

Université du Québec  
INRS-Santé

**ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DES MÉTAPYROCATÉCHASES  
INDUITES PAR LE BIPHÉNYLE CHEZ COMAMONAS TESTOSTERONI B-356  
ET ESSAI DE CLONAGE DE LA CATÉCHOL 2,3-DIOXYGÉNASE.**

Par

Paul Hein

Mémoire présenté pour l'obtention  
du grade de Maître ès science (M.Sc)

26 avril 1996



## REMERCIEMENTS

Je remercie sincèrement tous ceux qui m'ont aidé à la rédaction de ce mémoire. Je remercie d'abord mon directeur de recherche le Dr Michel Sylvestre de l'INRS pour m'avoir donné un projet de recherche qui s'est montré intéressant. Aussi, je remercie le Dr Michel Sylvestre, ainsi que le Dr Justin Powlowski de Concordia pour leur disponibilité et leurs conseils. Je crois que leur professionnalisme a grandement contribué à mon apprentissage.

Je remercie également Angèle, Darakshan, Diane, Hélène, Isabelle, Mohammad, Mona et Yves du laboratoire du Dr Michel Sylvestre pour leurs conseils et leur patience.



## RÉSUMÉ

La minéralisation du biphenyle et de certains congénères de biphenyles polychlorés (BPC) par Comamonas testosteroni B-356 nécessite la participation de deux tronçons métaboliques successifs. Le premier (tronçon supérieur) entraîne l'ouverture du cycle aromatique le moins chloré pour générer des chlorobenzoates. Le tronçon inférieur est responsable de l'ouverture du deuxième cycle aromatique. Dans ces deux tronçons, l'ouverture des cycles est catalysée par des dioxygénases qui ouvrent les intermédiaires diols en position *meta*. Le gène de la 2,3-dihydroxybiphényle-1,2-dioxygénase (B1,2O), du tronçon supérieur, a déjà été cloné et séquencé. L'étude présentée visait à séparer et purifier la B1,2O et la catéchol-2,3-dioxygénase (C2,3O) qui agit au niveau du tronçon inférieur afin d'évaluer et de comparer certains de leurs paramètres cinétiques. Les études cinétiques sur les dioxygénases nous ont permis de constater que la B1,2O était spécifique à l'intermédiaire diol naturel du tronçon supérieur, c'est-à-dire le 2,3-dihydroxybiphényle (2,3-DHBP) et que la C2,3O avait une spécificité similaire envers plusieurs substrats diols. L'analyse de la séquence en acide aminé N-terminal de la C2,3O du tronçon inférieur démontre qu'elle contient 75% d'homologie avec la section N-terminal du produit génique de xylEII du plasmide TOL pWW15, suggérant une origine phylogénique commune entre ces deux enzymes. Les mesures des activités préférentielles de la B1,2O et de la C2,3O face au 2,3-DHBP et au catéchol nous a permis d'évaluer l'expression relative des enzymes du tronçon supérieur et inférieur. Les résultats semblent suggérer que le tronçon inférieur est induit par l'acide salicylique. Nos résultats nous ont permis de constater que la souche B-356 contenait un gène codant pour une métapyrocatechase responsable l'ouverture du cycle du benzoate. Nous avons tenté de cloner ce gène, mais sans succès. Cependant, nous avons pu démontrer qu'il est amplifiable chez cette souche lorsqu'elle est crue sur le biphenyle. Ce gène hybride avec une sonde contenant le gène xylEII du plasmide pWW15.



Paul Hein



Directeur de recherche  
(Michel Sylvestre)



## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENT	iii
RÉSUMÉ	v
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES FIGURES	xiii
INTRODUCTION	01
CHAPITRE 1: REVUE DE LITTÉRATURE	07
1.1 Voie catabolique des BPC chez la souche B-356	07
1.2 Caractéristiques des métapyrocatéchases bactériennes	08
1.2.1 Introduction	08
1.2.2 Protocoles généraux de purification des métapyrocatéchases	11
1.2.3 Caractérisation et cinétique des métapyrocatéchases	12
1.2.4 Stabilité réactivation des métapyrocatéchases	15
1.2.5 Inhibition de la C2,3O par le 3-chlorocatéchol	17
1.3 Mécanismes d'adaptation des bactéries envers leur environnement	18
1.3.1 Introduction	18
1.3.2 Induction et régulation	18
1.3.3 Amplification des gènes	20
1.3.4 La duplication des gènes et la divergence des protéines	23
CHAPITRE 2: MATÉRIEL ET MÉTHODES	29
2.1 Produits chimiques	29
2.2 Milieux de cultures, souches bactériennes et plasmides	29
2.3 Étapes de purification de la B1,2O et de la C2,3O	31
2.4 Essais enzymatiques et cinétiques	32
2.5 Détermination de la stabilité des enzymes	33
2.6 Protocoles de réactivation des enzymes	33
2.7 Production du 2,3-DHBP et du 4'-chloro-2,3-DHBP	34

2.8	Méthodes analytiques	35
2.9	Études d'induction des métapyrocátéchases	35
2.10	Préparation de l'ADN	37
2.11	Préparation des sondes et hybridation	37
2.12	Construction de la librairie génomique	38
<b>CHAPITRE 3: RÉSULTATS</b>		<b>39</b>
3.1	Isolement et caractérisation de la B1,2O et de la C2,3O de la souche B-356	39
3.1.1	Isolement de la B1,2O et de la C2,3O	39
3.1.2	Séquence N-terminale de la C2,3O	44
3.1.3	Inactivation et réactivation des préparations	44
3.1.4	Détermination des constantes cinétiques de la B1,2O et de la C2,3O	47
3.1.5	Inhibition des métapyrocátéchases par les monochlorocatéchols	51
3.2	Proportion relative des activités de la B1,2O et de la C2,3O induites par divers substrats	53
3.3	Homologie entre les gènes codant pour les métapyrocátéchases de la souche B-356 et les gènes métapyrocátéchases du plasmide TOL	5
3.4	Essai de clonage de la C2,3O	54
<b>CHAPITRE 4: DISCUSSION</b>		<b>67</b>
4.1	Isolement et caractérisation des deux métapyrocátéchases inductibles par le biphényle de la souche B-356	67
4.2	Induction des métapyrocátéchases	73
4.3	Amplification des gènes	75
4.4	Essai de clonage	76
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>		<b>79</b>

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
2,3-DHBP	2,3-Dihydroxybiphényle
B1,2O	2,3-Dihydroxybiphényle-1,2-dioxygénase
BPC	Biphényles polychlorés
BSTFA	N-O-bis-(Triméthylsilyl)-trifluoroacétamide
C2,3O	Catéchol-2,3-dioxygénase
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTT	Dithiothréitol
HEPES	N-2-Hydroxyéthyl-piperazine-N'-2-éthanesulfonate
kD	Kilo Dalton
kpb	Kilo paire de bases
LB	Luria-Bertani
MM 30	Milieu minimal 30
MOPS	4-Morpholinepropanesulfonate
PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PVDF	Polyvinylidène difluorure
SDS	Dodécylsulfate de sodium



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I:	Résumé des étapes de purification de la B1,2O	40
Tableau II:	Résumé des étapes de purification de la C2,3O	42
Tableau III:	Réactivation de la B1,2O en présence de FeSO <sub>4</sub> , de DTT, ou de FeSO <sub>4</sub> en combinaison avec du DTT	46
Tableau IV:	Activité relative de la B1,2O et de la C2,3O pour certains composés diols	46
Tableau V:	Paramètres cinétiques de la B1,2O	49
Tableau VI:	Paramètres cinétiques de la C2,3O	49
Tableau VII:	Paramètres cinétiques de la B1,2O face au 2,3-DHBP en présence de 3-chlorocatéchol	50
Tableau VIII:	Paramètres cinétiques de la C2,3O face au catéchol en présence de 3-chlorocatéchol	50
Tableau IX:	Proportion d'activité métapyrocatechase attribuable à la B1,2O et à la C2,3O chez B-356 (adaptée) cultivée sur différents substrats	52



## LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Voie catabolique du biphényle	03
Figure 2 :	Arbre phylogénique représentant les degrés d'affiliation entre diverses métapyrocatechases	09
Figure 3 :	Recombinaison entre deux brins naissants d'ADN	21
Figure 4 :	SDS-PAGE de préparations provenant des étapes de purification de la B1,2O	41
Figure 5 :	SDS-PAGE de préparations provenant des étapes de purification de la C2,3O	43
Figure 6 :	Alignement de la séquence des 25 acides aminés de la portion N-terminale de la C2,3O provenant de la souche B-356 et du produit génique de <u>xyIEII</u> du plasmide pWW15	45
Figure 7 :	Taux de réactivation de la C2,3O en fonction du pH du milieu d'incubation en présence de 0,4 mM de FeSO <sub>4</sub> plus 0,4 mM de DTT	45
Figure 8 :	"Dot blot" de l'ADN génomique de la souche B-356 et de la souche B-356 (adaptée)	55
Figure 9 :	Gel d'agarose de préparations d'ADN génomique de la souche B-356 et de la souche B-356 adaptée digérées avec l'enzyme <u>XhoI</u>	57
Figure 10 :	Hybridation "Southern" du gel de la figure 8 avec la sonde d'ADN contenant <u>xyIE</u>	59
Figure 11 :	Cartes de restriction de l'opéron <u>bph</u> retrouvé sur les inserts des plasmides pDA1 et pDA2 (Ahmad et al 1990)	60
Figure 12 :	Hybridation "Southern" d'un gel d'agarose avec une sonde constituée A) d'un fragment du plasmide pMMB26 portant le gène <u>xyIE</u> ou B) d'un fragment <u>ClaI/SmaI</u> de 2,0 kpb originaire de l'opéron <u>bph</u> de la souche B-356 qui porte les gènes <u>bphBC</u>	61

- Figure 13 : A) Chromatogramme de l'extrait de métabolites dérivés au bis-(triméthylsilyl)-trifluoroacétamide (BSTFA) produits de la transformation du 2,3-DHBP par un extrait brut d'une culture d'un clone de E. coli DH1 portant le plasmide p1951. B) Spectre de masse de l'acide benzoïque (métabolite) 62
- Figure 14 : Digestion par des endonucléases de p1951 et de pDA2 63
- Figure 15 : Hybridation "Southern" du gel de la figure 13 avec une sonde portant le fragment SmaI de 3.6 kpb de pDA2 64
- Figure 16 : Hybridation "Southern" du gel de la figure 13 avec une sonde portant le fragment SmaI de 2.8 kpb de pDA2 65

## INTRODUCTION

Les BPC sont des composés contenant de un à dix atomes de chlore fixés par des liens covalents sur les atomes de carbone du noyau biphenyle. Il existe 209 congénères possibles. Ces atomes de chlore modifient l'environnement électronique du cycle aromatique, protégeant la molécule contre les attaques électrophiles. Ce phénomène contribue à leur stabilité et leur persistance dans l'environnement (Strachan, 1988).

Les BPC sont omniprésents dans l'environnement. Ils ont même été détectés dans la région arctique où il y a peu d'activité industrielle (McDonald et Tourangeau, 1988). L'atmosphère serait la principale source de diffusion dans la biosphère (Strachan, 1988). Ils sont liposolubles et tendent à s'accumuler dans les tissus adipeux des organismes vivants. Les BPC sont peu mutagènes mais semblent promouvoir le développement de lésions cancéreuses, notamment au niveau du foie (Strachan, 1988). Certains problèmes respiratoires associés aux BPC ont été rapportés (Nordlund-Moller *et al.*, 1990) ainsi que des problèmes d'ordre neurofonctionnel (Seegal et Shain, 1992).

Les huiles renfermant des teneurs élevées en BPC, tel que celles utilisées dans les transformateurs et condensateurs électriques peuvent être détruites à 99.9999% par une incinération de deux secondes à 1200°C (McDonald et Tourangeau, 1988). Cette technique est toutefois peu rentable pour le traitement de matériaux contenant de faibles concentrations en BPC tel que les sédiments aquatiques et les sols.

La biorestauration qui fait appel à des souches microbiennes spécialisées, constituerait une méthode de choix pour la décontamination de ces sites. Parmi les bactéries les plus étudiées qui peuvent dégrader les BPC, citons *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 (Taira *et al.*, 1992), *Pseudomonas* sp. LB400 (Bopp, 1986) et *Comamonas testosteroni* B-356 (Ahmad *et al.*, 1990). La capacité de ces souches à

transformer les BPC est due à la présence d'une voie catabolique du biphenyle dont les enzymes ont un très large spectre de substrat. Elles auraient possiblement été sélectionnées dans l'environnement pour dégrader des lignines et des composés phénoliques libérés des racines de certains végétaux (Donnelly *et al.*, 1994).

Le processus de biodégradation des BPC par les bactéries dans les sols ou dans la partie oxygène des sédiments aquatiques est très lent. Un nombre limité de congénères sont dégradés. Des études de dégradation ont révélé qu'il existe différentes classes de bactéries capables de dégrader les BPC selon leurs capacités préférentielles face aux différents congénères (Harkness *et al.*, 1993; Mondello, 1989). Les différents patrons de réactivité des souches envers les congénères de BPC seraient attribuables à des différences mineures au niveau de la séquence en acides aminés des enzymes responsables de cette dégradation (Gibson *et al.*, 1993; Furukawa *et al.*, 1989).

Les microorganismes transforment les BPC en empruntant une voie catabolique à deux tronçons. Le premier tronçon (tronçon supérieur) sert à ouvrir le cycle aromatique le moins chloré du noyau biphenyle pour donner de l'acide chlorobenzoïque. Pour qu'il y ait dégradation complète (minéralisation), le chlorobenzoate est à son tour transformé par une série de réactions similaires (tronçon inférieur) conduisant à l'ouverture du second cycle aromatique. Les molécules découlant de ces réactions sont ensuite canalisées vers le cycle de Krebs (Sondossi *et al.*, 1992). La transformation du biphenyle est schématisée à la figure 1.

Des études préliminaires avaient suggéré que la souche *C. testosteroni* B-356 contiendrait deux dioxygénases qui catalyseraient l'ouverture de chacun des cycles aromatiques du noyau biphenyle, c'est-à-dire la 2,3-dihydroxybiphenyle-1,2-dioxygénase (B1,2O) du tronçon supérieur, codée par *bphC*, et la catéchol-2,3-dioxygénase (C2,3O) du tronçon inférieur dont le gène n'a pas encore été caractérisé (Sondossi *et al.*, 1992).

