 2001). Cependant, des analyses plus approfondies doivent être effectuées sur le sujet, puisqu'actuellement, il est difficile d'établir une relation causale entre les problèmes de santé d'une population associés à un mécanisme de modulation endocrinienne et des contaminants industriels synthétiques sous forme de mélanges de plusieurs congénères comme les BPC (Safe, 2000).

1.1.6 Procédés de décontamination des BPC dans l'environnement

1.1.6.1 Incinération

Plusieurs méthodes physico-chimiques permettent l'élimination des BPC des sols contaminés (Anonyme (EPA), 1993 ; Chiarenzelli *et al.*, 1995 ; Johnston, 1985 ; Piver et Lindstrom, 1985). La méthode la plus employée est l'incinération à haute température où 99,99% des contaminants sont alors détruits (Anonyme (EPA), 1993). L'incinération présente l'avantage d'être une méthode rapide et efficace pour les sites comportant de

grandes concentrations de polluants (Chiarenzelli *et al.*, 1995). Cependant, une combustion incomplète peut entraîner la production de polluants secondaires hautement toxiques tels que les dibenzo-*p*-dioxines et les dibenzofurannes (Hutzinger *et al.*, 1985 ; Kitamura *et al.*, 2000). De plus, mentionnons que les sols ayant une forte teneur en eau ne peuvent être traités par ce procédé. Cette méthode requiert, également, l'excavation et le transport des sols contaminés vers les sites d'incinération (Pellerin, 1994). Finalement, ce procédé exige un coût élevé d'installation et d'exploitation ainsi que la détention de divers permis pour l'ensemble des procédures (Environnement Canada ; Chiarenzelli *et al.*, 1995).

1.1.6.2 Biorestauration

Le développement de méthodes de biorestauration représente une approche intéressante, compte tenu des inconvénients inhérents à l'emploi de procédés physico-chimiques conventionnels. En effet, contrairement à l'incinération, les méthodes microbiologiques d'élimination des polluants consistent en l'utilisation d'un processus naturel qui ne stérilise pas le sol. De plus, mentionnons que celles-ci sont moins coûteuses, puisque, généralement, ces méthodes de bioréhabilitation procèdent au traitement sur le site même de la contamination. Étant réalisés dans une optique de respect de l'environnement, les traitements microbiologiques exigent, par contre, un temps de réalisation plus long (Pellerin, 1994).

De nombreuses souches bactériennes et fongiques ont été isolées de sites contaminés aux BPC (Bedard *et al.*, 1986 ; Bumpus *et al.*, 1985). Les souches sont en mesure d'utiliser le biphényle comme source de carbone et d'énergie et dégradent certains congénères BPC par co-métabolisme (Barriault et Sylvestre, 1993).

Des procédés de biorestauration ont été développés pour plusieurs contaminants environnementaux. Il existe, notamment, des traitements en bioréacteur ou en biopile dans lesquels il est possible de contrôler et d'optimiser la biodégradation en faisant varier l'apport de nutriments, la ventilation ainsi que la température (Anonyme (EPA), 1993 ;

Blackburn et Hafker, 1993). Cependant, il n'existe pas de procédé biotechnologique commercial pour la restauration de sites contaminés par les BPC. Quelques essais ont été réalisés sur des sites contaminés et ont obtenu un certain succès (Harkness *et al.*, 1993 ; Unterman, 1996). Toutefois, les bactéries aérobies sont incapables de dégrader efficacement les BPC à forte teneur en chlore. Certains procédés faisant appel à des bactéries anaérobies, qui effectuent une deshalogénation réductrice des congénères BPC les plus chlorés, ont été proposés (Abramowicz, 1994; Abramowicz et Olson, 1995). Cependant, ces procédés à deux phases (anaérobies-aérobies) ne sont pas encore applicables pour la restauration de sites contaminés. Un problème majeur est l'accumulation des congénères portant des atomes de chlore en position *ortho* dont le 2,6-dichlorobiphényle et le 2,2',6,6'-tétrachlorobiphényle qui sont des métabolites de la deshalogénation réductrice que les bactéries aérobies sont incapables de dégrader (Maltseva *et al.*, 1999).

1.2 Disposition des BPC dans l'environnement

1.2.1 Introduction

La dépollution des BPC nécessite l'existence de deux voies cataboliques distinctes. Certains microorganismes peuvent métaboliser des congénères faiblement chlorés par la voie catabolique oxydative du biphényle. Toutefois, les BPC fortement chlorés sont récalcitrants au métabolisme aérobie. Par contre, il existe une voie de dégradation permettant une déchlorination réductrice des congénères les plus chlorés. Cette étape, effectuée en conditions anaérobiques, permet de réduire le nombre d'atomes de chlore sur la molécule de biphényle et d'augmenter sa susceptibilité au catabolisme oxydatif (Abramovicz, 1990).

La biodégradation oxydative consiste en une transformation des congénères BPC faiblement chlorés par une succession d'étapes enzymatiques menant à leur minéralisation complète générant, ainsi, du chlorure d'hydrogène, du dioxyde de carbone

et de l'eau (Neilson, 1990). L'observation d'une bactérie pouvant dégrader les BPC fut répertoriée, pour la première fois, en 1970 (Lunt et Evans, 1970). Par la suite, de nombreux microorganismes furent isolés à partir de sites contaminés aux BPC et ceux-ci démontraient une capacité à dégrader des congénères, par co-métabolisme, à l'aide de la voie catabolique du biphényle (Bedard *et al.*, 1986). Des observations ont démontré que tous ces organismes sont en mesure de dégrader des composés aromatiques faiblement chlorés (1-2 chlores) (Ahmad *et al.*, 1990 ; Bedard *et al.*, 1986). Certaines souches bactériennes aérobies ont, par contre, révélé une habileté intéressante à métaboliser un large spectre de congénères dont certains plus fortement chlorés (Bedard *et al.*, 1986 ; Bedard *et al.*, 1987).

1.2.2 Voie catabolique oxydative du biphényle

La biodégradation oxydative complète du biphényle s'effectue suivant l'action de deux voies cataboliques. La voie métabolique supérieure permet la transformation de la molécule de biphényle, par une étape d'hydroxylation suivi du clivage de l'un des noyaux aromatiques, pour ainsi former de l'acide benzoïque (Furukawa et Miyazaki, 1986 ; Seeger *et al.*, 1995). Ce composé peut, par la suite, être métabolisé par une autre voie enzymatique (voie inférieure) menant à la formation de métabolites pouvant être réutilisés au cours du cycle de Krebs (Sondossi *et al.*, 1992).

Le processus de biodégradation du biphényle retrouvé chez les microorganismes comprend quatre étapes réactionnelles (Figure 1.4). La première étape de dégradation des BPC est catalysée par une 2,3 dioxygénase qui introduit l'oxygène moléculaire sur deux carbones adjacents d'un des noyaux aromatiques de la molécule de biphényle. Le métabolite généré est le 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle (dihydrodiol). La 2,3-dioxygénase est une enzyme multi-composante qui est codée par les gènes *bphAEFG* (Bergeron *et al.*, 1994 ; Haddock *et al.*, 1993). La dioxygénation s'effectue en présence de NADH comme cofacteur. Le métabolite est, par la suite, oxydé par une dihydrodiol déshydrogénase (BphB) pour former le 2,3-dihydroxybiphényle (catéchol). Cette étape requiert du NAD et permet l'enlèvement de deux groupements hydrogène sur le noyau

aromatique. Le catéchol est ensuite clivé en position *meta* par la 2,3-dihydroxybiphényle-1,2-dioxygénase (BphC). Finalement, le composé de *meta*-clivage, le 2-hydroxy-6-oxo-6-phényl-2,4-diènoate (HOPDA), est hydrolysé par la HOPDA hydrolase (BphD) permettant la formation de l'acide benzoïque et du 2-hydroxy-penta-2,4-diènoate (Ahmad *et al.*, 1990 ; Furukawa, 1982 ; Massé *et al.*, 1989).

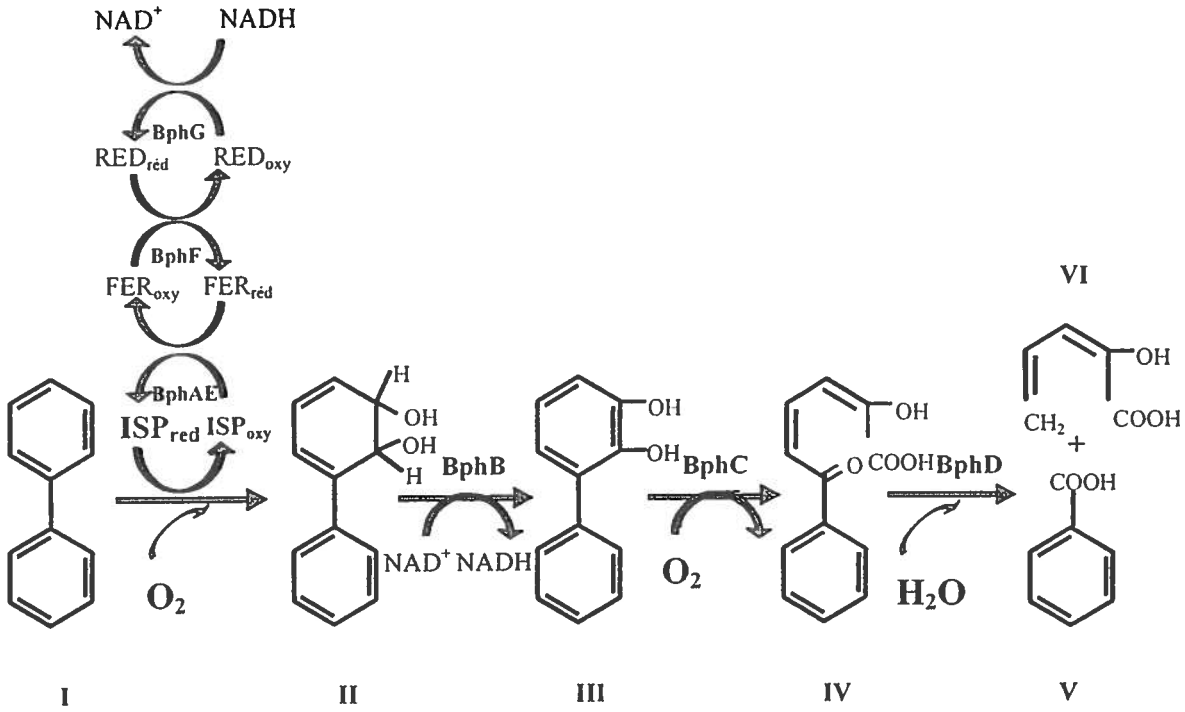


Figure 1.4 : Voie catabolique oxydative du biphényle. Métabolites produits: I : biphényle, II : 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle (dihydrodiol), III : 2,3-dihydroxybiphényle (catéchol), IV : 2-hydroxy-6-oxo-6-phényl-2,4-diènoate (HOPDA), V : benzoate, VI : 2-hydroxy-penta-2,4-diènoate. Enzymes de la réaction: BphAEFG : biphényle 2,3-dioxygénase (BPDO), BphB : 2,3-dihydrodiol déshydrogénase, BphC : 2,3-dihydroxybiphényle 1,2-dioxygénase, BphD : HOPDA hydrolase.

La dioxygénase du biphényle (BPDO) est un système enzymatique à multiples composantes comprenant l'oxygénase, une protéine fer-soufre, constituée d'une sous-unité α (51 kDa) et d'une sous-unité β (22 kDa) codées respectivement par les gènes *bphA* et *bphE* ; une ferrédoxine (12 kDa) codée par le gène *bphF* et une ferrédoxine-réductase (43 kDa) codée par le gène *bphG* (Figure 1.5) (Bergeron *et al.*, 1994 ; Erickson et Mondello, 1992 ; Taira *et al.*, 1992 ; Hurtubise *et al.*, 1995). La ferrédoxine et la réductase forment une chaîne de transport des électrons pour le transfert de deux électrons provenant du NADH réduit au centre Rieske [2Fe-2S] de l'oxygénase (Haddock *et al.*, 1993 ; Hurtubise *et al.*, 1995). Les électrons sont ensuite transférés au fer mononucléaire situé au centre actif qui sert à activer l'oxygène moléculaire pour la *cis*-hydroxylation de la molécule de biphényle (Mason et Cammack, 1992). La structure active de la BPDO est de type $\alpha_3\beta_3$ et c'est au niveau de la sous-unité α de l'oxygénase que s'effectue l'interaction directe du site actif de l'enzyme avec le substrat (Haddock et Gibson, 1995 ; Hurtubise *et al.*, 1996).

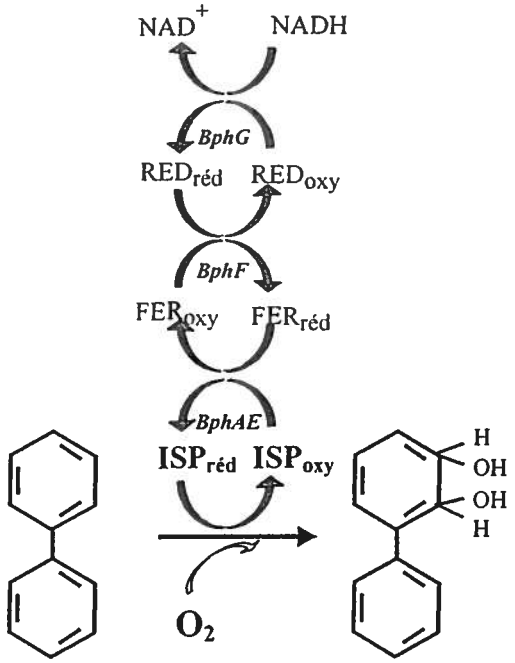


Figure 1.5 : Composantes de la dioxygénase du biphényle. RED : Ferrédoxine-réductase, FER : Ferrédoxine, ISP : Oxygénase (Protéine fer-soufre). réd : réduite, oxy : oxydée.

1.2.3 Caractéristiques des souches bactériennes isolées

Les bactéries capables de métaboliser des congénères BPC, sont ubiquitaires dans l'environnement et appartiennent à plusieurs genres bactériens (Furukawa, 1982). Les espèces étudiées sont, majoritairement, des bactéries Gram négatives appartenant, par exemple, aux genres *Pseudomonas*, *Alcaligenes* et *Comamonas* (Bedard et Haberl, 1990). Il est intéressant de noter que les deux tiers de ces espèces appartiennent au genre *Pseudomonas* (Abramovicz, 1990). Toutefois, certaines espèces de bactéries Gram positives appartenant au genre *Rhodococcus* présentent aussi des activités cataboliques envers des chlorobiphényles (Asturias *et al.*, 1995 ; Masai *et al.*, 1995). On retrouve, également, des microorganismes autres que des bactéries, notamment des champignons, capables de métaboliser des biphényles polychlorés (Dietrich *et al.*, 1995).

Parmi les bactéries largement étudiées dans la littérature, mentionnons *Burkholderia sp.* LB400 (Bopp, 1986 ; Fain et Haddock, 2001), *Comamonas testosteroni* B-356 (Ahmad *et al.*, 1990) et *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 (Taira *et al.*, 1992). Ces bactéries furent isolées à partir de sites contaminés aux BPC ou de boues activées (Ahmad *et al.*, 1990 ; Bédard *et al.*, 1986 ; Bopp, 1986).

Burkholderia sp. LB400, *C. testosteroni* B-356 et *P. pseudoalcaligenes* KF707 effectuent l'activité d'hydroxylation de la molécule de biphényle en position 2,3 (Guilbeault *et al.*, 1994 ; Haddock *et al.*, 1995 ; Taira *et al.*, 1992). Cependant, elles semblent se distinguer relativement à leur spectre de réactivité envers des congénères BPC (Figure 1.6). En effet, nous pouvons observer que B-356 attaque préférentiellement des congénères substitués en position *meta* comme le 3,3'-dichlorobiphényle (CB), mais, contrairement à LB400, cette souche ne présente pas d'activité envers les BPC substitués en position *ortho* comme le 2,2'-CB et est incapable de catalyser l'oxygénation de la molécule en position 3,4 (Ahmad *et al.*, 1991 ; Barriault *et al.*, 1997). Par sa capacité d'hydroxylation et de déchloration à la fois en position 2,3 et 3,4 sur le noyau aromatique, la souche LB400 présente un spectre de réactivité beaucoup plus large et peut dégrader des congénères plus fortement chlorés, où les atomes de carbone en position *ortho* et *meta*

ne sont plus disponibles pour la dioxygénation. Les exemples comprennent le 2,2',5,5'-CB ainsi que des congénères ayant jusqu'à six atomes de chlores autour de la molécule de biphényle (Bedard *et al.*, 1986 ; Bopp, 1986 ; Gibson *et al.*, 1993 ; Haddock *et al.*, 1995). La souche KF707 possède une activité préférentielle envers des congénères substitués en position *para* comme le 4,4'-CB et, tout comme B-356, est incapable d'oxygéner le noyau biphényle en position 3,4 (Bedard *et al.*, 1986 ; Gibson *et al.*, 1993). Mentionnons que, contrairement aux souches B-356 et KF707, la souche LB400 métabolise peu ou pas du tout le 3,3'-CB et le 4,4'-CB (Gibson *et al.*, 1993 ; Hurtubise *et al.*, 1998 ; Erickson et Mondello, 1993).

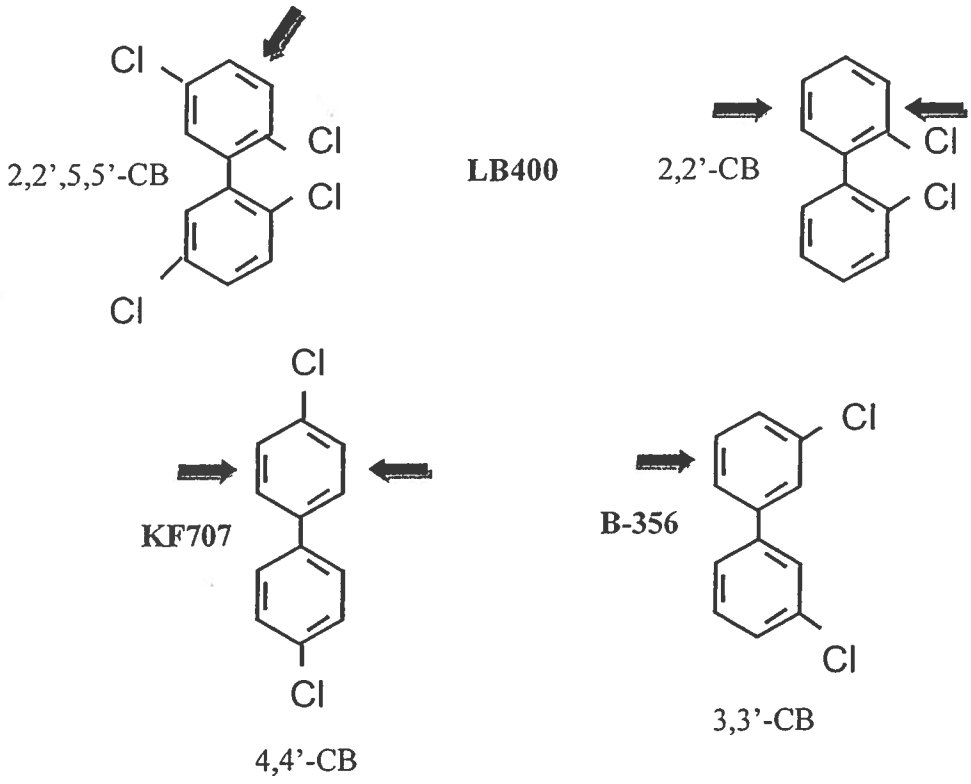


Figure 1.6 : Représentation des différents congénères dégradés par les souches LB400, B-356 et KF707. Les flèches représentant la position (2,3 ou 3,4) de l'activité d'hydroxylation sur le noyau aromatique. 2,2'-CB : 2,2'-dichlorobiphényle, 3,3'-CB : 3,3'-dichlorobiphényle, 4,4'-CB : 4,4'-dichlorobiphényle 2,2',5,5'-CB : 2,2',5,5'-tétrachlorobiphényle.

Les gènes codant pour les enzymes impliquées dans la biodégradation du biphényle, particulièrement pour les souches LB400, B-356 et KF707, sont organisés sur le chromosome sous forme d'opéron (Ahmad *et al.*, 1990 ; Mondello, 1989 ; Taira *et al.*, 1992). Cependant, l'organisation génique varie selon la souche (Figure 1.7) (Erickson et Mondello, 1992 ; Sylvestre *et al.*, 1996 ; Taira *et al.*, 1992). En effet, mentionnons que la disposition des gènes de la souche *C. testosteroni* B-356 présente des différences comparativement aux deux autres souches, puisque le gène *bphG*, codant pour la ferrédoxine-réductase, est situé à environ 18 kb en amont de *bphA*. (Sylvestre *et al.*, 1996). Toutefois, l'organisation des gènes *bph* de LB400 et de KF707 présentent une homologie très élevée. En effet, les séquences des gènes *bphAEFG*, pour ces deux souches, présentent une homologie de plus de 95 % (Gibson *et al.*, 1993). Par contre, les gènes *bph* de *C. testosteroni* B-356 démontrent un pourcentage d'homologie d'environ 75 % avec les gènes correspondants des souches LB400 et KF707. Cette homologie diminue à 30 % pour la ferrédoxine-réductase (*bphG*) (Sylvestre *et al.*, 1996).

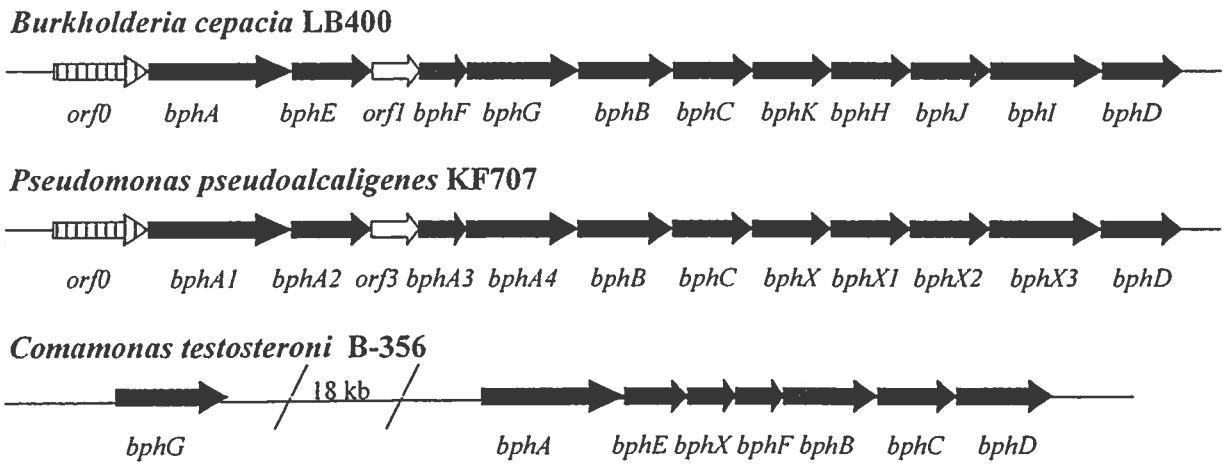


Figure 1.7 : Organisation génétique des gènes *bph* des souches LB400, KF707 et B-356 qui sont impliqués au niveau du catabolisme du biphényle. Les flèches noires indiquant les gènes codant pour des enzymes de la voie catabolique du biphényle. Les flèches blanches indiquant les gènes de fonction inconnue et les flèches rayées indiquant les gènes impliqués dans la régulation de l'opéron.

1.3 Ingénierie de la dioxygénase du biphényle

1.3.1 Introduction

Les microorganismes démontrent des capacités remarquables d'adaptation et d'évolution en présence de composés chimiques dans leur environnement et l'intérêt de ces enzymes à des fins commerciales provient, notamment, de ce potentiel à améliorer la spécificité de leurs réactions dans le but d'éliminer des polluants environnementaux. Cependant, l'accumulation de xénobiotiques toxiques et persistants ne permet pas toujours de les métaboliser par les voies cataboliques naturelles microbiennes et certains contaminants peuvent alors, être transformés de façon incomplète (Bosma *et al.*, 1999 ; Hrywna *et al.*, 1999). De plus, l'utilisation de microorganismes à des fins industrielles peut s'effectuer, parfois, sous des conditions incompatibles avec les enzymes naturelles (Cherry, 2000 ; Pieper et Reineke, 2000).

L'évolution naturelle des enzymes s'effectuant très lentement, particulièrement lors de l'acquisition d'activités catalytiques, implique, par conséquent, le développement de méthodes d'ingénierie afin de permettre l'accélération de ce processus naturel d'évolution des enzymes et d'en améliorer leur performance (Chen *et al.*, 1999 ; Cherry, 2000). À ce jour, nous pouvons répertorier diverses méthodes d'ingénierie appliquées au niveau des enzymes. Mentionnons, notamment, la mutagénèse dirigée qui emploie une démarche rationnelle et qui requiert, idéalement, la connaissance de la structure tridimentionnelle de l'enzyme, puis l'utilisation de la recombinaison aléatoire *in vitro* (DNA shuffling) et de « l'error prone PCR » décrites comme étant des méthodes d'expérimentation aléatoires et plus rapides pour modifier l'activité catalytique des enzymes (Stemmer, 1994).

1.3.2 Enzymes hybrides

De nombreuses informations peuvent être obtenues sur les régions d'intérêt d'une enzyme, impliquées dans la détermination de la spécificité envers un substrat, suite à la

création d'hybrides entre des enzymes ayant des propriétés catalytiques ou des spécificités différentes. Par exemple, cette procédure fut employée afin de déterminer des régions responsables de la spécificité de la dioxygénase du biphényle (Barriault et Sylvestre, 1999 ; Furukawa *et al.*, 1993 ; Hurtubise *et al.*, 1998).

Hirose et ses collaborateurs ont généré des hybrides entre la dioxygénase du biphényle de *P. pseudoalcaligenes* KF707 et la dioxygénase du toluène de *Pseudomonas putida* F1. Mentionnons, d'abord, que l'opéron *bph* codant pour les enzymes de la voie catabolique du biphényle chez KF707 et l'opéron *tod* codant pour les enzymes de la voie de dégradation du toluène chez F1 présentent des similitudes au niveau de l'organisation, de la taille et de l'homologie pour chacune des composantes du complexe multi-protéique (Zylstra *et al.*, 1989 ; Taira *et al.*, 1992). Le degré d'homologie entre les séquences des gènes de ces deux opérons est de l'ordre de 60 % (Hirose *et al.*, 1994). Les observations tirées de leurs investigations ont permis de démontrer que des hybrides construits à partir de l'échange des deux sous-unités entre la dioxygénase du biphényle et du toluène, TodC1 :: BphA2 et BphA1 :: TodC2, formaient une oxygénase multi-composante active et que ces deux sous-unités sont responsables de la spécificité de l'enzyme envers des congénères. Par exemple, les résultats obtenus à partir de tests avec des lysats cellulaires démontrèrent que l'hybride TodC1 :: BphA2A3A4BC présentait une habileté à convertir, à la fois, le toluène et le biphényle en produit de *meta*-clivage comparable à la dioxygénase parentale KF707 (BphA1A2A3A4BC). Finalement, ces essais ont permis de conclure que la ferrédoxine (FER) et la ferrédoxine-réductase (RED) peuvent être interchangeables entre ces deux dioxygénases (Hirose *et al.*, 1994).

Ces mêmes conclusions furent tirées suite à l'analyse des hybrides conçus en interchangeant les composantes de la dioxygénase du naphtalène (NAP) et de la dioxygénase du biphényle (BPH) (Barriault et Sylvestre, 1999). Notons que la naphtalène 1,2-dioxygénase et la biphényle 2,3-dioxygénase sont des enzymes qui présentent aussi un arrangement très similaire (Barriault et Sylvestre, 1999). En effet, ces hybrides ont permis de démontrer que le transfert des électrons entre les composantes RED_{BPH} et FER_{NAP} s'effectuait efficacement. La composante RED_{BPH} de la souche B-356 pouvait

donc, reconstituer, de manière similaire, l'activité métabolique de la BPDO et celle du naphtalène en présence des composantes FER respectives pour les deux enzymes. Ces travaux ont permis de confirmer une hypothèse suggérant que la réductase de la dioxygénase du biphényle n'est pas spécifique au système enzymatique (Hurtubise *et al.*, 1995). La ferrédoxine s'avère, toutefois, une composante plus spécifique.

Hirose et ses collaborateurs conclurent, suite à ces études effectuées à partir de BPDO, qu'il est possible de générer des dioxygénases montrant un spectre d'activité catabolique modifié envers des composés suite au remplacement des différentes composantes de la dioxygénase (Hirose *et al.*, 1994). Cependant, des modifications trop importantes apportées au niveau de la dioxygénase du biphényle peuvent avoir comme conséquence, par exemple, de nuire au transfert des électrons qui s'effectue entre la ferrédoxine et l'oxygénase terminale pouvant affecter le potentiel métabolique du complexe enzymatique (Hurtubise *et al.*, 1998 ; Barriault et Sylvestre, 1999)

1.3.3 Régions impliquées dans la spécificité de la BPDO

1.3.3.1 Travaux de mutagénèse dirigée sur la BPDO

La comparaison des séquences protéiques de BphA de LB400 et de BphA1 de KF707 a permis d'identifier quatre régions (I-IV) associées de près à la spécificité de l'enzyme envers des congénères BPC (Figure 1.8) (Mondello *et al.*, 1997). BphA de LB400 et BphA1 de KF707 diffèrent en vingt positions incluant 19 acides aminés substitués et une glycine délétée chez BphA1 et toutes ces différences sauf une sont localisées dans une région de 141 acides aminés entre les résidus Thr237 et Asn377 de LB400 en position C-terminale. Par contre, BphE de LB400 et BphA2 de KF707 ne diffèrent que par un seul acide aminé. Puisque BphA et BphE constituent les deux sous-unités de la composante oxygénase qui interagit directement avec le substrat pour oxygéner la molécule, Erickson et Mondello ont conclu que certaines des 19 différences dans la région C-terminale de BphA et BphA1 doivent être responsables de la spécificité de la dioxygénase du biphényle pour ces deux souches (Erickson et Mondello, 1993). Ils

employèrent ainsi la mutagénèse dirigée, comme procédé, afin d'altérer les régions spécifiques de *bphA* de LB400 pour les régions correspondantes de *bphA*1 de KF707 (Erickson et Mondello, 1993 ; Mondello *et al.*, 1997).

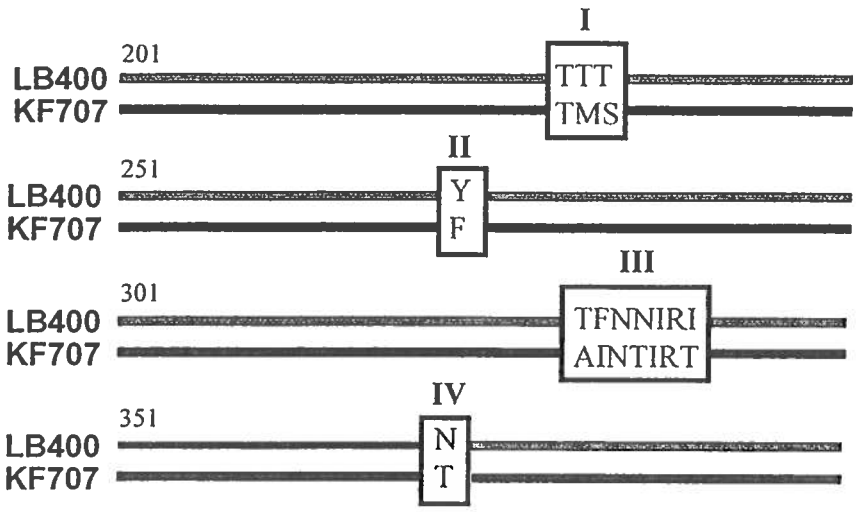


Figure 1.8 : Comparaison des régions (I-IV) situées en position C-terminale de la sous-unité α des dioxygénases des souches LB400 et KF707.

Mutagénèse dirigée dans les régions I, II et IV

Une analyse par mutagénèse dirigée démontra qu'aucune modification de la spécificité de l'enzyme envers des congénères n'est observé lorsque la séquence de la BPDO de LB400 est individuellement convertie pour celle de la BPDO de KF707 dans les régions I, II et IV (Mondello *et al.*, 1997). De même, la spécificité n'était pas modifiée en combinant les mutations des régions I et II ou I et IV.

Mutagénèse dirigée dans la région III

Par mutagénèse dirigée, la région 335 à 341 de la BPDO de LB400 (-TFNNIRI-) fut modifiée par la séquence correspondante de KF707 (-AINTIRT-). Les résultats ont démontré une modification de la spécificité de la dioxygénase (Mondello *et al.*, 1997). En effet, l'activité envers le 2,2'-CB et le 2,2',5,5'-CB était conservée et ces altérations au niveau de la région III permettaient d'étendre le spectre d'activité de dégradation des congénères BPC, spécialement envers des congénères substitués en position *para* (Erickson et Mondello, 1993). Les quatre acides aminés de cette région (-TF-N--I-) furent, également, modifiés individuellement et en groupe par les résidus (-AI-T--T-). Mondello et ses collaborateurs ont ainsi, identifié certaines mutations ponctuelles situées dans cette région comme étant en mesure de modifier l'activité catabolique de la dioxygénase de LB400. En effet, les substitutions Phe336Ile et Asn338Thr ont significativement amélioré l'activité de biodégradation des BPC comportant des atomes de chlore en position *para* comme le 4,4'-CB et le 2,4,4'-CB. Certains changements substantiels de spécificité ont, cependant, requis des modifications multiples de résidus dans cette région indiquant que leurs effets sur l'activité de l'enzyme sont coopératifs (Mondello *et al.*, 1997).

Finalement, les variations importantes au niveau de la spécificité des souches LB400 et KF707 peuvent, également, provenir de combinaisons entre des résidus différents dans les régions III et IV. En effet, Mondello et ses collaborateurs ont remarqué un changement dans la réactivité de l'enzyme suite à une substitution du résidu thréonine à la position 376 (région IV) de la séquence de KF707 par une asparagine et ces résultats se sont avérés différents selon l'acide aminé présent en position 336 de la région III (Erickson et Mondello, 1993 ; Mondello *et al.*, 1997).

Kimura et ses collaborateurs ont également, construit une variété de chimères de *bphA*1 par l'échange de fragments entre les BPDO des souches LB400 et KF707. Suite à l'analyse de l'expression des dioxygénases mutées chez *E. coli*, certains de ces hybrides présentèrent une activité catabolique, à la fois, envers le 4,4'-CB et le 2,2',5,5'-CB

similaire aux enzymes parentales. Ils conclurent qu'un petit nombre de résidus situé dans la région C-terminale de la sous-unité α, est impliqué au niveau de la reconnaissance du noyau chloré et de l'hydroxylation de la molécule de biphényle. Tout comme les recherches de Mondello et de ses collaborateurs, l'un de ces résidus identifiés par leurs travaux fut la thréonine 376, présente sur la séquence de la BPDO de KF707 correspondant à une asparagine pour la BPDO de la souche LB400 (Kimura *et al.*, 1997 ; Mondello *et al.*, 1997).

1.3.3.2 Acquisition d'activité d'hydroxylation en position 3,4 par des hybrides

Suenaga et ses collaborateurs ont construit un hybride, KF707-D34, ayant acquis une activité d'hydroxylation en position 3,4 par recombinaison *in vivo* entre les souches KF707 et LB400. L'hybride de KF707, obtenu lors de ces recherches, conservait l'activité catabolique en position 2,3 sur le 4,4'-CB. Celui-ci avait, également, acquis une capacité de dégradation en position 3,4 envers le 2,2',5,5'-CB, un congénère métabolisé uniquement par la BPDO de la souche LB400. L'analyse séquentielle de BphA1 de cet hybride démontra l'importance du résidu asparagine de la BPDO de LB400 pour permettre l'activité catalytique en position 3,4.