### 3 Tronçon supérieur

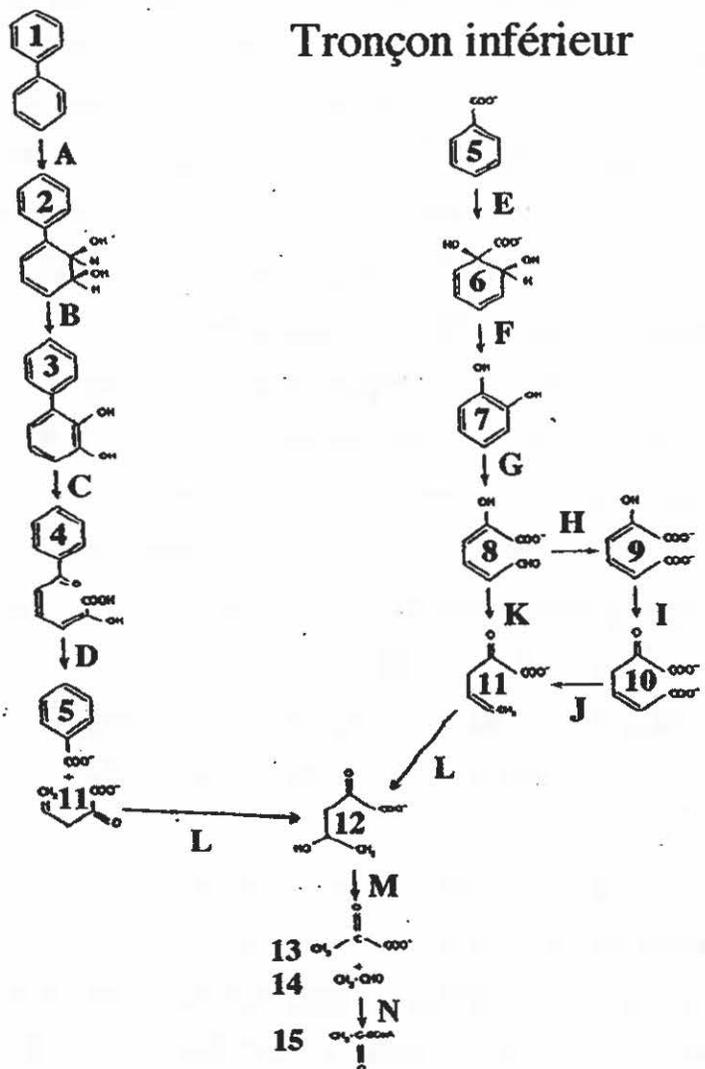


Figure 1 : Voie catabolique du biphenyle. Métabolites : 1, biphenyle; 2, 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphenyle; 3, 2,3-dihydroxybiphenyle; 4, 2-hydroxy-6-oxo-6-phénylhexa-2,4-dienoate; 5, benzoate; 6, 2-hydroxy-3-carboxyhexa-4,6-diène; 7, catéchol; 8, 2-hydroxymuconate semialdéhyde; 9, 4-oxalocrotonate, forme enol; 10, 4-oxalocrotonate, forme cétone; 11, 2-oxo-4-penténoate; 12, 4-hydroxy-2-oxovalérate; 13, pyruvate; 14, acétaldéhyde; 15, acétyl-CoA. Enzymes : A, biphenyle-2,3-dioxygénase, codée par les gènes *bphA*EFG; B, dihydrodiol déshydrogénase, codée par le gènes *bph*B; C, 2,3-dihydroxybiphenyle-1,2-dioxygénase, codée par le gène *bph*C; D, 2-hydroxy-6-oxo-6-phénylhexa-2,4-dienolate hydrolase codée par le gène *bph*D; E, benzoate-dioxygénase; F, 2-hydroxy-3-carboxyhexa-4,6-diène hydrolase; G, catéchol-2,3-dioxygénase; H, 2-hydroxymuconate semialdéhyde déhydrogénase; I, 4-oxalocrotonate isomérase; J, 4-oxolocrotonate décarboxylase; K, 2-hydroxymuconate semiladéhyde hydrolase; L, 2-oxo-4-penténoate hydratase; M, 4-hydroxy-2-oxovalérate aldolase; N, acétaldéhyde déshydrogénase.

La B1,2O du tronçon supérieur provenant de la souche KF707 (Furukawa et Arimura 1987) et celle de LB400 (Eltis *et al.*, 1993) ont été purifiées et caractérisées. Les B1,2O de quelques autres souches microbiennes ont aussi été partiellement caractérisées (Khan *et al.*, 1988; Asturias et Timmis, 1993; Hirose *et al.*, 1994; Sondossi *et al.*, 1992). La métapyrocatéchase du tronçon inférieur de la voie catabolique des BPC de Pseudomonas sp. IC (Carrington *et al.*, 1994) ainsi que celle de Pseudomonas sp. CB406 (LLoyd-Jones *et al.*, 1994) ont été clonées et certaines de leurs caractéristiques ont été déterminées. La présence d'une deuxième métapyrocatéchase impliquée dans le métabolisme du biphényle a été suggérée chez la souche KF707 (Furukawa et Arimura, 1987) et chez la souche B-356 (Sondossi *et al.*, 1992). Cependant, celles-ci n'ont pas été caractérisées. Une C2,3O a été clonée chez Pseudomonas putida KF715, souche capable de dégrader les BPC (Lee *et al.* 1995). Dans un premier volet de ce projet nous avons isolé et caractérisé deux métapyrocatéchases induites par le biphényle. Cette étude a permis de confirmer l'existence chez la souche B-356 d'une C2,3O induite par le biphényle.

Dans un deuxième volet du projet, nous avons touché à certains aspects de la génétique de la voie catabolique des BPC chez la souche B-356, plus particulièrement des métapyrocatéchases impliquées dans cette voie biochimique. Chez les souches KF707 (Taira *et al.*, 1992), LB400 (Hofer *et al.*, 1993), KKS102 (Kikuchi *et al.*, 1994), et B-356 (Bergeron *et al.*, 1994), le gène bphC qui spécifie la B1,2O, est localisé sur un opéron induit par le biphényle en aval des gènes bphAB et en amont du gène bphD.

Quelques différences entre ces opérons suggèrent qu'il y a eu des réarrangements durant le processus évolutif. Chez la souche B-356 et chez la souche KKS102 (Kikuchi *et al.*, 1994), le gène bphG (bphA4 chez la souche KKS102) qui spécifie la ferrédoxine réductase, une des composantes de la dioxygénase du biphényle, est absent de l'opéron (Sylvestre *et al.*, article soumis). Chez la souche B-356, ce gène se retrouverait en amont de l'opéron bph (Bergeron *et al.*, 1994). L'opéron bph de la souche KKS102 contient trois autres gènes, nommés par Kikuchi *et al.* (1994) bphEGF. Ceux-ci codent pour des enzymes qui transforment le métabolite découlant de l'action

de l'hydrolase (BphD) en intermédiaire de cycle de Krebs. Ces gènes se trouvent en amont des gènes de la dioxygénase du biphenyle (Kikuchi *et al.*, 1994). Exceptionnellement, Rhodococcus globerulus P6 contient deux dioxygénases du 2,3-dihydroxybiphényle qui sont codées par des gènes qui ne sont pas localisés sur un opéron bph (Asturia et Timmis 1993).

Peu de travaux ont porté sur la génétique du tronçon inférieur du métabolisme du biphenyle. Chez la souche IC où le gène de la C2,3O a été cloné et séquencé (Carrington *et al.*, 1994) et chez la souche CB406 (LLoyd-Jones *et al.*, 1994) et la souche KF715 (Lee *et al.* 1995) où les gènes ont été clonés, il semblerait que les gènes du tronçon inférieur soient regroupés sur un opéron. De plus, dans le cas de la métapyrocatechase de la souche IC, ces études ont montré qu'il y a peu d'homologie entre bphC et le gène correspondant du tronçon inférieur (Carrington *et al.*, 1994).

Le deuxième volet de ce projet visait à cloner le gène de la C2,3O de la souche B-356 afin de vérifier si elle faisait partie du même opéron que bphC. Nous n'avons pas atteint cet objectif. Cependant, durant notre étude nous avons appliqué les connaissances acquises lors de l'étude de caractérisation de la B1,2O et de la C2,3O pour obtenir certaines informations sur les mécanismes de régulation des deux enzymes chez la souche B-356. Notre étude a révélé l'importance de l'amplification des gènes comme mécanisme d'adaptation des bactéries à dégrader plus efficacement les substrats récalcitrants. Pour cette raison nous présenterons un chapitre complet sur l'amplification des gènes. Nous présenterons quelques résultats préliminaires à cet égard, où nous avons comparé les mécanismes de régulation des voies cataboliques de la souche B-356 avec ceux qui prévalent chez une souche mutante de C. testosteroni B-356, qui est mieux adaptée par amplification de gènes, à dégrader les BPC.



## CHAPITRE 1

### REVUE DE LITTÉRATURE

#### 1.1. Voie catabolique des BPC chez la souche B-356.

C. testosteroni B-356 est une souche sauvage qui peut dégrader le biphenyle et les BPC. Les quatre premières étapes de la voie catabolique des BPC chez cette souche sont semblables à celles retrouvées chez d'autres souches bactériennes capables de dégrader les BPC (Bergeron *et al.* 1994). Ces étapes sont illustrées à la figure 1. Le cycle aromatique le moins chloré est hydroxylé par la dioxygénase du biphenyle. Cet enzyme est composé d'une protéine soufre-fer qui est constituée d'une sous-unité  $\alpha$  et d'une sous-unité  $\beta$  comprenant également une ferredoxine et une ferredoxine réductase, toutes deux impliquées dans un système de transport d'électrons (Hurtubise *et al.*, 1995). Le 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphenyle ainsi produit est transformé en 2,3-DHBP par une déshydrogénase. Le 2,3-DHBP est ensuite ouvert en position meta par la B1,2O pour donner du 2-hydroxy-6-oxo-6-(chloro)phényl-hexa-2,4-diénoate. Celui-ci est ensuite transformé en acide benzoïque ou chlorobenzoïque par une hydrolase. À ce jour, on connaît encore mal les réactions qui conduisent à la minéralisation de l'acide benzoïque dans le métabolisme du biphenyle.

Certains mutants de B-356, sélectionnés sur le biphenyle comme seule source de carbone ont une performance accrue face à la dégradation du biphenyle et des monochlorobiphenyles (Sondossi et Sylvestre, 1990). Chez ces souches mutantes, l'expression des enzymes qui transforment le biphenyle est constitutive (Desnoyer, 1991).

## 1.2. Caractéristiques des métapyrocatechases bactériennes

### 1.2.1 Introduction

La biodégradation des composés aromatiques comme les BPC conduit souvent à la production d'intermédiaires diols. Ceux-ci sont éventuellement transformés en composés aliphatiques qui sont utilisés comme source d'énergie par l'organisme (Assinder et Williams, 1990; Haramaya *et al.*, 1987). La capacité des organismes à utiliser les composés aromatiques repose sur la présence d'oxygénases capables de catalyser l'ouverture du cycle aromatique du noyau diol, facilitant les réactions subséquentes qui conduisent à la minéralisation.

La fission du cycle aromatique sous forme diol se fait par l'introduction d'oxygène moléculaire sur deux atomes de carbone adjacents. L'oxydation en position intradiol (ou ortho) est catalysée par les pyrocatechases. Ces enzymes sont formés de deux types de sous-unités ( $\alpha$  et  $\beta$ ) et sont associés à un ion ferrique. Alternativement, les métapyrocatechases catalysent l'oxydation des diols en position extradiol (ou meta). Elles sont formées de sous-unités identiques et contiennent un ion ferreux (Yamamoto et Ishimura, 1991). Ces deux types d'enzymes auraient des origines phylogéniques différentes (Haramaya et Rejik, 1989).

Le catabolisme de plusieurs composés aromatiques dont le benzoate/toluate, le naphthalène et le biphenyle, procède par l'intermédiaire d'une fission du diol en position meta. Le produit de cette réaction est facilement mesurable par colorimétrie (Catelani *et al.*, 1973). Ceci facilite l'étude de ces enzymes.

Le mécanisme catalytique conduisant au clivage du catéchol n'est pas complètement élucidé. Malgré la différence de l'état d'oxydation des atomes de fer associés au site catalytique des pyrocatechases et des métapyrocatechases, certains auteurs ont postulé que leur mécanisme d'action est similaire (Que, 1983; Funabiki *et al.*, 1986). En se basant sur une réaction modèle impliquant la fission en position meta

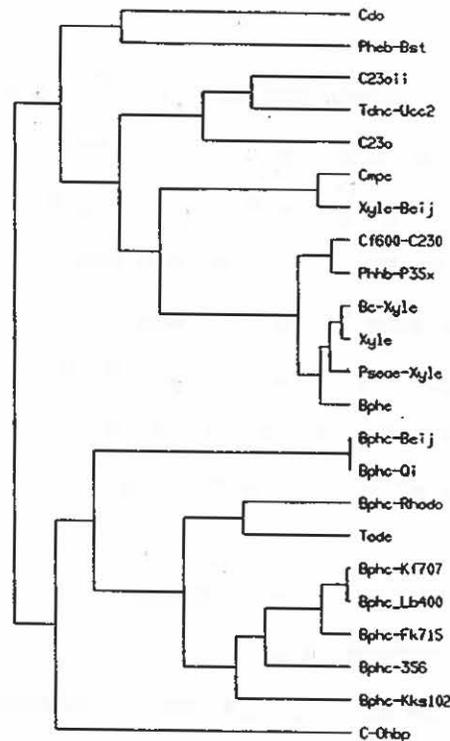


Figure 2 : Arbre phylogénique représentant les degrés d'affiliation entre diverses protéines métapyrocatéchases. Ce diagramme a été construit à l'aide du programme Pileup. Les protéines suivantes sont représentées: Cdo, la C2,3O de *Rhodococcus rhodochrous* CTM (Candidus *et al.*, 1994); Pheb-Bst, la C2,3O de *Bacillus stearothermophilus* FDTP-3 (non-publié [numéro d'accension GenBank X67860]); C2,3OII, la C2,3O de *P. putida* mt-15 (non-publié [numéro d'accension GenBank UO1826]); Tdnc-Ucc2, la 3-méthylcatéchol 2,3-dioxygénase de *P. putida* UCC2 (non-publié [numéro d'accension GenBank X59790]); C2,3O, la C2,3O de *C. testosteroni* B-356 (voir figure 6 dans la section Résultats); Cmpe, la C2,3O de *Pseudomonas* sp. HV3 (Yrjälä *et al.*, 1994); Xyle-Beij, la C2,3O de *Beijerinckia* sp. B1 (Kim et Zylstra, 1995); CF600-C2,3O, la C2,3O de *P. putida* CF600 (Bartilson et Shingler, 1989); Phhb-P35X, la C2,3O de *P. putida* P35X (non-publié [numéro d'accension GenBank X77856]); Bc-Xyle, *Bacillus subtilis* (non-publié [brevet EP0086139-A1]); Xyle, la C2,3O de *P. putida* mt-2 (Nakai *et al.* 1983c); Pseae-Xyle, la C2,3O de *Pseudomonas aeruginosa* JI104 (non-publié [numéro d'accension GenBank X60740]); Bphe, la C2,3O de *Pseudomonas* sp. IC (Carrington *et al.*, 1994); BphC-Beij, la B1,2O de *Beijerinckia* B1 (Kim et Zylstra, 1995). BphC-Q1, la B1,2O de *P. paucimobilis* Q1 (Taira *et al.*, 1988); BphC-Rhodo, la B1,2O de *Rhodococcus globerulus* (Asturia *et al.*, 1994); Tode, la 3-méthylcatéchol-2,3-dioxygénase de *P. putida* F1 (Ziffer *et al.*, 1977); BphC-KF707, la B1,2O de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 (Furukawa *et al.*, 1987). BphC-LB400, la B1,2O de *Pseudomonas* sp. LB400 (Hofer *et al.*, 1993); BphC-KF715, la B1,2O de *P. pseudoalcaligenes* KF715 (Hayase *et al.*, 1990); BphC-356, la B1,2O de *C. testosteroni* B-356 (Ahmad, communication personnelle); BphC-Kks102, la B1,2O de *Pseudomonas* sp. KKS102 (Kimbara *et al.*, 1989); C-Ohbp, la 2,2',3-trihydroxybiphényle dioxygénase de *Sphingomonas* sp. RW1 (Happe *et al.*, 1993).

du 3,5 di-tert-butyl catéchol, catalysée par le complexe (bipyridine)(pyridine) fer (III), il a été postulé que la phase initiale comprend la déprotonation du catéchol (Funabiki *et al.*, 1986) et la formation d'un complexe fer-catécholate. L'oxygène, qui selon Arciero et Lipscomb (1986) serait activé par association directe au centre ferreux, attaquerait ensuite le catécholate pour former possiblement un intermédiaire peroxyde, lequel se transformerait en produit final (Funabiki *et al.*, 1986). Dans le cas de la protocatéchuate 3,4-dioxygénase, un intermédiaire de la réaction de la fission en ortho de la protocatéchuate, consisterait en une forme cétonique du substrat qui résulterait d'une réaction de tautomérisation (Whittaker et Lipscomb, 1984).

Les métapyrocatéchases font généralement partie de voies cataboliques qui confèrent à la cellule la capacité de croître sur un composé aromatique. Les gènes codant pour ces enzymes sont souvent situés sur des opérons inductibles spécifiquement par le substrat de croissance (Kataeva et Golouleva, 1990). Plusieurs souches bactériennes contiennent des métapyrocatéchases. Les structures primaires de plusieurs d'entre elles ont été caractérisées. La figure 2 énumère plusieurs C2,3O et B1,2O placées selon leur degré d'affiliation dans un arbre phylogénique construit sur la maximisation de l'alignement des séquences en acides aminés. On peut constater qu'il existe plusieurs lignées évolutives pour les métapyrocatéchases (Hofer *et al.*, 1993). Cette diversité résulterait d'une évolution divergente (Harayama et Reik, 1993). Cependant on constate que de façon générale, les C2,3O et les B1,2O font partie de groupes distincts.

Parmi les C2,3O, celles spécifiées par les gènes xylE de la série de plasmides pWW (TOL) ont été étudiées en détail. Le plasmide pWW15 qui dérive de pWW0, porte deux gènes isofonctionnels qui codent pour des C2,3O distincts. On retrouve d'une part, le gène xylE provenant de pWW0 et dont le produit génique est souvent désigné C2,3OI. Ce gène se perd facilement par délétion d'un segment du plasmide pWW15. D'autre part, on trouve sur le plasmide pWW15 un second gène (xylEII) qui montre peu d'homologie envers xylE, mais qui code pour une seconde C2,3O désignée C2,3OII, qui

peut se substituer à la C2,3OI chez les mutants ayant perdu cet enzyme (Keil *et al.*, 1985).

Notre revue portera principalement sur les caractéristiques des métapyrocatechases bactériennes impliquées dans le métabolisme du toluène et du biphényle.

### 1.2.2 Protocoles généraux de purification des métapyrocatechases.

Les méthodes de purification de la C2,3O de *P. putida* mt-2 sont basées sur celle décrite par Nozaki (1970). Généralement, les cellules propagées sur le benzoate comme unique source de carbone, sont recueillies par centrifugation et suspendues dans un tampon phosphate à 50 mM pH7.5. La suspension est sonifiée puis un volume d'acétone équivalent à 10% du volume total est ajouté à l'extrait brut. La présence d'acétone dans le milieu de lyse protège l'enzyme contre la désactivation par l'oxygène atmosphérique. Certains solvants organiques sont des inhibiteurs de la C2,3O en compétitionnant avec le catéchol (Nozaki *et al.*, 1968; Bertini *et al.*, 1994). La protection conférée par ces solvants pourrait résulter de leur interaction avec le site actif de la protéine.

Suivant le protocole de Nozaki, une quantité d'acétone suffisante pour obtenir une concentration entre 50% (v/v) et 66% (v/v) est ajoutée à l'extrait brut pour précipiter la C2,3O. Cette étape est suivie par une chromatographie sur colonne de DEAE où la C2,3O est éluée avec du tampon de purification saturé à environ 2% de sulfate d'ammonium. La protéine est ensuite précipitée par l'ajout graduel de sulfate d'ammonium. Cette préparation donne une activité spécifique d'environ 110  $\mu$ moles/min/mg de protéines (Nozaki, 1970).

Selon d'autres protocoles, la lyse des cellules peut être effectuée par broyage sur oxyde d'aluminium au mortier et pilon (Takemori *et al.*, 1971). Bartels *et al.*, (1984) incluent un traitement à la chaleur à 55°C pendant 10 minutes avant la précipitation à

l'acétone. Arciero *et al.*, (1985) remplacent l'étape de la précipitation au sulfate d'ammonium par une chromatographie sur colonne de Phenyl-Sepharose. La C2,3O peut être éluée de cette colonne par une solution de sulfate d'ammonium saturée à environ 2%. Utilisant cette méthode, Arciero *et al.*, (1985) ont obtenu une préparation qui donne une seule bande lorsqu'elle est soumise à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante (SDS-PAGE). Elle a une activité spécifique entre 250 et 320  $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines.

Des méthodes semblables ont été proposées pour la purification des B1,2O, impliquées dans le métabolisme du biphenyle et des 2,3-dihydroxynaphtalène-1,2-dioxygénases, impliquées dans le métabolisme du naphthalène. Comme pour la C2,3O, il a été observé que la présence de 10% (v/v) d'un solvant organique dans le tampon de purification stabilise ces enzymes (Eltis *et al.*, 1993; Furukawa et Arimura, 1987; Kuhm *et al.*, 1991; Patel et Barnsley, 1980).

### 1.2.3 Caractérisation et cinétique des métapyrocatechases

La C2,3O de *P. putida* mt-2 (ATCC 23973) est la première métapyrocatechase qui fut caractérisée en détail (Assinder et Williams, 1990). Cet enzyme est spécifié par le gène *xyIE* qui est localisé sur le plasmide pWWO (Nakai *et al.*, 1983a), souvent désigné plasmide TOL. Cette C2,3O est considérée comme modèle de ce type d'enzyme.

La C2,3O spécifiée par *xyIE* est composée de quatre sous unités identiques de 35 000 Dalton chacune. Chaque sous-unité contient un atome de fer (II) et peut se lier à une molécule de catéchol (Nozaki, 1970; Nakai *et al.*, 1983b). L'analyse par dichroïsme circulaire révèle que sa structure comporte peu de régions hélicoïdales (Hirata *et al.*, 1971).

Le cycle catalytique suit un mécanisme ordonné bi-uni où le catéchol est le premier substrat à s'associer à l'enzyme (Hori *et al.*, 1973). La fission en position meta

d'analogues du catéchol méthylés en position 3 ou 4 se fait sur le lien extradiol se trouvant le plus rapproché du substituant (Nozaki *et al.*, 1970). Les constantes de Michaelis sont pour le catéchol, entre 2,1 à 3,0  $\mu\text{M}$  et pour l'oxygène, entre 7 à 9  $\mu\text{M}$  (Nozaki, 1970; Hori *et al.*, 1973; Nakai *et al.*, 1983b). Les valeurs de  $K_m$  pour le 3-méthylcatéchol et le 4-méthylcatéchol sont de 1,8 et 1,5  $\mu\text{M}$  respectivement. Les paramètres  $V_{\text{max}}$  pour le catéchol, le 3-méthylcatéchol et le 4-méthylcatéchol varient de façon parallèle aux valeurs de  $K_m$ . Ainsi, la spécificité ( $V_{\text{max}}/K_m$ ) de l'enzyme est similaire pour ces trois substrats (Ramos *et al.*, 1987). Le 4-méthylcatéchol et certains autres analogues désactivent l'enzyme lorsqu'ils sont présents en forte concentration. Des études réalisées sur deux C2,3O spécifiées par des gènes présents sur le plasmide pWW53, et qui sont homologues au gène *xyIE* de pWW0, démontrent que la portion C-terminale de l'enzyme joue un rôle déterminant sur la valeur du  $K_m$ . De même, la portion N-terminale semble jouer un rôle dans l'inhibition par certains substrats à haute concentration (Williams *et al.*, 1990).

En condition anaérobie, la constante d'association de la C2,3O avec l'oxyde d'azote (Arciero et Lipscomb, 1986; Arciero *et al.*, 1985) et l'azidure (Mabrouk *et al.*, 1991) qui agissent tous deux comme l'oxygène, augmente lorsque le catéchol est présent dans le milieu réactionnel. Que la présence de catéchol modifie l'affinité de l'enzyme envers l'oxygène ou certains de ses analogues, s'explique par le fait que le substrat favorise une meilleure coordination du fer avec les deux groupements hydroxyl du substrat (Arciero et Lipscomb, 1986). L'association catéchol-enzyme induirait, de plus un changement de conformation locale (Hirata *et al.*, 1971) qui favoriserait l'association avec l'oxygène et ses analogues (Mabrouk *et al.*, 1991).

Nos connaissances du site actif de cet enzyme sont encore limitées. Comme nous l'avons mentionné ci-haut, les solvants organiques, certains alcools et cétones, inhibent de façon compétitive la C2,3O. L'efficacité de l'inhibition augmente proportionnellement à la longueur de la chaîne aliphatique, ce qui suggère la présence d'une poche hydrophobe à proximité du site actif. Les cétones sont des inhibiteurs plus efficaces que les alcools (Bertini *et al.*, 1994). Ce fait suggère que le site actif se lie plus facilement

avec un carbone de conformation planaire portant un atome d'oxygène qu'avec un carbone tétraédrique. Le produit de la fission du catéchol en position meta inhibe de façon non-compétitive la réaction, suggérant que le site actif est peu complémentaire au produit de la réaction.

Des métapyrochatéchases autres que la C<sub>2,3</sub>O ont aussi été étudiées. La 1,2-dihydroxynaphtalène-1,2-dioxygénase fait partie du tronçon supérieur du métabolisme du naphthalène. Chez P. putida NCIB9816, cet enzyme est formé d'environ 14 sous-unités identiques de 19 kD chacune (Patel et Barnsley, 1980) tandis que chez Pseudomonas sp. (NCIB10535), cette dioxygénase est formée de 8 sous-unités identiques de 33 kD chacune (Kuhm *et al.*, 1991). Malgré des différences importantes au niveau structural, l'activité relative de ces deux enzymes envers le 1,2-dihydroxynaphtalène, le 3-méthylcatéchol et le 4-méthylcatéchol, est semblable et estimée à environ 100%, 3% et 6% respectivement.

Plusieurs B<sub>1,2</sub>O ont été identifiées. R. globerulus P6 en contient trois, chacune ayant ses propres caractéristiques cinétiques. Chacun de ces enzymes a une prédilection réactionnelle envers le 2,3-DHBP (Asturias et Timmis, 1993). De façon générale, il semble que les B<sub>1,2</sub>O attaquent préférentiellement le 2,3-DHBP plutôt que le catéchol, et montrent une activité supérieure envers le 3-méthylcatéchol qu'envers le 4-méthylcatéchol. De plus, ces enzymes agissent plutôt faiblement sur le 4-chlorocatéchol (Hirose *et al.*, 1994; Asturia et Timmis, 1993).

Les constantes cinétiques des B<sub>1,2</sub>O semblent varier considérablement selon la souche. Par exemple, le  $K_m$  pour le 2,3-DHBP fut évalué à 14  $\mu$ M pour la B<sub>1,2</sub>O de P. putida OU83 (Khan *et al.*, 1988) et à 114  $\mu$ M pour la B<sub>1,2</sub>O de Pseudomonas sp. CB15 (Adams *et al.*, 1992).

La B<sub>1,2</sub>O de Pseudomonas sp. LB400 (Eltis *et al.*, 1993) et la B<sub>1,2</sub>O de P. pseudoalcaligenes KF707 (Furukawa *et al.*, 1987) ont été isolées et les gènes qui les spécifient ont été clonés. Dans les deux cas, l'enzyme est formé de huit sous-unités

identiques d'environ 33 kD chacune. Les valeurs de  $K_m$  envers le 2,3-DHBP qui ont été rapportées pour ces deux enzymes, sont respectivement de 7  $\mu$ M pour la souche LB400 et de 87  $\mu$ M pour la souche KF707. Sachant que la seule différence entre ces deux enzymes consiste en une substitution de l'alanine qui occupe la position 185 chez la souche LB400, par une valine chez la souche KF707, nous pouvons nous questionner sur l'exactitude des mesures qui ont été rapportées.

Cependant, une seule mutation peut modifier la spécificité des métapyrocatechases de façon significative. La réaction d'oxydation du 4-éthylcatéchol par la C2,3O du plasmide pWW0 est faible (Ramos *et al.*, 1987). Cependant, le remplacement de la leucine en position 226 par une sérine, ou de la thréonine en position 253 par une isoleucine, confère à cette C2,3O la capacité de catalyser le metaclivage du 4-éthylcatéchol (Cerdan *et al.*, 1994). La substitution de la valine en position 291 par une isoleucine donne un effet semblable (Wasserfallen *et al.*, 1991).