1.3.3.3 Recombinaison entre des fragments de *bphA* de LB400 et B-356

À la lumière des résultats tirés de l'analyse de la structure tridimentionnelle de la composante oxygénase du naphtalène, Barriault et ses collaborateurs ont effectué des recombinaisons dans la région C-terminale de la sous-unité α de l'oxygénase entre les souches LB400 et B-356. Les hybrides ont été obtenus par l'utilisation de sites communs de restriction aux gènes *bphA* des deux souches soient *MluI*, *ScaI* et *AvrII* afin de permettre des échanges de fragments d'ADN entre ces gènes (Figure 1.9) (Barriault *et al.*, soumis). Les multiples fragments générés par cette étude étaient situés loin du centre Rieske qui ne doit pas être altéré pour permettre la conservation de l'activité métabolique des hybrides.

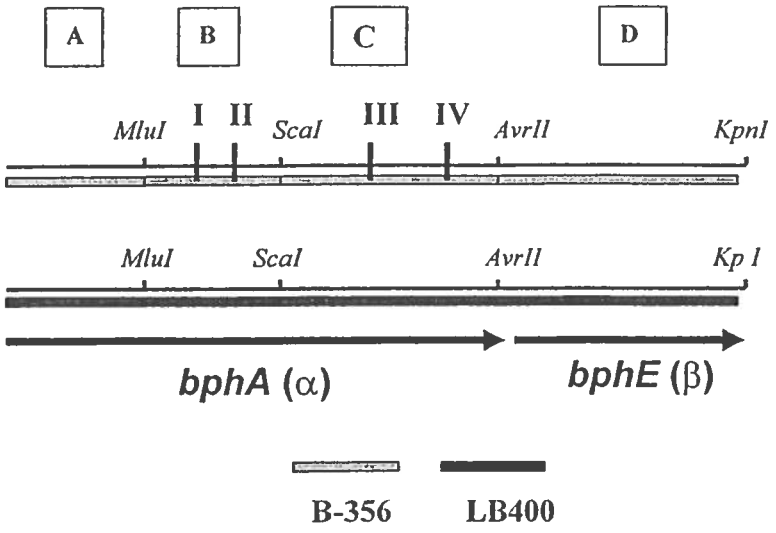


Figure 1.9 : Présentation des gènes *bphA* et *bphE* ainsi que les sites communs de restriction entre les deux souches LB400 et B-356 qui ont permis de générer les fragments A, B, C et D qui sont représentés par des encadrés. Les régions (I-IV), identifiées par Mondello et ses collaborateurs, sont également situés sur la séquence (Mondello *et al.*, 1997).

Mentionnons que tous les hybrides, obtenus par les échanges des fragments B, C ou B+C de *bphA* de LB400 par les fragments correspondants de *bphA* de B-356, étaient actifs (Figure 1.10). Les hybrides LAD et LABD démontrèrent une diminution de l'activité catabolique envers le 2,2',5,5'-CB confirmant le rôle joué par les régions III et IV telles qu'identifiées par Mondello et ses collaborateurs (Mondello *et al.*, 1997). Mentionnons aussi que les hydrides générés par l'échange des fragments B, C ou B+C dans *bphA* de B-356 par ceux de LB400 étaient peu actifs. Les études leur permirent de conclure que la dioxygénase du biphényle de la souche LB400 peut subir d'importante modifications dans la région C-terminale tout en conservant son activité catabolique ce qui pourrait, possiblement, expliquer l'intéressant potentiel de dégradation de cette souche (Barriault *et al.*, soumis).

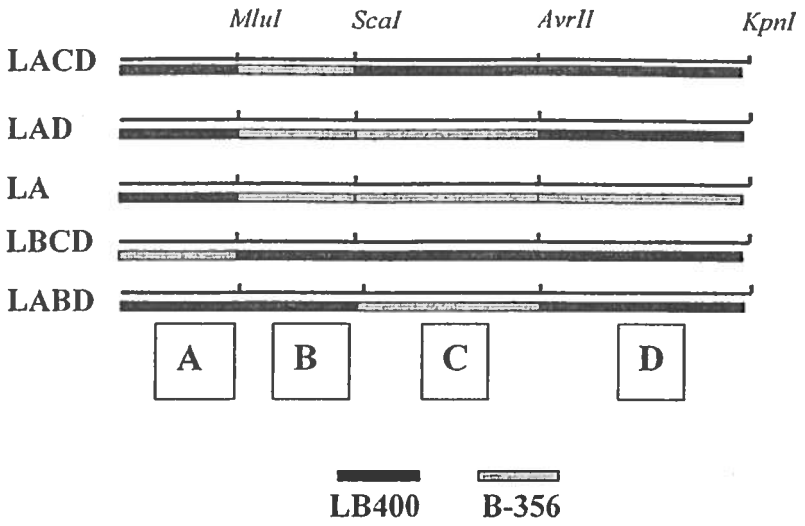


Figure 1.10 : Présentation des BPDO hybrides LB400/B-356 ayant conservé l'activité de la dioxygénase ainsi que des fragments respectifs échangés entre les deux souches. Les différents fragments générés (A-D) lors de l'étude sont représentés par des encadrés.

1.3.4 Rôle de la sous-unité β

Les observations présentées dans la section précédente suggèrent donc que de légères modifications dans la composition en acides aminées situées dans la région C-terminale de la sous-unité α de l'oxygénase seraient impliquées au niveau de la spécificité de la dioxygénase du biphényle. Néanmoins, des recherches ont permis la construction d'hybrides de dioxygénase du biphényle par des changements de sous-unités α et β entre des oxygénases de souches bactériennes différentes et l'implication de la sous-unité β de l'oxygénase terminale au niveau de la réactivité de l'enzyme envers des congénères BPC fut rapportée (Chebrou *et al.*, 1999 ; Hurtubise *et al.*, 1998). Notons qu'entre KF707 et LB400, la sous-unité β ne diffère que par un seul acide aminé et il est donc impossible de déterminer l'implication de cette sous-unité au niveau de la spécificité de la BPDO de ces souches (Taira *et al.*, 1992). Cependant, il y a environ 75% d'homologie entre les sous-unités β des BPDO des souches LB400 et B-356. Les résultats employant des

préparations d'enzymes purifiées d'hybrides, qui ont été construites par l'échange des sous-unités α et β des BPDO de LB400 et B-356, démontrèrent que la sous-unité β influence l'activité de *cis*-hydroxylation de la dioxygénase envers des biphényles polychlorés. En effet, l'hybride $\alpha_{LB400}\beta_{B-356}$ démontra un patron d'activité métabolique caractéristique des deux souches où celui-ci pouvait dégrader, à la fois, le 2,2'-CB ainsi que le 3,3'-CB, mais possédait, également, une activité d'hydroxylation en position 3,4 envers le 2,2',5,5'-CB plus faible que le chimère $\alpha_{B-356}\beta_{LB400}$ (Hurtubise *et al.*, 1998).

Chebrou et ses collaborateurs ont rapporté des observations similaires par la constructions d'hybrides entre la dioxygénase du biphényle de la souche Gram-positive, *Rhodococcus globerulus* P6 et les souches Gram-négatives, LB400 ou B-356. L'analyse de la spécificité des chimères BPDO purifiées envers des chlorobiphényles a indiqué que cette capacité catalytique de l'enzyme à effectuer la biodégradation de congénères chlorés est déterminée non pas par l'une ou l'autre des sous-unités, mais, dépend plutôt de la structure entière de l'oxygénase imposée par cette association tridimentionnelle des sous-unités α et β (Chebrou *et al.*, 1999). Mentionnons que cette même observation fut, précédemment, relevée par une autre équipe de recherche lors de leurs études impliquant des hybrides conçus à partir des dioxygénases du biphényle et du toluène (Hirose *et al.*, 1994) .

Des études présentées par diverses équipes de recherche ont proposé que certains résidus, situés dans la région III de la sous-unité α, pouvaient interférer au cours de l'interaction entre l'oxygénase et son substrat (Mondello *et al.*, 1997 ; Kimura *et al.*, 1997). Cependant, ces mêmes acides aminés qui sont impliqués au niveau de la spécificité des souches LB400 et KF707, ne semblèrent pas affecter la réactivité des hybrides conçus lors des travaux effectués par Hurtubise et de ses collaborateurs (Hurtubise *et al.*, 1998). Le concept ainsi élaboré par Chebrou et ses collaborateurs proposa que, selon la structure tridimentionnelle de la composante oxygénase, les acides aminés impliqués au niveau de la sélectivité de l'enzyme envers des congénères pour un type d'arrangement comme, par exemple, $\alpha_{LB400}\beta_{LB400}$, n'affectent pas inévitablement la sélectivité d'un autre

arrangement comme le chimère $\alpha_{B\text{-}356}\beta_{LB400}$ (Chebrou *et al.*, 1999 ; Hurtubise *et al.*, 1998).

1.3.5 Structure tridimentionnelle de la dioxygénase du naphtalène

La structure tridimentionnelle de l'oxygénase terminale de la naphtalène 1,2-dioxygénase (NDO) a permis de mettre en évidence l'implication majeure de la sous-unité α au niveau de l'activité catalytique (Kauppi *et al.*, 1998). Kauppi et ses collaborateurs notèrent aussi que plusieurs acides aminés situés au niveau du site actif de la NDO sont hydrophobes d'où proviendrait cette préférence de l'enzyme envers des hydrocarbures aromatiques. La naphtalène 1,2-dioxygénase, tout comme la biphényle 2,3-dioxygénase, fait partie de la famille des oxygénases où la sous-unité α contient, à la fois, un centre Rieske [2Fe-2S] ainsi qu'un fer mononucléaire (Figure 1.11) (Butler *et al.*, 1997). La NDO s'avère, également, en mesure de catalyser la *cis*-hydroxylation de certains congénères BPC et présente une homologie de séquence et de structure très élevée avec la dioxygénase du biphényle (Barriault *et al.*, 1998 ; Parales *et al.*, 2000a). De plus, les régions III et IV identifiées par Mondello et ses collaborateurs comme étant impliquées au niveau de la spécificité de BPDO, correspondent à certains résidus localisés près du site actif de l'oxygénase du naphtalène (Mondello *et al.*, 1997 ; Parales *et al.*, 2000a). Mentionnons que le centre Rieske [2Fe-2S] de l'oxygénase est organisé avec deux paires de résidus cystéine-histidine aux positions 100, 102, 120 et 123 localisées dans la région conservée de la sous-unité α entre les acides aminés 5 et 236 (Erickson et Mondello, 1992). Finalement, Kauppi et ses collaborateurs ainsi que Parales et ses collaborateurs ont identifié des acides aminés du domaine catalytique de l'oxygénase qui coordonneraient les actions du centre fer-soufre et du fer mononucléaire au niveau du transfert des électrons (Kauppi *et al.*, 1998 ; Parales *et al.*, 2000a).

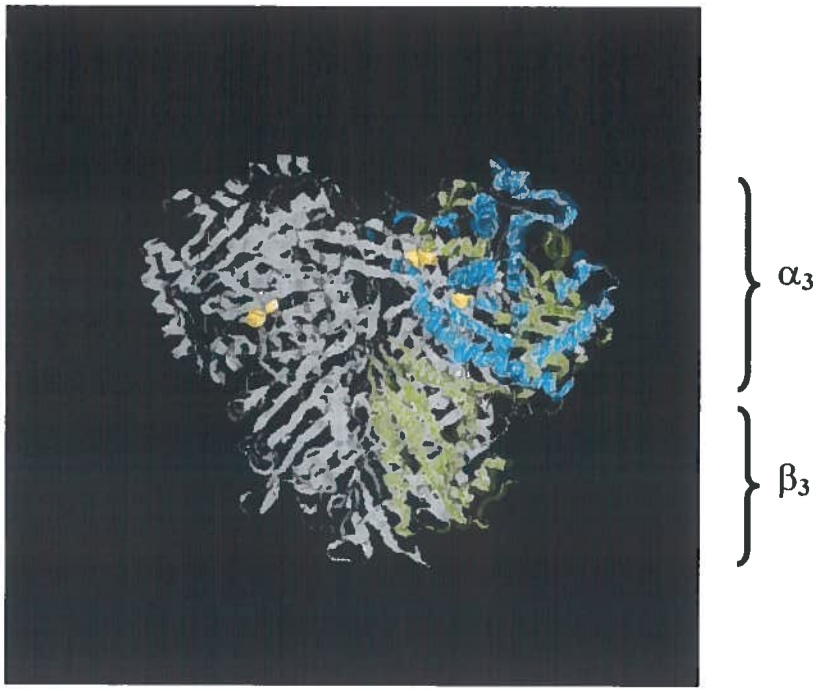


Figure 1.11 : Structure tridimentionnelle de la composante oxygénase de la dioxygénase du naphtalène. Cette structure, de type $\alpha_3\beta_3$, se présente sous la forme d'un champignon où trois sous-unités α constituent la tête et trois sous-unités β constituent le pied. L'une des sous-unités α et β est présentée en vert et la portion C-terminale de la sous-unité α est présentée en bleu.

D'autres résultats, présentés par Parales et ses collaborateurs, ont démontré que la plupart des modifications, effectuées par mutagénèse dirigée au niveau de la sous-unité α de l'oxygénase du naphtalène, sauf celles qui modifient l'acide aspartique 205 et 362 qui affecteraient la liaison de la molécule de biphényle au fer mononucléaire (Asp362) et le transfert des électrons (Asp205), sont tolérées suggérant une flexibilité de l'enzyme face à l'introduction de mutations près du site actif (Parales *et al.*, 2000a). Finalement, en modifiant l'acide aminé en position 352, des NDO mutées ont transformé principalement le biphényle en biphényle 3,4-dihydrodiol comparativement à l'enzyme parentale. Ces

résultats démontrent qu'il est possible de modifier significativement l'activité d'hydroxylation de l'enzyme (Parales *et al.*, 2000b).

1.3.6 Caractérisation d'hybrides obtenus par «évolution moléculaire *in vitro*»

1.3.6.1 Introduction

Le procédé d'évolution moléculaire *in vitro* «directed evolution» se fonde sur la recombinaison aléatoire *in vitro* (DNA shuffling) qui est une méthode de recombinaison homologue *in vitro*. Ce procédé permet d'optimiser rapidement la fonction d'un gène en utilisant des séquences géniques préalablement sélectionnées. La recombinaison aléatoire *in vitro* procède par une fragmentation aléatoire des gènes suivi de deux étapes de réassemblage par PCR (Polymerase chain reaction) (Figure 1.12) (Stemmer, 1994). De nombreuses applications de l'ingénierie des protéines peuvent être tirées de la littérature. Mentionnons, notamment, que la première démonstration de l'utilisation de la recombinaison aléatoire *in vitro* fut pour accroître la résistance de la β-lactamase à la cefotaxime (Stemmer, 1994). Cette méthode fut, également, employée pour générer des enzymes thermostables ainsi que pour modifier la spécificité d'enzymes (May *et al.*, 2000 ; Ness *et al.*, 1999 ; Song et Rhee, 2000 ; Zhang *et al.*, 1997 ; Zhao et Arnold, 1999).

Certains travaux employèrent des séquences géniques tirées de souches fortement apparentées (Crameri *et al.*, 1996 ; Crameri *et al.*, 1997 ; Zhang *et al.*, 1997). Cependant, Crameri et ses collaborateurs proposèrent d'effectuer des essais sur des gènes ayant un degré d'homologie plus faibles entre eux afin d'accroître l'éventail de structures au cours du processus d'évolution *in vitro*. Ils ont conclu que la diversité structurelle des modifications générées lors du processus d'évolution *in vitro* est plus faible lorsque l'homologie des gènes choisis entre des organismes parentaux est plus élevée. Cette diversité s'accroît, toutefois, en présence de gènes où l'homologie est réduite (Crameri *et al.*, 1998).

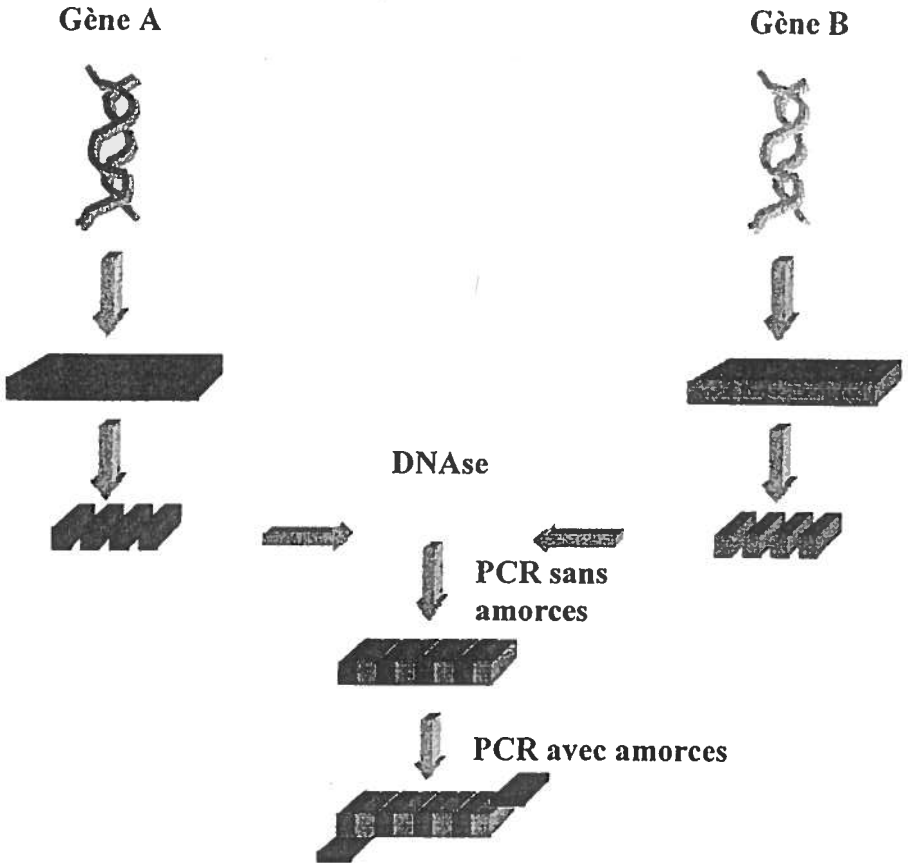


Figure 1.12 : Schéma du procédé de recombinaison aléatoire *in vitro* tel qu'élaboré par Stemmer (Stemmer, 1994).

Toutefois, des recherches démontrèrent que plus les gènes parentaux s'avéraient distants, plus les «crossing-over» s'effectuaient exclusivement dans les régions de forte homologie restreignant ainsi l'exploitation des combinaisons génétiques possibles (Ostermeier *et al.*, 1999). Kikuchi et ses collaborateurs proposèrent une stratégie visant à forcer les recombinaisons dans des régions où l'homologie entre les séquences est plus faible par l'utilisation des sites de restriction plutôt que de la DNAse pour l'étape de la fragmentation aléatoires des gènes. Notons que les événements de recombinaison sont, cependant, limités quant au nombre ainsi qu'à la position des sites de restriction (Kikuchi *et al.*, 1999).

1.3.6.2 Travaux de DNA shuffling sur la dioxygénase du biphényle

Le procédé de recombinaison aléatoire *in vitro* fut utilisé afin de produire des hybrides entre les gènes *bphA* de LB400 et *bphA*1 de KF707. Certaines des enzymes hybrides obtenues démontrèrent un potentiel accru d'activité envers des congénères BPC sélectionnés comparativement aux enzymes parentales (Brühlmann et Chen, 1999 ; Kumamaru *et al.*, 1998). En effet, des hybrides présentèrent des capacités de dégradation supérieures envers des BPC tétra- et pentachlorés ainsi qu'une reconnaissance de congénères substitués aux positions *ortho* et *para* (Brühlmann et Chen, 1999). Il s'avéra que toutes les chimères ayant une capacité de dégradation accrue étaient des recombinants ayant surtout des «crossing-over» dans la région III (Kimura *et al.*, 1997). Ces variants ont présenté, effectivement, des substitutions communes aux acides aminés Thr335Ala et Phe336Ile dans cette région (Brühlmann et Chen, 1999). De plus, certains résidus, comme Ser325 et Val326, qui sont situés à l'extérieur des régions III et IV auraient un rôle dans la détermination de la spécificité de l'enzyme. Finalement, les acides aminés Thr338 et Thr341 auraient une influence négative sur l'activité métabolique de la dioxygénase. Ces travaux démontrent que des modifications à l'extérieur des régions critiques III et IV, combinées avec des substitutions dans ces deux régions, affectent l'activité catabolique de BPDO (Brühlmann et Chen, 1999). Cet argument est supporté par Sylvestre et ses collaborateurs qui, suite à la comparaison des gènes *bphA* entre les souches KF707 et de B-356, ont constaté une homologie très élevée entre leurs régions III et IV respectives sans, toutefois, que ces deux souches présentent la même activité préférentielle envers des congénères BPC (Figure1.13) (Sylvestre *et al.*, 1996).

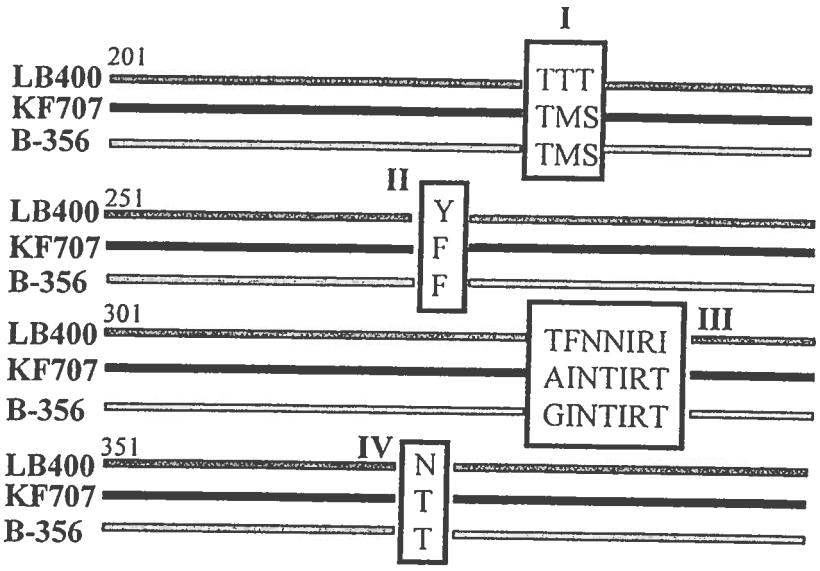


Figure 1.13 : Comparaison des régions (I-IV) situées en C-terminale de la sous-unité α de la dioxygénase entre les souches LB400, KF707 et B-356.

Kumamaru et ses collaborateurs utilisèrent le procédé de DNA shuffling entre les gènes *bphA* de KF707 et de LB400. Les colonies, exprimant une variété de dioxygénases du biphényle, présentèrent diverses capacités de dégradation envers des chlorobiphényles (Kumamaru *et al.*, 1998). Certaines de ces BPDO hybrides avaient acquis des caractéristiques phénotypiques provenant des deux parents soient une activité catabolique, à la fois, envers le 2,2'-CB, le 4,4'-CB et le 2,2',5,5'-CB. De plus, ils ont constaté, tout comme Brühlmann et Chen, qu'en modifiant des résidus de la région C-terminale de la sous-unité α de KF707 par celle de LB400 a comme conséquence de créer une enzyme exhibant des capacités de dégradation similaires à celles de l'enzyme LB400 originale. Leurs travaux ont confirmé l'influence de la substitution du résidu Thr376 pour l'asparagine de LB400 sur le mode d'hydroxylation de la molécule de biphényle en position 3,4. Ce résidu, correspondant à la région IV de *bphA*, est situé, d'après la structure tridimentionnelle de la naphtalène 1,2-dioxygénase, près du fer mononucléaire (Kauppi *et al.*, 1998).

Finalement, mentionnons, qu'à la suite de ces différentes investigations, les divers hybrides produits entre les BPDO des souches KF707 et LB400 ne furent, toutefois, pas en mesure de dégrader des chlorobiphényles persistants qu'aucune souche ne peut métaboliser jusqu'à présent. Par conséquent, l'extension des capacités catalytiques de la dioxygénase du biphényle envers des congénères plus récalcitrants à la biodégradation requerrait des modifications structurelles de plus grande importance au niveau de l'enzyme.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Souches bactériennes et plasmides

Les principales souches bactériennes utilisées lors de cette étude furent *Escherichia coli* DHIIS (Lin *et al.*, 1992), *E. coli* M15 [pREP4] et *E. coli* SG13009 [pREP4] (QIAGEN Inc., Chatsworth, Californie). Celles-ci servirent d'hôte pour le maintien et la réplication des plasmides employés au cours des diverses manipulations (Hurtubise *et al.*, 1996). Les gènes présents sur ces plasmides proviennent des souches *Comamonas testosteroni* B-356 (Ahmad *et al.*, 1990) et *Pseudomonas* sp. LB400 [En référence également à la souche *Burkholderia* sp. LB400, *Burkholderia* cepacia LB400 ou *Pseudomonas cepacia* LB400] (Bopp, 1986; Fain et Haddock, 2001) qui possèdent, sur leur chromosome, les gènes *bphAEFGBCD* codant pour les enzymes de la voie catabolique des biphényles/chlorobiphényles en benzoates/chlorobenzoates (Furukawa, 1982).

Les plasmides pDB31, pQE31 et pQE51 furent employés au cours de cette étude. Les caractéristiques génétiques de ces plasmides sont énumérées dans le tableau 2.1.

Les plasmides pDB31 [LB400-*bphAE*] et pDB31 [B-356-*bphAE*] de 5,5 kb (Barriault *et al.*, soumis) furent obtenus en liguant le fragment *Bam*HI/*Kpn*I de 3,5 kb du vecteur pDB31 au fragment *Bam*HI/*Kpn*I de 2,0 kb provenant de pQE31 [LB400-*bphAE*] ou de pQE31 [B-356-*bphAE*] qui ont été décrit précédemment (Hurtubise *et al.*, 1998) et qui comportaient les gènes *bphAE* de LB400 ou de B-356. Les plasmides pDB31 [LB400-*bphAE Avr*II+] et pDB31 [B-356-*bphAE Avr*II+] ont été obtenus en introduisant une mutation en position 1354 du gène *bphA* de la souche LB400 et en position 1348 correspondante du gène *bphA* de la souche B-356 pour ajouter un site *Avr*II dans cette position (Barriault *et al.*, soumis).

Tableau 2.1 : Caractéristiques génétiques des vecteurs plasmidiques utilisés pour le projet.

Vecteurs	Caractéristiques	Références
pDB31	Vecteur d'expression de 3,5 kb, Kan^R, Promoteur phage T5, Origine de Réplication p15A, Opérateur Lac, Étiquette histidine (6Xhis), Cassette de clonage	Barriault et Sylvestre, 1999b
pQE31	Vecteur d'expression de 3,4 kb, Amp^R, Promoteur phage T5, Origine de Réplication ColE1, Opérateur Lac, Étiquette histidine (6Xhis), Cassette de clonage	QIAGEN Inc.
pQE51	Vecteur de 3,4 kb, Amp^R, Promoteur phage T5, Origine de réplication ColE1, Opérateur Lac, Cassette de clonage	QIAGEN Inc.

Les plasmides pDB31 [LB400-*bphA*] et pDB31 [B-356-*bphA*] de 4,9 kb (Barriault *et al.*, soumis) furent obtenus en liguant le fragment *Bam*HI/*Kpn*I de 1,4 kb provenant de pQE31 [LB400-*bphA*] ou de pQE31 [B-356-*bphA*] qui ont été décrit précédemment (Hurtubise *et al.* 1998) et qui comportaient le gène *bphA* de LB400 ou *bphA* de B-356. Les plasmides pDB31 [LB400-*bphA Avr*II+] et pDB31 [B-356-*bphA Avr*II+] ont été obtenus en introduisant une mutation en position 1354 du gène *bphA* de la souche LB400 et en position 1348 correspondante du gène *bphA* de la souche B-356 pour ajouter un site *Avr*II dans cette position (Barriault *et al.*, soumis). La mutagénèse fut réalisée à l'aide du

protocole *U.S.E. Mutagenesis kit* de la compagnie Amersham Pharmacia biotech Inc. selon la méthode décrite par Wang et Sul (Wang et Sul, 1997).

Le plasmide pQE51 [LB400-*bphFGBC*] de 6,5 kb (Chebrou *et al.*, 1999) fut obtenu en liguant le fragment *SmaI/Nde*I de 2,2 kb provenant du vecteur pQE51 au fragment *Bbr*PI/*Nde*I de 4,3 kb comportant les gènes *bphFGBC* de LB400 provenant du plasmide pAH7 (fourni par V. De Lorenzo, Centro Nacional de Biotecnologia, CSIC, Madrid, Espagne).

2.2 Milieux et conditions de culture et produits chimiques

Les milieux de culture principalement employés furent le Luria-Bertani (LB) et le milieu M9 sous forme de bouillon ou solidifiés avec 1,5% d'agar (Sambrook *et al.*, 1989). Le milieu M9 fut supplémenté par 15 µM de thiamine comme source de vitamine telle que recommandée par la compagnie Stratagene. Les cultures des souches de *E. coli* furent effectuées en aérobiose à 37°C et incubées pendant 18 heures. Les antibiotiques, ampicilline 100 µg/ml et kanamycine 25 µg/ml, furent ajoutés au milieu de culture selon le (s) plasmide (s) présent (s) dans la souche bactérienne.

Les produits chimiques utilisés dans ce travail étaient de la plus haute qualité disponible sur le marché. Le biphényle provenait de la compagnie Aldrich Chemicals (Milwakee, Wisconsin), le 4-CB provenait de chez PFALTZ & BAUER, Inc. (Waterbury, Connecticut). Tous les autres congénères BPC ainsi que le mélange commercial Aroclor 1242 provenaient de la compagnie ULTRA scientific (North Kingstown, Rhode Island). L'isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) provenait de la compagnie Roche (Laval, Québec). Le 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle a été produit par synthèse enzymatique tel que décrit précédemment (Barriault *et al.*, 1998).

2.3 Protocoles généraux de biologie moléculaire

2.3.1 Préparation d'ADN plasmidique

L'extraction d'ADN plasmidique des souches de *E. coli* fut réalisée selon les méthodes suggérées par Amersham Pharmacia biotech Inc. à l'aide de la trousse FlexiPrep Kit™. Quant à l'ADN plasmidique destiné au séquençage, celui-ci fut purifié d'après le protocole de QIAfilter™ Plasmid Kit (QIAGEN Inc., Chatsworth, Californie).

2.3.2 Réactions d'endonucléases de restriction

Les diverses réactions d'endonucléases de restriction furent réalisées selon les procédures suggérées par New England BioLabs®Inc., Amersham Pharmacia biotech Inc. et Boehringer Mannheim selon le fournisseur de l'enzyme de restriction utilisée.

2.3.3 Procédure d'élution sur gel d'ADN plasmidique digéré

Les fragments d'ADN digérés furent déposés sur des gels d'agarose 0,7% (fragments de 1000 à 6000 pb) et 2,0% (fragments de 50 à 500 pb). Les fragments d'ADN furent, ensuite, séparés par électrophorèse à un voltage de 100V, puis colorés au bromure d'éthidium. L'élution de l'ADN plasmidique du gel d'agarose fut effectuée à l'aide de la trousse QIAEX® II Gel Extraction System selon la procédure recommandée par QIAGEN Inc.

2.3.4 Réaction de remplissage d'extrémités franches par l'ADN polymérase I (Klenow)

Les réactions de remplissage d'extrémités franches par l'ADN polymérase 1 (Klenow) (Amersham Pharmacia biotech Inc.) furent réalisées à une température de 37°C pendant 30 minutes. Les réactions de 25 µl contenaient 50 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM de $MgCl_2$, 1mM de dithiotréitol (DTT), 50 µg/ml de sérum d'albumine bovine

(BSA), 20 µM des 4 dNTP, 1 µg d'ADN plasmidique et 1 U de Klenow. Suite à l'incubation, les réactions furent arrêtées en chauffant 10 minutes à 75°C.

2.3.5 Ligation vecteur-insert

L'étape de ligation vecteur-insert fut effectuée en présence de l'enzyme T4 DNA Ligase (GIBCO BRL Products) à 14°C pendant 18 heures. Les réactions de 20 µl contenaient le tampon de ligation à une concentration de 1X (GIBCO BRL Products), le vecteur et l'insert dans une proportion moléculaire de 3 : 1 et 1 U de T4 DNA Ligase.

2.3.6 Production et transformation des cellules *E. coli* compétentes

Les étapes de production et de transformation des cellules *E. coli* compétentes furent appliquées en respectant les procédures tirées du guide QIA*expressionist* recommandées par QIAGEN Inc.

2.3.7 Purification des produits de PCR

La purification des produits de PCR fut effectuée selon le protocole High Pure™ recommandé par la compagnie Boehringer mannheim. Cette procédure était suivie d'une précipitation à l'éthanol 100% pendant 18 heures à -20°C.

2.3.8 Conception des oligonucléotides et séquençage d'ADN des hybrides

Les oligonucléotides utilisés pour cette étude furent synthétisés au laboratoire du Dr. François Shareck au Centre de Microbiologie et Biotechnologie de l'Institut National de Recherche Scientifique (INRS)-Institut Armand-Frappier (Laval, Québec). Les oligonucléotides suivants ont été utilisés dans l'étude :

I	*Mlu*I-101	5' ACGGCTGGGCCTACGACATC 3'
II	*Mlu*I (L471-490)	5' ATGGGGCCCGCTCCAGGCAC 3'
III	*Sca*I-193	5' GACATGTACCACGCCGGCAC 3'

IV	*Avr*II inv.	5' TTGAGCGTGGCCCACCTA 3'
V	L1520-1500	5' AATGCGGGGATGGATTTGTC 3'
VI	*Pst*I/pDB31	5' CGTTGTTGCCATTGCTGCAGG 3'

Le séquençage des hybrides obtenus suite au procédé de recombinaison aléatoire *in vitro* fut réalisé par le service de séquençage de l'INRS-Institut Armand-Frappier (Laval, Québec) en utilisant les amorces suivantes : Oligonucléotide **I** pour séquencer 101 paires de base (pb) en amont du site *Mlu*I de *bphA* ; oligonucléotide **II** pour séquencer à partir du site *Mlu*I du gène *bphA* de LB400 ; oligonucléotide **III** pour séquencer 193 pb en amont du site *Sca*I de *bphA* ; oligonucléotide **IV** pour séquencer à partir du site *Avr*II de *bphA* en direction inverse; oligonucléotide **V** pour séquencer 166 pb en aval du site *Avr*II de *bphA* en direction inverse sur le fragment portant *bphAE* de LB400.

2.4 Construction du plasmide pQE51 [LB400-*bphFGB*]

Au cours de cette étude, nous avons construit un plasmide de 5,1 kb pouvant exprimer les protéines correspondantes aux gènes *bphFGB* de la voie catabolique du biphényle de la souche LB400. Le plasmide fut construit en digérant pQE51 [LB400-*bphFGBC*] (Chebrou *et al.*, 1999), qui comprend les gènes *bphFGBC* de LB400 sur un fragment *Bbr*PI/*Nde*I, avec les enzymes de restriction *Cla*I et *Nde*I afin de libérer un fragment de 1,3 kb comportant le gène *bphC*. Suite à la création d'extrémités franches par la Klenow, le plasmide fut ligué permettant l'obtention du plasmide pQE51 [LB400-*bphFGB*] (Figure 2.1). La sélection des colonies de *E. coli* DHIIS transformées par le plasmide pQE51 [LB400-*bphFGB*], s'effectua sur le milieu LB solide contenant de l'ampicilline 100 µg/ml.