#### 1.2.4 Stabilité et réactivation des métapyrocatechases

Les métapyrocatechases contiennent généralement comme co-facteur l'ion ferreux (Gibello *et al.*, 1994). Durant le cycle catalytique, l'atome ferreux serait activé par une coordination suite à des changements de conformation induits par des interactions hydrophobes entre le substrat organique et l'enzyme (Mabrouk *et al.*, 1991). La coordination du fer se ferait par quatre résidus d'histidine, un résidu de tyrosine et un résidu de glutamate (Hirose *et al.*, 1994). La désactivation chez KF707 qui résulte de la substitution de l'histidine-209 par une alanine, suggère que ce résidu serait associé au fer (Hirose *et al.*, 1994). La C2,3O partiellement dénaturée en présence d'urée entre 1 M et 3 M a moins d'affinité envers le fer. Ceci indique possiblement que la structure tridimensionnelle jouerait un rôle important dans l'association du fer et de l'enzyme.

La perte du co-facteur semble être la cause principale de la désactivation des métapyrocatechases (Sanschagrin, 1988; Nozaki *et al.*, 1968; Nakai *et al.*, 1983b;

Furukawa et Arimura, 1987; Eltis *et al.*, 1993). Cette perte peut résulter d'une oxydation par l'oxygène moléculaire ou le peroxyde d'oxygène et par l'intervention d'un chélateur de l'ion ferreux (Nozaki *et al.*, 1968). La perte de l'ion ferreux peut également être provoquée par le 3-méthylcatéchol et le 4-méthylcatéchol (Polissi et Harayama, 1993). Il a été observé que la présence de solvants organiques pouvait protéger certaines C<sub>2,3O</sub>, dont celle spécifiée par pWW0, d'une désactivation par l'air (Nozaki, 1970). Toutefois d'autres préparations de cette C<sub>2,3O</sub> ne se sont pas montrées aussi stables (Bartels *et al.*, 1984). Par conséquent, cet effet protecteur ne semble pas reproductible.

Les métapyrocatechases qui ont perdu leur co-facteur peuvent être facilement réactivées. La C<sub>2,3O</sub> provenant de pWW0 est généralement réactivée par une incubation à pH 7,5 de 30 minutes en présence de l'ion ferreux en condition anaérobie et nécessite la présence d'agents réducteurs (Nozaki *et al.*, 1968; Hirata *et al.*, 1971). Cependant, dans certains cas, il est possible de réactiver la C<sub>2,3O</sub> avec l'ion ferreux en condition aérobie. C'est le cas de la C<sub>2,3O</sub> purifiée de *P. putida* T-2, propagée sur le benzoate (Takemori *et al.*, 1971) et la C<sub>2,3O</sub> partiellement purifiée d'une souche de *P. putida* sélectionnée sur l'éthylbenzène et propagée sur le toluène (Klecka et Gibson, 1981). Chez la souche T-2, le taux de réactivation diminue en fonction du pH. La réactivation se fait en quelques minutes à pH inférieur à 6,2 et est négligeable à pH neutre (Takemori *et al.*, 1971).

La C<sub>2,3O</sub> isolée de cellules recombinantes de *Escherichia coli* contenant les gènes *xyIE* et *xyIT* du plasmide pWWO est régénérée automatiquement après sa désactivation par le peroxyde d'hydrogène ou par le 4-méthylcatéchol, un métabolite de la dégradation du toluate/xylène difficilement transformé (Polissi et Harayama, 1993). Le produit génique de *xyIT* est apparenté à certaines ferredoxines. Ce produit serait impliqué dans un système de transport d'électrons qui maintiendrait l'activité des métapyrocatechases en condition oxydante ou en présence de métabolites inhibiteurs. Des protéines homologues au produit génique de *xyIT* ont été détectées chez des bactéries portant les opérons *sal* de pNAH7 et *dmp* de pVI150, qui sont respectivement

impliqués dans le métabolisme du naphthalène et du diméthylphénol (Harayama *et al.*, 1991).

#### 1.2.5 Inhibition de la C2,3O par le 3-chlorocatéchol

Le 3-chlorocatéchol, ou son produit de metaclivage provenant de la transformation du 3-chloro ou du 4-chlorobiphényle, inhibe très fortement les métapyrocatechases (Sondossi *et al.*, 1992; Bartels *et al.*, 1984; Klecka et Gibson, 1981; Asturias et Timmis, 1993; Adams *et al.*, 1992). Il a été suggéré que cette inhibition peut causer un déséquilibre du flux métabolique de la voie catabolique du biphényle chez certaines souches microbiennes (Sylvestre, soumission).

Le 3-chlorocatéchol peut intervenir de différentes façons pour inhiber la C2,3O codée par le plasmide pWW0. Entre autres, le 3-chlorocatéchol inhibe irréversiblement cet enzyme par un mécanisme suicidaire. Dans ce cas, le produit résultant du metaclivage du 3-chlorocatéchol est un dérivé chloroformyle qui réagit rapidement avec l'enzyme pour l'inactiver (Bartels *et al.*, 1984). Cette C2,3O est également inhibée de façon réversible par le 3-chlorocatéchol qui agit comme chélateur et désactive l'enzyme en s'associant à l'ion ferreux. Enfin, à faible concentration (nM), le 3-chlorocatéchol inhibe la C2,3O de façon compétitive (Harayama *et al.*, 1992).

Cependant, selon la C2,3O à laquelle on s'adresse, les mécanismes d'inhibition par le 3-chlorocatéchol sont variables. Par exemple, Klecka et Gibson (1981) ont démontré que l'inhibition d'une métapyrocatechase isolée d'une souche de P. putida, sélectionnée sur l'éthylbenzène et propagée sur le toluène résultait exclusivement de la chélation de l'ion ferreux par le 3-chlorocatéchol. La différence de sensibilité des métapyrocatechases envers le 3-chlorocatéchol résulterait possiblement de variations dans la structure primaire. Par exemple, une substitution du résidu isoleucine-291 par une valine sur la C2,3O de pWW0, diminue l'effet inhibiteur du 3-chlorocatéchol. Un mutant de P. putida affecté par cette mutation peut croître sur le benzoate/tolué en présence de 3-chlorocatéchole contrairement à la souche sauvage (Wasserfallen, 1991).

Du fait que certains congénères de BPC, particulièrement ceux portant un atome de chlore en position meta sont ultimement transformés en 3-chlorocatéchol, les mutations conduisant à la résistance de la B1,2O et de la C2,3O de la souche B-356 sont particulièrement importantes pour améliorer la capacité de cette souche à dégrader les BPC.

### 1.3. Mécanismes d'adaptation des bactéries envers leur environnement

#### 1.3.1 Introduction

Durant le vingtième siècle, plusieurs composés chimiques qui auparavant étaient absents ou se trouvaient en faible quantité dans l'environnement, ont été introduits dans la biosphère. La présence d'antibiotiques dans les milieux hospitaliers, tel l'ampicilline et de produits associés aux activités industrielles comme les BPC, a favorisé le développement de souches bactériennes dotées de phénotypes spécifiques leur conférant la capacité de se propager dans ces nouvelles conditions. Cette adaptation est en partie redevable à plusieurs types de mutation qui peuvent affecter les mécanismes de régulation des produits géniques appropriés, le nombre de copie des gènes (amplification génique) ou encore la structure de certains enzymes pour leur permettre d'attaquer de nouveaux substrats.

Cette revue portera principalement sur : 1) les mécanismes de régulation d'enzymes responsables du métabolisme de composés aromatiques, 2) le rôle de l'amplification des gènes dans l'adaptation de certains organismes sous pression de sélection et, 3) le rôle de la duplication des gènes dans la divergence des protéines.

#### 1.3.2 Induction et régulation

La capacité des bactéries à croître sur divers substrats dépend de leur capacité à réguler l'expression des gènes spécifiant les enzymes qui catalysent les réactions métaboliques conduisant à leur catabolisme. Pour qu'un produit puisse être dégradé,

il est nécessaire que sa présence dans le milieu de culture favorise l'expression des enzymes responsables de son catabolisme. Plusieurs mécanismes ont été développés chez les bactéries pour réguler l'expression de la transcription génétique. La régulation de la transcription des gènes présents sur les plasmides régissant le catabolisme des composés aromatiques se fait souvent selon un mode positif (Ghosal *et al.*, 1985). Ci-après, nous ferons un résumé des mécanismes de régulation de quelques unes des voies cataboliques les mieux connues à ce jour.

Les plasmides TOL font partie d'une classe de plasmides qui portent les gènes responsables du métabolisme du meta-xylène, du toluène et du toluate. Le plasmide TOL type, pWWO, qui a été isolé de P. putida mt-2 (Worsey et Williams, 1975) porte ses gènes structuraux et de régulation sur le transposon Tn4651 (Tsuda et Ino, 1987). La voie catabolique du toluène est organisée en deux tronçons (Burlage *et al.*, 1989; Franklin *et al.*, 1981). Le tronçon supérieur, régi par les gènes xyICAB, est responsable de la dégradation du xylène et du toluène en meta-toluate ou en benzoate. Le tronçon inférieur, régi par les gènes xyIDLEGFJKIH, est responsable de la dégradation du benzoate en intermédiaire du cycle de Krebs (Meer *et al.*, 1992). Chacun des deux tronçons du plasmide TOL est sous le contrôle de son propre régulateur; XylR, synthétisé de façon constitutive est, en absence d'inducteur, un autorépresseur. En présence de toluène ou de meta-xylène, XylR se complexe à l'opérateur de l'opéron spécifiant les enzymes du tronçon supérieur et du gène de régulation xyIS. Ceci active leur transcription. XylS, en présence de benzoate ou de toluate (deux métabolites possibles du tronçon supérieur) induit fortement la transcription des gènes du tronçon inférieur (Burlage *et al.*, 1989).

Les gènes responsables de la dégradation du naphthalène sont aussi d'origine plasmidique (Cane et Williams, 1986). Les gènes du tronçon supérieur incluant nahA à nahF, codent pour les enzymes qui catalysent la transformation du naphthalène en salicylate, et ceux du tronçon inférieur (nahG à nahN) codent pour la transformation du salicylate en pyruvate et en acétaldéhyde (Schell, 1990). Les produits des gènes du tronçon supérieur ainsi que le produit du gène de régulation nahR sont exprimés de

façon constitutive à un niveau basal. En présence du métabolite du tronçon supérieur (le salicylate), *nahR* induit la transcription des gènes des deux tronçons simultanément, conduisant à la production de niveaux élevés des enzymes impliqués dans la transformation du substrat (Schell 1990; Yen et Serdar 1988).

On connaît peu les mécanismes d'induction des tronçons supérieur et inférieur du métabolisme du biphenyle. On sait cependant que chez *Pseudomonas paucimobilis* Q1, les enzymes sont induits par le biphenyle, le xylène/toluène ou le salicylate (Furukawa *et al.*, 1983). Il existe également plusieurs évidences que le produit final du tronçon supérieur du métabolisme du biphenyle (le benzoate) ne semble pas induire d'enzymes du tronçon inférieur chez *P. paucimobilis* Q1 (Furukawa *et al.*, 1983), chez la souche B-356 (Sondossi *et al.*, 1992), et chez *Pseudomonas* souche CB406 (Lloyd-Jones *et al.*, 1994). Ceci est contraire au métabolisme du xylène/toluène chez les souches portant les plasmides TOL, et au métabolisme du naphthalène, où le benzoate et le salicylate induisent les tronçons inférieurs respectifs, comme il est mentionné plus haut. Chez la souche B-356, il a été démontré que le biphenyle, le chlorobiphenyle ainsi que le 3-hydrobenzoate, le 2,3- et le 2,6-dihydroxybenzoate peuvent induire des métapyrocatechases (Sondossi communication personnelle). Toutefois, le rôle fonctionnel de ces métapyrocatechases reste encore à être précisé. De plus, à ce jour, la présence d'une protéine de régulation qui s'associerait au biphenyle pour activer la transcription des enzymes du tronçon supérieur n'a pas encore été démontrée.

### 1.3.3 Amplification des gènes

La duplication et l'amplification de gènes sont des phénomènes qui peuvent augmenter le taux de synthèse d'un produit génique chez un individu. Le résultat en est une accentuation du caractère phénotypique correspondant. Sous une pression de sélection appropriée, les individus d'une population ayant ces phénotypes amplifiés sont avantagés. À titre d'exemple, la capacité de *Pseudomonas* sp. ligné B13 d'utiliser le 3-chlorobenzoate résulte d'une amplification d'un fragment d'ADN de 4.3 kpb organisé en tandem (Rangnekar, 1988). De façon similaire, certaines observations rapportées par

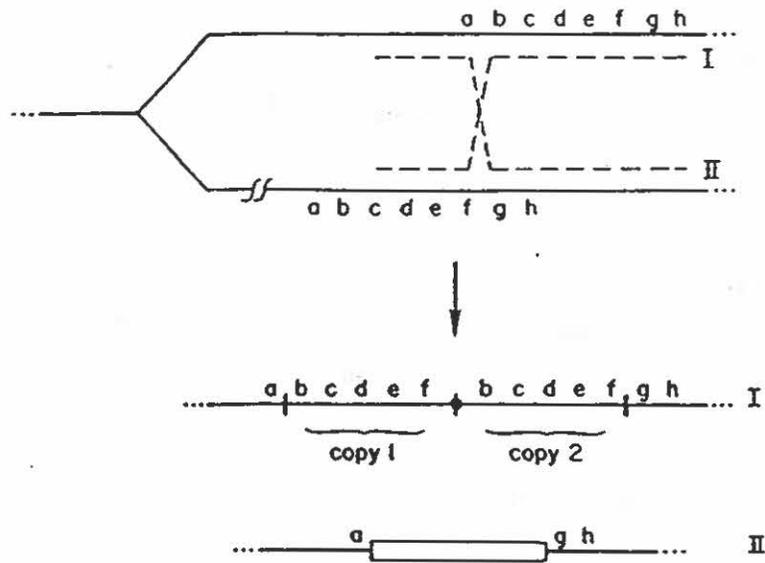


Figure 3 : Recombinaison entre deux brins naissants d'ADN se traduisant par une duplication (I) ou une délétion (II) de gènes (Anderson et Roth, 1977)

Desnoyer (1991) suggèrent que la sélection de C. testosteroni B-356 sur un milieu de culture contenant du biphényle comme unique source de carbone, conduirait à l'amplification des gènes impliqués dans le métabolisme de ce composé.