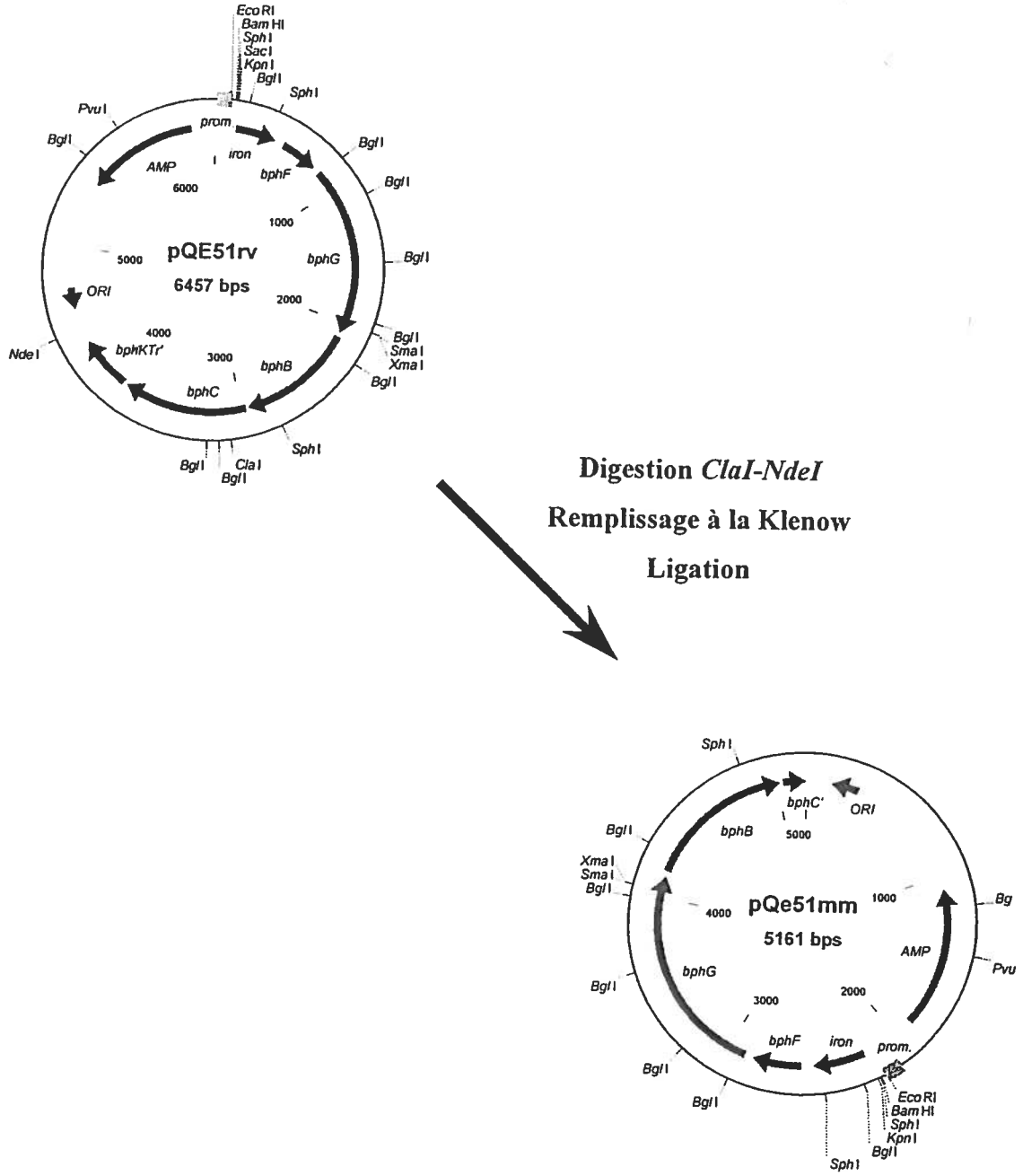


Figure 2.1 : Construction du plasmide pQE51 [LB400-*bphFGB*] à partir du plasmide pQE51 [LB400-*bphFGBC*]. Le plasmide pQE51 [LB400-*bphFGBC*] fut digéré avec *Cla*I et *Nde*I, puis recircularisé pour donner le plasmide pQE51 [LB400-*bphFGB*]. Prom. : Promoteur phage T5, ORI : Origine de réplication ColE1, AMP : Gène de résistance à l'ampicilline.

2.5 Protocoles et stratégies pour la recombinaison aléatoire *in vitro* (DNA shuffling)

Dans cette étude, nous avons utilisé la procédure de recombinaison aléatoire *in vitro* afin d'obtenir des BPDO hybrides résultant d'événements de recombinaison entre les gènes *bphA* de LB400 et de B-356. Pour augmenter les chances de recouvrer des variants actifs, nous avons appliqué la procédure de recombinaison *in vitro* sur la partie distale seulement du gène *bphA*. La stratégie utilisée pour leur obtention consistait à créer des hybrides par recombinaison *in vitro* entre un fragment *Mlu*I/*Avr*II de 865 pb du gène *bphA Avr*II+ de LB400 et un fragment plus court couvrant la partie distale du fragment *Mlu*I/*Avr*II correspondant de *bphA Avr*II+ de B-356 (Fig. 2.2). Les fragments *Mlu*I/*Avr*II hybrides obtenus ont servi à créer une banque d'hybrides, en les substituant au fragment *Mlu*I/*Avr*II de *bphA Avr*II+ de LB400 dans le plasmide pDB31 [LB400-*bphAE Avr*II+].

Les conditions de PCR sans amorce utilisées pour favoriser la recombinaison génétique favorisent aussi de mauvais appariements pendant la reconstitution des fragments d'ADN. De façon à réduire la fréquence des fragments résultant de recombinaisons incorrectes, il est préférable d'utiliser une approche modelée sur la technique dite de «nested-PCR» (PCR nichée) qui permet d'augmenter la spécificité du produit de PCR (Miyazaki et Arnold, soumis). Cette approche se pratique en utilisant deux couples d'amorces. Des amorces externes à la région qu'on veut soumettre au protocole de recombinaison *in vitro* servent à amplifier un fragment plus grand que la région d'intérêt. Des amorces dites internes limitant la région d'intérêt, servent à amplifier le produit de PCR résultant de l'étape d'amplification sans amorce. Pour cette raison, dans toutes nos stratégies de recombinaison *in vitro*, nous avons fait appel à un couple d'amorces externes et un couple d'amorces internes.

2.5.1 Première génération de recombinaison

Pour créer la banque de première génération d'hybrides, nous avons appliqué la procédure de recombinaison *in vitro* sur les deux fragments de *bphA* illustrés à la figure

2.2. Le fragment *Mlu*I/*Avr*II de 865 pb du gène *bphA Avr*II+ de LB400 fut amplifié à partir du plasmide pDB31 [LB400-*bphA Avr*II+] à l'aide des amorces externes I (qui limite l'extrémité 5' à 101 pb en amont du site *Mlu*I) et VI (qui situe l'extrémité 3' dans la cassette de clonage de pDB31 (+30 pb de la fin de *bphA*) pour créer le fragment I. Un fragment plus court (fragment II) de la partie distale du gène *bphA Avr*II+ de B-356 fut amplifié à partir du plasmide pDB31 [B-356-*bphA Avr*II+] à l'aide des deux oligonucléotides III et VI où l'oligonucléotide III limite l'extrémité 5' du fragment à 193 pb en amont de l'unique site *Sca*I situé sur le fragment *Mlu*I/*Avr*II (Figure 2.2). Les conditions de PCR pour amplifier ces fragments furent celles recommandées par Boehringer Mannheim selon le protocole de la taq® polymérase. Le programme d'amplification, répété sur 30 cycles, fut le suivant :

Dénaturation complète :	3 minutes, 95°C
Dénaturation :	1 minutes, 94°C
Hybridation :	1 minutes, 58°C
Élongation :	1 minutes 45 secondes, 72°C
Élongation finale :	10 minutes, 72°C

Les fragments I et II furent digérés avec 20 mU de DNAse I, afin de générer des fragments de l'ordre 50 pb à 250 pb pour l'étape subséquente de DNA shuffling. La digestion fut effectuée selon le protocole suggéré par Zhao et Arnold utilisant 5 µg d'ADN amplifié pour chaque fragment soit : le fragment I de LB400 et II de B-356 (Zhao et Arnold, 1997). Ces fragments digérés, furent purifiés par centrifugation afin de retirer la DNAse d'après les procédures de Micropure™-EZ (Amicon® Bioseparations, MILLIPORE), puis concentrés par centrifugation selon la méthode de MICROCON® YM-10 (Amicon®Bioseparations, MILLIPORE) à 2500 rpm, 110 minutes, afin de concentrer l'ADN amplifié et d'enlever le $MnCl_2$ du mélange réactionnel.

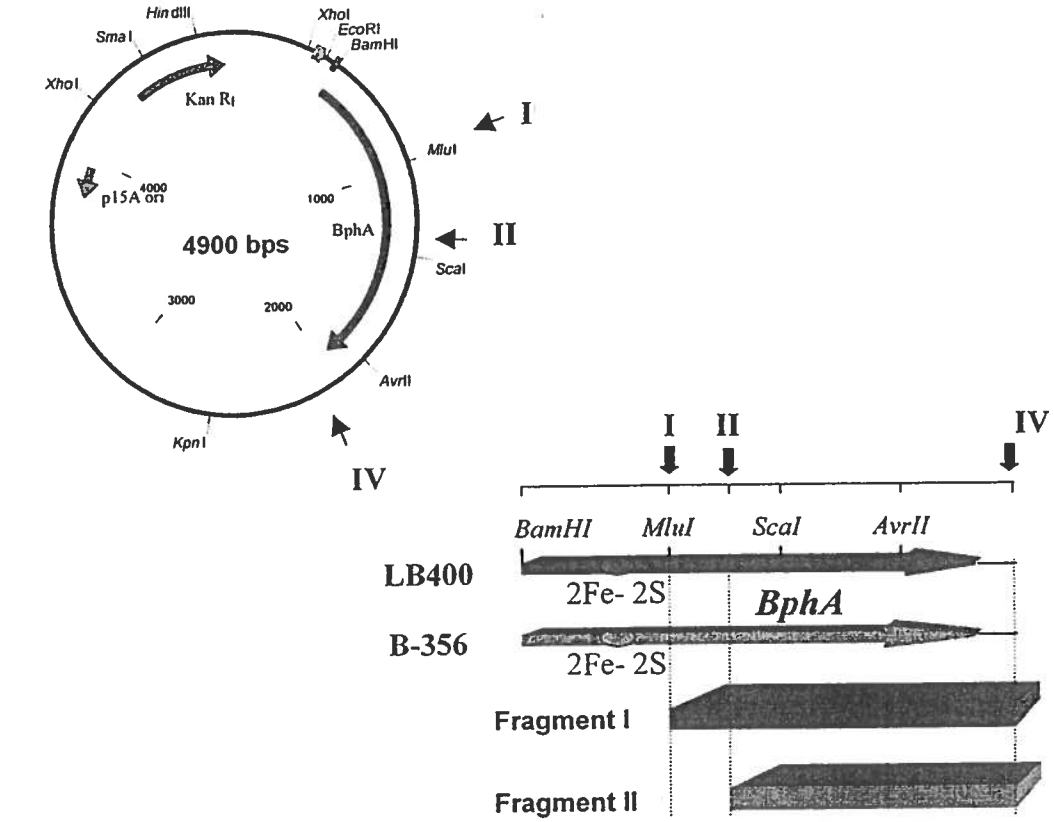


Figure 2.2 : Fragments employés pour générer les hybrides BPDO LB400/B-356 de première génération. Le gène *bphA AvrII+* de LB400 fut amplifié à l'aide des deux oligonucléotides I et IV afin de générer le fragment I. Le gène *bphA AvrII+* de B-356 fut amplifié à l'aide des deux oligonucléotides III et VI afin de générer le fragment II. Les chiffres I, III et IV représentant les oligonucléotides utilisés et leur positionnement sur la séquence de *bphA*.

Par la suite, 2 µg de chacun de ces fragments d'ADN digérés furent mélangés puis assemblés par PCR sans amorce employant la polymérase Expand®. Les conditions de

PCR furent celles recommandées par la compagnie Boehringer Mannheim, mais comportant les modifications suivantes pour un PCR de 60 cycles : dénaturation, 94°C pour 1 minute ; hybridation, 42°C pour 1 minute ; élongation, 72°C pour 2 minutes 30 secondes. Finalement, le produit de ce PCR sans amorce fut amplifié par PCR avec amorces employant les oligonucléotides I et VI. Les conditions de PCR avec amorces furent celles recommandées par Boehringer Mannheim pour la polymérase Expand®. Le programme d'amplification fut répété sur 30 cycles tel que défini précédemment.

Finalement, le fragment obtenu a été digéré par *Mlu*I et *Avr*II puis cloné par des extrémités compatibles dans pDB31 [LB400-*bphAE Avr*II+] préalablement digéré avec les mêmes enzymes de restriction pour créer une banque de plasmides portant les gènes *bphAE* hybrides. Ces plasmides sont désignés pDB31 [MA-X-*bphAE*] où X est le numéro de l'hybride.

2.5.2 Seconde génération de recombinaison

La banque d'hybride de deuxième génération de recombinaison *in vitro* a été créée en appliquant la procédure de recombinaison *in vitro* sur le fragment *Mlu*I/*Avr*II de six hybrides choisis de première génération. Pour chacun de ces six hybrides, MA-3-4-7-9-10-11-*bphAE*, un fragment de 1126 pb commençant à 101 pb en amont du site de restriction *Mlu*I et se terminant à 166 bp en aval du site *Avr*II fut amplifier avec les amorces externes I et V à partir des plasmides pDB31 [MA-X-*bphAE*] correspondant. Les conditions de PCR furent celles recommandées par Boehringer Mannheim selon le protocole de la Hot Star taq® polymérase. Le programme d'amplification répété sur 30 cycles comportait les modifications suivantes :

Dénaturation complète :	15 minutes, 95°C
Dénaturation :	1 minutes, 94°C
Hybridation :	1 minutes, 55°C
Élongation :	1 minutes 45 secondes, 72°C
Élongation finale :	10 minutes, 72°C

Les fragments obtenus ont été digérés avec la DNAse I selon le protocole de Zhao et Arnold (1997) qui est décrit à la section 2.5.1. Ces fragments digérés (50 à 250 pb) furent purifiés et concentrés selon les procédures décrites par QIAGEN Inc. à l'aide du protocole QIAEX II de concentration d'ADN en solution.

Par la suite, 2 µg d'un mélange de ces six fragments d'ADN digérés furent assemblés par PCR sans amorce employant la polymérase Expand®. Les conditions de PCR ainsi que le programme d'amplification répété sur 60 cycles furent les mêmes qu'employés lors de la production des hybrides de première génération (section 2.5.1). Le produit de ce PCR sans amorce fut amplifié par PCR avec des amorces internes employant les oligonucléotides I et IV pour amplifier le fragment *Mlu*I/*Avr*II de 865 pb. Les conditions de PCR avec amorces et le programme d'amplification répété sur 30 cycles furent également les mêmes qu'employés lors de la production des hybrides de première génération. Les fragments hybrides *Mlu*I/*Avr*II furent ligués avec le plasmide pDB31 [LB400-*bphAE Avr*II+] préalablement digéré avec *Mlu*I et *Avr*II. Les plasmides résultants pDB31 [MB-X-*bphAE*] constituaient la banque d'hybrides de deuxième génération de recombinaison aléatoire *in vitro*.

2.5.3 Troisième génération de recombinaison

Une partie de la banque d'hybrides de deuxième génération a servi à transformer des cellules de *E. coli* DH11S pour analyser leur performance, une autre partie de la banque a servi directement à créer des hybrides de troisième génération, selon la stratégie décrite ci-après.

Ainsi, le produit résultant de la ligation entre les fragments *Mlu*I/*Avr*II hybrides de la deuxième génération de recombinaison et le plasmide pDB31 [LB400-*bphAE Avr*II+] digéré avec *Mlu*I/*Avr*II a été amplifié avec les amorces externes I et V pour générer des fragments de 1126 pb commençant à 101 pb en amont du site *Mlu*I et se terminant à 166 pb en aval du site *Avr*II. Ces fragments furent digérés avec la DNAse I selon un protocole identique à celui utilisé pour les première et deuxième générations d'hybrides.

Les fragments de 50 à 250 pb furent ensuite assemblés par PCR sans amorce et avec les amorces internes II et IV selon des protocoles identiques à ceux décrits aux sections 2.5.1 et 2.5.2. Le produit résultant fut digéré avec les enzymes *Mlu*I et *Avr*II et les fragments digérés furent ligués au plasmide pDB31 [LB400-*bphAE Avr*II+] préalablement digéré avec *Mlu*I et *Avr*II. La banque de troisième génération pDB31 [MC-X-*bphAE*] servi à transformer des cellules de *E. coli* DH11S pour faire le criblage des clones d'intérêt.

2.5.4 Recombinaison aléatoire *in vitro* de fragments digérés par des enzymes de restriction

De façon à favoriser les échanges génétiques entre fragments homologues n'ayant pas un haut niveau d'identité, Kikuchi et ses collaborateurs ont proposé une approche consistant à digérer chacun des fragments homologues avec une série d'enzymes de restriction différentes au lieu de digérer les fragments avec la DNAse I (Kikuchi *et al.*, 1999). Afin d'augmenter l'éventail de possibilités d'événements de recombinaison entre les fragments *Mlu*I/*Avr*II des gènes *bphA* de LB400 et de B-356, nous avons appliqué cette approche en la combinant à la banque d'hybrides de deuxième génération. Ainsi, dans un premier temps, le produit résultant de la ligation entre les fragments *Mlu*I/*Avr*II hybrides de la deuxième génération de recombinaison et le plasmide pDB31 [LB400-*bphAE Avr*II+] digéré avec *Mlu*I/*Avr*II a été amplifié avec les amorces externes I et V pour générer des fragments de 1126 pb commençant à 101 pb en amont du site *Mlu*I et se terminant à 166 pb en aval du site *Avr*II de façon identique au protocole suivi à la section 2.5.3. Ces fragments furent digérés avec la DNAse I selon un protocole identique à celui utilisé à la section 2.5.3 pour obtenir des fragments de 50 à 250 pb, ce qui constituait le mélange A.

Dans une étude parallèle (Chatel *et al.*, en préparation), le fragment *Mlu*I/*Avr*II du gène *bphA* de LB400 avait été digéré avec les enzymes *Nae*I, *Sph*I et *Eco*NI et le fragment *Mlu*I/*Avr*II du gène *bphA* de B-356 avec les enzymes *Sca*I, *Eco*RV, *Eco*RI et *Pst*I. Les produits de ces digestions avaient été combinés puis, assemblés par PCR sans amorce selon un protocole décrit par Kikuchi et ses collaborateurs (Kikuchi *et al.*, 1999).

Nous avons récupéré une partie du produit de ce PCR pour le digérer avec la DNAseI selon un protocole identique à celui décrit précédemment pour obtenir des fragments de 50 à 250 pb. Le produit de cette digestion a été combiné avec le mélange A et soumis au protocole de PCR sans amorce décrit aux sections précédentes. Le produit de PCR obtenu (1.3 kb approximativement) fut amplifié avec les amorces internes II et IV pour reconstituer le fragment *Mlu*I/*Avr*II de 865 pb. Ce fragment fut digéré avec les enzymes *Mlu*I et *Avr*II puis, ligué au plasmide pDB31 [LB400-*bphAE-Avr*II$^+$] préalablement digéré avec les deux mêmes enzymes. Les hybrides résultants constituaient la banque de plasmides désignés pDB31 [MD-X-*bphAE*] qui servirent à transformer des cellules de *E. coli* DH11S pour faire le criblage des clones d'intérêt.

2.6 Méthode de criblage des hybrides sur milieu solide

Les banques plasmidiques d'hybrides pDB31 [MA-X-*bphAE*], pDB31 [MB-X-*bphAE*], pDB31 [MC-X-*bphAE*] et pDB31 [MD-X-*bphAE*] furent transformé dans la souche *E. coli* DHIIS compétente comprenant le plasmide pQE51 [LB400-*bphFGB*]. Les cellules transformées avec l'une ou l'autre de ces banques, furent inoculées sur une membrane de Nylon placée sur un milieu LB solide, contenant 100 µg/ml d'ampicilline et 25 µg/ml de kanamycine. Ces cultures furent incubées pendant 18 heures à 37°C.

Les membranes contenant les colonies étaient ensuite transférées sur un milieu identique contenant 0,5mM d'IPTG puis ces cultures étaient incubées pendant 2 heures à 37°C avant d'introduire des cristaux de 2,2'-dichlorobiphényle (2,2'-CB) dans le couvercle des boîtes de Pétri pour générer des vapeurs de 2,2'-CB par la sublimation. Les colonies étaient exposées aux vapeurs de 2,2'-CB à 37°C pendant une période de 72 heures. La sélection des colonies, plus actives sur le 2,2'-CB que les clones portant les gènes *bphAE* de la souche LB400 parentale, s'effectua par l'observation d'une coloration brunâtre des colonies qui révélait la production de catéchol généré par l'oxygénation du substrat.

Les hybrides actifs furent congelés à une température de -80°C dans une solution de glycérol à une concentration finale de 15%.

2.7 Procédure d'expression et de purification des enzymes de la voie catabolique du biphényle

Les enzymes de la voie catabolique du biphényle furent exprimées et purifiées chez *E. coli* DHIIS par chromatographie d'affinité utilisant une résine d'affinité de Nickel-Nitriloacétate (Ni-NTA) selon le protocole du système de purification *QIAexpress* recommandées par QIAGEN Inc. La composante oxygénase (ISP_{BPH}) a été produite à partir du plasmide pDB31 [*bphAE*]. Les constructions dans le plasmides pDB31 étaient telles qu'elles permettaient l'expression d'une oxygénase terminale ht-(ISP_{BPH}) portant la chaîne Histidine à l'extrémité N-terminale de la chaîne α. Les enzymes purifiées portant la chaîne Histidine, ht-B-356 FER_{BPH} et ht-B-356-RED_{BPH}, ht-B-356-BphB et ht-B-356-BphC furent exprimées dans les souches *E. coli* SG13009 et *E. coli* M15 respectivement, à partir des gènes *bphF*, *bphG*, *bphB* ou *bphC* insérés sur le plasmide pQE31, selon des protocoles publiés précédemment (Hurtubise *et al.* 1996; Hein *et al.*, 1998). Tous ces enzymes comportaient une étiquette histidine de 13 acides aminés (MRGSHHHHHHTPD) en position N-terminale (Chebrou *et al.*, 1999 ; Hurtubise *et al.*, 1995 ; Hurtubise *et al.*, 1996).

Le protocole utilisé pour la production et la purification des enzymes portant l'étiquette Histidine est celui décrit par Hurtubise et ses collaborateurs (Hurtubise *et al.*, 1995). Les cellules congelées servaient à inoculer un bouillon de LB contenant les antibiotiques appropriés pour les plasmides pDB31 et pQE31. La culture était incubée 18 heures à une température de 37°C avec agitation. Cette culture servit à inoculer 4 cultures de 800 ml de milieu LB dans des fioles Erlenmeyer de 2 L contenant les mêmes antibiotiques. La croissance de la culture s'effectua à 37°C avec agitation à 250 rpm jusqu'à l'obtention d'une densité optique de 0,8-0,9 à 600 nm. Après l'ajout de 0,5 mM

d'IPTG, la culture fut incubée 4 heures avec agitation, à température ambiante (pour les composantes oxygénase et ferrédoxine) ou à 37°C (pour la ferrédoxine-réductase).

Les cellules furent récoltées par centrifugation à 8000 rpm pendant 10 minutes et lavées avec une solution du tampon de sonification, constitué de piperazine-N,N'-bis [2-éthanesulfonate] (PIPES) 50 mM, pH 7,2, contenant 5% (p/v) d'éthanol, 10% (p/v) de glycérol et 300 mM de NaCl. Les cellules furent resuspendues dans 4 volumes du même tampon, puis sonifiées 7 fois 15 secondes à l'aide d'un homogénéisateur ultrasonique, modèle 4710 (Cole-Palmer Instrument Company) laissant une période de repos entre chaque sonification afin d'éviter la dénaturation thermique des enzymes. Le lysat cellulaire fut centrifugé à 18 000 rpm pendant 1 heure à une température de 4°C.

La résine Ni-NTA fut préalablement lavée avec un volume d'H_2O déionisée puis, équilibrée avec un volume du tampon de sonification. L'extrait cellulaire et la résine furent mélangés puis le mélange agité par agitation circulaire pendant 1 heure 30 à 4°C. La résine avec son produit lié fut versée dans une colonne vide puis elle fut lavée avec 15 ml de tampon de lavage [piperazine-N,N'-bis [2-éthanesulfonate] (PIPES) 50 mM, pH 6,4, contenant 5% (p/v) d'éthanol, 10% (p/v) de glycérol et 300 mM de NaCl] suivi de 15 ml du tampon de lavage contenant 40 mM d'imidazole (20 mM si l'enzyme à purifier était FER_{BPH}). Finalement, la protéine fut éluée à l'aide du tampon de lavage contenant 200 mM d'imidazole.

2.8 Méthode de production de lysats cellulaires exprimant la ISP_{BPH} de la dioxygénase du biphényle

Dans certaines expériences, l'activité de conversion du 2,2'-CB ou du 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphenyl en HOPDA correspondant par les ISP_{BPH} hybrides, fut évaluée à l'aide de lysats cellulaires plutôt que par des préparations d'enzymes purifiées. Dans ces cas, les protocoles d'expression et de lyse des cellules étaient identiques à ceux

décrits à la section 2.7, excepté que la composante ht-ISP_{BPH} n'était pas soumis à la purification par chromatographie d'affinité sur résine de Ni-NTA.

2.9 Caractérisation des protéines

Les gels SDS-PAGE furent développés d'après la méthode de Laemmli (Laemmli, 1970). La coloration des protéines s'effectua à l'aide du bleu brillant de Coomassie (Sambrook *et al.*, 1989) et les concentrations protéiques furent estimées selon la méthode développée par Lowry (Lowry *et al.*, 1951) employant le sérum d'albumine bovine à titre de standard. La concentration des enzymes purifiées ht-ISP_{BPH}, ht-B-356 FER_{BPH} et ht-B-356-RED_{BPH}, fut déterminée spectrophotométriquement utilisant les valeurs de coefficient d'absorption molaire suivantes qui ont été établies précédemment pour la BPDO de la souche B-356 (Hurtubise *et al.*, 1995): 8300 $M^{-1}cm^{-1}$ à 455 nm pour le composant ht-ISP_{BPH}, 7400 $M^{-1}cm^{-1}$ à 460 nm pour la ferrédoxine et 11 250 $M^{-1}cm^{-1}$ à 450 nm pour la ferrédoxine-réductase .

2.10 Protocole d'essais enzymatiques

2.10.1 Conversion des congénères BPC en dérivés hydroxylés

Les différents essais enzymatiques effectués au cours de cette étude pour évaluer la capacité des hybrides à hydroxyler les congénères BPC ainsi que leur mode d'hydroxylation furent réalisés principalement à une température de 37°C utilisant comme tampon, l'acide morpholine éthane sulfonique 50 mM (MES, pH 6,0). Le mélange réactionnel, dans un volume total de 400 µl, contenait 400 nmoles de NADH, 6µl de $FeSO_4$ 0,01% dilué dans le HCL 5 mM et 2 nmoles de chacune des composantes enzymatiques purifiées : ht-ISP_{BPH}, ht-B-356 FER_{BPH} et ht-B-356 RED_{BPH}. Les réactions furent initiées par l'addition des congénères BPC à une concentration de 100 nmoles solubilisés dans 4 µl d'acétone. Les différentes réactions furent incubées pour une

période de 10 minutes avant d'extraire les métabolites par le protocole décrit à la section 2.11.1.

2.10.2 Conversion des congénères BPC en HOPDA correspondant

La conversion des congénères BPC en HOPDA était évaluée dans des essais enzymatiques couplés contenant tous les composants de la dioxygénase du biphényle plus BphB et BphC. Les essais furent réalisés à une température de 37°C utilisant comme tampon, l'acide morpholine éthane sulfonique 50 mM (MES, pH 6,0). Le mélange réactionnel, dans un volume total de 200 µl, contenait 200 nmoles de NADH, 200 nmoles de NAD^+, 3 µl de $FeSO_4$ 0,01% et 1 nmole de chacune des composantes enzymatiques : ht-ISP_{BPH}, ht-B-356 FER_{BPH} et ht-B-356 RED_{BPH} ou 75 µl de lysats cellulaires selon les tests effectués. Les enzymes purifiées, ht-BphB et ht-BphC, furent ajoutées dans le mélange réactionnel à raison de 5 µl chacun. Finalement, les réactions furent initiées par l'addition des congénères BPC à une concentration de 50 nmoles solubilisés dans 2 µl d'acétone. L'activité fut évaluée spectrophotométriquement à 434 nm en mesurant le métabolite de *meta*-clivage (HOPDA) produit après 7 minutes d'incubation. Le témoin négatif utilisé pour ces essais consistait en ce même mélange réactionnel sans l'ajout des enzymes.

2.10.3 Essais en présence de la catalase et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Ces essais furent effectués selon les mêmes mélanges réactionnels et les mêmes conditions expérimentales que lors des essais couplés à BphB et BphC. Toutefois, la modification suivante fut apportée au niveau des réactifs ajoutés aux réactions enzymatiques soit l'ajout d'une concentration de 1000 U de catalase et d'une concentration totale de peroxyde d'hydrogène de 0,6 mM telles que suggérées par Lee (Lee, 1999). Le témoin négatif utilisé pour ces essais consistait en ce même mélange réactionnel sans l'ajout de la composante enzymatique ht-ISP_{BPH}. La concentration de peroxyde d'hydrogène fut déterminée par le coefficient d'extinction molaire, 43,6 M^{-1} cm^{-1} à 240 nm. La catalase provenait d'extraits de foie de bœuf.

2.11 Procédures d'extraction des métabolites et d'analyse par GC-MS

2.11.1 Méthode d'extraction des métabolites

Les métabolites résultant de la conversion catalytique du dihydrodiol du biphényle, du 2,2'-dichlorobiphényle, du 2,2',5,5'-tétrachlorobiphényle ou du 2,6-dichlorobiphényle par les BPDO hybrides purifiées furent extraits du milieu réactionnel avec trois volumes d'acétate d'éthyle. L'extrait fut déshydraté avec du sulfate d'ammonium puis, évaporé à sec par un jet d'azote. L'échantillon fut solubilisé dans 250 µl d'acétone puis couplé, à température de la pièce pendant 30 minutes, avec 5 µl d'acide *n*-butylboronique 25 mM. L'échantillon fut, à nouveau, évaporé à sec et solubilisé dans 100 µl d'hexane. Un volume de 1 µl d'échantillon contenant les métabolites fut injecté au GC-MS.

2.11.2 Analyse par GC-MS

La chromatographie en phase gazeuse (GC) fut effectuée à l'aide d'un chromatographe de modèle HP5890 (série II) (Hewlett Packard, Missisauga, Canada) équipé d'un injecteur automatique split/splitless HP7673. L'appareil était, également, équipé d'une colonne HP1MS (25 mètres x 0,2 millimètres) composée d'une matrice de phénylpolyméthylsiloxane 1% (0,33 µM d'épaisseur). L'Hélium ($1mL/min^{-1}$) fut employé comme gaz vecteur. L'échantillon fut injecté en mode splitless. La température initiale (60°C) fut maintenue 2 minutes, puis programmée à 10°C min^{-1} jusqu'à 310°C. Cette température fut maintenue durant 8 minutes. Les températures de l'injecteur, de l'interface et de la source d'ions furent maintenues à une température de 270°C. Un spectromètre de masse HP5970 (Hewlett Packard, Missisauga, Canada) fut relié au GC. Le spectromètre de masse (MS) fut opéré en mode d'ionisation d'électron (70 eV) avec une accélération du voltage de 4 kV. L'échelle de masse de 50-500 unités fut balayée de manière répétitive à une vitesse de 10 unités/seconde.

2.12 Évaluation de la dégradation de l'Aroclor 1242 ou d'un mélange synthétique de 18 congénères BPC par des recombinants exprimant les BPDO hybrides

2.12.1 Méthode de culture des recombinants et d'extraction des produits de la réaction

Un protocole a été établi afin d'évaluer la capacité d'hybrides de *E. coli* DH11S portant pQE51 [LB400-*bphFGB*] plus pDB31 [*bphAE Avr*II+] exprimant les BPDO hybrides, à dégrader les congénères BPC présents dans l'Aroclor 1242 ou dans un mélange synthétique de 18 congénères. Le tableau 2.2 décrit la composition du mélange synthétique de 18 congénères. La dégradation a été évaluée pour des cellules induites, non croissantes, en suspension dans un milieu liquide synthétique. Des cultures de 12 ml de milieu LB, comprenant les antibiotiques appropriés, furent inoculées avec de 350 µl d'une culture-nuit puis, elles furent incubées à 37°C jusqu'à l'obtention d'une densité optique (D.O.) à 600 nm de 0,7. À ce stade de croissance, les cultures furent induites en les incubant 3 heures en présence de 0,5 mM d'IPTG. Les cultures induites furent centrifugées 10 minutes à 7000 rpm et lavées avec 5 ml de milieu M9. Les cellules furent resuspendues dans un volume suffisant de milieu M9 comprenant 15 µM de thiamine, 100 µg/ml ampicilline et 25 µg/ml kanamycine, pour ajuster la D.O. à 600 nm à une valeur de 2,0. Cette suspension a été distribuée par volume de 2 ml dans des tubes de verre de 20 ml couverts par des bouchons vissés enduits, à l'intérieur, d'une couche de Teflon®. Le milieu réactionnel comprenait 0,5 mM d'IPTG plus 5 ppm d'Aroclor 1242 solubilisé dans l'acétone où 0,1 µM de chacun des congénères étaient présents dans le mélange de 18 BPC excepté pour le 3,3'-CB et le 4,4'-CB dont la concentration était de 0,05 µM. Les différents milieux réactionnels furent incubés à 37°C pendant 18 heures. Des milieux réactionnels inoculés avec *E. coli* DH11S portant pQE51[LB400-*bphFGB*] plus pDB31 sans insert ont servi de témoins négatifs.

À la fin de la période d'incubation, les milieux réactionnels furent extraits 3 fois avec 5 ml d'hexane. Les extraits étaient déshydratés avec du sulfate d'ammonium puis, évaporés jusqu'à obtention d'un volume final de 1,5 ml (pour l'Aroclor 1242) ou de 3 ml

(pour le mélange de 18 BPC). Ces préparations étaient injectées au chromatographe en phase gazeuse (GC) relié à un détecteur à capture d'électrons (EC) pour analyse. Toutes les analyses furent effectuées au moins en triplicata.

Mentionnons que pour toutes les étapes de la procédure d'extraction des produits de la réaction de l'Aroclor 1242 ou du mélange de congénères BPC ciblés, la verrerie utilisée était exempte de BPC telle que suggérée par Bedard et ses collaborateurs (Bedard *et al.*, 1986).

Tableau 2.2 : Congénères BPC ciblés présents dans le mélange 18 BPC conçu au laboratoire. Le congénère 2,2',3,3',4,5,5',6,6'-nonachlorobiphényle (#18) étant choisi comme standard interne lors de cette étude.

No du pic	Temps rétention	# IUPAC	Congénères
1	17,42	10	2,6
2	22,25	11	3,3'
3	23,06	15	4,4'
4	25,21	54	2,2',6,6'
5	25,69	25	2,3',4
6	26,20	28	2,4,4'
7	27,43	22	2,3,4'
8	28,70	52	2,2',5,5'
9	29,22	47	2,2',4,4'
10	31,70	40	2,2',3,3'
11	33,35	66	2,3',4,4'
12	35,57	79	3,3',4,5'
13	37,07	87	2,2',3,4,5'
14	37,78	77	3,3',4,4'
15	39,71	118	2,3',4,4',5
16	41,38	153	2,2',4,4',5,5'
17	42,30	141	2,2',3,4,5,5'
18	**52,55**	**208**	**2,2',3,3',4,5,5',6,6'**

2.12.2 Analyse par GC-ECD

La chromatographie en phase gazeuse (GC) fut effectuée à l'aide d'un chromatographe de modèle HP5890 (série II) (Hewlett Packard, Missisauga, Canada)

équipé d'un injecteur automatique split/splitless HP7673 et d'un détecteur à capture d'électrons (ECD). L'appareil était, également, équipé d'une colonne HP5MS (30 mètres x 0,2 millimètres) composée d'une matrice de phénylpolyméthylsiloxane 5% (0,33 µM d'épaisseur). L'Hélium (1mL/min^{-1}) fut employé comme gaz vecteur. L'échantillon fut injecté en mode splitless. La température initiale (75°C) fut maintenue 2 minutes, puis programmée à 15°C min^{-1} jusqu'à 150°C. Cette température fut maintenue durant 2 minutes. Par la suite, la température fut programmée à raison de 15°C min^{-1} jusqu'à 290°C. Cette température fut, également, maintenue durant 2 minutes. Le signal provenant du détecteur fut, finalement, capté par un intégrateur HP3396 (série II) (Hewlett Packard, Missisauga, Canada).

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Développement d'une méthode de criblage comme stratégie de sélection

L'utilisation du procédé de recombinaison aléatoire *in vitro* requiert le criblage d'un grand nombre de clones variants où plusieurs d'entre eux peuvent présenter, à la fois, des mutations neutres qui résultent en une conservation de l'activité enzymatique initiale, ou des mutations ayant pour effet d'inactiver l'enzyme. Ainsi, le développement d'une méthode de sélection des hybrides positifs est donc, de première importance pour discriminer ceux qui nous intéressent. À cet égard, l'utilisation des essais colorimétriques est intéressante pour un criblage rapide et sensible de colonies.

Il est possible de tirer avantage de la coloration jaune intense du HOPDA, le métabolite issu de l'ouverture du cycle du biphényle par BphC, afin de détecter les clones actifs. En effet, des colonies de *E. coli* DH11S ou JM105 portant *bphAEFGBC* sur des plasmides compatibles, en amont du promoteur *lac*, induites à l'IPTG deviennent jaune intense lorsqu'exposées au biphényle ou aux chlorobiphényles (Brühlmann et Chen, 1999 ; Chebrou *et al.*, 1999 ; Kumamaru *et al.*, 1998). De plus, nous avons constaté que les colonies exposées à des congénères qui sont peu ou pas dégradés par la BPDO ne produisent pas cette coloration jaune intense. Ce protocole fut exploité, antérieurement, pour le criblage d'hybrides issus de la recombinaison *in vitro* entre *bphA* de LB400 et *bphA1* de KF707 (Brühlmann et Chen, 1999 ; Kumamaru *et al.*, 1998).

Toutefois, BphC est incapable d'oxygéner les métabolites des congénères de chlorobiphényles portant des groupements hydroxyl en position *meta/para* (Eltis *et al.*, 1993). De plus, le nombre et la position des atomes de chlore sur le noyau biphényle affectent grandement l'activité de cette enzyme (M. Sylvestre, communication personnelle). Par conséquent, il en résulte que ce protocole de criblage ne s'applique qu'à

un nombre restreint de congénères. Finalement, il a été démontré que la déshydrogénase du 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle présente un spectre d'activité envers les chlorobiphényles qui est beaucoup plus étendu que celui de BphC (Barriault *et al.*, 1999).

Pour ces raisons, nous avons développé un protocole de criblage qui fait appel, uniquement, à la BPDO et à BphB en se basant sur la détection du catéchol, le métabolite généré par la réaction de déshydrogénation du 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle, catalysée par BphB. Ce protocole de criblage est basé sur le fait que les catéchols s'oxydent spontanément à l'air ambiant pour prendre une coloration brunâtre. Nous avons montré que, comme la plupart des catéchols, le 2,3-dihydroxybiphényle devient brunâtre lorsqu'il est déposé, en solution, sur une membrane de Nylon, puis exposée à l'air ambiant pour quelques heures. Suite à cette observation, nous avons vérifié si des cellules de *E. coli* DH11S, induites à l'IPTG, portant pDB31 [LB400-*bphAE* *Avr*II$^+$] plus pQE51 [*bphFGB*] pouvaient transformer le biphényle en un métabolite brunâtre détectable lorsqu'elles étaient inoculées sur une membrane de Nylon placée à la surface d'un milieu solide. La composition du milieu, la température et le temps d'incubation, la quantité d'IPTG, l'âge des cellules au moment de l'induction, le mode d'exposition au biphényle (vaporisation sur les colonies, sublimation à partir de cristaux placés sur le couvercle de la boîte de Pétri), tous ces facteurs influençaient l'intensité de la coloration produite. Le protocole décrit à la section 2.6, qui a été retenu pour notre étude de recombinaison *in vitro*, est celui qui était le plus reproductible.

3.2 Stratégie utilisée pour l'évolution *in vitro* de la BPDO et caractérisation des BPDO variantes obtenues

Dans cette étude, nous avons construit des BPDO hybrides par recombinaison *in vitro* entre les gènes *bphA* des souches LB400 et B-356. Afin de réduire le nombre de BPDO variantes à analyser, nous avons appliqué le protocole de recombinaison *in vitro* sur une partie ciblée seulement du gène *bphA*. Le fragment ciblé de *bphA* était limité par les sites uniques de restriction, *Mlu*I et *Avr*II, et correspondait à la partie C-terminale de la

sous-unité α de la composante oxygénase de la BPDO. La stratégie faisait appel au plasmide pDB31 [LB400-*bphAE AvrII*$^+$] préparé précédemment (Barriault *et al.*, soumis) où *bphA* portait une mutation en position 1354 afin d'introduire un site *Avr*II (Barriault *et al.*, soumis). Nous avons appliqué le protocole de recombinaison *in vitro* tel que décrit à la section 2.5.1 en recombinant le fragment *Mlu*I/*Avr*II de 858 pb de *bphA* de LB400 avec un fragment de 660 pb de *bphA* de B-356 qui commence à 193 pb en amont du site *Sca*I et qui se termine au site *Avr*II (voir Fig. 2.2). Le fragment provenant de *bphA* de B-356 correspondait donc à la partie distale du fragment *Mlu*I/*Avr*II de *bphA* de LB400. Le produit de cette recombinaison était ensuite cloné dans le plasmide pDB31 [LB400-*bphAE AvrII*$^+$] après une digestion avec les enzymes *Mlu*I et *Avr*II. Les plasmides hybrides ont servi à transformer une souche de *E. coli* DH11S qui portait le plasmide pQE51 [LB400-*bphFGB*] tel que mentionné dans la méthodologie (section 2.6).

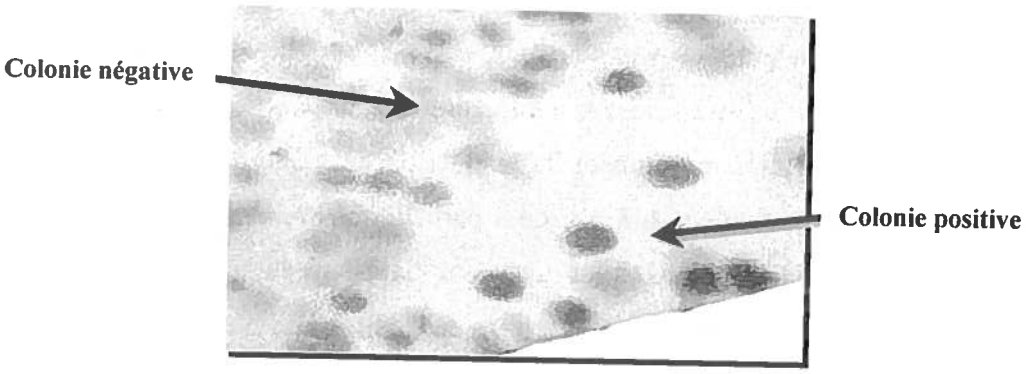


Figure 3.1 : Colonies induites d'un mélange de clones de *E. coli* pDB31 [*bphAE AvrII*$^+$]/pQE51 [*bphFGB*] exprimant des BPDO actives et inactives lorsqu'exposées aux vapeurs de 2,2'-CB. Les clones positifs sont de coloration brunâtre, résultant de la transformation du 2,2'-CB en 2,3-dihydroxy-2'-chlorobiphényle. Les colonies négatives se reconnaissent par une coloration naturelle jaunâtre.

Au cours de cette étude, nous avons recherché les BPDO hybrides présentant une activité accrue envers le 2,2'-CB par rapport à celle de la souche LB400 parentale. Des

colonies, ayant préalablement été ensemencées sur une membrane de Nylon, furent exposées aux vapeurs de 2,2'-CB générées par la sublimation des cristaux placés dans le couvercle du Pétri. Sous ces conditions, des colonies positives prenaient une coloration brunâtre après environ 48 heures d'incubation (Figure 3.1). En suivant cette procédure, nous avons observé que l'intensité de coloration des colonies variait selon l'activité des BPDO hybrides permettant ainsi, une sélection des clones exprimant des BPDO plus actives envers le 2,2'-CB que la BPDO de la souche LB400.

3.3 Caractérisation des hybrides de première génération

Tout d'abord, les régions III et IV, identifiées par Mondello et ses collaborateurs et impliquées au niveau de la spécificité de la dioxygénase, sont localisées sur le fragment *Mlu*I/*Avr*II de *bph*A ciblé pour ces travaux (Mondello *et al.*, 1993). De plus, nous souhaitions, en employant des gènes *bphA* parentaux ayant un degré d'homologie plus faible, que cela augmenterait l'éventail d'exploration de structures et donc, la fréquence d'hybrides plus actifs que la souche LB400 parentale.

3.3.1 Détermination de la fréquence des hybrides actifs

Le criblage de 20 000 colonies basé sur la conversion du 2,2'-CB en dihydroxy-chlorobiphényle, nous a permis de répertorier 150 colonies produisant une coloration brunâtre, équivalente ou plus forte que celle de colonies témoins exprimant la BPDO de la souche LB400 et placées dans les mêmes conditions. Donc, la fréquence de colonies actives en comparaison avec le nombre total de colonies criblées fut de 0,75%. Les colonies actives ont, à nouveau, été criblées sur le 2,2'-CB pour rechercher celles qui présentaient, de manière reproductible, une coloration brunâtre plus intense que le parent LB400. Six clones ont été retenus de cette deuxième phase de sélection. Il s'agit des hybrides MA3-4-7-9-10 et 11. Ceux-ci furent retenus pour des études de caractérisation plus approfondies.

Mentionnons également que, par cette méthode, il a été possible de démontrer, de façon reproductible, que le variant MA9 a acquis, de la souche parentale B-356, la capacité de dégrader le benzène et de la souche parentale LB400, la capacité de dégrader le naphtalène. Cet hybride s'est, également, montré capable de dégrader le toluène, un congénère qu'aucun des parents ne pouvaient dégrader.

3.3.2 Analyse du spectre d'activité envers des congénères BPC de cellules entières de *E. coli* exprimant des BPDO hybrides

3.3.2.1 Activité envers l'Aroclor 1242

Nous avons effectué des tests d'activité envers l'Aroclor 1242 de cellules de *E. coli* DH11S portant les plasmides pDB31 [*bphAE AvrII*$^+$] plus pQE51 [*bphFGB*] et exprimant l'une des BPDO variantes suivantes : MA3, MA4, MA7, MA9, MA10 ou MA11. L'activité de dégradation de l'Aroclor 1242 fut mesurée en évaluant la disparition des congénères BPC dans le mélange réactionnel après 18 heures d'incubation lorsque les cellules de *E. coli* exprimant l'une ou l'autre des différentes BPDO hybrides étaient induites à l'IPTG tel que décrit à la section 2.12. Les conditions de chromatographie utilisées nous ont permis de résoudre le mélange Aroclor 1242 en 58 pics distincts dont plusieurs contenaient plus d'un congénère. L'assignation des congénères BPC aux différents pics fut établie précédemment (Barriault et Sylvestre, 1993 ; Frame *et al.*, 1996). Le pourcentage de dégradation de vingt des pics chromatographiques représentant des congénères d'intérêt du mélange Aroclor 1242 est présenté au tableau 3.1. Parmi l'ensemble des congénères du mélange d'Aroclor 1242 présentés dans ce tableau, nous constatons que les pics qui correspondent respectivement au 2,3,3',5-CB + 2,3,4',5-CB, et au 2,3,3',4'-CB + 2,3,4,4'-CB + 2,2',3,4,6'-CB, n'ont pas été altérés par les clones portant la BPDO de LB400. Cependant, ces pics ont diminué de 79% et 51% respectivement dans le milieu réactionnel inoculé avec le clone de *E. coli* exprimant l'hybride MA9.

Congénères BPC	LB400	MA3	MA4	MA7	MA9	MA10	MA11
2,4'	96	86	83	92	100	81	100
2,3'	98	92	84	96	100	84	98
2,3 2,4'	96	96	87	95	98	87	98
2,2',6	13	7	0	0	0	20	35
2,2',5	92	85	78	87	94	73	87
2,3,6 2,3',6	31	7	2	10	78	11	56
2,2',3 2,4',6	57	51	46	48	62	47	60
2,4,5	50	11	19	58	84	4	36
2,3',5	81	44	59	74	93	43	74
2,3,3' 2',3,4 2,2',5,6'	80	66	70	72	78	70	76
2,2',4,5'	58	21	25	52	79	20	49
2,2',3,5'	71	33	56	68	67	34	35
3,4,4' 2,2',3,4'	20	2	5	17	51	0	20
2,2',3,4 2,3,4',6	15	4	6	11	40	2	11
2,3,3',5 2,3,4',5	0	0	0	1	79	0	0
2,3',4',5	53	18	26	55	65	20	32
2,3,3',4' 2,3,4,4' 2,2',3,4,6'	2	0	0	2	52	0	28
2,2',4,5,5'	27	8	14	31	51	8	21
2,2',3,3',5	19	2	9	22	36	4	12
2,3,3',4',6	0	0	0	0	0	0	0
2,2',3,4,4',5'	0	42	59	0	0	42	37

Tableau 3.1 : Pourcentage de dégradation de congénères BPC sélectionnés de l'Aroclor 1242 par des cellules induites de *E. coli* DH11S/pDB31 [*bphAE AvrII*$^+$] plus pQE51 [*bphFGB*] exprimant des BPDO hybrides obtenues par recombinaison *in vitro*. Le protocole utilisé est celui décrit à la section 2.12. L'identification des congénères présents dans les pics sélectionnés est basée sur des études précédentes (Barriault *et al.*, 1993 ; Frame *et al.*, 1996). Les pourcentages de dégradation furent établis à partir des résultats de trois expériences différentes. Le standard interne utilisé pour cette étude fut le 2,3,3',4'6-pentachlorobiphényle.

Outre les congénères que seul MA9 a dégradé, nous avons, également, pu relever les points suivants :

- Le pic correspondant aux congénères 2,3,6-CB + 2,3',6-CB fut davantage réduit par l'hybride MA9, ce qui démontrerait une capacité de ce mutant à attaquer des congénères dont les deux positions *ortho* sont occupées par des atomes de chlore. Cette constatation fut aussi relevée pour les pics

correspondant aux congénères 2,2',3-CB+ 2,4',6-CB ainsi que 2,2',3,4-CB + 2,3,4',6-CB.

- Les pics correspondants aux congénères 2,4,5-CB, 2,3',5-CB, 2,3',4',5-CB, 2,2',4,5,5'-CB et 2,2',3,3',5-CB qui furent, également, dégradés plus facilement par MA9 révélerait une activité supérieure, de cet hybride, envers des congénères BPC portant un atome de chlore à la fois en position *ortho* et *meta* sur la molécule de biphényle.
- Finalement, nous avons noté que le pic de 3,4,4'-CB + 2,2',3,4' fut davantage dégradé par l'hybride MA9.

Par ailleurs, selon le tableau, l'activité catabolique envers l'Aroclor 1242 des BPDO hybrides, MA3-4-7-10 et 11, se révéla, de façon générale, similaire à l'activité de LB400.

3.3.2.2 Activité envers un mélange de 18 congénères BPC ciblés

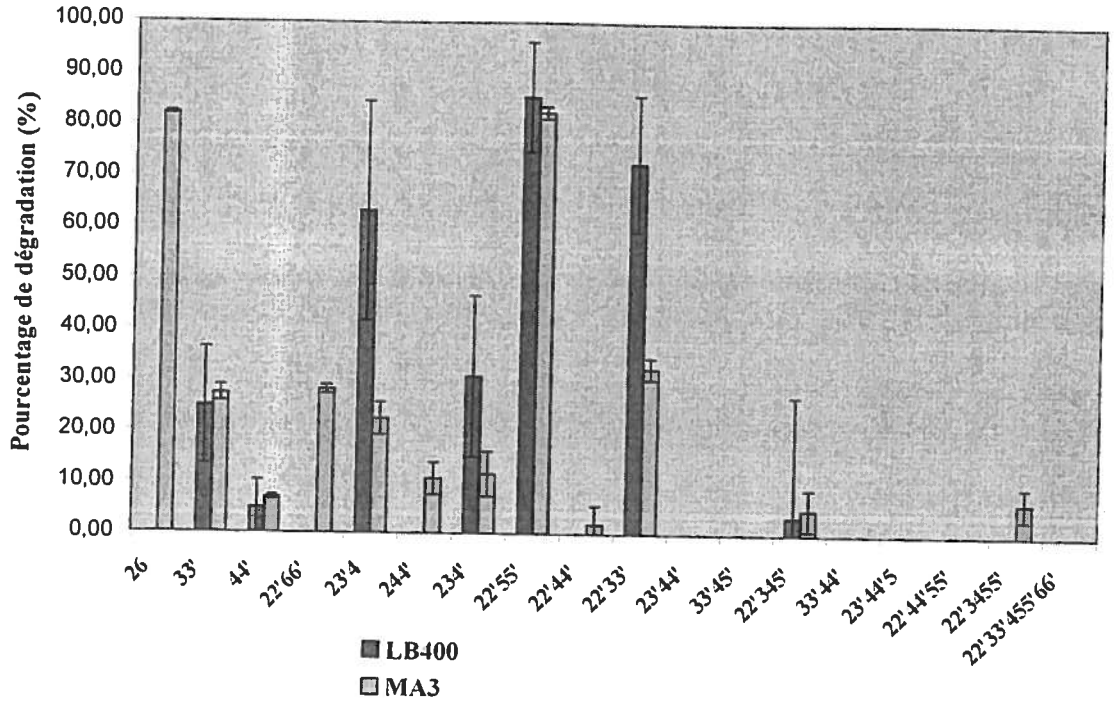
À la lumière des résultats tirés des analyses de l'activité des cellules entières exprimant les différentes BPDO hybrides sur l'Aroclor 1242, un mélange synthétique de congénères BPC ciblés fut développé afin de différencier plus spécifiquement entre les capacités de dégradation de la souche LB400 parentale et les variants sélectionnés. En effet, certains pics du chromatogramme de l'Aroclor 1242 contribuent à plus d'un congénère BPC, ce qui ne nous permettait pas de cibler précisément l'activité de dégradation des hybrides envers certains composés du mélange.

Les histogrammes de la Figure 3.2 représentent la capacité de dégradation, envers les congénères BPC présents dans le mélange synthétique, de clones de *E. coli* DH11S/pDB31 [*bphAE AvrII*$^+$] plus pQE51 [*bphFGB*] exprimant les différentes BPDO hybrides MA3-4-7-9-10 et 11. Mentionnons d'abord que plusieurs études montrent que la souche LB400 dégrade mal les congénères BPC ayant un atome de chlore en position *para ou meta* sur la molécule de biphényle comme le 4,4'-dichlorobiphényle, le 2,4,4'-trichlorobiphényle, le 2,2',4,4'-tétrachlorobiphényle et le 3,3'-dichlorobiphényle (Arnett

et al., 2000 ; Gibson *et al.*, 1993 ; Hurtubise *et al.*, 1998 ; Erickson et Mondello, 1993 ; Maltseva *et al.*, 1999). Les résultats présentés à la Figure 3.2 nous permettent de constater que plusieurs congénères BPC que la souche LB400 ne dégrade pas, comme le 2,6-dichlorobiphényle, le 4,4'-dichlorobiphényle, le 2,4,4'-trichlorobiphényle, le 2,2',4,4'-tétrachlorobiphényle et le 2,2',6,6'-tétrachlorobiphényle sont dégradés par certains de nos hybrides. Notons que tous les hybrides [MA-X-*bphAE*] ont pu métaboliser le 2,6-dichlorobiphényle qui, à ce jour, correspond à un congénère très résistant à l'attaque microbienne (Maltseva *et al.*, 1999). De plus, outre ces congénères, l'analyse des graphiques nous a permis de constater que le 2,3',4-CB et le 2,3,4'-CB furent davantage dégradés par les hybrides MA7, MA9 et MA11. Finalement, nous constatons que l'hybride MA4 dégradent uniquement les congénères portant un atome de chlore en position *ortho*. Ce variant semblerait avoir développé une spécialisation envers des congénères substitués en position *ortho*.

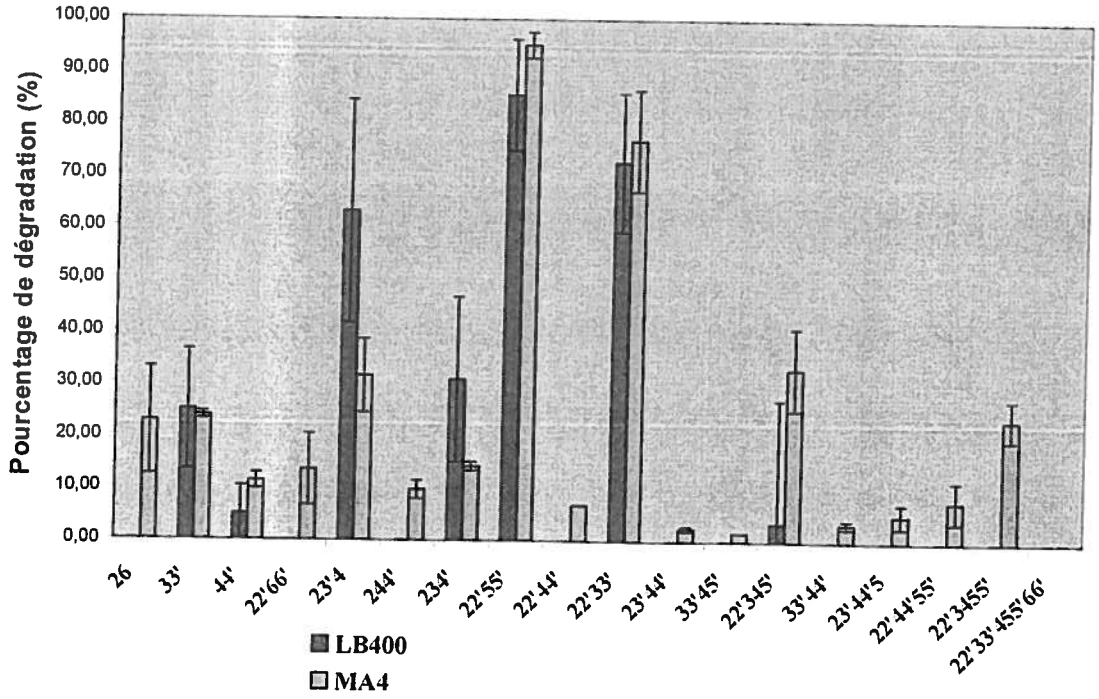
A)

Activité de dégradation de l'hybride MA3 sur le mélange de 18 BPC en comparaison avec LB400

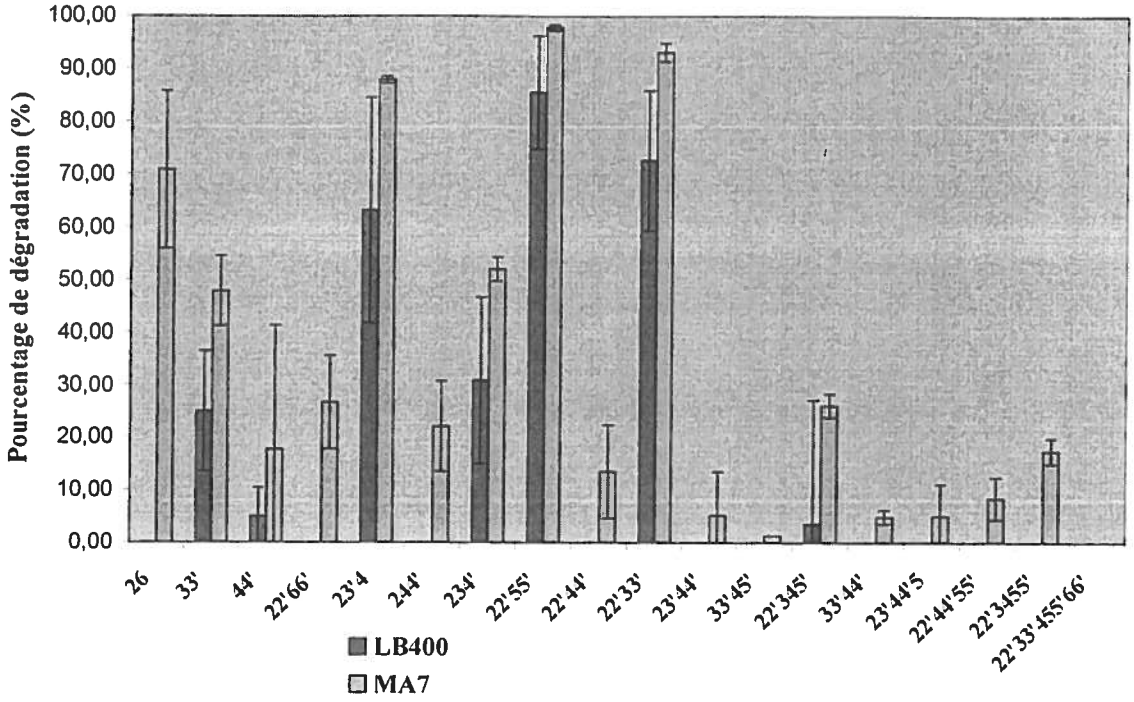


B)

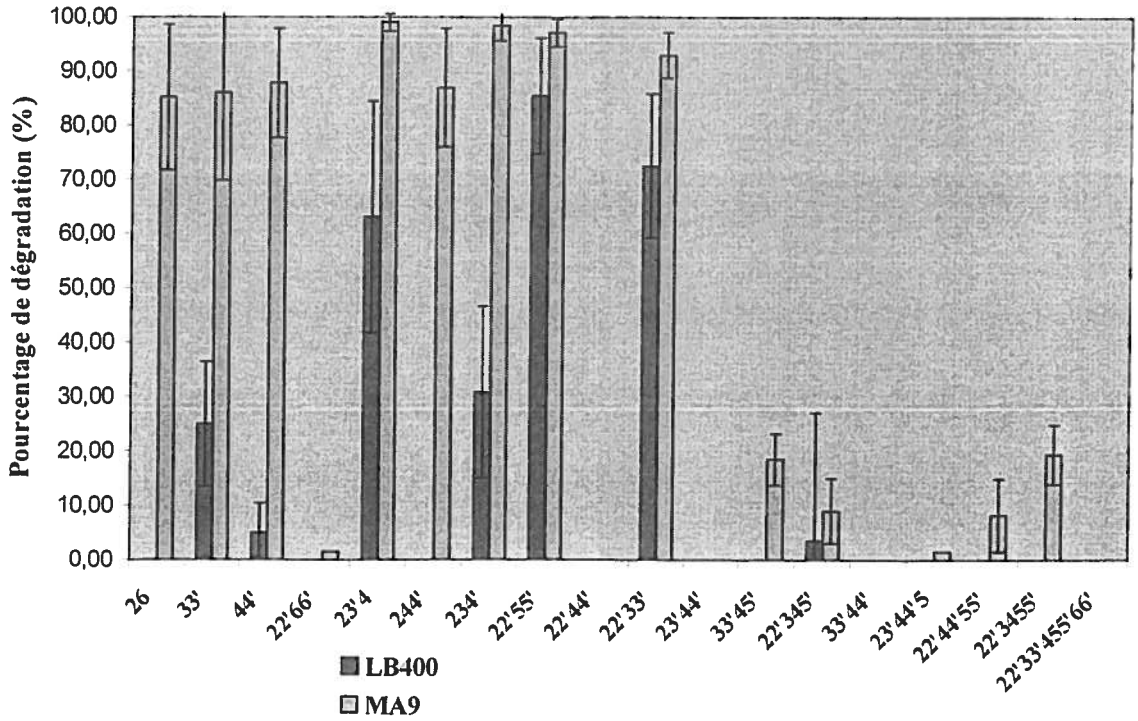
Activité de dégradation de l'hybride MA4 sur le mélange de 18 BPC en comparaison avec LB400



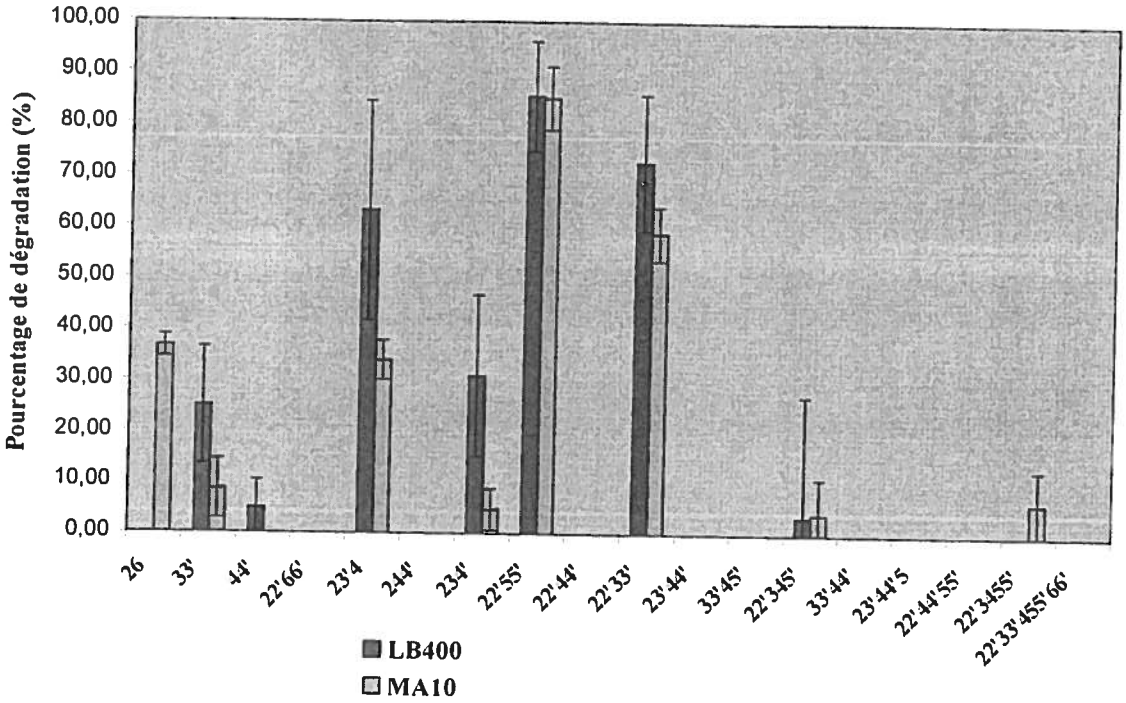
C) **Activité de dégradation de l'hybride MA7 sur le mélange de 18 BPC en comparaison avec LB400**



D) **Activité de dégradation de l'hybride MA9 sur le mélange de 18 BPC en comparaison avec LB400**



E) **Activité de dégradation de l'hybride MA10 sur le mélange de 18 BPC en comparaison avec LB400**



F) **Activité de dégradation de l'hybride MA11 sur le mélange de 18 BPC en comparaison avec LB400**

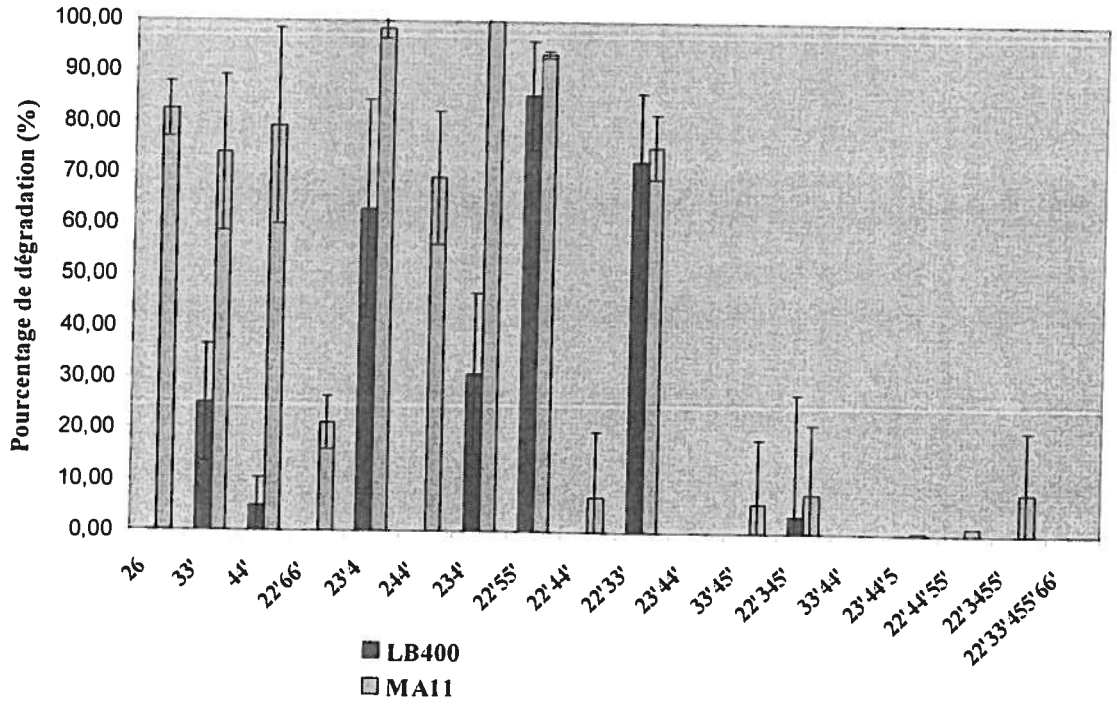


Figure 3.2 : Dégradation d'un mélange de 18 congénères BPC ciblés par des cellules induites de *E. coli* DH11S/pDB31 [*bphAE AvrII*$^+$]/pQE51 [*bphFGB*] exprimant la BPDO de LB400 comparée à celles exprimant les BPDO hybrides MA3-4-7-9-10 et 11. A) BPDO de l'hybride MA3, B) BPDO de l'hybride MA4, C) BPDO de l'hybride MA7, D) BPDO de l'hybride MA9, E) BPDO de l'hybride MA10, E) BPDO de l'hybride MA11. Le protocole d'analyse est décrit à la section 2.12. Les calculs statistiques de cette étude sont basés sur des tests réalisés en triplicata. Le 2,2',3,3',4,5,5',6,6'-nonachlorobiphényle a servi de standard interne.