Plusieurs mécanismes sont mis à la disposition des bactéries pour l'amplification des gènes. La recombinaison impliquant deux séquences hétérologues entre brins naissants d'ADN (illegitimate crossing-over) semble être un mécanisme de duplication fréquemment utilisé par les bactéries (figure 3). Selon ce mécanisme, la réplication des deux brins d'ADN se fait de façon inégale, provoquant la duplication ou la délétion du gène se trouvant entre les sites de recombinaison (Anderson et Roth 1977).

Un autre type de duplication implique des séquences répétitives et se fait entre segments homologues. Ces duplications sont favorisées sous pression de sélection par le système RecA, et demeurent stables une fois la pression allégée en absence du système RecA (Petes 1988). Le génome procaryote contient plusieurs types de séquences répétitives qui peuvent favoriser ces recombinaisons (Lupski et Weinstock 1992; Petes 1988).

Le génome de E. coli K-12 comprend sept unités de transcription distinctes dont chacune porte tous les gènes requis pour la synthèse de l'ARN ribosomale (rARN) (nommés rna à rng) (Lindahl et Zengel 1982). L'irradiation aux rayons ultraviolets ou certains traitements mutagènes provoquent la duplication en tandem de certaines régions du chromosome (Hill *et al.*, 1977). Ces segments d'ADN dupliés originent souvent de régions localisées à l'intérieur de cistrons de ARN (Anderson et Roth 1981). Cette forme de duplication est dépendante du système RecA (Tlsty *et al.*, 1984). Les mutants portant des gènes dupliés sont stabilisés dans les souches Rec<sup>-</sup> (Anderson et Roth 1981). Dans ce cas, les mécanismes de duplication sont encore mal compris mais certaines données suggèrent que ce phénomène se produit au cours d'un processus de recombinaison entre segments homologues naissants des gènes de l'ARN. Ces duplications en tandem sont instables et sont maintenues par la pression de sélection exercée sur le gène dupliqué (Anderson et Roth, 1977; Lindahl et Zengel, 1982).

La duplication est fréquemment un pré-requis à l'amplification. Chez Streptomyces lividans 66, un segment d'ADN de 6,8 kpb, bordé de part et d'autre par des unités d'ADN identiques de 1 kpb, est d'abord dupliqué. Ce segment dupliqué sert ensuite à l'amplification d'un segment de 5,7 kpb, produisant jusqu'à 500 copies en tandem de ce fragment. Dans certains cas, la duplication est l'étape limitante de l'amplification (Dyson et Schrempf, 1987).

Certains mutants de E. coli K-12 sélectionnés sur l'ampicilline expriment une grande résistance à cet antibiotique. Le degré de résistance chez ces mutants est proportionnel au degré d'amplification des gènes responsables de l'expression de la  $\beta$ -lactamase (Normark *et al.*, 1977). Certains mutants peuvent porter en tandem de 30 à 50 copies des mêmes gènes. Cette amplification est générée à partir d'une duplication d'un segment d'ADN compris entre 9 kpb et 13 kpb contenant le gène de la  $\beta$ -lactamase. La duplication préalable dépend du système RecA et impliquerait une recombinaison homologue entre brins naissants d'ADN. Les segments homologues d'ADN qui délimitent la région dupliée auraient une longueur de 12 paires de bases (Edlund et Normark, 1981).

La recombinaison entre brins naissants d'ADN ne se fait pas toujours entre segments homologues. Certains mutants de E. coli K-12 sélectionnés sur l'ampicilline portent un fragment d'ADN amplifié dont la formation est indépendante du système RecA. La présence de nitrozoguanidine, un mutagène qui agit à la fourche de réplication, augmente la fréquence de ces mutants suggérant que l'amplification se fait à partir d'ADN nouvellement synthétisé. L'amplification dans ce cas, se produirait au cours du processus de recombinaison nonhomologue entre brins naissants d'ADN, sans passer par l'intermédiaire d'une duplication (Normark *et al.*, 1977). Des résultats semblables ont été obtenus pour la duplication du gène argH de E. coli K-12 (Beefnick *et al.*, 1974).

Les plasmides sont des molécules circulaires d'ADN extrachromosomique qui peuvent se répliquer plus rapidement que l'ADN chromosomique de la cellule hôte. La

réplication rapide des plasmides dans la cellule, en multipliant le nombre de copies de plasmides, permet d'amplifier les gènes qu'ils portent. Les plasmides représentent donc un autre mécanisme favorisant l'amplification des gènes.

Les plasmides cataboliques (et de résistance) sont souvent formés par insertion et délétion d'éléments transposables (Cohen, 1976; Villawoel *et al.*, 1983). Ces plasmides peuvent être divisés en deux sections; un fragment essentiel au maintien qui porte les gènes nécessaires pour la réplication et le transfert du plasmide et un fragment portant les gènes cataboliques et les gènes de régulations. Chez les plasmides du groupe Inc-P, qui regroupe plusieurs plasmides cataboliques, la région essentielle contient peu de sites de restriction. Ceci explique la capacité de ces plasmides de se propager chez un grand nombre d'hôtes (Burlage *et al.*, 1990; Don et Pemberton 1981). Cette capacité de transfert permet le déploiement rapide d'un phénotype dans une population hétérogène.

#### 1.3.4 La duplication des gènes et la divergence des protéines

Il a été postulé que la duplication de gènes jouerait un rôle important dans la divergence des protéines. La présence de plusieurs copies de ce gène augmente la fréquence des mutations et la possibilité de les sélectionner. Ainsi le duplicata d'un gène essentiel à la survie d'un organisme pourrait subir des mutations de tout ordre, incluant des mutations néfastes sans qu'elle soient létales. Par la suite, ce gène silencieux, pourrait subir des mutations favorables redonnant au produit génique une activité avantageuse à la cellule qui le porte dans certaines conditions de sélection (Meer *et al.*, 1992).

Les structures tertiaires de protéines homologues sont conservées à un plus grand degré que leurs structures primaires (Dijkstra *et al.*, 1983). Les mutations amenant des divergences se font fréquemment en respectant la conformation de la chaîne peptidique originale. Tel semble être le cas des métapyrocatéchases. Par alignement maximal des séquences primaires de cinq métapyrocatéchases, Harayama et Reikik (1989) ont

démontré que quatre régions avec de fortes tendances à former des repliements bêta sont conservées. Ceci suggère une similarité dans la structure tertiaire des enzymes.

Une mutation peut conduire à des changements de résidus d'acides aminés à l'intérieur ou à l'extérieur d'une protéine globulaire. Les résidus hydrophobes ont tendance à se trouver à l'intérieur des protéines globulaires (Rose *et al.*, 1985a) où ils joueraient un rôle majeur dans la stabilité thermique de la structure tridimensionnelle (Dill, 1990). Les codons correspondant aux acides aminés aliphatiques partagent plusieurs points en commun. Une mutation sur un tel codon produit souvent un autre résidu aliphatique. De telles mutations influenceraient la stabilité thermique d'une protéine sans pour autant en influencer l'activité. Par exemple, la substitution de certains résidus aliphatiques de la barnase diminue de moitié sa stabilité sans changer de façon importante son activité (Kellis *et al.*, 1989). En condition environnementale où la stabilité thermique n'est pas un facteur de sélection, les protéines ayant des mutations aliphatiques-aliphatiques ne sont pas moins avantageées que la protéine de départ.

La divergence entre protéines homologues est souvent causée par des mutations touchant les résidus de surface (Summers *et al.*, 1987). Ceci inclut dans certains cas, les résidus participant au site actif et les résidus impliqués dans les repliements de la chaîne peptidique qui sont importants dans la structure tertiaire des protéines (Rose *et al.*, 1985b). Des mutations dans ces régions conduisent à des changements importants de l'activité d'une protéine (Hampsey *et al.*, 1986). Des gènes inactivés peuvent être portés par un organisme sous forme silencieuse si le gène se trouve aussi sous forme active sur un autre loci. Par l'accumulation de mutation, ce gène peut contribuer éventuellement à l'adaptabilité de générations subséquentes (Meer *et al.*, 1992).

La duplication de gènes se produit quelques fois sur des plasmides. Le plasmide pJP2 porte les gènes responsables du métabolisme du 2,4-dichlorophénoxyacétate sur un fragment d'ADN de 25 kpb. Lorsque la souche qui porte le plasmide est soumise à

certaines conditions de sélection spécifiques, ce fragment de 25 kpb se duplie en tandem. Le plasmide pJP4, qui porte les gènes responsables du métabolisme du 3-chlorobenzoate, a un segment d'ADN de 24,5 kpb sur lequel les fonctions cataboliques sont dupliées par inversion. En l'absence d'une pression sélective, il y a perte d'une des copies chez pJP4 et persistance de la duplication chez pJP2 malgré la présence du système RecA. La duplication en tandem est très stable et pourrait permettre la divergence de ces deux gènes (Negoro *et al.*, 1983). Ce mécanisme est utilisé pour expliquer l'apparition de l'hydrolase pour l'oligomère linéaire de l'acide 6-aminohexanoïque du plasmide pOAD2 de *Flavobacterium* sp.KI72. Selon Okada *et al.*, (1983), cette hydrolase se serait développée à partir d'un duplicata du gène codant pour l'hydrolase du dimère cyclique de l'acide 6-aminohexanoïque.

Les gènes pour la C2,3O sont souvent dupliés sur les plasmides TOL. C'est ainsi que pWW5, pWW74 et pWW88 contiennent chacun deux gènes pour la C2,3O qui hybrident avec *xyIE* de pWW0. D'autres plasmides de la série TOL comme pWW14, pWW15 et pWW85, portent plutôt des gènes isofonctionnels; l'un des gènes hybride davantage avec le gène codant pour la C230II de pWW15 (Williams *et al.*, 1992; Williams et Chatfield 1986). Le plasmide pWW53, porte deux opérons pour la fission en *meta* du catéchol et chacun contient un gène codant pour la C2,3O qui hybride avec le gène de la C2,3OI. Cependant, ces deux gènes ne sont pas identiques. Leurs produits géniques sont désignés C2,3OIa et C2,3OIb. L'arrangement de l'ADN sur les plasmides TOL semblerait comporter plusieurs éléments qui stabilisent les duplications (Williams *et al.*, 1992). La duplication des gènes sur les plasmides TOL pourrait être un mécanisme qui facilite la divergence de la C2,3O et d'autres protéines qu'ils contiennent, permettant l'adaptation de certaines cellules à de nouveaux composés xénobiotiques. Plusieurs types de mutation de la C2,3O de pWWO peuvent conduire à des variations de sa spécificité (Harayama *et al.*, 1992; Ramos *et al.*, 1987). La recombinaison homologe à l'intérieur de deux gènes codant pour la C2,3O qui sont dupliés en tandem et qui diffèrent dans leurs portions N et C terminales, pourrait conduire à la formation de protéines de fusion ayant différentes spécificités (Williams *et al.*, 1990). Ceci permettrait de faciliter l'adaptation de certaines souches aux

nouveaux composés qui sont apparus au cours des dernières décades.



## CHAPITRE 2

### MATÉRIEL ET METHODES

#### 2.1 Produits chimiques

Le biphényle, le 4-chlorobiphényle, le catéchol, le 3-méthylcatéchol et le 4-méthylcatéchol provenaient de Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, Wis). Le 3-chlorocatéchol a été offert par J. Knuutinen, département de chimie, Université de Jyväskylä, Finlande. Le 4-chlorocatéchol a été synthétisé à partir de 5-chlorosalicylaldéhyde (Aldrich Chemical Co.) (Sondossi *et al.*, 1992). Le 3,4-dihydroxybiphényle provenait de Analabs, Inc. New Haven, Conn.

#### 2.2 Milieux de cultures, souches bactériennes et plasmides

Les milieux de cultures utilisés sont: le milieu minimal 30 (MM30), (Sylvestre, 1980), le milieu Luria-Bertani (LB), (Sambrook *et al.*, 1989), et le milieu Mueller-Hinton (Gibco Diagnostics).

La souche de *C. testosteroni* B-356 a été isolée d'un échantillon de sol contaminé au BPC (Ahmad *et al.*, 1990). Dans cette étude, nous avons utilisé cette souche et un mutant de la souche B-356 sauvage qui a été obtenue par transferts successifs sur MM30 contenant du biphényle comme seule source de carbone (Sondossi *et al.*, en préparation). Cette souche fut propagée pendant 24 heures sous agitation à 250 rpm à 29°C dans des fioles Erlenmeyers de deux litres contenant 800 ml de MM30, saturé de biphényle et additionné de 50 mg d'extrait de levure et de 50 mg d'hydrolysate acide de peptides.

Les autres souches utilisées dans cette étude sont Escherichia coli JM109 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985), E. coli DH1 (Sambrook *et al.*, 1989), E. coli SK1592 (Kushner, 1978), E. coli NM522 (Williams, collection personnelle), ainsi que Pseudomonas putida KT2440 (Bagdasarian *et al.*, 1981).

Dans ce travail, nous avons utilisé le plasmide pDA2 dérivé du cosmide pPSA842 (Ahmad *et al.*, 1990) et qui porte les gènes bphAEFBC de la souche B-356 (voir la carte de restriction à la figure 11 dans la section Résultats). Nous avons aussi utilisé deux sous-clones de pDA2 insérés dans le vecteur pT7.5 (Tabor et Richardson, 1985) et qui ont été décrits par Bergeron *et al.*, (1994). L'un de ces sous-clones portait les gènes bphBC sur un fragment d'ADN XhoI/XhoI de 2 kpb. L'autre sous-clone portait les gènes bphAEFBC sur un fragment d'ADN SmaI/SmaI de 6,3 kpb. Lorsque ce fragment de 6,3 kpb était digéré par SmaI, il en résultait deux fragments : un fragment SmaI/SmaI de 2,8 kpb portant bphA et un fragment SmaI/SmaI de 3,6 kpb portant bphFBC (Ahmad *et al.*, 1990). Le fragment XhoI/XhoI de 2 kbp portant les gènes bphBC avait été cloné dans pT7.5 et il pouvait être récupéré en digérant ce plasmide avec les enzymes SmaI et ClaI.

Nous avons utilisé le plasmide pMMB26 (Bagdasarian *et al.*, 1983). Un fragment EcoRI/EcoRI de 2,2 kbp de ce plasmide porte le gène xyIE originaire du plasmide pWW0. Le recombinant de E. coli SK1592 qui portait pMMB26 était maintenu par sélection sur 100 µg/ml d'ampicilline (Bagdasarian *et al.*, 1983).