3.3.3 Caractérisation biochimique des BPDO hybrides purifiées

Le plasmide pDB31, utilisé pour exprimé les BPDO hybrides, nous a permis de purifier ces enzymes par chromatographie d'affinité sur résine Ni-NTA à l'aide d'une étiquette Histidine placée en N-terminale des protéines. Les six BPDO hybrides MA3-4-7-9-10 et 11 ont ainsi été purifiées. Toutes ces enzymes étaient actives et présentaient un spectre UV-visible identique à celui des parents révélant des pics caractéristiques des oxygénases ayant un centre Rieske soient deux pics à 323 nm et 455 nm ainsi qu'un épaulement à 575 nm (Hurtubise *et al.*, 1995). Ces enzymes purifiées étaient actives envers le biphényle et quelques congénères BPC. Nous décrirons dans les sections suivantes certains des paramètres cinétiques des enzymes hybrides ainsi que l'analyse des métabolites produits par ces hybrides.

3.3.3.1 Identification des métabolites de chlorobiphényles produits par les BPDO hybrides

L'habileté des hybrides BPDO à métaboliser les congénères 2,2'-dichlorobiphényle, 2,6-dichlorobiphényle et 2,2'5,5'-tétrachlorobiphényle fut confirmée en employant des préparations de BPDO purifiées. Les métabolites produits par les hybrides furent extraits des milieux réactionnels, puis dérivés à l'acide *n*-butylboronique

selon le protocole décrit à la section 2.11 et analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

3.3.3.1.1 Métabolites du 2,2'-CB

L'analyse par GC-MS des métabolites du 2,2'-CB produits par la BPDO de la souche parentale LB400 montre la présence de trois pics chromatographiques correspondant à trois métabolites distincts. Ainsi, les trois pics de métabolites paraissant à la Figure 3.3 correspondent aux métabolites du 2,2'-CB identifiés précédemment par Haddock et ses collaborateurs (Haddock *et al.*, 1995). De plus, mentionnons que les proportions respectives des métabolites sont semblables à celles rapportées par Haddock et ses collaborateurs (Haddock *et al.*, 1995). Le métabolite 2, le 2,3-dihydroxy-2'-chlorobiphényle (catéchol monochloré) est le métabolite majeure produit par la souche LB400. Celui-ci a un ion moléculaire à *m/z* 286. Le métabolite 3, le second en importance, est le 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphényle (diol dichloré) dont l'ion moléculaire est à *m/z* 322. Finalement, le métabolite 1, dont l'intensité est la plus faible, est le 2,3-dihydro-2,3-dihydroxy-2'-chlorobiphényle (diol monochloré) et l'ion moléculaire est à *m/z* 288. La structure moléculaire de ces métabolites fut déduite d'après le patron de fragmentation révélé par le spectre de masse en se basant sur les spectres de composés similaires publiés par Massé et ses collaborateurs (Massé *et al.*, 1989) ainsi que sur l'étude de Haddock et de ses collaborateurs (Haddock *et al.*, 1995). Par exemple, pour le cas du diol monochloré, la fragmentation est initié par la perte d'un atome de chlore radicalaire produisant un ion à *m/z* de 253 (M-35) et où l'élimination du groupement *n*-C_4H_9BO donne un ion à *m/z* de 204 (M-84). Finalement, l'élimination du groupement *n*-C_4H_9BO suivie de la perte successive d'un groupement CO et d'un atome de chlore ou d'un atome de chlore uniquement génère les ions abondants de *m/z* à 141 (M-84-28-35) et de *m/z* à 169 (M-84-35), respectivement.

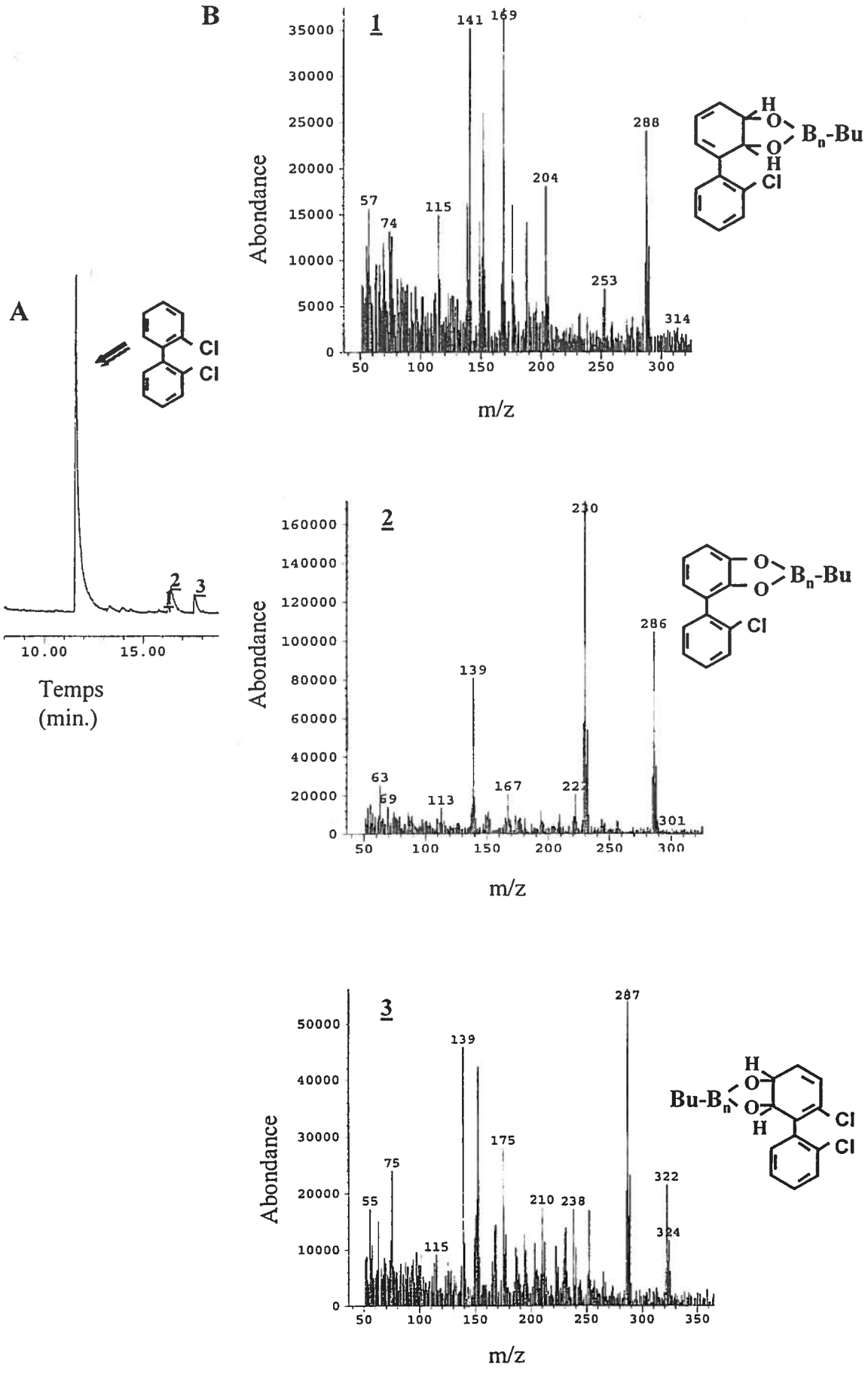
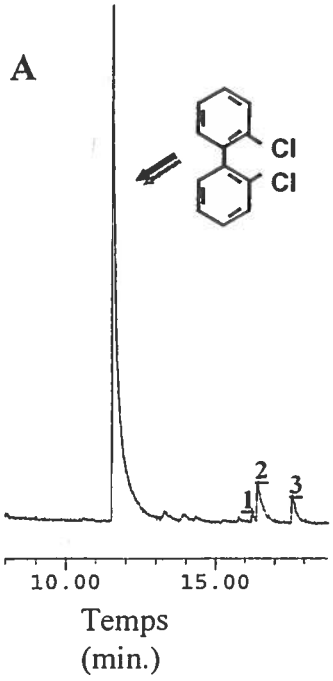
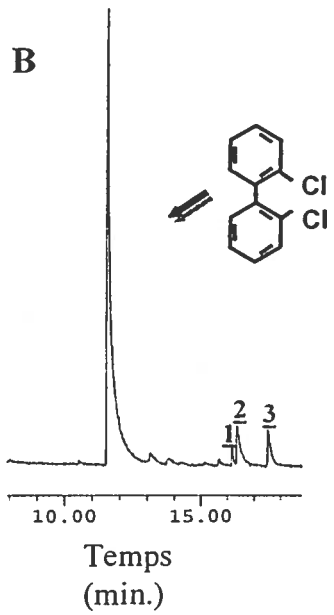

A
Cl
Cl
2
3
10.00
15.00
Temps
(min.)
B
1
141
169
288
204
57
74
115
253
314
Abondance
m/z
H
O
O
H
Cl
Bn-Bu
2
230
286
139
63
69
113
167
222
301
Abondance
m/z
O
O
Bn-Bu
Cl
3
287
139
175
75
55
115
210
238
322
324
Abondance
m/z
H
O
O
H
Bu-Bn
Cl
Cl

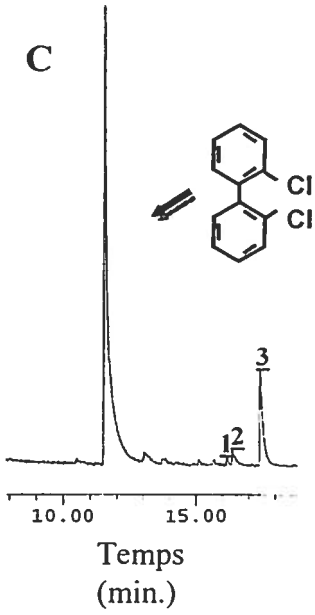
Figure 3.3 : Analyse des métabolites résultant de l'oxygénation catalytique du 2,2'-CB par ht-ISP$_{BPH}$ purifiée de LB400. A) Profil des métabolites produits par la BPDO de LB400 d'après le chromatogramme obtenu par chromatographie en phase gazeuse. B) Spectre de masse des métabolites produits par LB400 à partir du 2,2'-CB. 1 : 2,3-dihydro-2,3-dihydroxy-2'-chlorobiphényle ; 2 : 2,3-dihydroxy-2'-chlorobiphényle ; 3 : 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphényle.

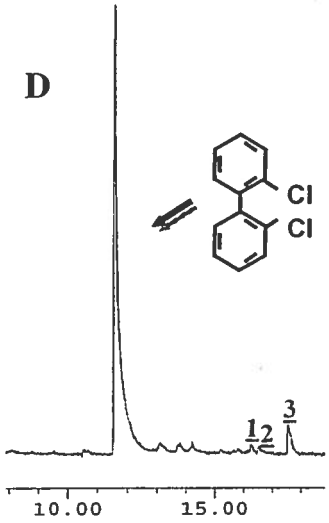
Nos résultats confirment que la BPDO de LB400 catalyse préférentiellement l'oxygénation du 2,2'-CB sur les atomes de carbone 2 et 3 conduisant à l'élimination de l'atome de chlore porté par le carbone 2. Cette déshalogénation est accompagnée d'une réaction spontanée de déshydratation dont le mécanisme reste encore inconnu (Haddock *et al.*, 1995). La BPDO catalyse non seulement, l'attaque en position 2 et 3, mais aussi une oxygénation en position 5 et 6 non négligeable et qui conduit à la formation du métabolite dihydrodiol dichloré correspondant. De façon générale, environ 60 à 75% de l'attaque a lieu en position 2,3 alors que 25 à 40% du substrat est oxygéné en position 5 et 6.

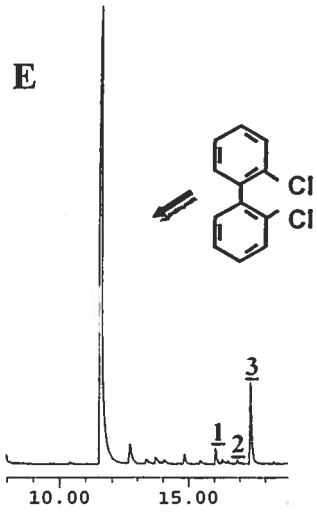
Nous avons comparé les chromatogrammes des métabolites du 2,2'-CB générés par les hybrides MA3, MA4, MA7, MA9, MA10 et MA11 avec celui de la BPDO de LB400. La figure 3.4 illustre les résultats de cette analyse, et permet de constater une variabilité quant à l'intensité de ces pics selon l'hybride. Il est à remarquer que l'analyse des métabolites du 2,2'-CB par ces hybrides a été effectuée avec plusieurs préparations d'enzymes purifiées permettant d'exclure l'artéfact expérimental comme étant la cause de ces intensités différentes. Ainsi, selon les rapports des pics des métabolites des hybrides MA4, MA7 et SA9, il apparaît que, contrairement à la BPDO de LB400, ces hybrides produisent une plus grande quantité de 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphényle que de 2,3-dihydroxy-2'-chlorobiphényle. Mentionnons que le diol dichloré résulte d'une attaque de la molécule de 2,2'-CB en position 5,6 (Seeger *et al.*, 1999).

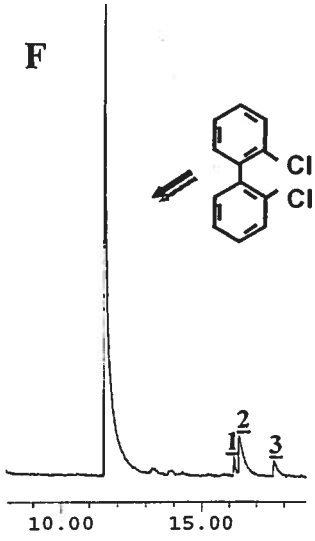

A
Cl
Cl
1
2
3
10.00
15.00
Temps
(min.)


B
Cl
Cl
1
2
3
10.00
15.00
Temps
(min.)


C
Cl
Cl
1
2
3
10.00
15.00
Temps
(min.)


D
Cl
Cl
1
2
3
10.00
15.00
Temps
(min.)


E
Cl
Cl
1
2
3
10.00
15.00
Temps
(min.)


F
Cl
Cl
1
2
3
10.00
15.00
Temps
(min.)

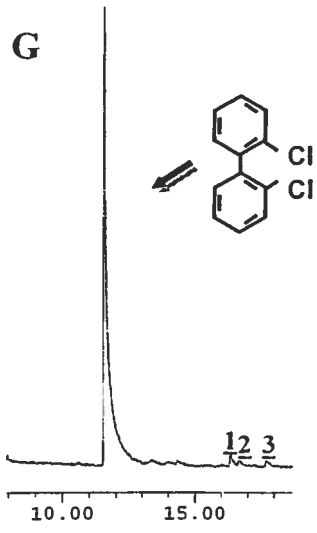

G
Cl
Cl
1
2
3
10.00
15.00
Temps
(min.)

Figure 3.4 : Profil des métabolites du 2,2'-CB produits par la BPDO de LB400 ou celles des hybrides, MA3-4-7-9-10 et 11, d'après le chromatogramme obtenu par chromatographie en phase gazeuse. A) BPDO de LB400, B) BPDO hybride MA3, C) BPDO hybride MA4, D) BPDO hybride MA7, E) BPDO hybride MA9, F) BPDO hybride MA10, G) BPDO hybride MA11. 1 : 2,3-dihydro-2,3-dihydroxy-2'-chlorobiphényle ; 2 : 2,3-dihydroxy-2'-chloro-biphényle ; 3 : 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphényle.

Le fait qu'en présence du 2,2'-CB, ces BPDO hybrides produisent davantage du diol dichloré et très peu de catéchol monochloré, comparativement à la BPDO de la souche parentale LB400, pourrait signifier que l'attaque de ces dioxygénases se fait principalement sur les atomes de carbone 5 et 6.

Nous constatons aussi, suite à l'analyse de ces chromatogrammes, que pour l'hybride MA11, le métabolite majeur retrouvé dans le milieu réactionnel est le 2,3-dihydro-2,3-dihydroxy-2'-chlorobiphényle. Cette observation est difficile à expliquer puisqu'on assume que l'oxygénation en position 2 et 3 devrait, de façon spontanée, conduire à la formation du catéchol monochloré (métabolite 2). Cette observation pourrait indiquer que la BPDO de MA11 transformerait par réaction catalytique le catéchol monochloré en un métabolite non détectable par nos méthodes d'analyses. D'autres expériences présentées dans une section subséquente tendent à expliquer cette observation. Finalement, le chromatogramme résultant de l'activité d'hydroxylation envers le 22'-CB des BPDO hybrides, MA3 et MA10, se révéla similaire à celui de l'activité de LB400.

3.3.3.1.2 Métabolites du 2,2',5,5'-CB

Les hybrides MA3, MA4, MA7, MA9, MA10 et MA11 ont aussi été analysés pour leur capacité à hydroxyler le 2,2',5,5'-CB en position *meta/para*, un potentiel que possède la BPDO de la souche LB400 (Haddock *et al.*, 1995). L'analyse par GC-MS des métabolites du 2,2',5,5'-CB générés par la BPDO de la souche parentale LB400 indique

la présence d'un seul composé identifié comme étant le 3,4-dihydro-3,4-dihydroxy-2,2',5,5'-tétrachlorobiphényle (Haddock *et al.*, 1995) (Figure 3,5). Tout comme pour le congénère 2,2'-CB, la structure moléculaire du diol dichloré fut déduite d'après l'ion moléculaire de *m/z* 392 et le patron de fragmentation du spectre de masse en référence avec les spectres déjà publiés pour ce produit (Haddock *et al.*, 1995, Barriault *et al.*, 1999). Dans le cas de ce métabolite, la fragmentation est initiée par la perte d'un atome de chlore radicalaire produisant un ion à *m/z* 355. L'autre indication caractéristique d'une molécule chlorée, consiste en l'abondance relative des isotopes où l'isotope 37 du chlore correspond à environ 60 % du pic correspondant à l'ion moléculaire (^{35}Cl).

La capacité des hybrides MA3, MA4, MA7, MA9, MA10 et MA11 à hydroxyler le 2,2',5,5'-CB a donc été analysée. Lorsque nous avons comparé les différents chromatogrammes de la figure 3.6, illustrant le pic caractéristique du métabolite produit par les hybrides BPDO, avec le chromatogramme obtenu pour la BPDO de LB400, nous avons constaté que les six variants analysés pouvaient métaboliser le 2,2',5,5'-CB et que le 3,4-dihydro-3,4-dihydroxy-2,2',5,5'-tétrachlorobiphényle était le seul métabolite.

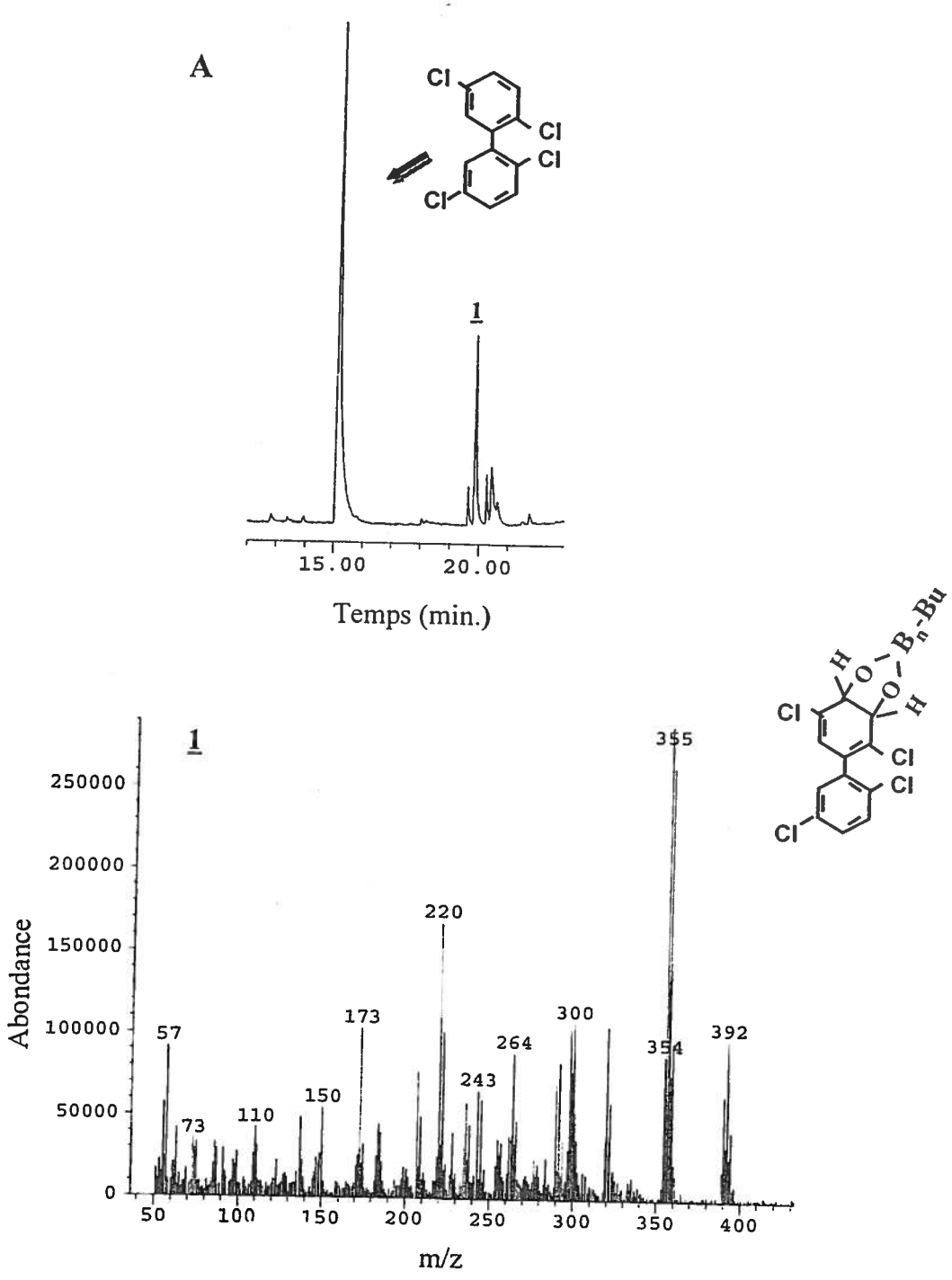


Figure 3.5 : Analyse du métabolite résultant de l'oxygénation catalytique du 2,2',5,5'-CB par ht-ISP$_{BPH}$ purifiée de LB400. A) Profil du métabolite produit par la BPDO de LB400 d'après le chromatogramme obtenu par chromatographie en phase gazeuse. B) Spectre de masse du métabolite produit par LB400 à partir du 22'55'-CB. 1 : 3,4-dihydro-3,4-dihydroxy-2,2',5,5'-tétrachlorobiphényle.

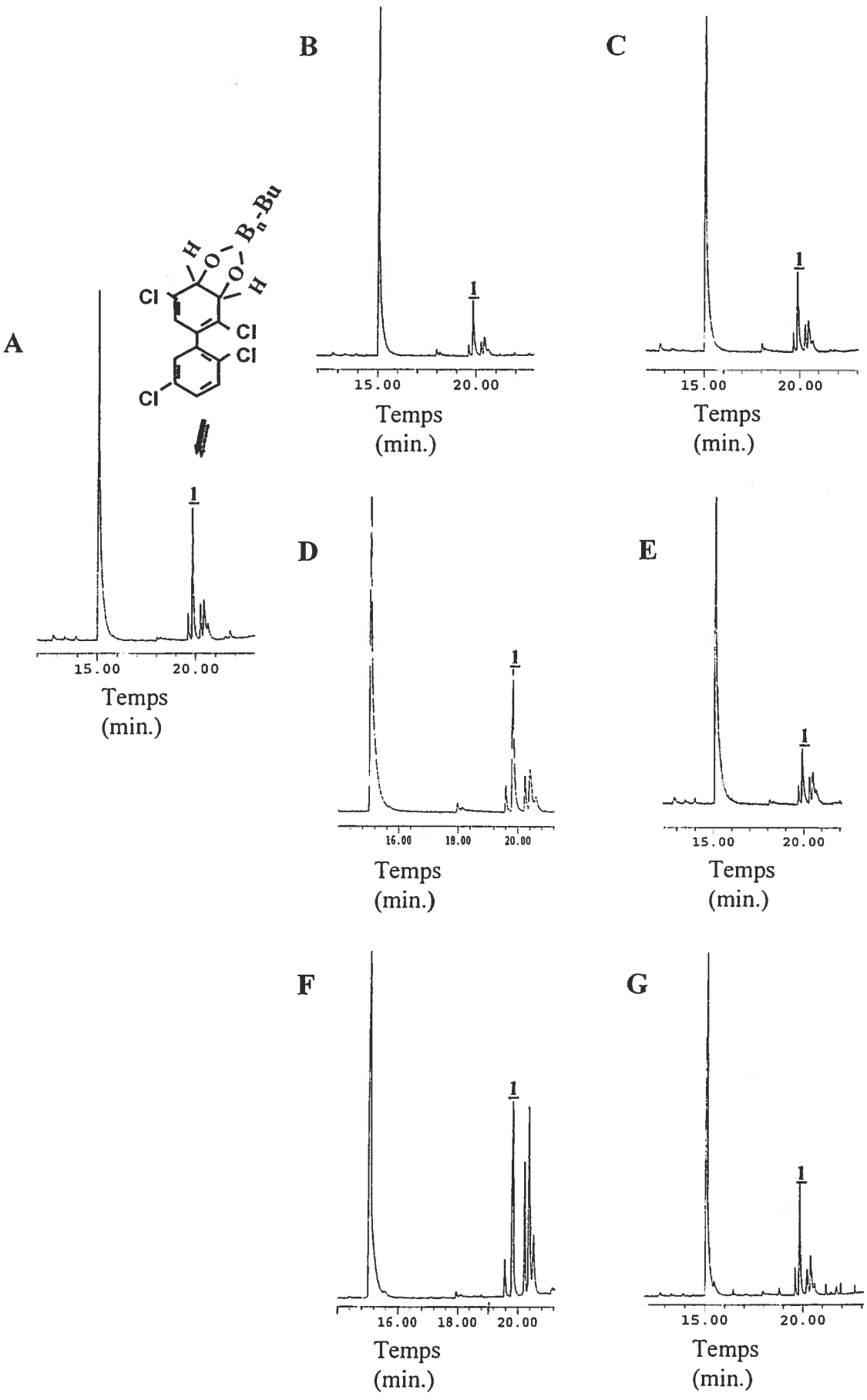

A
B
C
D
E
F
G
Cl
Cl
Cl
Cl
H
O
O
H
B
n-Bu
1
15.00
20.00
16.00
18.00
20.00
Temps
(min.)

Figure 3.6: Profil des métabolites produits par la transformation du 2,2',5,5'-CB par dihydroxylation catalysée par les BPDO hybrides, MA3-4-7-9-10 et 11, en comparaison avec la souche LB400 d'après le chromatogramme obtenu par chromatographie en phase gazeuse. A) BPDO de LB400, B) BPDO hybride MA3, C) BPDO hybride MA4, D) BPDO hybride MA7, E) BPDO hybride MA9, F) BPDO hybride MA10, G) BPDO hybride MA11. 1 : 3,4-dihydro-3,4-dihydroxy-2,2',5,5'-tétrachlorobiphényle.

3.3.3.1.3 Métabolites du 2,6-CB

L'un des problèmes majeurs au niveau de la biodégradation des BPC, consiste en l'accumulation des congénères portant des atomes de chlore en position *ortho* dont le 2,6-dichlorobiphényle et le 2,2',6,6'-tétrachlorobiphényle qui sont des molécules que ni les bactéries aérobies ni les bactéries anaérobies sont capables de dégrader (Maltseva *et al.*, 1999). Il a été possible de démontrer, par des tests en milieu liquide en présence d'un mélange de congénères BPC ciblés, que les hybrides MA pouvaient métaboliser le 2,6-dichlorobiphényle (Section 3.3.2.2). Comme ces analyses avaient été faites en évaluant la disparition du substrat, il fallait confirmer la capacité de ces BPDO à métaboliser le 2,6-CB. Pour obtenir cette confirmation, la BPDO de l'hybride MA9 purifiée par chromatographie d'affinité sur résine Ni-NTA fut utilisée dans un essai enzymatique en présence du 2,6-CB. Les métabolites produits ont été extraits, puis dérivés à l'acide *n*-butylboronique et analysés par GC-MS. L'analyse du spectre GC/MS révèle la présence, aux temps de rétention de 17,54 et de 17,99 minutes, de deux métabolites chlorés dont l'ion moléculaire à m/z 322 indique qu'ils seraient des métabolites dihydroxylés dichlorés (Figure 3.7).

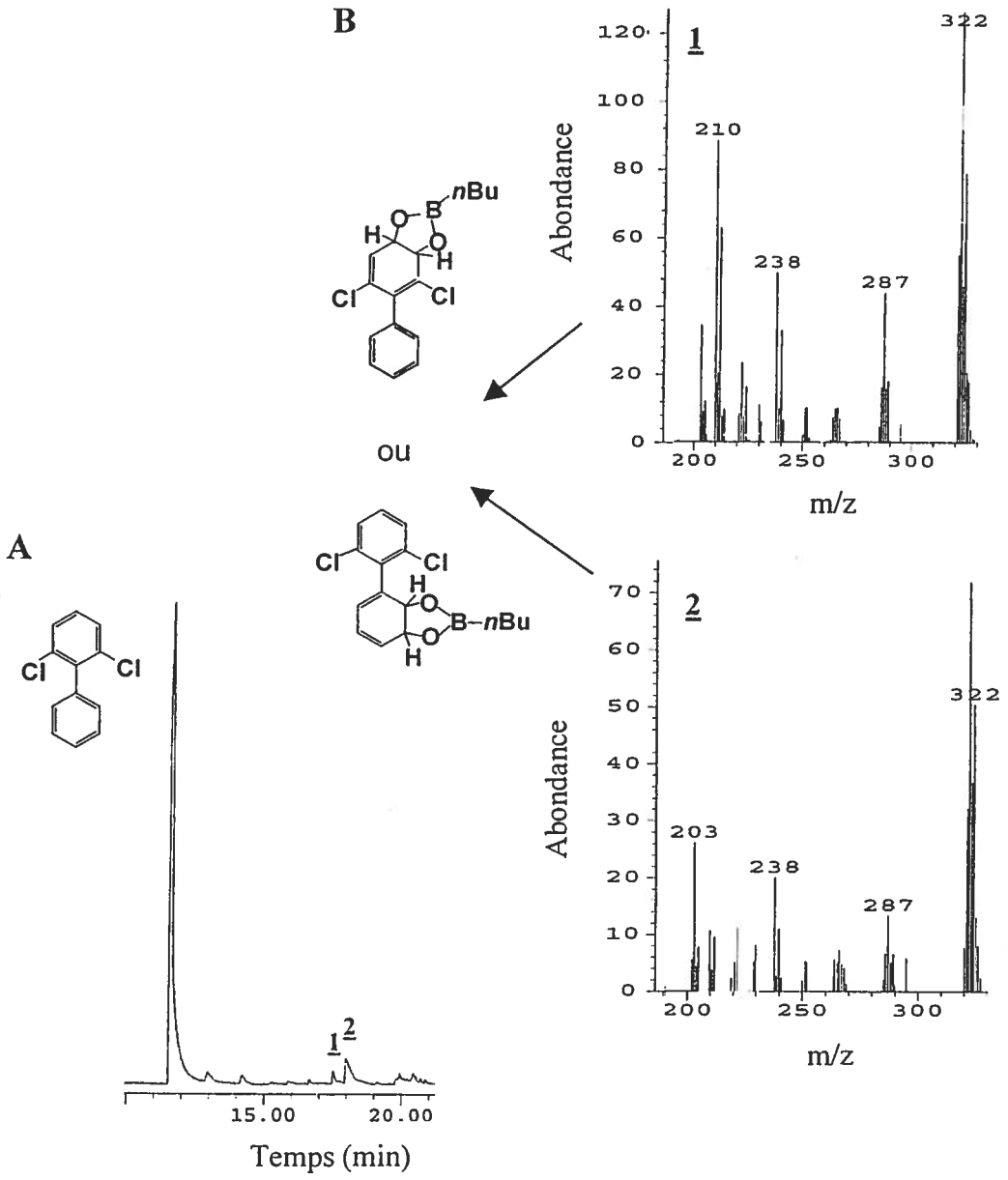


Figure 3.7 : Transformation du 2,6-CB par dihydroxylation catalysée par la dioxygénase du biphényle de l'hybride MA9. A) Profil des métabolites produits par la BPDO de MA9 d'après le chromatogramme obtenu par chromatographie en phase gazeuse. B) Spectre de masse des deux métabolites hydroxylés (1 et 2) produits par MA9 à partir du 2,6-CB. 1 et 2: Dihydrodiol dichloré.

En effet, basé sur les ions significatifs m/z=287 (M-35), m/z=238 (M-84) et m/z=222 (M-100) tout en se référant aux spectres publiés de dérivés dihydrodiols dichlorés des congénères BPC (Massé *et al.*, 1989 ; Hurtubise *et al.*, 1998), nous avons déduit que ces métabolites sont des dihydrodiols dichlorés du 2,6-CB.

Cependant, les spectres ne nous permettent pas de connaître la position exacte de l'attaque, soit en position 2,3 ou 3,4 sur le noyau biphényle non-substitué ou en position 3,4 sur le noyau biphényle substitué. La présence de deux métabolites est cependant intéressante, car elle indique que, tout comme dans le cas du 2,5-CB (Hurtubise *et al.*, 1998) et du 2,2'-CB (Haddock *et al.*, 1995), les BPDO hybrides peuvent ainsi attaquer le 2,6-CB selon plusieurs positions.

3.3.3.2 Métabolites du 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle produit par l'hybride MA9

Certaines BPDO hybrides, dont MA9, ont démontré un élargissement de leur spectre d'activité envers les analogues chlorés du biphényle. Ainsi, nous avons vérifié si l'enzyme aurait aussi acquis la capacité d'oxygéner son propre métabolite, le 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle. Les résultats sont présentés aux Figures 3.8 et 3.9. Nous avons constaté que la réaction catalytique d'oxygénation du biphényle par la BPDO de LB400 produit une faible quantité de 2,3-dihydroxybiphényle dans le milieu réactionnel. Il en résulte que notre préparation de 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle était contaminée par le 2,3-dihydroxybiphényl (pic 2 sur la Fig. 3.8). L'origine de ce métabolite reste inconnue (transformation spontanée du 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle en 2,3-dihydroxybiphényle ou réaction de déshydrogénation catalytique par la BPDO). Cependant, en comparant les Figures 3.8 A), B) et C), nous constatons qu'il apparaît deux métabolites (pics 3 et 4) qui sont produits en quantité un peu plus importante par la BPDO de MA9 que par celle de LB400, indiquant que cet hybride métaboliserait le 2,3-dihydro-2,3-dihdyroxybiphényle un peu plus rapidement que la BPDO de LB400.

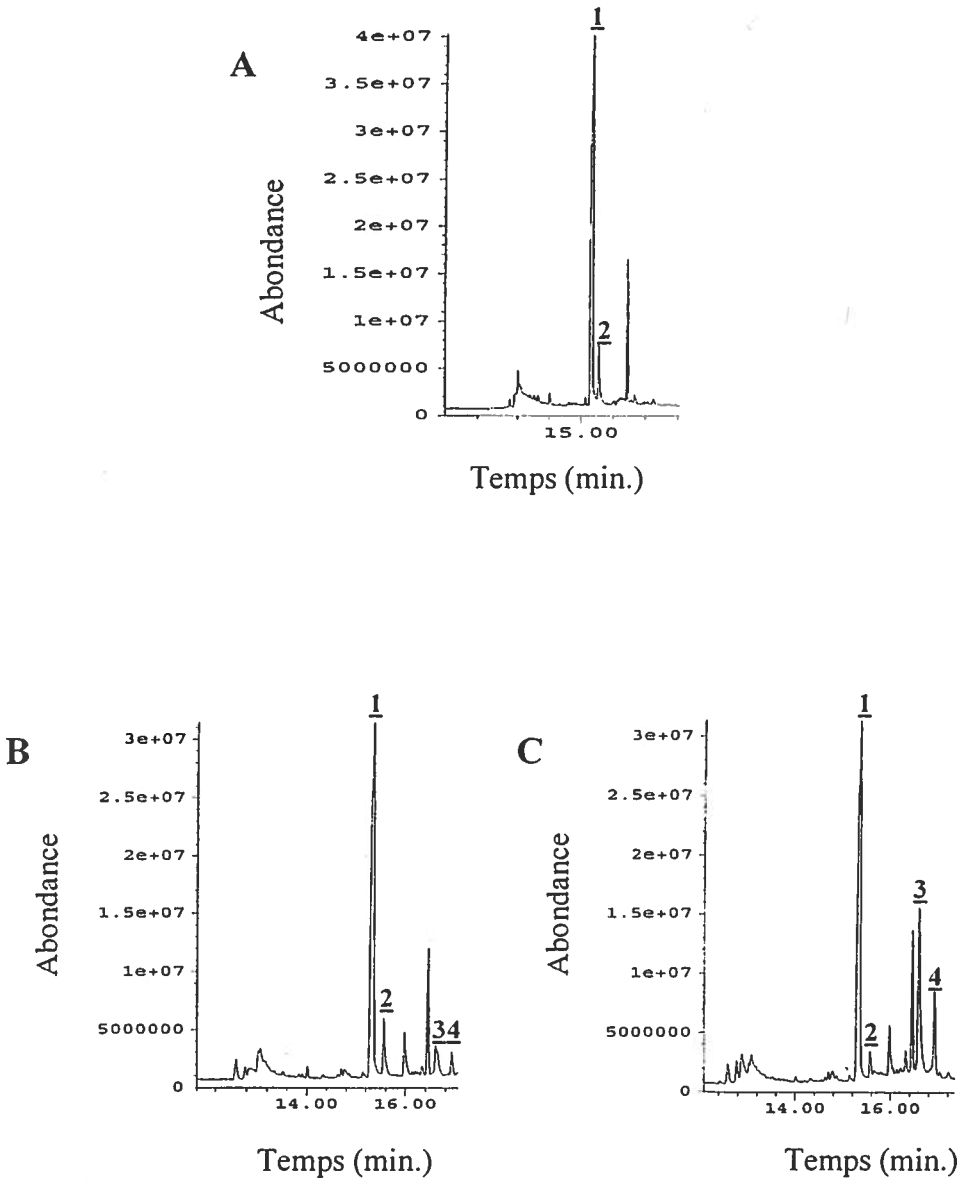


Figure 3.8 : Profil des métabolites produits par la transformation du 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle par les BPDO de LB400 et de l'hybride MA9 d'après le chromatogramme obtenu par chromatographie en phase gazeuse. A) Témoin négatif sans la BPDO B) BPDO de LB400 C) BPDO de l'hybride MA9. Le pic 1 est le substrat restant, le pic 2 est du 2,3-dihydroxybiphényle qui contaminait la préparation de substrat. Les pics 3 et 4 sont les métabolites du 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle.

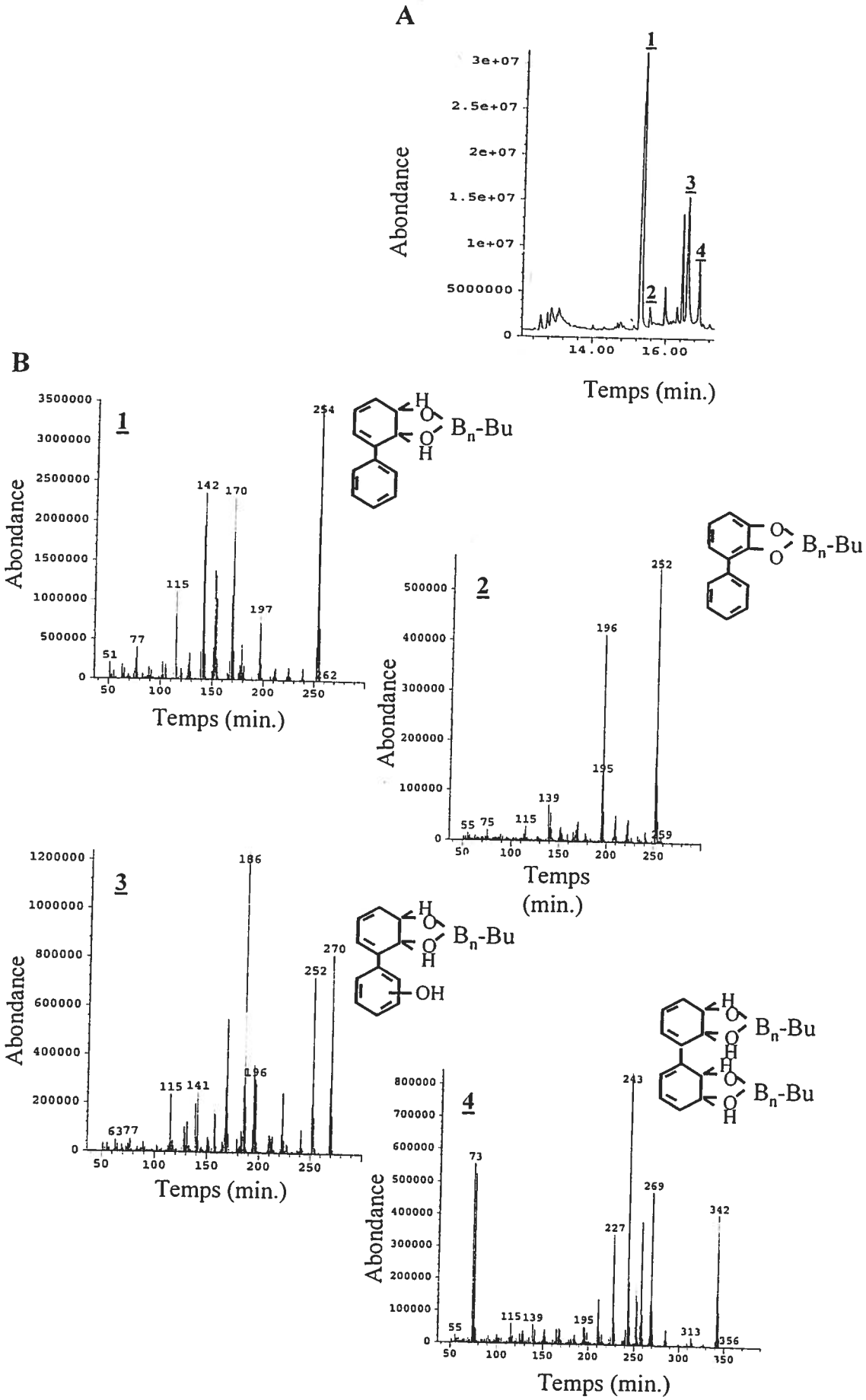

A
Abondance
Temps (min.)
B
1
2
3
4
Bn-Bu
OH
Abondance
Temps (min.)

Figure 3.9 : Analyse des métabolites résultant de l'oxygénation catalytique du 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle par la dioxygénase du biphényle de l'hybride MA9. A) Profil des métabolites produits par la BPDO de l'hybride MA9 d'après le chromatogramme obtenu par chromatographie en phase gazeuse. B) Spectres de masse des métabolites hydroxylés produits par MA9 à partir du diol du biphényle. 1 : Dihydrodiol ; 2 : Catéchol ; 3 : Diol hydroxylé ; 4 : Biphényle tétrahydroxylé.

Selon leur patron de fragmentation, les métabolites 3 et 4 seraient des dérivés mono- et dihydroxylés du substrat (Figure 3.9). Les ions significatifs du métabolite 3, qui sont *m/z* 270 (ion moléculaire), *m/z* 252 (M-H_2O), *m/z* 186 (M-*n*-C_4H_9BO), *m/z* 170 (M-*n*-$C_4H_9BO_2$) et *m/z* 196 qui résulterait de la perte successive d'un groupement *n*-C_4H_9 et d'un groupement OH nous permettent de l'identifier comme étant un dérivé monohydroxylé du 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle. Quant au métabolite 4, celui-ci serait le 2,3-dihydro-2,3-dihydroxy-2',3'-dihydro-2',3'-dihydroxybiphényle. Sa structure fut déduite d'après l'ion moléculaire à *m/z* 354 (très faible) et le patron de fragmentation qui comporte un ion à *m/z* 342 (élimination d'un atome de carbone du cycle), m/z 269 (élimination du groupement *n*-C_4H_9BO), un ion à *m/z* 258 généré par la perte d'un carbone plus le groupement *n*-C_4H_9BO et un ion à *m/z* 242 généré par la perte d'un carbone plus un groupement *n*-$C_4H_9BO_2$.

3.3.3.3 Cinétique de conversion du biphényle et du 4-CB en HOPDA par les BPDO hybrides

Nous avons évalué l'activité spécifique des préparations purifiées des six BPDO hybrides MA3-4-7-9-10 et 11 envers le biphényle et le 4-chlorobiphényle, en utilisant une réaction couplée avec BphB et BphC pour évaluer la production de HOPDA. Par cette analyse, nous avons pu constater que l'activité spécifique des ht-ISP_{BPH} purifiées MA9, MA10 et MA11 envers le biphényle était respectivement de 314 nmoles/min/mg, de 237 nmoles/min/mg et de 285 nmoles/min/mg. Cette activité était deux fois plus élevée que la valeur obtenue avec la dioxygénase de LB400 (125 nmoles/min/mg) (Figure 3.10).

L'activité spécifique de la dioxygénase de l'hybride MA4 sur le biphényle (58 nmoles/min/mg) était, toutefois, inférieure de moitié à l'activité de la BPDO de LB400.

Nous avons aussi évalué l'activité spécifique des enzymes ht-ISP_{BPH} purifiées de MA9, MA10 et MA11 envers le 4-chlorobiphényle. Les valeurs obtenues étaient respectivement de 281 nmoles/min/mg, de 204 nmoles/min/mg et de 227 nmoles/min/mg comparativement à 121 nmoles/min/mg pour la dioxygénase de LB400. L'activité spécifique de la dioxygénase de l'hybride MA4 sur ce substrat (56 nmoles/min/mg) était, encore ici, inférieure de moitié à l'activité de la BPDO de LB400 (Figure 3.10).

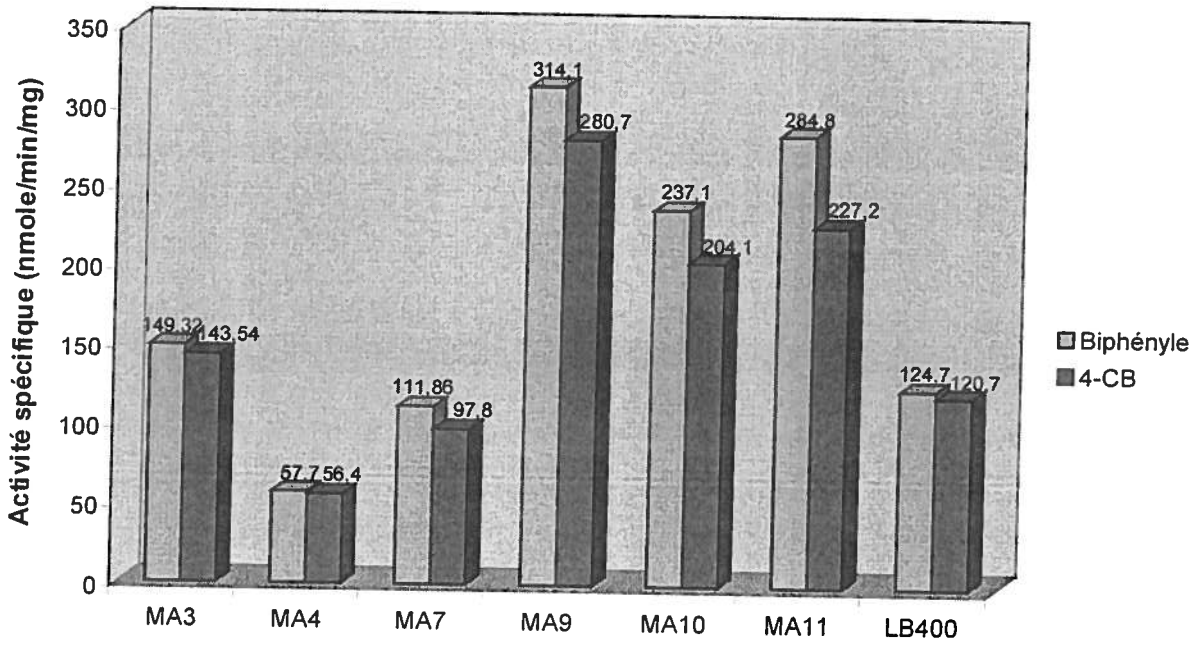


Figure 3.10 : Activité des enzymes ht-ISP_{BPH} purifiées des hybrides MA envers le biphényle et le 4-chlorobiphényle. Les enzymes furent purifiées par chromatographie d'affinité. L'activité spécifique fut évaluée en mesurant la production de HOPDA (nmole) par minute par milligramme d'enzyme dans une réaction couplée avec ht-BphB et ht-BphC purifiées selon le protocole décrit à la section 2.10.2.

3.3.3.4 Conversion du 2,2'-CB en chloro-HOPDA par les BPDO hybrides

Nous avions observé, de façon reproductible, sur plusieurs préparations que le rapport des métabolites du 2,2'-CB générés par certains hybrides dont MA9 était différent de celui observé par la BPDO de LB400 (Voir section 3.3.3.1.1). Nous notions, particulièrement, la faible quantité apparente de 2,3-dihydroxy-2'-chlorobiphényle. Malheureusement, il était impossible de vérifier s'il y avait stoïchiométrie entre la quantité de 2,2'-CB utilisée et la quantité de 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphényle produit, puisqu'aucun des métabolites du 2,2'-CB n'était disponible en quantité suffisante pour pouvoir établir une courbe standard. Par conséquent, cette observation nous a conduit à une série d'expérimentation visant à vérifier la production de chloro-HOPDA lorsque MA9 était mis en présence de 2,2'-CB dans une réaction couplé avec BphC sans BphB (Figure 3.11). Nous nous attendions à ce que, dans ce système, MA9 produise significativement moins de HOPDA que la BPDO de LB400, puisque le 2,3-dihydroxy-2'-chlorobiphényle est le seul des trois métabolites du 2,2'-CB à pouvoir être converti en chloro-HOPDA sans l'apport de BphB. Ainsi, lorsque 1 nmole d'enzyme fut ajouté au milieu réactionnel, la densité optique mesurée à 434 nm après 7 min d'incubation à 37°C fut de l'ordre de 0,3 pour la BPDO de LB400 alors qu'elle n'était que de 0,07 pour M9 (donc négligeable). Le fait que, dans ce système, la BPDO de LB400 convertisse le 2,2'-CB en chloro-HOPDA beaucoup plus efficacement que celle de MA9 confirme donc que MA9 produit peu de 2,3-dihydroxy-2'-chlorobiphényle disponible dans le milieu réactionnel. Cependant, lorsque l'activité fut mesurée dans un système couplé en présence de BphB plus BphC, la conversion du 2,2'-CB en chloro-HOPDA par MA9 restait du même ordre de grandeur que celle mesurée en absence de BphB soit une valeur mesurée de l'ordre de 0,08. Par conséquent, même en présence de BphB, qui aurait dû avoir converti le 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphényle en catéchol correspondant, la conversion de 2,2'-CB en chloro-HOPDA par MA9 restait négligeable.

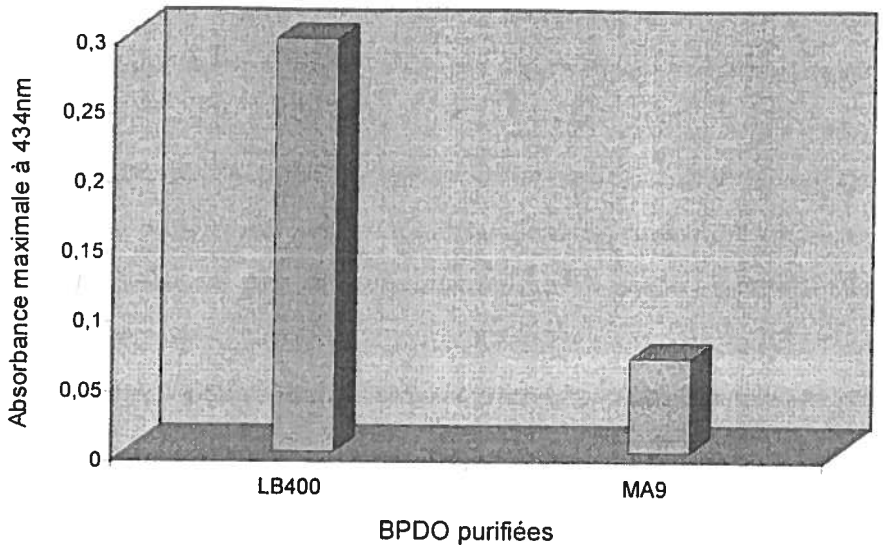


Figure 3.11 : Production de chloro-HOPDA par la BPDO hybride MA9 en présence du 2,2'-CB dans une réaction couplée sans BphB en comparaison avec la BPDO de LB400. Le produit de *meta*-clivage (HOPDA) fut déterminé spectrophotométriquement par la mesure de l'absorbance à 434 nm dans une réaction couplée avec l'enzyme purifiée BphC selon le protocole décrit à la section 2.10.2.

Cette observation nous incite donc à conclure que d'autres facteurs influenceraient la proportion des métabolites du 2,2'-CB, mesurée dans nos analyses de GC/MS, et leur conversion en chloro-HOPDA.

L'une des hypothèses à envisager est le phénomène de découplage de la réaction d'oxygénation qui entraînerait la production de peroxyde dont la présence pourrait influencer la quantité relative des différents métabolites dans le milieu réactionnel. Cette hypothèse est plausible, car il a été démontré que, par découplage, la BPDO peut produire du peroxyde d'hydrogène (Imbeault *et al.*, 2000) et ce dernier peut initier une réaction de polymérisation des catéchols (Schweigert *et al.*, 2001). Ainsi, ces polymères de catéchols ne pourraient pas servir de substrat à l'enzyme BphC.

Afin de rechercher des évidences supportant cette hypothèse, nous avons, dans un premier temps, évaluer la capacité des variants hybrides, qui produisent plus de 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphényle que de 2,3-dihydroxy-2'-chlorobiphényle à partir du 2,2'-CB, à convertir le 2,2'-CB en chloro-HOPDA dans une réaction couplée avec BphB et BphC. Cette expérience a été réalisée avec des extraits cellulaires.

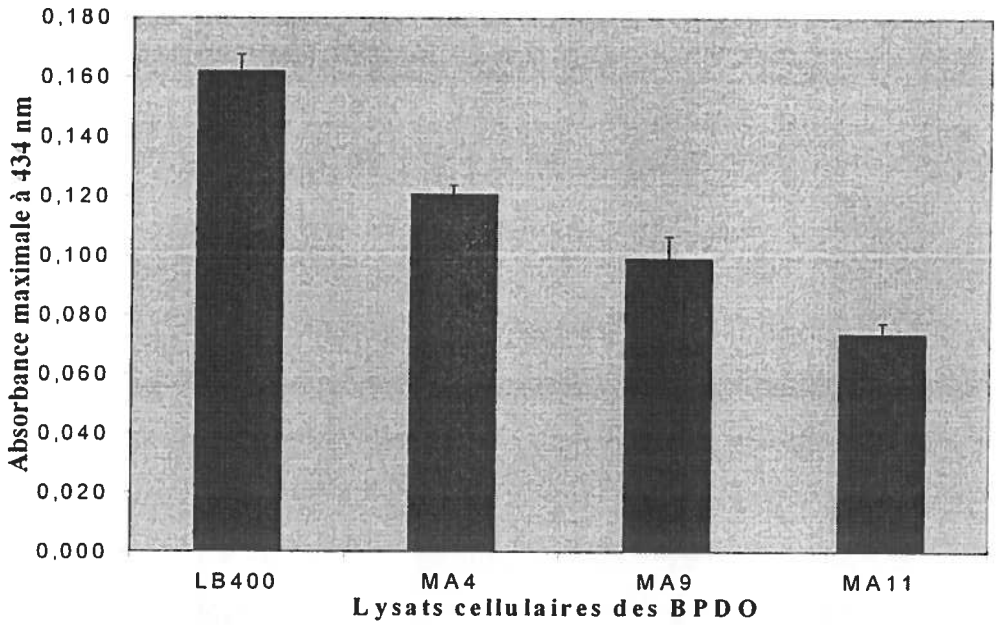


Figure 3.12 : Détermination de la production de chloro-HOPDA à partir du 2,2'-CB par des lysats de *E. coli* exprimant la BPDO de LB400 ou celle de l'un des hybrides MA4, MA7 ou MA9. Le produit de *meta*-clivage (HOPDA) fut déterminé spectrophotométriquement par la mesure de l'absorbance à 434 nm dans une réaction couplée avec les enzymes purifiées BphB et BphC selon le protocole décrit à la section 2.10.2.

Les résultats obtenus nous ont permis de constater que la conversion du 2,2'-CB par les systèmes enzymatiques comportant les BPDO hybrides MA4, MA9 et MA11 était plus faible que celle du système comportant la BPDO de LB400 (figure 3.12). Ces résultats confirment que ces hybrides métabolisent le 2,2'-CB différemment de la BPDO

de LB400. Ces résultats peuvent, hypothétiquement, s'expliquer par le fait que le 2,3-dihydroxy-2'-chlorobiphényle pourrait subir rapidement des modifications de structure menant à la production d'autres métabolites que BphC ne pourrait pas transformer en produit de *meta*-clivage. De plus, la quantité de HOPDA produite par le lysat de cellules exprimant la BPDO hybride MA9 est supérieure à celle produite par la BPDO hybride MA9 purifiée et couplée à BphB et BphC. La présence de composantes non identifiées du lysat comme des peroxydases et les catalases pourraient protéger la polymérisation des catéchols produits.

3.3.3.5 Mise en évidence du phénomène de découplage au cours de l'activité d'oxygénation par la BPDO de l'hybride MA9

Les résultats présentés à la section 3.3.3.1.1 montrant que la proportion des trois métabolites du 2,2'-CB produits par les BPDO hybrides MA4, MA7 et MA9 différait de celle de la BPDO de LB400 (Figure 3.4) pourraient, finalement, s'expliquer par un phénomène de découplage du transfert des électrons menant à la production de peroxyde au cours de la réaction catalytique impliquant la dioxygénase de certains des hybrides. Cette hypothèse pourrait aussi expliquer les résultats de la section 3.3.3.4, où nous avons observé qu'en réaction couplée avec BphB plus BphC, toutes les BPDO hybrides testées produisaient moins de chloro-HOPDA à partir du 2,2'-CB que la BPDO de LB400.

Le phénomène de découplage mènerait, entre autres, à la formation de peroxyde d'hydrogène qui peut agir de plusieurs façons au niveau de l'activité enzymatique de la dioxygénase, comprenant : 1- L'inhibition de la dioxygénase du biphényle qui conduirait à la réduction de la production de catéchol monochloré ; 2- L'inhibition de BphC qui réduirait le taux de conversion du 2,3-dihydroxy-2'-chlorobiphényle en chloro-HOPDA ; 3- La présence de peroxyde favoriserait des réactions de polymérisation du 2,3-dihydroxy-2'-chlorobiphényle pour générer un métabolite non détectable par nos méthodes d'analyse et résistant à l'attaque par BphC.

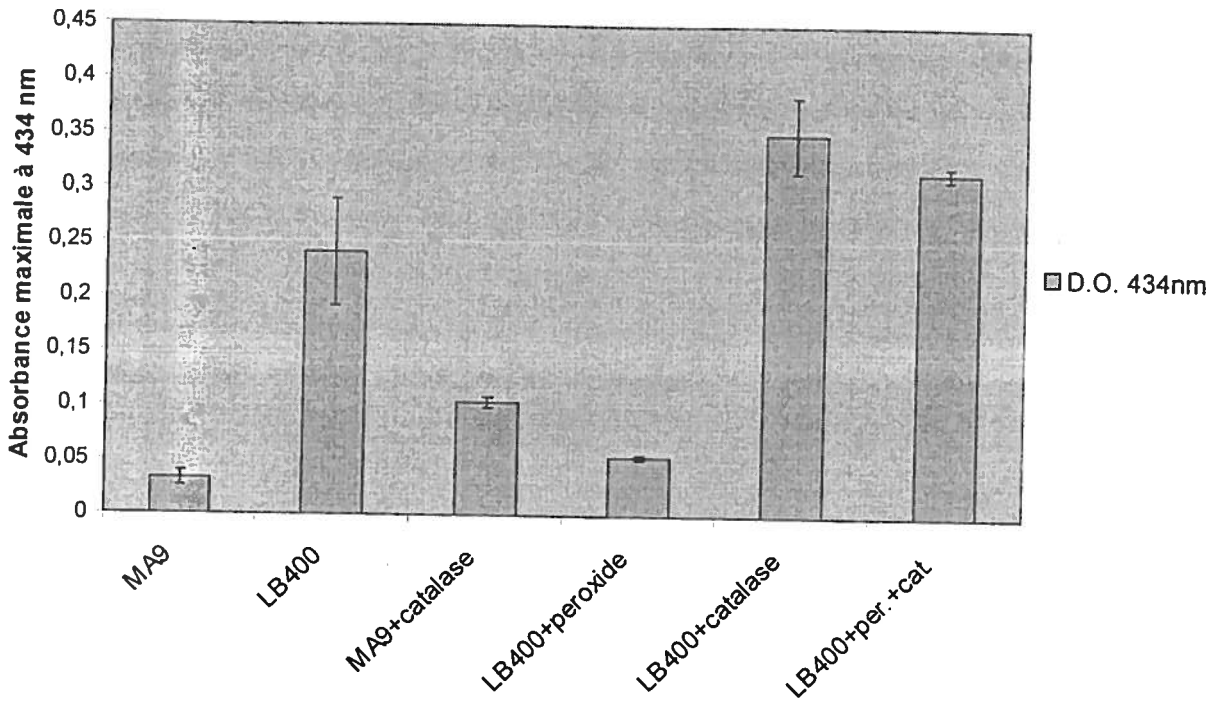


Figure 3.13 : Influence du peroxide et de la catalase sur l'activité de conversion du 2,2'-CB en chloro-HOPDA par la réaction couplée de BPDO et bphC. Les résultats sont basés sur des tests effectués en duplicata utilisant le protocole décrit à la section 2.10.3.

Une observation à l'appui, effectuée précédemment par Lee, montre que le benzène inhibe la dioxygénase du naphtalène en favorisant la production de peroxyde d'hydrogène (Lee, 1999). Tenant compte de cette observation, nous avons effectué une étude comparative entre la BPDO de l'hybride MA9 et de LB400 visant à rechercher des évidences qu'une production de peroxyde d'hydrogène au cours de la réaction d'oxygénation du 2,2'-CB causerait la réduction de la production de HOPDA. Dans un premier temps, nous avons constaté (Figure 3.13) que l'ajout de peroxyde d'hydrogène au milieu réactionnel, conduisait à une réduction marquée de la production de chloro-HOPDA lorsque la réaction était catalysée par la BPDO de LB400. Cette réduction pourrait être causée par une inhibition de la BPDO ou de BphC, mais il est intéressant de constater que la catalase peut renverser cette inhibition et que l'ajout de 1000 unités de

catalase a stimulé l'activité de conversion du 2,2'-CB en chloro-HOPDA, dans le milieu réactionnel comportant la BPDO de l'hybride MA9. Cette observation suggère donc, que le phénomène de découplage est, en partie, responsable des différences des proportions des métabolites hydroxylés détectés lors de l'oxygénation du 2,2'-CB catalysée par la BPDO hybride MA9.

3.3.4 Analyse des séquences des BPDO hybrides de première génération

Par la suite, les fragments *MluI/Avr*II de 865 pb de *bphA* des hybrides, MA3-4-7-9-10 et 11 ont été séquencés. Ce fragment qui correspond à la région modifiée par le procédé de recombinaison aléatoire *in vitro* comporte les régions I à IV, impliquées au niveau de la spécificité de la dioxygénase, telles qu'identifiées par Mondello et ses collaborateurs (Mondello *et al.*, 1997). La séquence protéique de la sous-unité α codée par ce fragment correspond à 288 acides aminées à partir d'Arg164 jusqu'à Glu451 (Figure 3.14). Mentionnons que la séquence protéique de l'hybride MA7 n'est pas présentée, car une partie de la région *MluI/Avr*II de *bphA* n'a pu être séquencée.

L'analyse des séquences révèle que plusieurs mutations et recombinaisons ont généré les cinq BPDO variantes MA3, MA4, MA9, MA10 et MA11. La fréquence de mutation en acides aminés générée au cours du processus de recombinaison aléatoire fut de l'ordre de 2,8%. Il est intéressant de constater que les hybrides MA4, MA9, MA10 et MA11 ont en commun le fait que la région III identifiée par Mondello et ses collaborateurs (Mondello *et al.*, 1997) qui comprend les résidus 335 à 341 de la BPDO de LB400 (-TFNNIRI-) a été remplacée par la région correspondante de la BPDO de B-356 (-GINTIRT-). Dans le cas des hybrides MA4 et MA11, toutefois, une mutation a causé une substitution de Thr335 par Ala335.

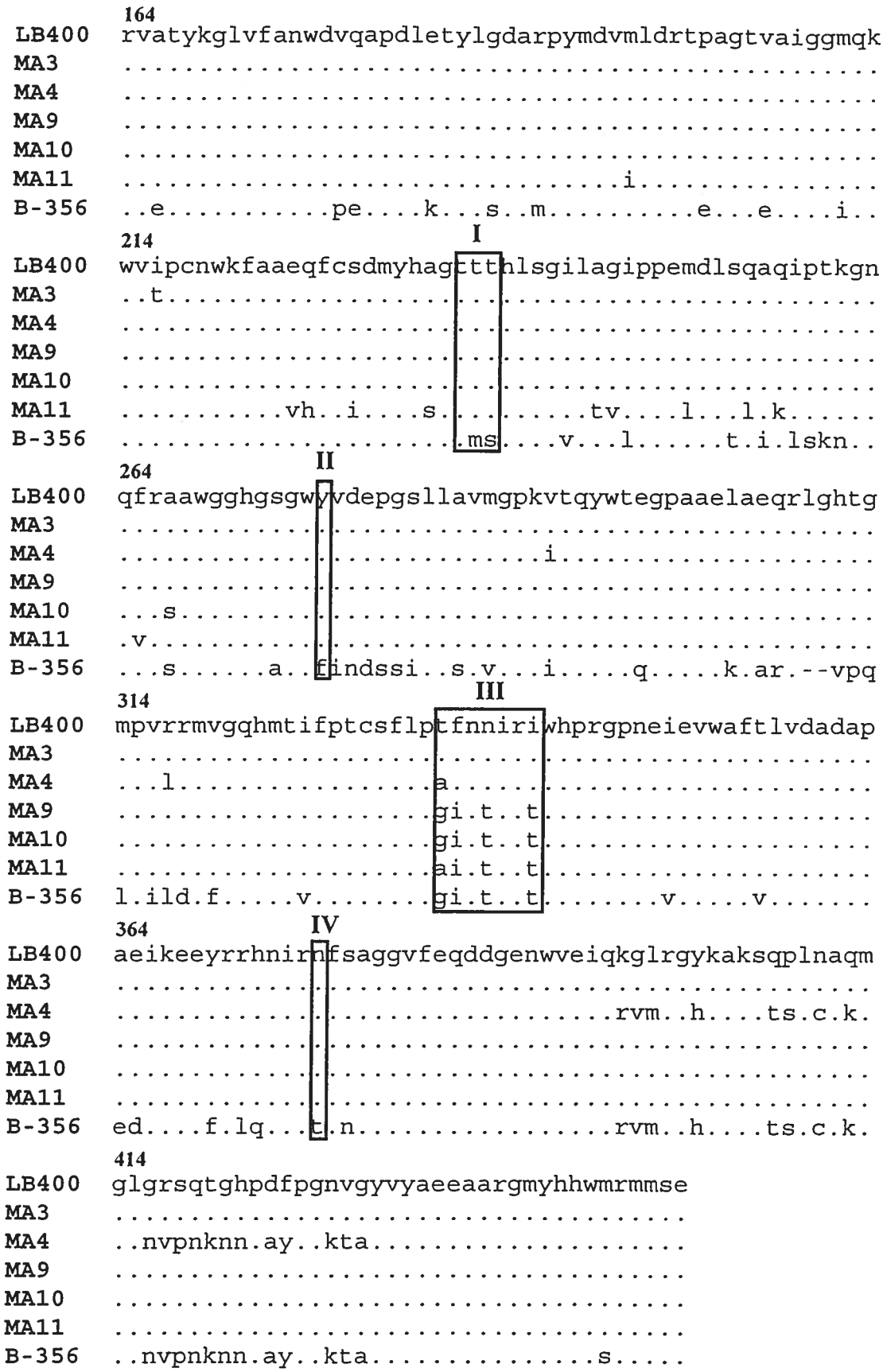

164
LB400 rvatykglvfanwdvqapdletylgdarpymdvmldrtpagtvaiggmqk
MA3 .....
MA4 .....
MA9 .....
MA10 .....
MA11 .....i.....
B-356 ..e.....pe....k...s..m.....e...e....i..
214
I
LB400 wvipcnwkfaaeqfcsdmyhagttthlsgilagippemdlsqaqiptkgn
MA3 ..t.....
MA4 .....
MA9 .....
MA10 .....
MA11 .....vh..i....s.....tv....l...l.k.....
B-356 .....ms....v...l.....t.i.lskn..
264
II
LB400 qfraawgghgsgwyvdepgsllavmgpkvtqywtegpaaelaeqrlghtg
MA3 .....
MA4 .....i.....
MA9 .....
MA10 ...s.....
MA11 .v.....
B-356 ...s.....a..findssi..s.v...i.....q.....k.ar.--vpq
314
III
LB400 mpvrrmvgqhmtifptcsflptfnniriwhprgpneievwaftlvdadap
MA3 .....
MA4 ...l.....a.....
MA9 .....gi.t..t.....
MA10 .....gi.t..t.....
MA11 .....ai.t..t.....
B-356 l.ild.f.....v.....gi.t..t.....v.....v.....
364
IV
LB400 aeikeeyrrhnirnfsaggvfeqddgenwveiqkglrgykaksqplnaqm
MA3 .....
MA4 .....rvm..h....ts.c.k.
MA9 .....
MA10 .....
MA11 .....
B-356 ed....f.lq...t.n.....rvm..h....ts.c.k.
414
LB400 glgrsqtghpdfpgnvgyvyaeeaargmyhhwmrmmse
MA3 .....
MA4 ..nvpnknn.ay..kta.....
MA9 .....
MA10 .....
MA11 .....
B-356 ..nvpnknn.ay..kta.....s.....