Enfin, le plasmide pWW15-3201 nous a été gracieusement offert par P. Williams (School of Biological Science, University of Wales). Un fragment EcoRI/EcoRI de 2,1 kbp de ce plasmide porte le gène xyIEII originaire du plasmide pWW15 (Williams, communication personnelle). La souche E. coli NM522 était maintenue par sélection sur 50 µg/ml d'ampicilline.

### 2.3 Étapes de purification de la B1,2O et de la C2,3O

Avant la récolte des cellules, le biphenyle était enlevé du milieu de croissance par filtration sur laine de verre. Après centrifugation à 6 000 x g pendant une heure, les cellules étaient lavées avec du tampon 4-morpholinepropanesulfonate (MOPS) 20 mM pH 7.4. Les cellules obtenues après une deuxième centrifugation étaient conservées à -70°C. Toutes les étapes de purification pour la B1,2O et la C230 furent exécutées à 4°C dans le tampon N-2-hydroxyéthyl-pipérazine-N'-2-éthanesulfonate (HEPES) 25 mM, pH 7.3 contenant 10% d'éthanol (v/v) (Tampon A), sauf indications contraires.

Six g de cellules d'une culture de B-356 furent suspendues dans 12 ml de tampon A. Les cellules étaient lysées par sonication à puissance et intensité modérée dix fois pendant 15 secondes chacune. Les débris cellulaires étaient éliminés par centrifugation à 60 000 x g pendant une heure. Le surnageant constituait l'extrait brut.

La deuxième étape de la purification consistait à chauffer l'extrait brut à 60°C pendant 15 minutes. La solution résultante était centrifugée à 60 000 x g pendant 15 minutes. Le surnageant contenait les métapyrocátéches actives.

Le surnageant était ensuite saturé à 20% avec du sulfate d'ammonium et placé sur une colonne jetable de Bio-Gel (15 cm x 1.5 cm) contenant 1 ml de Fast-Flow Phenyl-Sepharose préalablement équilibrée avec du tampon A saturé au sulfate d'ammonium à 20%. La colonne était lavée avec du tampon A saturé à 3%. La C2,3O éluait de la colonne avec 5 ml de tampon A saturé à 1% de sulfate d'ammonium. La B1,2O était éluee lentement de la colonne Fast-Flow Phenyl-Sepharose avec plus de 15 ml de tampon A ou rapidement avec 5 ml de tampon A contenant 25% (v/v) de glycol d'éthylène. La B1,2O obtenue par longue élution est plus facilement purifiable sur hydroxyapatite.

Les fractions provenant de la colonne Fast-Flow Phenyl-Sepharose contenant la B1,2O ou la C2,3O étaient ensuite chromatographiées sur une colonne d'hydroxyapatite

équilibrée avec du tampon A. La B1,2O et la C2,3O éluaient avec du tampon de purification contenant 10 mM et 20 mM de phosphate respectivement. La C2,3O a requis une étape de purification supplémentaire sur une colonne de Fast-Flow DEAE équilibrée avec du tampon A. La C2,3O éluait avec du tampon A contenant 0,25 M de NaCl.

#### 2.4 Essais enzymatiques et cinétiques

Les essais enzymatiques étaient réalisés à 25°C dans du tampon phosphate à 50 mM et à un pH de 7,5 dans un volume total de 1 ml. L'activité de l'extrait brut était évaluée en mesurant la consommation d'oxygène pendant les dix premières secondes de la réaction. L'extrait brut contient des enzymes qui consomment les produits de metaclivage du 2,3-DHBP et du catéchol. Les enzymes qui transforment ces produits de metaclivage sont absents dans les autres préparations. Pour cette raison, l'activité de ces préparations était mesurée par spectrophotométrie. Les mesures ce sont faites sur un appareil Philips UV/Vis PU8715 muni d'un mécanisme de réglage de température. Le coefficient d'extinction et la longueur d'onde d'absorbance maximale des produits de metaclivage des substrats étudiés ont été déterminés expérimentalement dans du tampon phosphate à pH 7.5. Leurs valeurs sont les suivantes: le 2,3-DHBP, 20 000  $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  à 434 nm; le catéchol, 44 000  $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  à 375 nm; le 3-méthylcatéchol, 13 000  $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  à 388 nm; le 4-méthylcatéchol, 32 500  $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  à 382 nm; le 4'-chloro-2,3-dihydroxybiphényle, 25 000  $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  à 438 nm et le 4-chlorocatéchol, 43 750  $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  à 380nm.

Les mesures d'activité de la B1,2O et de la C2,3O durant les étapes de purification et durant les essais d'inhibition ont été effectuées en présence de 15  $\mu\text{M}$  de 2,3-DHBP ou de 330  $\mu\text{M}$  de catéchol avec entre 0.1  $\mu\text{g}$  et 1.0  $\mu\text{g}$  de protéines en solution. Les essais utilisés pour les études cinétiques et les études d'inhibition par le 3-chlorocatéchol ont été réalisés en variant la concentration du substrat diol et de l'inhibiteur (voir 3.1.4 et 3.1.5 de la section résultats pour les concentrations de substrats et d'inhibiteurs utilisées). Les paramètres cinétiques furent obtenus après traitement des

données par la méthode Lineweaver-Burk.

Lorsque nécessaire, les métabolites produits dans le milieu réactionnel furent analysés et identifiés par chromatographie en phase gazeuse combinée à la spectrométrie de masse. Les métabolites étaient d'abord dérivés avec du trimethylsilyl-trifluoroacétamide puis analysés en suivant les protocoles décrits par Massé *et al.*, (1989).

### 2.5 Détermination de la stabilité des enzymes

La stabilité de la B1,2O et de la C2,3O a été évaluée en utilisant des préparations de protéines qui avaient été chauffées à 60°C comme nous l'avons décrit à la section 2.3. Ces préparations étaient entreposées à 4°C, à -20°C et à -70°C dans du tampon HEPES 25mM à pH7,3 contenant les solvants organiques suivant: soit 10% (v/v) d'éthanol; 10% de méthanol ou 10% d'un mélange 1:1 acétone:glycérol. Ces essais ont aussi été déterminés avec ou sans DTT (à 10 mM). L'activité de chacune de ces préparation a été suivie périodiquement durant cinq jours.

### 2.6 Protocole de réactivation des enzymes

La B1,2O qui avait été désactivée après passage sur hydroxyapatite a été réactivée dans le tampon A en présence de 4 mM de DTT et 2 mM de FeSO<sub>4</sub>. Le taux de réactivation d'une préparation de C2,3O inactive en milieu d'incubation à différents pH, a été évalué en incubant à 25°C, 25 µl de la solution de protéine diluée dans 225 µl de tampon phosphate 50 mM à des pH entre 5,4 et 6,5. Des résultats préliminaires ont suggéré que la nature du tampon utilisé avait une influence sur l'activité de la C2,3O. Pour cette raison l'étude de l'effet du pH est faite en utilisant seulement du tampon phosphate malgré le fait que ce tampon est peu efficace à pH acide. Les milieux d'incubations contenaient 10% d'acétone, 0,4 mM de DTT et 0,4 mM de FeSO<sub>4</sub> (Takemori *et al.*,1971). Des aliquots furent prélevés périodiquement. L'activité métapyrocatechase a été déterminée par spectrophotométrie selon le protocole décrit

à la section 2.4 de Matériel et Methodes. Le taux de réactivation de la C2,3O fut ainsi déterminé pour chaque milieu d'incubation.

### 2.7 Production du 2,3-DHBP et du 4'-chloro-2,3-DHBP

Les productions de 2,3-DHBP et de 4'-chloro-2,3-DHBP ont été effectuées par la méthode décrite par Ahmad *et al.*, (1991) en utilisant *P. putida* KT2440 portant le plasmide pDA269. Ce plasmide contient les gènes *bphA* et *bphB*. Cette souche a été propagée dans un litre de MM30 contenant 1% de glucose (p/v), 150 µg/ml de streptomycine et 0,5 mM de IPTG. Les cellules furent incubées à 29°C sous agitation à 250 rpm pendant 24 heures. Les cellules ont été récoltées par centrifugation à 6 000 x g et resuspendues dans le même milieu contenant en plus soit 100 mg de biphényle pour la production de 2,3-DHBP ou 100 mg de 4-chlorobiphényle pour la production de 4'-chloro-2,3-DHBP. Les cellules furent incubées à 29°C avec agitation pendant environ 18 heures. L'excès de biphényle ou de 4-chlorobiphényle était filtré sur laine de verre. Les cellules étaient déposées par centrifugation à 6 000 x g. Le pH du surnageant était ajusté à 7,5 avec du NaOH 6 M avant d'être extrait trois fois avec de l'acétate d'éthyle. Les extraits furent combinés, évaporés à sec avec un évaporateur rotatif et redissous dans un volume minimum d'hexane. L'analyse par chromatographie en phase gazeuse (GC-FID) de cet extrait montrait la présence de biphényle et d'un méthoxybiphényle en plus du diol. Celui-ci fut purifié par chromatographie sur une colonne (0,5 cm x 15 cm) de silice (acide silicique, Sigma, 60-200 mesh) équilibré avec de l'hexane.

L'extrait brut était introduit sur la colonne. Le biphényle était élué de la colonne avec 15 ml d'hexane. Le méthoxybiphényle éluait complètement de la colonne avec 15 ml d'une solution composée de 96% d'hexane et 4% d'acétate d'éthyle. Le 2,3-DHBP ou le 4'-chloro-2,3-DHBP éluait de la colonne avec 15 ml d'un solvant composé de 90% d'hexane et 10% d'acétate d'éthyle. Les fractions contenant les diols étaient évaporées à sec et dosées par gravimétrie avant d'être solubilisées dans un volume connu de diméthylsulfoxyde (DMSO). La pureté de la préparation de diol était

vérifiée par GC-MS.

## 2.8 Méthodes analytiques

La quantité de protéine dans les préparations d'enzyme fut estimée par la méthode BCA (acide bicinchroninique) (Smith *et al.*, 1985) à 60°C selon le protocole décrit par Pierce Chemical d'où provenaient les réactifs. L'albumine de sérum bovin a servi de standard dans toutes nos analyses.

Les électrophorèses en condition dénaturante ont été réalisées sur gel de polyacrilamide avec SDS (SDS-PAGE) selon la méthode de Laemmli (1970) utilisant les standards à poids moléculaires moyens de Pharmacia. Les protéines étaient révélées avec du bleu de coomassie.

Après SDS-PAGE les protéines étaient transférées par "electroblotting" sur une membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF), selon la méthode décrite par Matsudaira (1987). Une bande de 35 kD soupçonnée d'être la C2,3O fut séquencée selon la méthode d'Edman et Beggs (1967) à l'Institut de Recherches en Biotechnologie de Montréal.

## 2.9 Etude d'induction des métapyrocatechases

La souche de C. testosteroni B-356 adaptée sur le biphenyle fut cultivée pendant 24 heures à 29°C, sous agitation dans 50 ml de MM 30 contenant 0,1% (p/v) de biphenyle. Cette culture fut ensuite utilisée pour inoculer une série de milieux de cultures composés de MM30 contenant 0,1% (p/v) de diverses sources de carbone (voir tableau IX de la section résultats). Ces cultures étaient incubées à 29°C avec agitation jusqu'à l'obtention d'une densité cellulaire correspondant à une valeur d'absorbance entre 0,2 et 1,0 à 750 nm. Il était jugé qu'à ces concentrations les cellules se trouvaient dans la phase logarithmique de croissance. Tout dépendant de la source de carbone, le temps d'incubation pouvait varier entre quelques heures et plus d'une

semaine. Les cellules étaient recueillies par centrifugation et lavées une fois avec du tampon MOPS 20 mM pH 7,4. Elles étaient ensuite suspendues dans 1 ml de tampon A puis conservées à -20°C jusqu'à utilisation.

Les métagyrocatechases ont été purifiées partiellement après la lyse des cellules par sonication et un traitement à la chaleur, selon le protocole décrit dans la section 2.3 de résultats. L'activité métagyrocatechase de l'extrait fut évaluée à 25°C dans du tampon phosphate à pH 7,5 50 mM contenant soit 15  $\mu$ M de 2,3-DHBP ou 330  $\mu$ M de catéchol. Les proportions d'activité attribuables à la B1,2O et à la C2,3O dans un mélange contenant ces deux enzymes a pu être estimée à l'aide d'équations à deux variables, l'une représentant la transformation du catéchol (équation 1) et l'autre, la transformation du 2,3-DHBP (équation 2). Selon les résultats présentés au tableau IV de la section Résultats la B1,2O est 10 fois plus active envers le 2,3-DHBP que le catéchol, et la C2,3O est 2,8 fois plus active envers le catéchol que le 2,3-DHBP. Ces informations nous ont permis d'établir les équations 1 et 2 de la façon suivante:

$$(1) [C2,3O]_{rel/cat} + [B1,2O]_{rel/cat} = \text{Activité totale envers le catéchol}$$

$$(2) (1/2,8)[C2,3O]_{rel/cat} + 10[B1,2O]_{rel/cat} = \text{Activité totale envers le 2,3-DHBP}$$

où  $[C2,3O]_{rel/cat}$  et  $[B1,2O]_{rel/cat}$  est la concentration catalytique relative des deux enzymes.

Le paragraphe qui suit illustre un exemple de calcul établi en se servant de ces deux équation.

Deux  $\mu$ l d'extrait cellulaire obtenus de la souche B-356 adaptée, propagée sur le biphényle, transforment 0,82  $\mu$ moles de catéchol par minute et 2,75  $\mu$ moles de 2,3-DHBP par minute dans le milieu de réaction décrit à la section 2.4. En résolvant les deux équations on obtient une valeur pour  $[C2,3O]_{rel/cat}$  de 0,57 (70%) et pour  $[B1,2O]_{rel/cat}$  de 0,25 (30%).