Figure 3.14 : Séquence protéique de 288 acides aminés (Arg164 à Glu451) de la portion C-terminale de la sous-unité α des hybrides MA3, MA4, MA9, MA10 et MA11 en comparaison avec les séquences protéiques correspondantes des souches parentales LB400 et B-356. Les régions I à IV, relevées par Mondello et ses collaborateurs (1997), sont identifiées sur la séquence.

La BPDO variante MA3 n'est pas vraiment un hybride, mais un mutant présentant une seule substitution Ile216 par Thr216 sur sa séquence. Finalement, nous pouvons observer, pour l'hybride MA4, une recombinaison, entre des fragments de *bphA* de LB400 et B-356, générée en aval de la région IV soit entre les acides aminés Lys397 et Gly430. Mentionnons, toutefois, que ces séquences nécessitent confirmation.

3.4 Caractérisation des hybrides de seconde génération

Cette stratégie visant à obtenir des hybrides de seconde génération de recombinaison aléatoire *in vitro* à partir de colonies sélectionnées au premier tour a été introduite par Crameri et ses collaborateurs où ils obtinrent des clones présentant une résistance au moxalactam de 3,5 fois supérieure au clone le plus résistant de la première génération (Crameri *et al.*, 1998).

Basé sur cette étude, nous avons appliqué le procédé de la recombinaison aléatoire *in vitro* aux variants les plus actifs obtenus à la première génération. Le procédé fut donc appliqué aux hybrides MA3-4-7-9-10 et 11. Tel que décrit à la section 2.5.2, nous avons amplifié la région *MluI/Avr*II des gènes *bphA* de ces hybrides, que nous avons soumis au procédé de recombinaison aléatoire *in vitro*, et les fragments d'ADN hybrides obtenus furent clonés dans le plasmide pDB31 [*bphAE Avr*II$^+$] préalablement digéré avec les enzymes *Mlu*I et *Avr*II. Ces plasmides ont servi, ensuite, à transformer *E. coli* DH11S portant le plasmide pQE51 [*bphFGB*] puis, le criblage était effectué en recherchant les clones dégradant le 2,2'-CB plus efficacement que les parents. Cette stratégie visait ainsi

à accroître la diversité de la progéniture dans le but d'étendre davantage leur spectre d'activité.

3.4.1 Analyse de la fréquence des variants

La moitié des 11 000 clones testés dans le système de criblage, était capable de transformer le 2,2'-CB en dihydroxy-chlorobiphényle. La fréquence des colonies actives étaient donc de l'ordre de 50%, ce qui était une augmentation considérable de la fréquence des clones actifs comparativement à celle obtenue lors de la première génération. La fréquence de clones actifs fut tellement élevée qu'il était difficile de repérer des clones plus actifs que les six clones qui ont servi de parents. Ainsi, plutôt que de retenir certains clones de deuxième génération, dans le but d'augmenter l'espace exploratoire à analyser, nous avons choisi d'effectuer un passage direct au développement d'hybrides de troisième génération.

3.5 Caractérisation des hybrides de troisième génération

Dans l'optique de poursuivre le criblage de clones ayant une fréquence d'activité accrue envers le 2,2'-dichlorobiphényle ainsi que d'accroître davantage la diversité et le spectre d'activité des BPDO hybrides, nous avons opté pour le développement, par recombinaison aléatoire *in vitro*, d'hybrides BPDO de troisième génération. Afin de forcer les recombinaisons dans les régions de plus faible homologie, l'une des études a porté sur l'utilisation d'une méthodologie élaborée par Kikuchi et ses collaborateurs, où l'étape de fragmentation aléatoire des gènes était effectuée à l'aide d'enzymes de restriction plutôt que de la DNAse (Kikuchi *et al.*, 1999). Nous avons donc utilisé un mélange de fragments de *bphA* de LB400 et de B-356 digérés par divers endonucléases de restriction ainsi que l'ADN des transformants de seconde génération obtenus à partir d'un mélange de l'ADN des hybrides MA3-4-7-9-10 et 11 tel qu'énoncé dans la méthodologie à la section 2.5.4. L'autre étude effectuée simultanément porta sur l'utilisation d'une

partie de la banque d'hybrides de deuxième génération pour créer des hybrides de troisième génération selon la stratégie décrite dans la section 2.5.3.

3.5.1 Analyse de la fréquence des variants

Ainsi, suite au criblage de 6 000 colonies basé sur la production de dihydroxybiphényle à partir du 22'-CB en réponse au procédé de recombinaison aléatoire *in vitro* de troisième génération, nous avons repéré 16 colonies positives par le développement d'une coloration brunâtre équivalente ou plus forte que la souche LB400. Puis, suite au criblage de 6 000 colonies basé sur cette même méthode de sélection, mais en réponse au procédé de recombinaison aléatoire *in vitro* basé sur la méthode développée par Kikuchi et ses collaborateurs (Kikuchi *et al.*, 1999), nous avons repéré 18 colonies positives qui se traduisaient également par le développement d'une coloration brunâtre équivalente ou plus forte que la souche LB400. D'où l'obtention des fréquences de colonies actives en comparaison avec le nombre total de colonies criblées de 0,27% et de 0,3% respectivement. De ce nombre de colonies positives, quatorze clones présentaient une activité accrue envers le 22'-CB comparativement à la souche LB400, soient les variants MC1 à 5 de troisième génération et les variants MD1 à 9 tirés à partir de la méthode de Kikuchi (Kikuchi *et al.*, 1999). Ceux-ci furent retenus pour des études de caractérisation plus approfondies.

La fréquence d'hybrides positifs obtenus est comparable à celle de la première génération et inférieure à celle de la seconde génération. Par conséquent, ces résultats viennent contredire une hypothèse selon laquelle, la fréquence de clones actifs sur le 2,2'-dichlorobiphényle augmenterait avec le nombre de génération de recombinaison aléatoire *in vitro* effectué sur la dioxygénase du biphényle.

3.5.2 Analyse du spectre d'activité avec des cellules entières des hybrides envers des congénères BPC

3.5.2.1 Activité envers l'Aroclor 1242

À partir des BPDO hybrides de troisième génération, nous avons effectué des tests d'activité avec des cellules *E. coli* DH11S entières en présence d'un mélange commercial d'Aroclor 1242. Mentionnons que tous les hybrides de troisième génération MC et MD isolés présentèrent une activité de dégradation similaire à la souche LB400, à l'exception du variant MD8 où nous avons pu observer une activité accrue envers plusieurs congénères BPC du mélange. L'hybride MD8 s'avérait donc un hybride d'intérêt. Une comparaison du pourcentage de dégradation des congénères BPC de l'Aroclor 1242, obtenu par l'hybrides MD8 et LB400, est présentée par la figure 3.15.

Parmi l'ensemble des congénères du mélange d'Aroclor 1242, les congénères BPC d'intérêt furent ceux correspondant au pic de 2,4,5-CB (IUPAC#29), au pic de 2,3',4,5-CB (IUPAC#67) et au pic 2,3,3',5-CB + 2,3,4',5-CB (IUPAC#58,63) qui ne furent pas dégradés par la souche LB400. L'hybride MD8 présenta une activité de dégradation importante envers ces congénères, ce qui révélerait une activité supérieure envers des congénères BPC portant un atome de chlore à la fois en position *ortho* et *meta* sur la molécule de biphényle. Outre les congénères que seul MD8 dégrada, nous avons pu aussi relever les points suivants :

- Le pic correspondant aux congénères 2,3,4'-CB + 2,2',4,6'-CB (IUPAC#22,51) fut davantage dégradé par l'hybride MD8, ce qui démontrerait une capacité de ce mutant à attaquer des congénères dont la position *para* est occupée par un atome de chlore. Cette constatation a pu aussi être tirée avec le pic suivant de 2,3',4-CB (IUPAC#25), 2,4,4'-CB (IUPAC#28) ainsi que le pic de 2,3,3',4-CB + 2,3,4,4'-CB + 2,2',3,4,6'-CB (IUPAC# 56,60,89).
- Finalement, nous avons noté que le pic de 2,2',6-CB (IUPAC#19) a été dégradé davantage par l'hybride MD8.

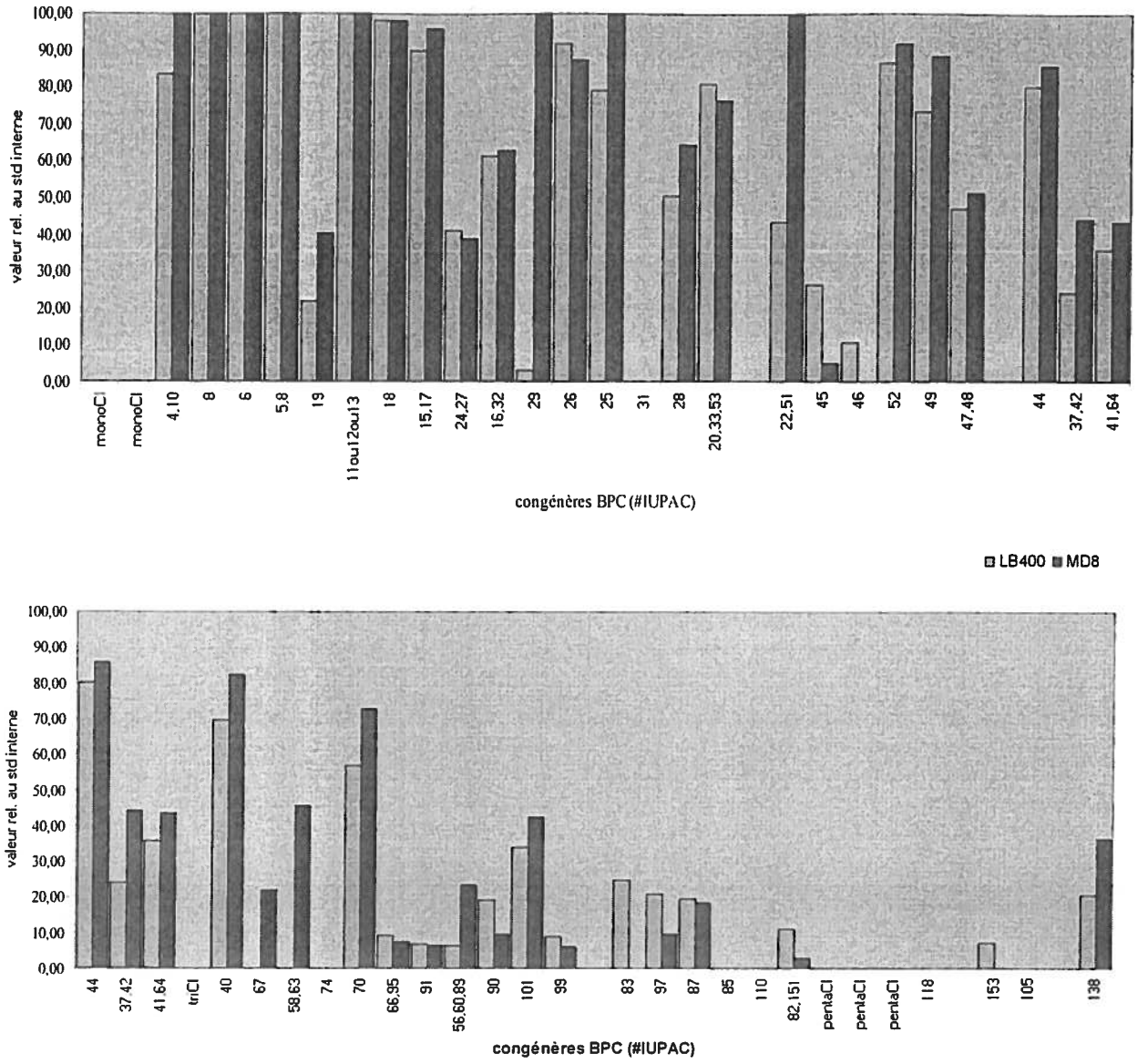
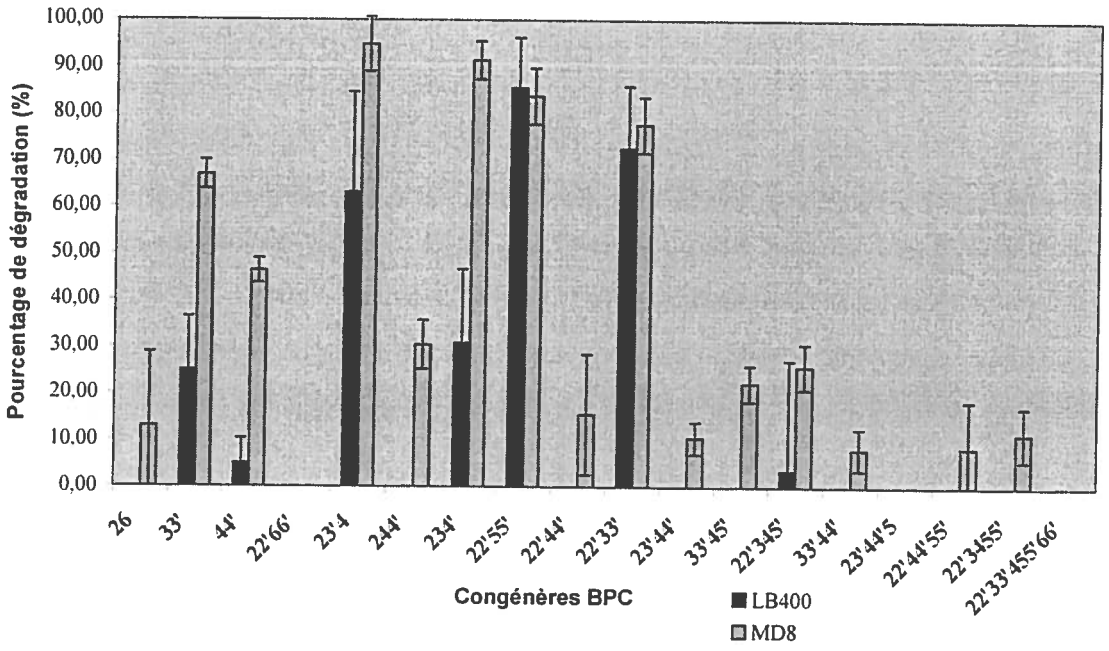


Figure 3.15 : Pourcentage de dégradation de congénères BPC sélectionnés de l'Aroclor 1242 par des cellules induites de *E. coli* DH11S/pDB31 [*bphAE AvrII*$^+$] plus pQE51 [*bphFGB*] exprimant la BPDO hybride MD8 obtenue par recombinaison *in vitro*. Les pourcentages de dégradation furent établis à partir d'expériences effectuées en duplicata. Le standard interne utilisé pour cette étude était le 2,3,3',4'6,-pentachlorobiphényle.

3.5.2.2 Activité envers un mélange de 18 congénères BPC ciblés

À la lumière des résultats de l'activité du variant MD8 sur l'Aroclor 1242, celui-ci fut testé afin d'analyser ses capacités de dégradation envers le mélange synthétique de 18 congénères BPC en comparaison avec la souche LB400. Ces résultats sont présentés par la Figure 3.16.



Figures 3.16 : Dégradation d'un mélange de 18 congénères BPC ciblés par des cellules induites de *E. coli* DH11S/pDB31 [*bphAE AvrII*$^+$]/pQE51 [*bphFGB*] exprimant la BPDO de LB400 comparée à celle exprimant la BPDO de l'hybride MD8. Le protocole d'analyse est décrit à la section 2.12. Les calculs statistiques de cette étude sont basés sur des tests réalisés en triplicata. Le 2,2',3,3',4,5,5',6,6'-nonachlorobiphényle a servi de standard interne.

Ces résultats ont permis d'observer une acquisition d'activité catabolique par l'hybride envers des congénères BPC que la souche LB400 ne dégrade pas soient le 4,4'-dichlorobiphényle, le 2,4,4'-trichlorobiphényle, le 2,2'4,4'-tétrachlorobiphényle et le 2,2'6,6'-tétrachlorobiphényle. De plus, outre ces congénères, l'analyse du graphique nous a permis de constater que le 3,3'-CB, le 2,3',4-CB, le 2,3,4'-CB et le 3,3',4,5'-CB furent davantage dégradés par l'hybride. Finalement, par ces résultats, nous avons supposé que l'hybride MD8 aurait développé une spécialisation d'activité en position 2,3 envers des congénères substitués en *para*.

3.5.3 Analyse de la séquence de l'hybride MD8

Le variant MD8, dont l'ADN plasmidique du vecteur pDB31 [LB400-*bphAE AvrII*+] a été préparé, fut également séquencé dans la région *MluI/AvrII* de *bphA* correspondant à la région modifiée par le procédé de recombinaison aléatoire *in vitro*. Nous avons séquencé 865 pb correspondant au fragment *MluI/AvrII*. La séquence protéique de la sous-unité α codée par ce fragment correspond à 288 acides aminées entre les acides aminés Arg164 et Glu451 (Figure 3.17).

À l'aide de cette séquence, nous avons pu constater que les résidus Thr335 et Phe336 de la BPDO de LB400 furent modifiés par les résidus Ala335 et Ile336. De plus, nous pouvons apercevoir des modifications en amont de la régions III qui ont pu être introduites par PCR. Cependant, nous avons remarquer que, malgré l'utilisation de divers fragments de restriction de *bphA* des souches LB400 et B-356 pour le procédé de DNA shuffling de troisième génération, des recombinaisons importantes n'ont pas eu lieu dans la région *MluI/ScaI*.

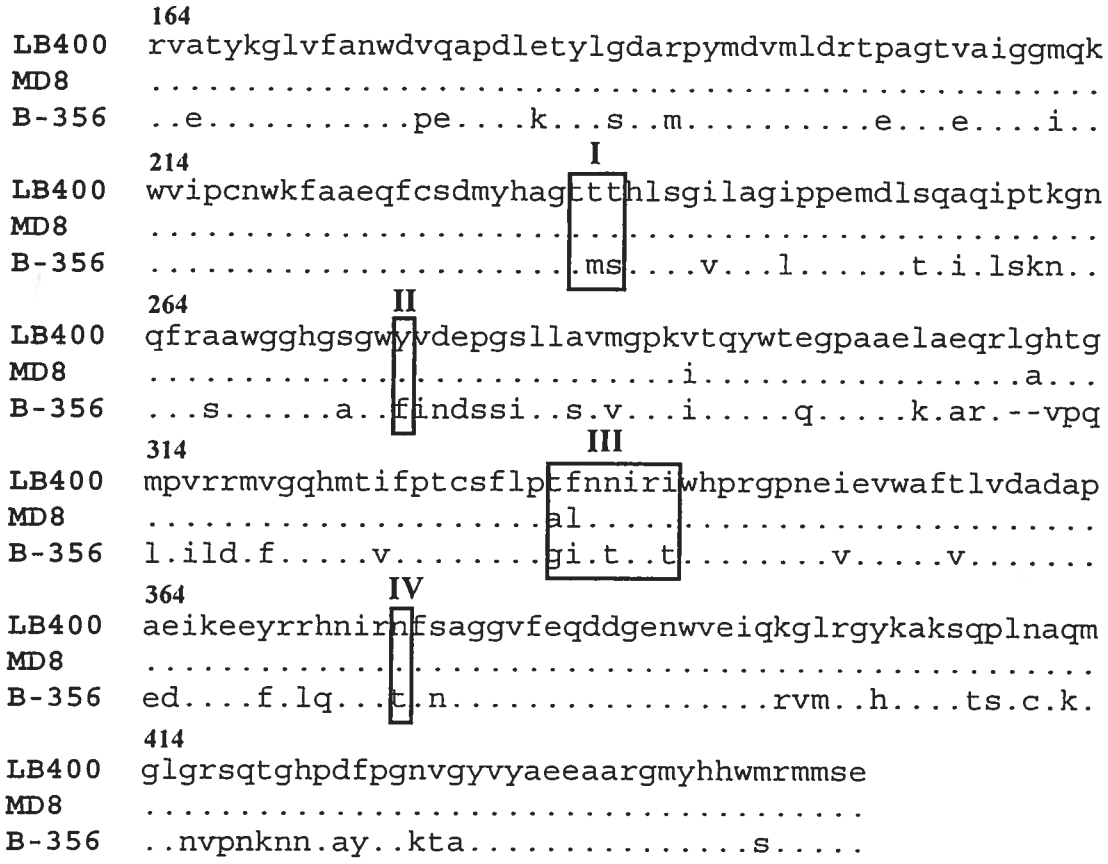


Figure 3.17 : Séquence protéique de 288 acides aminés (Arg164 à Glu451) de la portion C-terminale de la sous-unité α de l'hybride MD8 en comparaison avec les séquences protéiques correspondantes des souches parentales LB400 et B-356. Les régions I à IV, identifiées par Mondello et ses collaborateurs, sont situées sur la séquence (Mondello *et al.*, 1997).

En conclusion, il n'apparaît pas que la troisième génération de variants permet d'accroître significativement l'activité de la BPDO envers des congénères BPC de manière supérieure aux hybrides produits à la première génération contrairement aux résultats présentés par Crameri et ses collaborateurs (Crameri *et al.*, 1998). De plus, l'utilisation du procédé mis au point par Kikuchi et ses collaborateurs (Kikuchi *et al.*, 1999) n'a pas semblé donner des résultats concluants pour ce cas-ci.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

4.1 Analyse de la méthode colorimétrique de criblage comme stratégie de sélection

Dans le premier volet du projet, nous avions pour but de développer une méthode de criblage des clones d'intérêt issus du procédé de recombinaison aléatoire *in vitro*. La méthode sur milieu solide était basée sur la transformation catalytique du 2,2'-dichlorobiphényle en 2,3-dihydroxybiphényle par réaction couplée avec la BPDO et BphB. Nous avons atteint cet objectif en montrant que la méthode peut s'appliquer pour repérer des BPDO variantes dont l'activité envers le 2,2'-CB était supérieure à la souche LB400. Une méthode de dépistage de colonies positives basée sur l'observation de la coloration jaune du HOPDA qui est produit en présence de BphC a déjà été utilisée avec succès dans des études précédentes (Kumamaru *et al.*, 1998; Brühlmann et Chen, 1999). Contrairement à cette méthode, la nôtre permet de dépister des hybrides présentant une activité d'oxygénation sur une variété plus grande de congénères BPC incluant ceux nécessitant une oxygénation en position 3,4 sur le noyau biphényle, puisque que BphB démontre un spectre plus large envers les chlorobiphényles que l'enzyme BphC (Barriault *et al.*, 1999) ce qui constitue une amélioration majeure comparativement à la méthode précédente. Par conséquent, nos travaux de recherche nous indiquent qu'il est possible d'identifier des variants positifs par l'emploi d'une méthode colorimétrique ne requérant pas la présence de BphC. Cependant, la méthode de sélection des hybrides que nous avons développée présentent aussi certaines limites quant à son objectivité étant donné que nos observations sont basées sur une intensité de coloration des colonies selon l'activité catabolique des variants en comparaison avec la souche LB400. Afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats, un deuxième criblage était généralement nécessaire.

Pendant que nous effectuions nos travaux, d'autres méthodes de criblage permettant le dépistage d'oxygénases variantes sans nécessiter l'apport de BphC ont été décrites dans la littérature. L'avantage de ces autres procédés consiste en leur utilisation par microtitration sur plaque. L'une de ces méthodes emploie le réactif de Gibb (2,6-dichloroquinone-4-chloroimide) et a été développée par Quintana et ses collaborateurs pour la détection de composés aromatiques monocycliques (Quintana *et al.*, 1997). Cette méthode a également été employée par Sakamoto et ses collaborateurs dans le cadre d'essais d'évolution dirigée sur la dioxygénase du toluène (Sakamoto *et al.*, 2001). Cependant, contrairement à notre méthode colorimétrique, la méthode employée par Sakamoto et ses collaborateurs ne peut s'appliquer sur des composés aromatiques bicycliques tels que les biphényles polychlorés, car le réactif de Gibbs réagit très faiblement avec les composés bicycliques hydroxylés (Quintana *et al.*, 1997).

Une seconde méthode élaborée sur un principe de fluorescence a aussi été rapportée dans la littérature. La méthode a servi à obtenir par évolution dirigée des hybrides de la monooxygénase P-450 ayant une activité accrue envers le naphtalène (Joo *et al.*, 1999). La méthode est basée sur le couplage de la réaction d'oxygénation à une peroxydase pour générer du peroxyde d'hydrogène qui réagit avec le 1,2-dihydroxynaphtalène pour former un dimère qui émet une fluorescence dont l'intensité est proportionnelle à l'activité catalytique de l'enzyme. Mentionnons que cette méthode a aussi l'avantage d'émettre une fluorescence de couleurs différentes selon les patrons d'hydroxylation du substrat. Bien que cette méthode n'ait pas été développée pour les chlorobiphényles, elle pourrait s'avérer d'un éventuel intérêt pour l'analyse de BPDO ayant une activité accrue envers des congénères BPC.

Il serait intéressant d'envisager une combinaison de notre méthode de criblage qui se fonde sur le métabolisme des BPC en dérivé catéchol avec celle de Joo et ses collaborateurs (Joo *et al.*, 1999) qui se fonde sur la conversion des catéchols en dimères fluorescents afin d'élaborer une méthode de criblage applicable à l'échelle des micropuces. Entre-temps, en combinant notre méthode de criblage actuelle aux tests d'activité catabolique effectués en milieu liquide sur les cellules entières des hybrides en

présence de mélange de BPC, notre approche a permis d'obtenir plusieurs hybrides BPDO d'intérêt.

4.2 Analyse de l'activité catabolique des BPDO hybrides issus du procédé de recombinaison aléatoire *in vitro* sur une région ciblée de *bphA*

Le projet principal avait pour but de démontrer la possibilité d'accroître le potentiel d'action de la BPDO envers des congénères BPC de structures diverses suite à l'augmentation de la réactivité de la BPDO envers un congénère ciblé. Mentionnons d'abord que lors d'expérimentations préliminaires de recombinaison aléatoire *in vitro* entre les gènes *bphA* entiers des souches LB400 et B-356, Barriault et ses collaborateurs ont observé que moins de 1% de la progéniture issue de ces manipulations était active. Ces résultats ont probablement été causés par l'altération du centre Rieske lors du procédé de recombinaison entre des fragments de LB400 et B-356 dans cette région où l'homologie est de l'ordre de 90% (Barriault *et al.*, soumis). C'est pourquoi, en se basant sur la structure tridimentionnelle de la dioxygénase du naphtalène apparentée à la BPDO, nous avons appliqué le procédé de recombinaison aléatoire *in vitro* en ciblant la portion C-terminale de la sous-unité α qui est directement impliquée au niveau de l'activité catabolique de la BPDO. Suite au criblage de la progéniture sur le 22'-CB, nous avons identifié cinq hybrides d'intérêt. Ces résultats montrent qu'il est possible d'obtenir des BPDO à spectre d'activité accrue envers les BPC en altérant la portion C-terminale de BphA. En réduisant la portion de la protéine à altérer, cette stratégie permet de réduire statistiquement, le nombre de clones qu'il est nécessaire de cribler pour trouver des clones plus actifs que les parents.

Les hybrides obtenus dans ce travail montraient une activité catalytique envers un mélange de congénères BPC ciblés et envers l'Aroclor 1242 qui était supérieure à la BPDO de la souche parentale LB400. De plus, l'évaluation des capacités catalytiques des BPDO hybrides nous a permis de constater que certains hybrides s'étaient spécialisés pour la dégradation de certains congénères alors que d'autres hybrides présentaient un

potentiel catalytique accru envers un éventail plus large de congénères BPC. Mentionnons également que si aucune souche sauvage n'a été répertoriée dans la littérature comme étant en mesure de dégrader les quatre congénères BPC, 2,2'-CB, 3,3'-CB, 4,4'-CB et 2,2'5,5'-CB, les BPDO hybrides LB400/B-356, MA9, MA11 et MD8, ont démontré cette capacité lors des analyses en milieu liquide. De plus, nous pouvons observer un accroissement de l'activité de BPDO hybrides envers des congénères BPC fortement chlorés (tétra- à hexachlorés) provenant de l'Aroclor 1242. Cependant, contrairement à certains autres BPDO hybrides, MA10 était incapable d'oxygéner le 3,3'-CB et le 4,4'-CB. L'observation la plus intéressante chez certains de ces hybrides demeure, néanmoins, l'acquisition d'une activité envers des congénères BPC non dégradés par la BPDO de LB400 comme le 4,4'-dichlorobiphényle, le 2,2'6,6'-tétrachlorobiphényle ainsi que le 2,6-dichlorobiphényle. À ce jour, aucune souche connue n'est en mesure de cataboliser ce dernier congénère (Maltseva *et al.*, 1999). La détection par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a été démontrée de manière évidente suite à l'observation des métabolites hydroxylés du 2,6-CB par la BPDO hybride MA9 en mesure de le métaboliser. D'autres recherches portant sur le développement de BPDO hybrides à partir des BPDO homologues de LB400 et de KF707 ont aussi démontré l'acquisition d'une activité métabolique correspondante à l'activité des deux souches parentales (Brühlmann et Chen, 1999 ; Kimura *et al.*, 1997). Ces hybrides étaient en mesure d'oxyder le 2,2'-CB et le 4,4-CB et de catalyser la 3,4-dioxygénation du 2,2'5,5'-CB (Suenaga *et al.*, 1999). Cependant, la capacité de BPDO hybrides à oxygéner le 3,3'-CB ainsi que le 2,6-CB n'a jamais été rapportée ou analysée.

Mentionnons que des études antérieures, portant sur l'analyse du potentiel catalytique de la BPDO en milieu liquide en présence de congénères BPC, ont rapporté les phénomènes d'évaporation et d'adsorption possible des congénères faiblement chlorés présents dans le milieu réactionnel (Bedard *et al.*, 1986). En ce sens, nous avons pu constater, sur les graphiques de la Figure 3.2 de la section résultats, certains écart-types plus élevés résultant de la dégradation des congénères faiblement chlorés comme le 2,6-CB, le 3,3'-CB ainsi que le 4,4'-CB dont une légère évaporation de ces congénères pourrait en être la cause. La méthode expérimentale devra être retravaillée en ce sens.

cas des observations pour les BPDO hybrides effectuées pour ce projet, l'activité de dégradation de certains hybrides envers ces congénères fut largement supérieure comparativement à la souche parentale LB400 et nous en concluons que ce phénomène d'évaporation de congénères BPC du mélange réactionnel demeure relativement négligeable.

Une caractérisation de l'activité d'enzymes purifiées par chromatographie d'affinité nous a permis d'observer que le mode d'attaque du 22'CB peut varier selon l'hybride et nous avons été en mesure d'obtenir des évidences indiquant que cette variation pourrait être causée par un phénomène de découplage de la réaction d'oxygénation. Ce découplage entraînerait la production de peroxyde d'hydrogène dont la présence peut initier une réaction de polymérisation des catéchols en composés qui ne pourraient pas être catabolisés par l'enzyme BphC. Des résultats similaires antérieures révèlent que la dioxygénase du naphtalène, qui est fortement apparentée à la BPDO, est inactivée en présence de peroxyde (Lee, 1999). Nous avons clairement démontré l'effet inhibiteur du peroxyde sur la BPDO en montrant une réduction de la production de HOPDA lorsque la réaction de BPDO était couplé à BphC en présence de peroxyde. Finalement, ces observations concordent avec les études rapportées par Imbeault et ses collaborateurs qui ont démontré la production du peroxyde d'hydrogène dans le milieu réactionnel par la dioxygénase du biphényle (Imbeault *et al.*, 2000) ainsi qu'avec ceux de Schweigert et ses collaborateurs pour leurs recherches portant sur la polymérisation des catéchols (Schweigert *et al.*, 2001). Compte tenu des résultats obtenus au cours du projet, il faudra ainsi élaborer des stratégies d'ingénierie visant à obtenir une BPDO à spectre d'activité élargie qui puisse effectuer sa réaction catalytique sans découplage des électrons de la BPDO tout en conservant les capacités initiales de l'enzyme.

Il n'en demeure pas moins que l'ensemble des observations et des analyses enzymologiques effectuées permettent d'appuyer l'hypothèse initiale selon laquelle il est possible, par l'utilisation du procédé de recombinaison aléatoire *in vitro*, d'accroître le potentiel d'action de la BPDO envers divers congénères BPC persistants dans

l'environnement suite à l'augmentation de sa réactivité envers un congénère ciblé tel que le 22'-CB.

Finalement, l'un des aspects du projet a porté sur l'analyse des séquences des hybrides d'intérêt dans le but de mettre en relation les changements au niveau de l'activité catabolique des BPDO hybrides en fonction des régions modifiées sur la séquence de *bphA*. La portion C-terminale de la sous-unité α fut ciblée lors du procédé de recombinaison aléatoire *in vitro* et il est intéressant de constater que les BPDO hybrides obtenues présentent principalement des modifications de séquence dans la région III de *bphA* qui a été identifiée par Mondello et ses collaborateurs comme étant une région critique impliquée dans l'activité catalytique de l'enzyme (Mondello *et al.*, 1997). Notons, cependant, qu'entre les variants MA9 et MA10, malgré la similitude au niveau de leur séquence dans la région III (-GINTIRT-), correspondant aux résidus 335 à 341 de la séquence protéique de B-356, ainsi que dans la région IV identifiée par l'Asn377, nous avons pu observer des spécificités enzymatiques distinctes chez ces hybrides. Nous pouvons toutefois constater que la seule différence dans la séquence en acides aminées entre ces deux hybrides consiste en la substitution Ser267Ala présente chez l'hybride MA10. Une sérine provenant de la recombinaison avec B-356. Il se pourrait donc que cette sérine ait un rôle inhibiteur important au niveau de l'activité catabolique de la BPDO, puisque l'hybride MA10 présente une activité catabolique beaucoup plus faible que l'hybride MA9. Des comparaisons peuvent également être effectuées entre nos hybrides et ceux tirés d'autres expérimentations, par exemple, avec l'hybrides BDE335-5 décrit par Mondello (Mondello *et al.*, 1997). En effet, en dehors des treize acides aminés constituant l'étiquette histidine ainsi que la modification de l'Arg453 de l'hybrides MA10 pour la Ser453 de BDE335-5 résultant de la mutation dans la région distale de *bphA* pour l'introduction du site *Avr*II, nous constatons que l'unique différence entre ces deux hybrides consiste au remplacement de l'Ala267 pour la sérine de B-356 chez MA10. Cependant, contrairement à l'hybride MA10, le mutant BDE335-5 est en mesure d'hydroxyler efficacement le 4,4'-dichlorobiphényle (Mondello *et al.*, 1997). Ces deux observations évidentes laissent donc supposer que des modifications de certains acides aminées à l'extérieure des régions III et IV influenceraient la spécificité de la BPDO. En

somme, la modification d'un seul résidu d'acide aminé est suffisante pour changer l'éventail de BPC oxydés par certaines BPDO, mais le résultat dépend de la structure entière de l'enzyme. À l'heure actuelle, des analyses moléculaires ne nous permettent pas de déterminer quelles modifications dans la structure de l'enzyme sont responsables des nouveaux phénotypes. Toutefois, nos travaux corroborent l'implication de la région III de Mondello, car tous les hybrides d'intérêt générés lors de nos recherches présentent des altérations dans cette région. De plus, nous savons que les acides aminés de la NDO correspondants à la région III de la BPDO sont situés au niveau de la poche catalytique et que leur emplacement expliquerait leur implication au niveau de la spécificité de l'enzyme. Cependant, il semble que d'autres résidus influencent la spécificité de la BPDO envers un substrat et plus amples investigations employant des essais de mutagénèse dirigée pourraient permettre d'identifier les divers arrangements et combinaisons de séquences d'acides aminés qui influenceraient la spécificité de l'enzyme. Il est, par contre, intéressant de constater le potentiel du procédé d'évolution *in vitro* visant à accroître le spectre d'activité de la BPDO, puisque les modifications subies par les BPDO hybrides dans cette région III ont permis d'augmenter l'éventail de congénères BPC catabolisés par l'enzyme.