## 2.10 Préparation de l'ADN

L'ADN chromosomique fut préparé par la méthode décrite par Sambrook *et al.*, (1989). Les cellules de C. testosteroni B-356 (souche sauvage et souche adaptée sur biphényle) furent propagées dans du milieu LB, recueillies par centrifugation puis suspendues dans 10 ml de tampon TE (composé de Tris 10 mM pH 8,0 et de EDTA 1 mM) contenant 60 mM de NaCl. Les cellules étaient lysées en présence de SDS à 1% (p/v) et de pronase à 20 mg/ml. Le tampon était ajusté à 500 mM de NaCl et la suspension était incubée à 68°C pendant 30 min.. Le lysat cellulaire était refroidi rapidement sur glace et extrait quatre fois avec du phénol et 2 fois avec une solution de chloroforme:isoamyl alcool 24:1. L'ADN était ensuite précipité à -20°C après addition d'une solution d'acétate de potassium (concentration finale de 0,5M) et de l'éthanol (concentration finale de 65% (v/v)). L'ADN était redissous dans du tampon TE contenant de la RNase à 100 µM et conservé à 4°C.

L'ADN plasmidique fut préparé par la méthode décrite par Sambrook *et al.*, (1989) suivant le protocole "Method by boiling" et fut conservé à -20°C.

## 2.11 Préparation des sondes et hybridation

Les fragments d'ADN étaient d'abord digérés par les endonucléases appropriées, selon les conditions établies par le fabricant (BRL). Les fragments étaient isolés du vecteur par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,7% dans du tampon TBE (composé de Tris 45 mM, d'acide borique 45 mM et d'EDTA 2 mM) dilué 1/20 (Sambrook *et al.*, 1989). Les bandes d'ADN étaient détectées avec du bromure d'éthidium. Après excision de la bande du gel d'agarose, le fragment d'ADN était transféré dans une solution aqueuse en utilisant la trousse "GeneClean" de BRL.

Les sondes radioactives étaient synthétisées en présence de dCTP marqué au <sup>32</sup>P en utilisant la trousse "Nick Translation" de Gibco BRL.

L'ADN à être hybridé était, soit déposé directement (dot blot) sur la membrane de nylon "Biotrans" (ICN Biomedicals Inc. 1985 Pall Corporation), ou transféré sur la membrane à partir d'un gel d'agarose après digestion et migration selon la méthode décrite par Southern (1975).

L'hybridation des sondes était effectuée à 65°C selon la méthode décrite par Sambrook *et al.*, (1989).

### 2.12 Construction de la librairie génomique

La banque génomique de C. testosteroni B-356 a été construite dans le plasmide pPSA842 chez E. coli DH1 selon le protocole décrit par Ahmad *et al.*, (1990). Les colonies recombinantes étaient maintenues sur milieu Mueller-Hinton contenant 25 µg/ml de streptomycine.

Les colonies produisant une métapyrocatechase furent révélées en les vaporisant avec une solution d'éther contenant 1% de catéchol (p/v). Les colonies de bactéries exprimant une activité métapyrocatechase étaient reconnues par l'apparition d'une coloration jaune. La lecture des résultats était effectuée 30 minutes après vaporisation des colonies.

## CHAPITRE 3

### RESULTATS

#### 3.1 Isolement et caractérisation de la B1,2O et de la C2,3O de la souche B-356

##### 3.1.1 Isolement de la B1,2O et de la C2,3O

Les tableaux I et II montrent, de façon représentative, les rendements et les activités spécifiques de la B1,2O et de la C2,3O après chaque étape de purification. L'activité spécifique de chacun de ces enzymes était la plus élevée après passage sur une colonne de Fast-Flow Phenyl-Sepharose. Les chromatographies sur colonnes d'échangeurs d'ions (hydroxyapatite et Fast-Flow DEAE-Sepharose) diminuaient l'activité spécifique de ces enzymes. L'effet désactivant était plus important dans le cas de la B1,2O. Souvent, les préparations de B1,2O étaient complètement inactivées après une chromatographie sur hydroxyapatite et nous n'avons jamais obtenu de préparations actives de cet enzyme après chromatographie sur colonne de Fast-Flow DEAE-Sepharose. Toutefois, les préparations de B1,2O qui étaient obtenues par chromatographie sur une colonne Phenyl-Sepharose en présence de tampon contenant 25% (v/v) de glycol d'éthylène demeuraient active pour plusieurs mois.

Les analyses SDS-PAGE des fractions obtenues après chaque étape de purification (figure 4 et 5) montrent la prédominance graduelle de bandes à poids moléculaires correspondant à la B1,2O et à la C2,3O (33 kD et 35 kD), en fonction des étapes de purification.

Tableau I : Résumé des étapes de purification de la B1,20

Etapes de purification	Vol. (ml)	Protéines (mg)	Activité ( $\mu$ moles/min)	Rendement (%)	Activité spécifique ( $\mu$ moles/min/mg)
Extrait brut	27	965	770	100	0,8
Traitement chaleur	20	176	470	60	2,7
Fast-Flow Phenyl-Sepharose	265	26	200	26	7,7
Hydroxy-apatite	5	1,3	3,5	0,3	2,7

L'activité de l'extrait brut pour le 2,3-DHBP était mesurée avec une électrode à oxygène et l'activité des autres préparations était mesurée par l'apparition du produit de metaclivage tel que décrit dans la section Matériel et Méthodes.

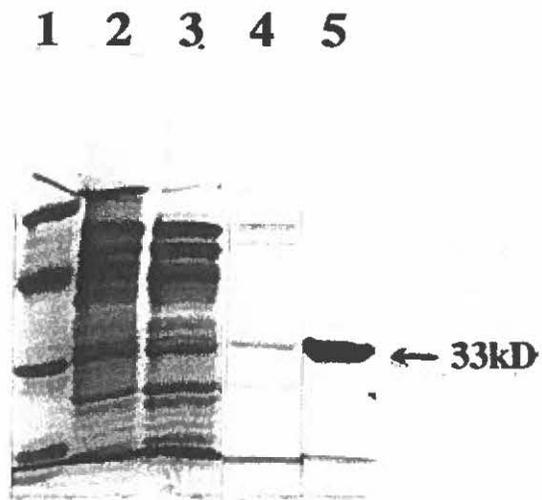


Figure 4 : SDS-PAGE de préparations provenant des étapes de purification de la B1,2O. Puit 1, standards à poids moléculaires moyens de Pharmacia; puit 2, extrait brut; puit 3, fraction contenant la B1,2O après traitement à la chaleur; puit 4, fraction contenant la B1,2O obtenue de la colonne de Fast-Flow Phenyl-Sepharose éluée avec le tampon A; puit 5, fraction contenant la B1,2O éluée de la colonne d'hydroxyapatite.

Tableau II : Résumé des étapes de purification de la C2,3O

Étapes de purification	Vol. (ml)	Protéines (mg)	Activité ( $\mu$ moles/min)	Rendement (%)	Activité Spécifique ( $\mu$ moles/min/mg)
Extrait brut	27	965	161	100	0,2
Traitement chaleur	20	176	94	58	0,5
Fast-Flow Phenyl-Sepharose	43	16	67	42	4,2
Hydroxy-apatite	5,6	2,4	7,0	4,3	2,9
Fast-Flow DEAE-Sepharose	3,8	1,3	3,8	2,3	2,9

L'activité de l'extrait brut pour le catéchol était mesurée avec une électrode à oxygène et l'activité des autres préparations était mesurée par l'apparition du produit de metaclivage tel que décrit dans la section Matériel et Méthodes.

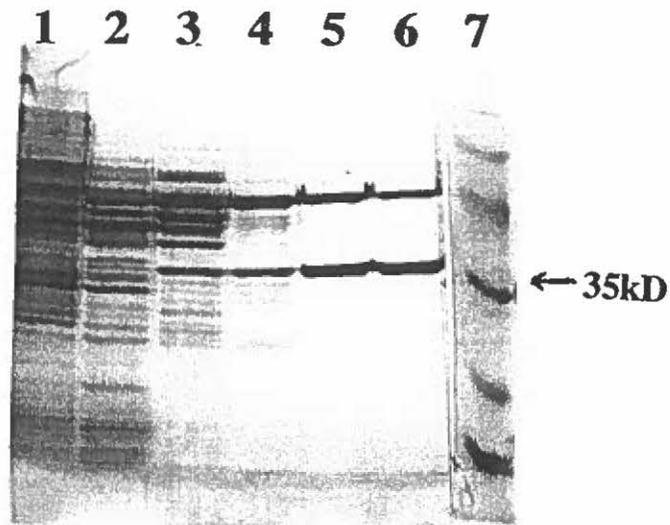


Figure 5 : SDS-PAGE de préparations provenant des étapes de purification de la C2,3O. Puit 1, extrait brut; puit 2, préparation obtenue après traitement à la chaleur; puit 3, fraction protéique obtenue après passage sur une colonne Fast-Flow Phenyl-Sepharose éluée au tampon A saturé au sulfate d'ammonium à 1%; puit 4, préparation de la C2,3O obtenue après passage sur colonne hydroxyapatite; puit 5, préparation de la C2,3O suivant une chromatographie sur colonne de Fast-Flow DEAE-Sepharose; puit 6, préparation de la C2,3O après filtration sur gel Sephacryl S-300; puit 7, standards à poids moléculaires moyens de Pharmacia.

La B1,2O et la C2,3O étaient toutes les deux retenues sur les colonnes d'échangeurs d'ions hydroxyapatite et Fast-Flow DEAE-Sepharose mais de façon différente. La B1,2O était éluée de l'hydroxyapatite avec un tampon phosphate à pH 7,3, 10 mM et de la Fast-Flow DEAE-Sepharose avec 150 mM de NaCl. La C2,3O était éluée de l'hydroxyapatite avec un tampon phosphate à pH 7,3, 20 mM et de la Fast-Flow DEAE-Sepharose avec 250 mM de NaCl. La B1,2O et la C2,3O ne montraient aucune affinité envers les colonnes CM-cellulose ou la "teinture-ligand" d'Amicon (1980).

La C2,3O de B-356 était co-purifiée avec une autre protéine d'environ 50 kD (figure 5 puit 5). Ces deux protéines précipitaient ensemble par fractionnement à l'acétone ou au sulfate d'ammonium et co-éluait par chromatographie sur tamis moléculaire S-300 (figure 5 puit 6). Cependant, nous n'avons pas déterminé la nature de cette protéine contaminante.

### 3.1.2 Séquence N-terminale de la C2,3O

Les vingt-cinq premiers acides aminés de la séquence N-terminale de la bande à 35 kD de la figure 5 puit 5 ont été déterminés selon le protocole décrit dans la section Matériel et Méthodes. Cette séquence montre 72% d'homologie avec la séquence N-terminale du produit génique de *xyleII* provenant de *P. putida* mt-15 (Keil *et al.*, 1985) (figure 6).

### 3.1.3 Inactivation et réactivation des préparations

L'inactivation des métapyrocatechases variait d'une préparation à l'autre. Cependant certaines préparations de la B1,2O éluées de la colonne de Fast-Flow Phenyl-Sepharose avec 25% de glycol d'éthylène et une préparation de la C2,3O provenant d'une chromatographie sur DEAE sont demeurées stables durant plusieurs mois sans

XylEII M G V M R I G H V N M R V M D I E L A V H H T E M  
 B-356 M G V M R I G H V S L K V M D I A T A V K D Y E G

Figure 6 : Alignement de la séquence des 25 acides aminés de la portion N-terminale de la C2,3O provenant de la souche B-356 et du produit génique de xylEII du plasmide pWW15.

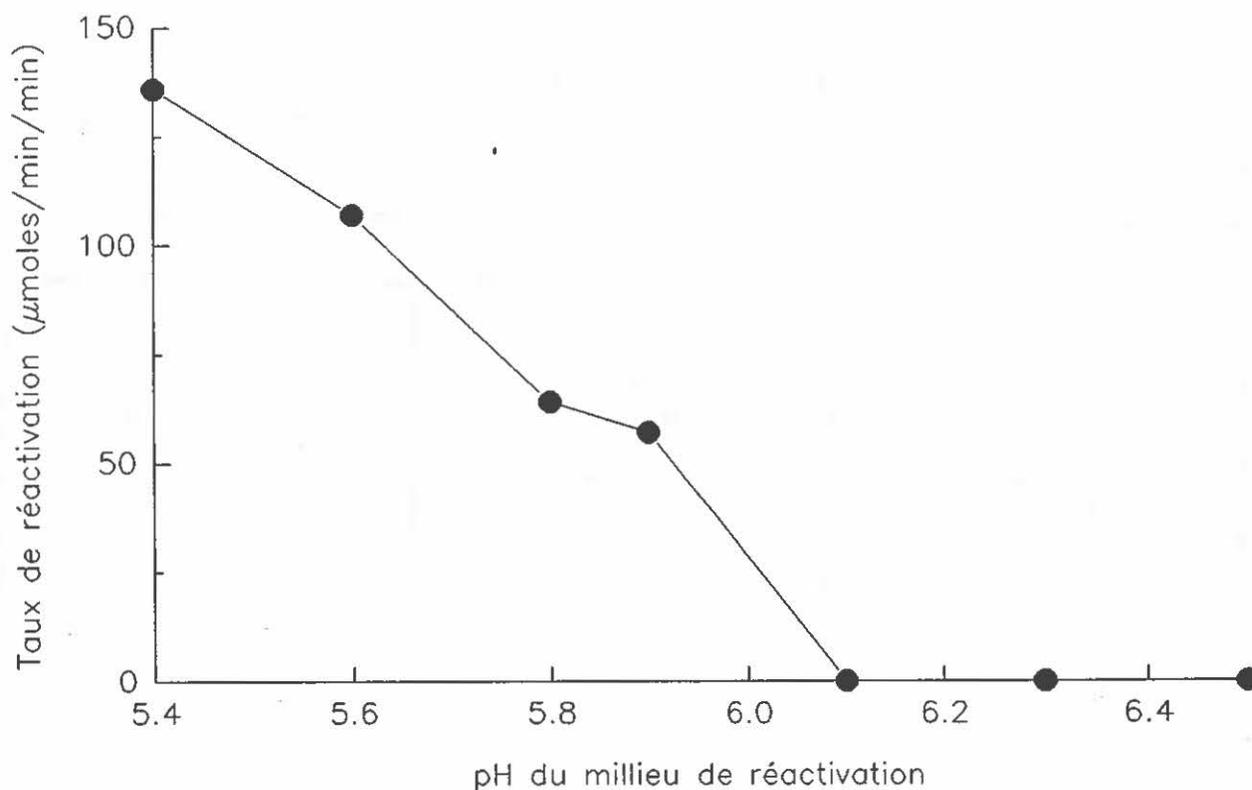


Figure 7 : Taux de réactivation de la C2,3O en fonction du pH du milieu d'incubation en présence de 0,4 mM de FeSO<sub>4</sub> plus 0,4 mM de DTT. Cette expérience fut réalisée avec une préparation de C2,3O inactive, obtenue après chromatographie sur Fast-Flow DEAE-Sepharose. Pour chaque milieu, l'activité métapyrocatechase fut déterminée à des intervalles de temps régulier.