Finalement, mentionnons que des recherches supplémentaires ont été effectuées au cours de ce projet dans le but d'améliorer le potentiel d'activité de BPDO variantes par différentes stratégies de recombinaison aléatoire *in vitro* appliquées aux générations subséquentes. Cependant, selon nos résultats, il n'apparaît pas que des générations supplémentaires de variants permettent d'accroître significativement l'activité de la BPDO envers des congénères BPC de manière supérieure aux hybrides produits à la première génération. En effet, la fréquence du nombre de variants actifs en présence du 2,2'-CB, dont l'activité fut supérieure à la souche parentale LB400, entre les générations 1 et 3 fut similaire soit de l'ordre de 0,3-0,4%. Nos résultats viennent donc à l'encontre des résultats présentés précédemment par Crameri et ses collaborateurs qui observaient un accroissement important de l'activité d'hybrides au cours des générations subséquentes d'évolution *in vitro* (Crameri *et al.*, 1998). Par contre, nous avons observé une augmentation d'environ 50% du nombre total de clones positifs sur le 2,2'-CB lors de la

deuxième et troisième génération ce qui constitue, sans aucun doute, un point positif de cette procédure. De plus, nous avons également constaté que l'utilisation du procédé mis au point par Kikuchi et ses collaborateurs (Kikuchi *et al.*, 1999) dans le but d'accroître les possibilités de recombinaisons dans des régions de plus faibles homologies n'a pas semblé donner de résultats significatifs lors de la réalisation de la troisième génération de variants au cours de ces recherches. Nous avons remarqué effectivement que, malgré l'utilisation de fragments de restriction multiples de *bphA* des souches LB400 et B-356 pour le procédé de recombinaison aléatoire *in vitro*, des recombinaisons majeures n'ont pas eu lieu dans la région en amont du site de restriction *Sca*I. En conclusion, à la lumière des variants générés lors de ces différentes stratégies, d'autres alternatives doivent être envisagées dans le but d'augmenter la diversité des recombinaisons sur des portions de *bphA* afin d'accroître davantage l'activité de BPDO hybrides envers d'autres congénères BPC persistants.

CONCLUSION

Pour le premier volet du projet, nous avions pour but de développer une méthode de criblage sur milieu solide basé sur la transformation du 2,2'-dichlorobiphényle en 2,3-dihydroxybiphényle catalysée par la BPDO et BphB afin de repérer des clones d'intérêt issus du procédé de recombinaison aléatoire *in vitro* en mesure de dégrader ce congénère plus efficacement que la BPDO de LB400. Nous avons atteint cet objectif en repérant six variants, MA3-4-7-9-10 et 11, de première génération ainsi que le variant MD8, de troisième génération dont l'activité envers le 22'-CB était supérieure à la souche LB400.

Nous avons, par la suite, évalué les capacités catalytiques de ces BPDO hybrides envers divers congénères BPC présents dans l'Aroclor 1242 ainsi que dans un mélange de congénères BPC sélectionnés afin de vérifier s'il était possible d'étendre le champ d'activité catabolique de ces variants envers des congénères BPC de structures différentes. Suite à ces analyses, nous pouvons effectivement remarquer que les BPDO variantes ont accrû leur éventail de chlorobiphényles dégradés comparativement à la BPDO de la souche parentale LB400. Par exemple, nous avons observé une augmentation d'activité envers des congénères BPC fortement chlorés (tétra- à hexachlorés). La constatation la plus intéressante consiste cependant à l'acquisition d'une activité importante des hybrides envers des congénères BPC non dégradés par la BPDO de LB400 comme le 4,4'-dichlorobiphényle et le 2,2'6,6'-tétrachlorobiphényle ainsi qu'envers le 2,6-dichlorobiphényle qui est, à ce jour, un congénère qu'aucune souche connue n'est en mesure de cataboliser (Maltseva *et al.*, 1999). L'activité envers ce congénère a d'ailleurs été démontrée de manière évidente par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse suite à l'observation des métabolites du 2,6-CB produits par la BPDO hybride MA9.

Nous avons également identifié une cause possible de la variation de l'activité des BPDO hybrides purifiées en présence du 22'-CB qui consiste en un phénomène de découplage de l'activité enzymatique menant à une production de peroxyde pouvant causer une polymérisation du catéchol que l'enzyme BphC ne peut, par la suite,

métaboliser. Malgré le développement qu'il reste à faire afin d'élargir le spectre d'activités de la BPDO et de conserver les capacités de l'enzyme sans mener à ce phénomène de découplage, l'ensemble des résultats obtenus permettent ainsi d'appuyer l'hypothèse initiale selon laquelle il est possible d'accroître le potentiel d'action de la BPDO envers divers congénères BPC persistants dans l'environnement suite à l'augmentation de sa réactivité envers un congénère ciblé tel que le 22'-CB.

Le second volet du projet a porté sur l'analyse des séquences des hybrides d'intérêt dans le but de mettre en relation les changements au niveau de l'activité catabolique des BPDO hybrides en fonction des régions modifiées sur la séquence de *bphA*. La portion C-terminale de la sous-unité α fut ciblée lors du procédé de recombinaison aléatoire *in vitro* et il est intéressant de constater que les BPDO hybrides obtenus présentent principalement des modifications de séquence dans la région III qui a été identifiée par Mondello et ses collaborateurs comme étant une région critique impliquée qui affecte les capacités catalytiques de la BPDO envers les congénères BPC (Mondello *et al.*, 1997). Il est intéressant de constater le potentiel du procédé d'évolution *in vitro* visant à accroître le spectre d'activité de la BPDO, puisque les modifications subies par les BPDO hybrides dans cette région comprise entre les résidus 335 et 341 ont permis d'augmenter l'éventail de congénères BPC dégradés par l'enzyme.

Finalement, mentionnons que des recherches supplémentaires ont été effectuées au cours de ce projet de recherche dans le but d'améliorer le potentiel d'activité de BPDO variantes par différentes stratégies appliquées au procédé de recombinaison aléatoire *in vitro*. À la lumière des résultats obtenus, d'autres alternatives visant à augmenter la diversité des recombinaisons sur des portions de *bphA* pour accroître davantage l'activité de BPDO hybrides envers d'autres congénères BPC sont envisagées et présentement en cours au laboratoire.

BIBLIOGRAPHIE

ABRAMOWICZ, D. A. 1990. «Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs : a review». Critical Review in Biotechnology, vol. 10, p. 241-249.

ABRAMOWICZ, D. A. 1994. «Aerobic PCB biodegradation and anaerobic PCB dechlorination in the environment». Research in microbiology, vol. 145, no. 1, p. 42-46.

ABRAMOWICZ D. A., et D. R. Olson. 1995. «Accelerated biodegradation of PCBs». CHEMTECH, vol. 24, p. 36-41.

AHMAD D., R. Massé et M. Sylvestre. 1990. «Cloning and expression of genes involved in 4-chlorobiphenyl transformation by *Pseudomonas testosteroni* : homology to polychlorobiphenyl-degrading genes in other bacteria». Gene, vol. 86, no. 1, p. 53-61.

AHMAD D., M. Sylvestre et M. Sondossi. 1991. «Subcloning of bph genes from *Pseudomonas testosteroni* B-356 in *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli* : evidence for dehalogenation during initial attack on chlorobiphenyls». Applied and Environmental Microbiology, vol. 57, no. 10, p. 2880-2887.

ANONYME, Office of pollution Prevention and toxics, United States Environmental Protection Agency. 2001. Welcome to the PCB Home Page at EPA, http://www.epa.gov/opptintr/pcb/

ANONYME, Office of water (WH-585), United States Environmental Protection Agency. 1993. Selecting remediation techniques for contaminated sediment. Chapitre III, EPA-823-B93-001, p. 33-71.

ARNETT C. M., J. V. Parales et J. D. Haddock. 2000. «Influence of chlorine substituents on rates of oxidation of chlorinated biphenyls by the biphenyl dioxygenase of *Burkholderia* sp. strain LB400». Applied and Environmental Microbiology, vol. 66, no. 7, p. 2928-2933.

ASTURIAS J.A., E. Diaz et K.N. Timmins. 1995. «The evolutionary relationship of biphenyl dioxygenase from gram-positive *Rhodococcus globerulus* P6 to multicomponent dioxygenases from gram-negative bacteria». Gene, vol. 156, p. 11-18.

AOKI, Y. 2001. «Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, and polychlorinated dibenzofurans as endocrine disrupters-What we have learned from Yusho disease». Environmental Research Section A, vol. 86, p. 2-11.

BARRIAULT D., H. Chatel et M. Sylvestre. «Characterization of hybrid biphenyl dioxygenases obtained by recombining *Burkholderia cepacia* strain LB400 *bphA* with the homologous gene of *Comamonas testosteroni* strain B-356». Soumis.

BARRIAULT D., J. Durand, H. Maaroufi, L. D. Eltis et M. Sylvestre. 1998. «Degradation of polychlorinated biphenyl metabolites by naphthalene-catabolizing enzymes». Applied and Environmental Microbiology, vol. 64, no. 12, p. 4637-4642.

BARRIAULT D., C. Pelletier, Y. Hurtubise et M. Sylvestre. 1997. «Substrate selectivity pattern of *Comamonas testosteroni* strain B-356 towards dichlorobiphenyls». International Biodeterioration & Biodegradation, vol. 39, p. 311-316.

BARRIAULT D. et M. Sylvestre. 1993. «Factors affecting PCB degradation by an implanted bacterial strain in soil microcosms». Canadian Journal of Microbiology, vol. 39, no. 6, p. 594-602.

BARRIAULT D. et M. Sylvestre. 1999a. «A ColE1-compatible expression vector for the production of His-tagged fusion proteins». Antonie Van Leeuwenhoek, vol. 75, p. 293-297.

BARRIAULT D. et M. Sylvestre. 1999b. «Functionality of biphenyl 2,3-dioxygenase components in naphthalene 1,2-dioxygenase». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 51, p. 592-597.

BEDARD D. L. et M. L. Haberl. 1990. «Influence of chlorine substitution pattern on the degradation of polychlorinated biphenyls by eight bacterial strains». Microbial Ecology, vol. 20, p. 87-102.

BEDARD D. L., R. Unterman, L. H. Bopp, M. J. Brennan, M. L. Haberl et C. Johnson. 1986. «Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade polychlorinated biphenyls». Applied and Environmental Microbiology, vol. 51, no. 4, p. 761-768.

BEDARD D. L., R. E. Wagner, M. J. Brennan, M. L. Haberl et J. F. Brown Jr. 1987. «Extensive degradation of Aroclors and environmentally transformed polychlorinated biphenyls by *Alcaligenes eutrophus* H850». Applied and Environmental Microbiology, vol. 53, no. 5, p. 1094-1102.

BÉLAND P., S. DeGuise, C. Girard, C. Lagacé, D. Martineau, R. Michaud, D. C. G. Muir, R. J. Norstrom, É. Pelletier, S. Ray et L. R. Shugart. 1993. «Toxic compounds and health reproductive effects in St-Lawrence beluga whales». Journal of Great Lakes Research, vol. 19, no. 4, p. 766-775.

BERGERON J., D. Ahmad, D. Barriault, A. Larose, M. Sylvestre et J. Powlowski. 1994. «Identification and mapping of the gene translation products involved in the first steps of the *Comamonas testosteroni* B-356 biphenyl/chlorobiphenyl biodegradation pathway». Canadian Journal of Microbiology, vol. 40, no. 9, p. 743-753.

BLACKBURN J. W. et W. R. Hafker. 1993. «The impact of biochemistry, bioavailability and bioactivity on the selection of bioremediation techniques». Tibtech, vol. 11, p. 328-333.

BOPP, L. H. 1986. «Degradation of highly chlorinated PCBs by *Pseudomonas* strain LB400». Journal of Industrial Microbiology, vol. 1, p. 23-29.

BOSMA T., E. Kruizinga, E. J. de Bruin, G. J. Poelarends et D. B. Janssen. 1999. «Utilization of trihalogenated propanes by *Agrobacterium radiobacter* AD1 through heterologous expression of the haloalkane dehalogenase from *Rhodococcus* sp. strain M15-3». Applied and Environmental Microbiology, vol. 65, no. 10, p. 4575-4581.

BROWN JR. J. F., R. W. Lawton, M. R. Ross et J. Feingold. 1991. «Assessing the human health effects of the PCBs». Chemosphere, vol. 23, nos. 11-12, p. 1811-1815.

BRÜHLMANN F. et W. Chen. 1999. «Transformation of polychlorinated biphenyls by a novel BphA variant through the *meta*-cleavage pathway». FEMS Microbiology Letters, vol. 179, no. 2, p. 203-208.

BRÜHLMANN F. et W. Chen. 1999. «Tuning biphenyl dioxygenase for extended substrate specificity». Biotechnology and Bioengineering, vol. 63, no. 5, p. 544-551.

BUMPUS J. A., M. Tien, D. Wright et S. D. Aust. 1985. «Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus». Science, vol. 228, no. 4706, p. 1434-1436.

BUTLER C. S., et J. R. Mason. 1997. «Structure-function analysis of the bacterial aromatic ring-hydroxylating dioxygenases». Advances in Microbial Physiology, vol. 38, p. 47-84.

Canadian Council of Resources Ministers of the environment (CCREM). 1987. Canadian Water Quality Guidelines. Environment Canada

CARRIER, G. 1991. Réponse de l'organisme humain aux BPC, dioxines et furannes et analyses des risques toxiques. Québec : Édition Le Passeur, 484p.

CARREDANO E., B. Kauppi, D Choudhury et S Ramaswamy. 2000. «Pseudo-symmetry characterization and refinement of a trigonal crystal form of naphthalene 1,2-dioxygenase». Acta Crystallographica section D Biological Crystallography, vol. 56, part 3, p. 313-321.

CHEBROU H., Y. Hurtubise, D. Barriault et M. Sylvestre. 1999. «Heterologous expression and characterization of the purified oxygenase component of *Rhodococcus globerulus* P6 biphenyl dioxygenase and of chimeras derived from it». Journal of Bacteriology, vol. 181, no. 16, p. 4805-4811.

CHEN W., F. Brühlmann, R. D. Richins et A. Mulchandani. 1999. «Engineering of improved microbes and enzymes for bioremediation». Current Opinion in Biotechnology, vol. 10, p. 137-141.

CHERRY, J. R. 2000. «Directed evolution of microbial oxydative enzymes». Current Opinion in Biotechnology, vol. 11, p. 250-254.

CHIARENZELLI J., R. Scrudato, M. Wunderlich et D. Rafferty. 1995. «Photodecomposition of PCB absorbed on sediments and industrial wastes : implication for photocatalytic treatment of contaminated solids». Chemosphere, vol. 31, p. 3259-3272.

CRAMERI A., E. A. Whitehorne, E. Tate et W. P. Stemmer. 1996. «Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling». Nature Biotechnology, vol. 14, no. 3, p. 315-319.

CRAMERI A., G. Dawes, E. Rodriguez, S. Silver et W. P. C. Stemmer. 1997. «Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway DNA shuffling». Nature Biotechnology, vol. 15, no. 5, p. 436-438.

CRAMERI A., S. A. Raillard, E. Bermudez, W. P. C. Stemmer. 1998. «DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution». Nature, vol. 391, p. 288-291.

DIETRICH D., W. J. Hickey et R. Lamar. 1995. «Degradation of 4,4'-dichlorobiphenyl, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl, and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*». Applied and Environmental Microbiology, vol. 61, no. 11, p. 3904-3909.

ELTIS L.D., B. Hofmann, H.J. Hecht, H. Lunsdorf et K.N. Timmis. 1993. «Purification and crystallization of 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase». Journal of Biological Chemistry, vol. 268, no. 4, p. 2727-2732

ENVIRONNEMENT CANADA. 2000. Bulletin de promotion de la conformité (PROCONF), http://www.on.ec.gc.ca/epb/fpd/fr/cpb/

ERICKSON B. D. et F. J. Mondello. 1992. «Nucleotide sequencing and transcriptional mapping of the genes encoding biphenyl dioxygenase, a multicomponent polychlorinated-biphenyl-degrading enzyme in *Pseudomonas* strain LB400». Journal of Bacteriology, vol. 174, no. 9, p. 2903-2912.

ERICKSON B. D. et F. J. Mondello. 1993. «Enhanced biodegradation of polychlorinated biphenyls after site-directed mutagenesis of a biphenyl dioxygenase gene». Applied and Environmental Microbiology, vol. 59, no. 11, p. 3858-3862.

FAIN M. G. et J. D. Haddock. 2001. «Phenotypic and phylogenetic characterization of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *sp.* Strain LB400». Current Microbiology, vol. 42, no. 4, p. 269-275.

FRAME G. M., R. E. Wagner, J. C. Carnahan, J. F. Brown Jr., R. J. May, L. A. Smullen et D. L. Bedard. 1996. «Comprehensive, quantitative, congener-specific analyses of eight Aroclors and complete PCB congener assignments on DB-1 capillary GC columns». Chemosphere, vol. 33, no. 4, p. 603-623.

FUOCO R., M. P. Colombini, A. Ceccarini et C. Abete. 1996. «Polychlorinated biphenyls in Antartica». Microchemical Journal, vol. 54, p. 384-390.

FURUKAWA, K. 1982. Microbial degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs). *In* Biodegradation and detoxification of environmental pollutants. Boca Raton, Florida : Chakrabarty, A.M. Edition, CRC Press, p. 33-57.

FURUKAWA K., J. Hirose, A. Suyama, T. Zaiki et S. Hayashida. 1993. «Gene components responsible for discrete substrate specificity in the metabolism of biphenyl (*bph* operon) and toluene (*tod* operon)». Journal of Bacteriology, vol. 175, no. 16, p. 5224-5232.

FURUKAWA K. et T. Miyazaki. 1986. «Cloning of a gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*». Journal of Bacteriology, vol. 166, no. 2, p. 392-398.

GIBSON D. T., D. L. Cruden, J. D. Haddock, G. J. Zylstra et J. M. Brand. 1993. «Oxidation of polychlorinated biphenyls by *Pseudomonas* sp. strain LB400 and *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707». Journal of Bacteriology, vol. 175, no. 14, p. 4561-4564.

GUILBEAULT B., M. Sondossi, D. Ahmad et M. Sylvestre. 1994. «Factors affecting the enhancement of PCB degradative ability in soil microbial populations». International Biodeterioration & Biodegradation, vol. 33, p. 73-91.

HADDOCK J. D. et D. T. Gibson. 1995. «Purification and characterization of the oxygenase component of biphenyl 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain LB400». Journal of Bacteriology, vol. 177, no. 20, p. 5834-5839.

HADDOCK J. D., J. R. Horton et D. T. Gibson. 1995. «Dihydroxylation and dechlorination of chlorinated biphenyls by purified biphenyl 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain LB400». Journal of Bacteriology, vol. 177, no. 1, p. 20-26.

HADDOCK J. D., L. M. Nadim et D. T. Gibson. 1993. «Oxidation of biphenyl by a multicomponent enzyme system from *Pseudomonas* sp. strain LB400». Journal of Bacteriology, vol. 175, no. 2, p. 395-400.

HARKNESS M. R., J. B. McDermott, D. A. Abramowicz, J. J. Salvo, W. P. Flanagan, M. L. Stephens, F. J. Mondello, R. J. May, J. H. Lobos, K. M. Carroll, M. J. Brennan, A. A. Bracco, K. M. Fish, G. L. Warner, P. R. Wilson, D. K. Dietrich, D. T. Lin, C. B. Morgan et W. L. Gately. 1993. «*In situ* stimulation of aerobic PCB biodegradation in Hudson river sediment». Science, vol. 259, p. 503-507.

HEIN P., J. Powlowski, D. Barriault, Y. Hurtubise, D. Ahmad et M. Sylvestre. 1998. «Biphenyl-associated *meta*-cleavage dioxygenases from *Comamonas testosteroni* B-356». Canadian Journal of Microbiology, vol. 44, no. 1, p. 42-49.

HIROSE J., A. Suyama, S. Hayashida et K. Furukawa. 1994. «Construction of hybrid biphenyl (*bph*) and toluene (*tod*) genes for functional analysis of aromatic ring dioxygenases». Gene, vol. 138, p. 27-33.

HURTUBISE Y., D. Barriault, J. Powlowski et M. Sylvestre. 1995. «Purification and characterization of the *Comamonas testosteroni* B-356 biphenyl dioxygenase components». Journal of Bacteriology, vol. 177, no. 22, p. 6610-6618.

HURTUBISE Y., D. Barriault et M. Sylvestre. 1996. «Characterization of active recombinant His-tagged oxygenase component of *Comamonas testosteroni* B-356 biphenyl dioxygenase». Journal of Biological Chemistry, vol. 271, no. 14, p. 8152-8156.

HURTUBISE Y., D. Barriault et M. Sylvestre. 1998. «Involvement of the terminal oxygenase beta subunit in the biphenyl dioxygenase reactivity pattern toward chlorobiphenyls». Journal of Bacteriology, vol. 180, no. 22, p. 5828-5835.

HUTZINGER O., G. G. Choudhry, B. G. Chittim et L. E. Johnston. 1985. «Formation of polychlorinated dibenzofurans and dioxins during combustion, electrical equipment fires and PCB incineration». Environmental Health Perspectives, vol. 60, p. 3-9.

HUTZINGER O., S. Safe et V. Zitko. 1972. «Polychlorinated biphenyls». Research Notes (Analabs), vol. 12, no. 2, p. 1-11.

HUTZINGER O., S. Safe et V. Zitko. 1974. The chemistry of PCBs. Cleveland, Ohio : CRC Press. 269p.

HRYWNA Y., T. V. Tsoi, O. V. Maltseva, J. F. Quensen 3rd et J. M. Tiedje. 1999. «Construction and characterization of two recombinant bacteria that grow on *ortho*- and *para*-substituted chlorobiphenyls». Applied and Environmental Microbiology, vol. 65, no. 5, p. 2163-2169.

IMBEAULT N. Y. R., J. B. Powlowski, C. L. Colbert, J. T. Bolin et L. D. Eltis. 2000. «Steady-state kinetic characterization and crystallization of a polychlorinated biphenyl-transforming dioxygenase». Journal of Biological Chemistry, vol. 275, no. 17, p. 12430-12437.

JENSEN, S. 1966. «Report of a new chemical hazard». New Scientist, vol. 32, p. 612.

JOHNSTON, L. E. 1985. «Decontamination and disposal of PCB wastes». Environmental Health Perspectives, vol. 60, p. 339-346.

JOO H., Z. Lin et F. H. Arnold. 1999. «Laboratory evolution of peroxide-mediated cytochrome P-450 hydroxylation». Nature, vol. 399, p. 670-673.

KAISER K. L. E., B. G. Oliver, M. N. Charlton, K. D. Nicol et M. E. Comba. 1990a. «Polychlorinated biphenylsin St-Lawrence River sediments». Science of the Total Environment, vol. 97-98, p. 495.

KAUPPI B., K. Lee, E. Carredano, R. E. Parales, D. T. Gibson, H. Eklund et S. Ramaswamy. 1998. «Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2- dioxygenase». Structure, vol. 6, no. 5, p. 571-586.

KIKUCHI M., K. Ohnishi et S. Harayama. 1999. «Novel family shuffling methods for the *in vitro* evolution of enzymes». Gene, vol. 236, no. 1, p. 159-167.

KIMBROUGH, R. D. 1995. «Polychlorinated biphenyls (PCBs) and human health : an update». Critical review in toxicology, vol. 25, no. 2, p. 133-163.

KIMURA N., A. Nishi, M. Goto et K. Furukawa. 1997. «Functional analyses of a variety of chimeric dioxygenases constructed from two biphenyl dioxygenases that are similar structurally but different functionally». Journal of Bacteriology, vol. 179, no. 12, p. 3936-3943.

KITAMURA K., Y. Kikuchi, S. Watanabe, G. Waechter, H. Sakurai et T. Takada. 2000. «Health effects of chronic exposure to polychlorinated dibenzo-P-dioxins (PCDD), dibenzofurans (PCDF) and coplanar PCB (Co-PCB) of municipal waste incinerator workers». Journal of Epidemiology, vol. 10, p. 262-270.

KUMAMARU T., H. Suenaga, M. Mitsuoka, T. Watanabe et K. Furukawa. 1998. «Enhanced degradation of polychlorinated biphenyls by directed evolution of biphenyl dioxygenase». Nature Biotechnology, vol. 16, no. 7, p. 663-666.

LAEMMLI, U. K. 1970. « Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4». Nature, vol. 227, p. 680-685.

LAUBER, J. D. 1986. Disposal and destruction of waste PCBs. *In* PCBs and the environment. Volume III, Boca Raton, Florida : Waid, J. S. editor., CRC Press, p. 83-159.

LEE, K. 1999. «Benzene-induced uncoupling of naphthalene dioxygenase activity and enzyme inactivation by production of hydrogen peroxide». Journal of Bacteriology, vol. 181, no. 9, p. 2719-2725.

LIN J. J., M. Smith, J. Jessee et F. Bloom. 1992. «DH11S : an *Escherichia coli* strain for preparation of single-stranded DNA from phagemid vector». Biotechniques, vol. 12, no. 5, p. 718-721.

L'ITALIEN S., et L. Hedley. Environment Canada. Inland Water Directorate. 1992. Organic contaminants in the Great Lakes 1986-1990. Draft Report.

LOWRY O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr et R. J. Randall. 1951. «Protein measurement with thw Folin phenol reagent». Journal of Biological Chemistry, vol. 193, p. 265-275.

LUNT D. et W. C. Evans. 1970. «The microbial metabolism of biphenyl». Biochemical Journal, vol. 118, no. 3, p. 54-55.

MACDONAL R. W., L. A. Barrie, T. F. Bidleman, M. L. Diamond, D. J. Gregor, R. G. Semkin, W. M. Strachan, Y. F. Li, F. Wania, M. Alaee, L. B. Alexeeva, S. M. Backus, R. Bailey, J. M. Bewers, C. Gobeil, C. J. Halsail, T. Harner, J. T. Hoff, L. M. Jantunen, W. L. Lockhart, D. Mackay, D. C. Muir, J. Pudykiewicz, K. J. Reimer, J. N. Smith et G. A. Stern. 2000. «Contaminants in the Canadian Arctic : 5 years of progress in understanding sources, occurrence and pathways». Science of the Total Environment, vol. 254, p. 93-234.

MALTSEVA O. V., T. V. Tsoi, J. F. Quensen 3rd, M. Fukuda et J. M. Tiedje. 1999. «Degradation of anaerobic reductive dechlorination products of Aroclor 1242 by four aerobic bacteria». Biodegradation, vol. 10, p. 363-371.

MASAI E., A. Yamada, J. M. Healy, T. Hatta, K. Kimbara, M. Fukuda et K. Yano. 1995. «Characterization of biphenyl catabolic genes of gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus sp.* Strain RHA1». Applied and Environmental Microbiology, vol. 61, p. 2079-2085.

MASON J. R. et R. Cammack. 1992. «The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases». Annual Review of Microbiology, vol.46, p. 277-305.

MASSÉ R., F. Messier, C. Ayotte, M. F. Lévesque et M. Sylvestre. 1989. « A comprehensive gas chromatographic/mass spectrometric analysis of 4-chlorobiphenyl bacterial degradation products». Biomedical and Environmental Mass Spectrometry, vol. 18, p. 27-47.

MAY O., P. T. Nguyen et F. H. Arnold. 2000. «Inverting enantioselectivity by directed evolution of hydantoinase for improved production of L-methionine». Nature Biotechnology, vol. 18, no. 3, p. 317-320.

MIYAZAKI K. et F. H. Arnold. *In vitro* DNA recombination. Chapter for : Phage display : A practical approach. Eds. T. Clackson and H. Lowman, Oxford University Press, in press.

MONDELLO, F. J. 1989. «Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Pseudomonas* strain LB400 genes encoding polychlorinated biphenyl degradation». Journal of Bacteriology, vol. 171, no. 3, p. 1725-1732.

MONDELLO F. J., M. P. Turcich, J. H. Lobos et B. D. Erickson. 1997. «Identification and modification of biphenyl dioxygenase sequences that determine the specificity of polychlorinated biphenyl degradation». Applied and Environmental Microbiology, vol. 63, no. 8, p. 3096-3103.

MUKERJEE, D. 1998. «Health risk of endocrine-disrupting *ortho*-substituted PCBs emitted from incinerators». Environmental Engineering Science, vol. 15, no. 2, p. 157-169.

NEILSON, A. H. 1990. «The biodegradation of halogenated organic compounds». Journal of Applied Bacteriology, vol.69, no. 4, p. 445-470.

NESS J. E., M. Welch, L. Giver, M. Bueno, J. R. Cherry, T. V. Borchert, W. P. Stemmer et J. Minshull. 1999. «DNA shuffling of subgenomic sequences of subtilisin». Nature Biotechnology, vol. 17, no. 9, p. 893-896.

OSTERMEIER M., J. H. Shim et S. J. Benkovic. 1999. «A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology». Nature Biotechnology, vol.17, no. 12, p. 1205-1209.

PARALES R. E., K. Lee, S. M. Resnick, H. Y. Jiang, D. J. Lessner et D. T. Gibson. 2000a. «Substrate specificity of naphthalene dioxygenase : Effect of specific amino acids at the active site of the enzyme». Journal of Bacteriology, vol. 182, no. 6, p. 1641-1649.

PARALES R. E., S. M. Resnick, C. L. Yu, D. R. Boyd, N. D. Sharma et D. T. Gibson. 2000b. «Regioselectivity and enantioselectivity of naphthalene dioxygenase during arene *cis*-dihydroxylation : Control by phenylalanine 352 in the alpha subunit». Journal of Bacteriology, vol. 182, no. 19, p. 5495-5504.

PELLERIN, C. 1994. «Alternatives to incineration : there's more than one way to remediate». Environmental Health Perspectives, vol. 102, no. 10, p. 840-845.

PIEPER D. H. et W. Reineke. 2000. «Engineering bacteria for bioremediation». Current Opinion in Biotechnology, vol. 11, p. 262-270.

Programme des Nations Unies sur l'Environnement (PNUE), 1999. L'inventaire des Capacités Mondiales de Destruction des PCB. Deuxième Édition.

PIVER W. T. et F. T. Lindstrom. 1985. «Waste disposal technologies for polychlorinated biphenyls». Environmental Health Perspectives, vol. 59, p. 163-177.

QUÉMERAIS B., C. Lemieux et K. R. Lum. 1994a. «Temporal variation of PCB concentrations in the St-Lawrence River (Canada) and four of its tributaries». Chemosphere, vol. 28, no. 5, p. 947-959.

QUINTANA M. G., C. Didion et H. Dalton. 1997. «Colorimetric method for a rapid detection of oxygenated aromatic biotransformation products». Biotechnology Techniques, vol. 11, no. 8, p. 585-587.

RISEBROUGH R. W., P. Rieche, D. B. Peakall, S. G. Herman et M. N. Kirven. 1968. «Polychlorinated biphenyls in the global ecosystem». Nature, vol. 220, no. 172, p. 1098-1102.

SAFE, S. 1990. «Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds : environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs)». CRC Critical Reviews in Toxicology, vol. 21, p.51-88.

SAFE, S. 1992. «Toxicology, structure-function relationship, and human and environmental health impacts of polychlorinated biphenyls : progress and problems». Environmental Health Perspectives, vol. 100, p. 259-268.

SAFE, S. 2000. «Endocrine disruptors and humain health-Is there a problem? An update». Environmental Health Perspectives, vol. 108, no. 6, p. 487-493.

SAFE S., S. Bandiera, T. Sawyer, L. Robertson, L. Safe, A. Parkinson, P. E. Thomas, D. E. Ryan, L. M. Reik, W. Levin, M. A. Denomme et T. Fujita. 1985. «PCBs : structure-function relationships and mechanism of action». Environmental Health Perspectives, vol. 60, p. 47-56.

SAKAMOTO T., J. M. Joern, A. Arisawa et F. H. Arnold. 2001. «Laboratory evolution of toluene dioxygenase to accept 4-picoline as a substrate». Applied and Environmental Microbiology, vol. 67, no. 9, p. 3882-3887.

SAMBROOK J., E. F. Fritsch et T. Maniatis. 1989. Molecular cloning : a laboratory manual. 2e édition. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York.

SCHWEIGERT N., A. J. B. Zehnder et R. I. L. Eggen. 2001. «Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals». Environmental Microbiology, vol. 3, no. 2, p. 81-91.

SEEGER M., K. N. Timmis et B. Hofer. 1995. «Conversion of chlorobiphenyls into phenylhexadienoates and benzoates by the enzymes of the upper pathway for polychlorobiphenyl degradation encoded by the *bph* locus of *Pseudomonas* sp. strain LB400». Applied and Environmental Microbiology, vol. 61, no. 7, p. 2654-2658.

SONDOSSI M., M. Sylvestre et D. Ahmad. 1992. «Effects of chlorobenzoate transformation of the *Pseudomonas testosteroni* biphenyl and chlorobiphenyl degradation pathway». Applied and Environmental Microbiology, vol. 58, p. 485-495.

SONG J. K., J. S. Rhee. 2000. «Simultaneous enhancement of thermostability and catalytic activity of phospholipase A(1) by evolutionary molecular engineering». Applied and Environmental Microbiology, vol. 66, no. 3, p. 890-894.

STEMMER, W. P. C. 1994a. «DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *in vitro* recombination for molecular evolution». Proceeding of the National Academy of Sciences U S A, vol. 91, no. 22, p. 10 747-10 751.

STEMMER, W. P. C. 1994b. «Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling». Nature, vol. 370, p. 389-391.

SUENAGA H., A. Nishi, T. Watanabe, M. Sakai et K. Furukawa. 1999. «Engineering a hybrid pseudomonad to acquire 3,4-dioxygenase activity for polychlorinated biphenyls». Journal of Bioscience and Bioengineering, vol. 87, no. 4, p. 430-435.

SYLVESTRE M., M. Sirois, Y. Hurtubise, J. Bergeron, D. Ahmad, F. Shareck, D. Barriault, I. Guillemette et J. M. Juteau. 1996. «Sequencing of *Comamonas testosteroni* strain B-356-biphenyl/chlorobiphenyl dioxygenase genes: evolutionary relationships among Gram-negative bacterial biphenyl dioxygenases». Gene, vol. 174, no. 2, p. 195-202.

TAIRA K., J. Hirose, S. Hayashida et K. Furukawa. 1992. «Analysis of *bph* operon from the polychlorinated biphenyl-degrading strain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707». Journal of Biological Chemistry, vol. 267, no. 7, p. 4844-4853.

UNTERMAN, R. 1996. A history of PCB biodegradation. *In* Bioremediation *Principles and applications*. Cambridge, Great Britain : Edited by R. L. Crawford and D. L. Crawford, Cambridge University Press, p. 209-253.

WANG D. et H. S. Sul. 1997. «Site-directed mutagenesis for large insertions by oligonucleotide primers in optimized molar ratios». Biotechniques, vol. 22, no. 1, p. 70-72.

ZHANG J. H., G. Dawes et W. P. Stemmer. 1997. «Directed evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening». Proceeding of the National Academy of Sciences U S A, vol. 94, no. 9, p. 4504-4509.

ZHAO H. et F. H. Arnold. 1997. «Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination». Nucleic Acids Research, vol. 25, no. 6, p. 1307-1308.

ZHAO H. et F. H. Arnold. 1999. «Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermitase». Protein Engineering, vol. 12, no. 1, p.47-53.

ZYLSTRA G. J. et D. T. Gibson. 1989. «Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. Nucleotide sequence of the *tod*C1C2BADE genes and their expression in *Escherichia coli*». Journal of Biological Chemistry, vol. 264, no. 25, p. 14 940-14 946.