Tableau III : Réactivation de la B1,2O en présence de FeSO<sub>4</sub>, de DTT, ou de FeSO<sub>4</sub> en combinaison avec du DTT.

Additions <sup>1</sup>	FeSO <sub>4</sub>	DTT	FeSO <sub>4</sub> DTT
Activité <sup>2</sup>	0.9	1.1	3.2

<sup>1</sup> 2 mM de DTT et/ou 4 mM le FeSO<sub>4</sub> est ajouté à une préparation de B1,2O inactive obtenue après chromatographie sur hydroxyapatite.

<sup>2</sup> Activités obtenues après réactivation de la préparation enzymatique en fonction des additions indiquées sur le tableau. L'activité est exprimée en nmoles de produit de meta clivage formés par minute dans le milieu réactionnelle.

Tableau IV : Activité relative de la B1,2O et de la C2,3O pour certains composés diols. Les chiffres en parenthèses indiquent la concentration à laquelle chaque substrat ne provoquait pas d'effet inhibiteur mesurable.

Substrats	B1,2O(%)*	C2,3O(%)*
2,3-DHBP	100 (60 μM)	33 (15 μM)
Catéchol	10 (500 μM)	100 (330 μM)
3-méthyl-catéchol	60 (500 μM)	165 (33 μM)
4-méthyl-catéchol	5 (50 μM)	340 (300 μM)
4-chloro-catéchol	2 (16 μM)	125 (16 μM)
4'chloro-2,3-DHBP	70 (20 μM)	20 (4 μM)

\* Activité relative de la B1,2O et de la C2,3O exprimée en pourcentage, utilisant la valeur de 100% pour l'activité de la B1,2O envers le 2,3-DHBP et la valeur de 100% pour l'activité de la C2,3O envers le catéchol. Ces activités ont été mesurés selon le protocole décrit dans la section 2.4 de matériel et méthodes.

traitement. Cependant, pour la plupart des préparations, la B1,2O et la C2,3O devenaient rapidement inactives autant à la température ambiante qu'à 4°C, qu'à -20°C, ou qu'à -70°C. L'anaérobiose partielle n'a pas eu d'effet majeur sur la stabilité de l'activité des enzymes. Des essais préliminaires n'ont démontré aucun effet sur l'inactivation des l'enzymes en présence d'éthanol, de méthanol ou d'une combinaison acétone-glycérol comme solvant organique dans le tampon de purification (tampon A). La présence de DTT stimulait l'activité mais ne semblait pas contribuer à la stabilité. Il a été impossible de trouver une façon de maintenir l'activité de la B1,2O et de la C2,3O.

L'activité de la B1,2O et de la C2,3O pouvait facilement être restaurée. Cependant, l'activité de l'enzyme restauré était instable. L'enzyme ne pouvait pas être utilisé dans les études cinétiques. Le tableau III montre le niveau de réactivation obtenu de la B1,2O dans du tampon de purification (pH 7,3) contenant 2 mM de FeSO<sub>4</sub>, 4 mM de DTT, ou 2 mM FeSO<sub>4</sub> en combinaison avec 4 mM DTT après une demi-heure d'incubation à 4°C. Pour chacune de ces conditions, le niveau d'activité plafonnait à environ 3,5 nanomoles par minute en prolongeant le temps d'incubation à une heure.

Dans le cas de la C2,3O l'incubation s'est faite à 25°C. Le taux de réactivation augmentait en diminuant le pH du milieu d'incubation (figure 7). Aucune réactivation n'a été observée lorsque le pH était supérieur à 6,1 (figure 7). La présence de FeSO<sub>4</sub> ou de DTT ajoutés séparément n'avait aucun effet sur l'activité de la C2,3O.

#### 3.1.4 Détermination des constantes cinétiques de la B1,2O et de la C2,3O

Considérant les résultats des sections précédentes, il est évident que l'obtention de préparations avec une activité stable était difficile. Dans le cas de la B1,2O, toutes les préparations étaient inactives après passage sur colonne d'échangeur d'ion. Pour

cette raison, nous avons réalisé nos études cinétiques en utilisant une préparation obtenue par chromatographie sur colonne de Fast-Flow Phenyl-Sepharose qui est demeurée active et stable pendant toute la durée du travail. Cette préparation contenait plusieurs protéines contaminantes. Dans le cas de la C2,3O, nous avons fait les études cinétiques avec une préparation obtenue après passage sur une colonne de Fast-Flow DEAE-Sepharose qui est demeurée active pendant la durée de notre étude.

La B1,2O et la C2,3O pouvaient catalyser la transformation de plusieurs composés diols en produit de metaclivage. L'activité de ces enzymes variait proportionnellement à la concentration de protéine se trouvant dans le milieu réactionnel. Le tableau IV donne l'activité relative maximale de la B1,2O et de la C2,3O envers divers substrats. La B1,2O était beaucoup plus active envers le 2,3-DHBP, le 4'-chloro-2,3-DHBP et le 3-méthylcatéchol qu'envers les autres diols testés. Par ailleurs, la C2,3O montrait des activités relatives similaires pour les substrats étudiés. Aucun des deux enzymes étaient actifs envers le 3,4-DHBP, le pyrogallol et le 3-chlorocatéchol par mesure spectrophotométrique. Le 3,4-DHBP inhibait faiblement les métapyrocatechases de B-356. La B1,2O et la C2,3O perdaient la moitié de leur activité en présence de 17 mM de ce diol.

L'activité de la B1,2O variait d'une façon presque hyperbolique lorsqu'elle était mesurée en fonction des concentrations (0,6 à 60  $\mu\text{M}$ ) de 2,3-DHBP, (20 à 500  $\mu\text{M}$ ) de catéchol, (5 à 500  $\mu\text{M}$ ) de 3-méthylcatéchol, ou (1 à 50  $\mu\text{M}$ ) de 4-méthylcatéchol. Les mesures cinétiques pour la C2,3O ont été effectuées à des concentrations entre 0,25 et 330  $\mu\text{M}$  de catéchol, entre 0,3 et 15  $\mu\text{M}$  de 2,3-DHBP, entre 0,5 et 33  $\mu\text{M}$  de 3-méthylcatéchol et entre 5 et 33  $\mu\text{M}$  de 4-méthylcatéchol. Dans ces cas, la cinétique Michaelis-Menten était respectée. Cependant, des concentrations élevées de certains substrats semblaient provoquer une inhibition des enzymes. Ceci était le plus notable pour le 4-méthylcatéchol.

Des études cinétiques ont permis d'établir que la valeur de  $K_m$  de la B1,2O pour le 2,3-DHBP était de 4,3  $\mu\text{M}$  et de 1,9  $\mu\text{M}$  pour le 4-méthylcatéchol (tableau V). Cette

Tableau VII: Paramètres cinétiques de la B1,2O face au 2,3-DHBP en présence de 3-chlorocatéchol.

Concentration de 3-chlorocatéchol (nM)	Vmax ( $\mu$ moles/min)	Km ( $\mu$ M)
0	16,4	4,2
50	16,2	4,7
100	14,4	5,8
200	15,4	8,6

Le 3-chlorocatéchol fut introduit dans le milieu réactionnel en même temps que le 2,3-DHBP. Les essais enzymatiques ont été effectués selon le protocole décrit à la section 2.4 de Matériel et Méthodes. La B1,2O utilisée pour ces mesures fut préparée de la même façon que la préparation utilisée pour les études cinétiques.

Tableau VIII : Paramètres cinétiques de la C2,3O face au catéchol en présence de 3-chlorocatéchol.

Concentration de 3-chlorocatéchol ( $\mu$ M)	Vmax ( $\mu$ moles/min)	Km ( $\mu$ M)
0	4,0	1,3
200	3,4	1,3
500	2,7	1,3
1000	2,0	1,3

Le 3-chlorocatéchol fut introduit dans le milieu réactionnel en même temps que le catéchol. Les essais enzymatiques ont été effectués selon le protocole décrit à la section 2.4 de Matériel et Méthodes. La C2,3O utilisée pour ces mesures fut préparée de la même façon que la préparation utilisée pour les études cinétiques.

Tableau V : Paramètres cinétiques de la B1,2O.

Substrats	$K_m^*$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}^*$ ( $\mu\text{moles/min}$ )	Spécificité <sup>™</sup> relative
2,3-DHBP	4,3	21,6	100
Catéchol	120	2,2	0,4
3-méthyl- catéchol	108	13,4	2,4
4-méthyl- catéchol	1,9	1,0	10

Les constantes ont été déterminées selon la méthode de Lineweaver-Burk selon le protocole décrit dans la section Matériel et Méthodes. Les mesures d'activité ont été effectuées en triplicata avec une préparation de B1,2O obtenue après traitement de chaleur et éluée sur Fast-Flow Phenyl-Sepharose avec du tampon A contenant 25% de glycole d'éthylène.

<sup>™</sup> La spécificité relative (exprimée en pourcent) fut calculée en déterminant le quotient de  $V_{max}/K_m$  pour chaque substrats, la valeur de spécificité de 100 pourcent ayant été attribuée au substrat naturel de l'enzyme

Tableau VI: Paramètres cinétiques de la C2,3O.

Substrats	$K_m^*$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}^*$ ( $\mu\text{moles/min}$ )	Spécificité <sup>™</sup> relative
2,3-DHBP	1,2	0,8	35
Catéchol	1,2	2,3	100
3-méthyl- catéchol	1,2	4,2	184
4-méthyl- catéchol	3,2	9,2	152

Les constantes ont été déterminées par la méthode de Lineweaver-Burk selon le protocole décrit dans la section 2.4 de Matériel et Méthodes. Les mesures d'activité ont été effectuées en triplicat avec une préparation de C2,3O obtenue après chromatographie sur Fast-Flow DEAE-Sepharose. Toutes les étapes de purification sont décrites dans la section 2.3 de matériel et méthodes.

<sup>™</sup> Voir légende correspondante du tableau V.

constante était cependant beaucoup plus élevée lorsque le substrat était le catéchol ou le 3-méthylcatéchol. La vitesse maximale de réaction ( $V_{max}$ ) était la plus élevée pour le 2,3-DHBP et la moins élevée pour le 4-méthylcatéchol et le catéchol. Ces résultats traduisent la très grande spécificité de la B1,2O ( $V_{max}/K_m$ ) envers le 2,3-DHBP et la faible spécificité de cet enzyme envers les autres substrats analysés.

Au contraire, les valeurs des  $K_m$  qui caractérisent les réactions de la C2,3O avec le catéchol, le 2,3-DHBP, le 3-méthylcatéchol ou le 4-méthylcatéchol étaient très similaires (tableau VI). La vitesse maximale était la moins élevée pour le 2,3-DHBP et la plus élevée pour le 4-méthylcatéchol. La spécificité de la C2,3O ( $V_{max}/K_m$ ) variait peu pour les quatre substrats étudiés. Il semble donc que cet enzyme présente un large spectre d'activité envers plusieurs analogues du catéchol.

### 3.1.5 Inhibition des métopyrocatéchases par les monochlorocatéchols

La B1,2O perdait la moitié de son activité en présence de 30  $\mu\text{M}$  de 4-chlorocatéchol. La C2,3O était active envers le 4-chlorocatéchol. Cependant à concentration élevée, ce composé inhibait la C2,3O. Cette inhibition pourrait ressembler à une inhibition de substrat qui est fréquente dans les interactions des métopyrocatéchases envers leurs substrats (Williams *et al.*, 1990).

Le 3-chlorocatéchol n'est pas transformé de façon mesurable par la B1,2O et la C2,3O. Ces enzymes étaient toutes les deux inhibées par le 3-chlorocatéchol. La B1,2O et la C2,3O perdaient 50% de leur activité en présence de 0,7  $\mu\text{M}$  et de 60  $\mu\text{M}$  respectivement de ce composé. La B1,2O perdait 50% de son activité quand elle était pré-incubée pendant deux minutes en présence d'environ 20 nM de 3-chlorocatéchol. La C2,3O était moins sensible à l'inhibition du 3-chlorocatéchol. En effet, il fallait ajouter 3  $\mu\text{M}$  de ce composé à la préparation enzymatique et la pré-incuber pendant une heure pour une perte de 50% de l'activité initiale.

Le 3-chlorocatéchol, à des concentrations entre 50 nM et 200 nM semble inhiber

Tableau IX : Proportion d'activité métapyrocatechase attribuable à la B1,2O et à la C2,3O chez B-356 (adaptée) cultivée sur différents substrats.

Substrat de croissance	B1,2O	C2,3O
biphényle	30%	70%
biphényle + <u>ortho</u> -toluate	20%	80%
biphényle + <u>meta</u> -toluate	50%	50%
biphényle + <u>para</u> -toluate	30%	70%
biphényle + salicylate	40%	60%
biphényle + naphtalène	30%	70%
<u>para</u> -toluate	0%	100%
salicylate	0%	100%
biphényle + succinate	100%	0%
succinate	100%	0%

La proportion d'activité attribuable à la B1,2O et à la C2,3O fut déterminée à l'aide des équations à deux variables décrites dans la section 2.9 de Matériel et Méthodes.

la B1,2O principalement de façon compétitive (tableau VII). La C2,3O semble être

inhibée principalement de façon non-compétitive par le 3-chlorocatéchol à des concentrations entre 200 nM et 1  $\mu$ M (tableau VIII).

### 3.2 Proportion relative des activités de la B1,2O et de la C2,3O induites par divers substrats.

La souche B-356 adaptée exprime la B1,2O de façon constitutive puisque cet enzyme est présent dans des extraits de cellules cultivées avec du succinate et en absence de biphényle (tableau IX). Cependant l'absence d'une activité C2,3O dans les extraits préparés avec des cellules ayant cru sur le succinate suggère que cet enzyme n'y est pas exprimé de façon constitutive. En présence de biphényle, les cellules expriment les deux métapyrocatechases dans les proportions de 30 pourcent pour la B1,2O et de 70 pourcent pour la C2,3O. Les métapyrocatechases sont induites dans des proportions semblables chez la souche B-356 adaptée, cultivée en présence de biphényle et d'un deuxième substrat aromatique comme le para-, le meta-, ou l'ortho-toluate, le salicylate et le naphthalène (tableau IX).

D'autre part, dans les milieux contenant le para-toluate ou le salicylate comme seule source de carbone, l'activité métapyrocatechase était entièrement attribuable à la C2,3O du tronçon inférieur. Malgré que la B1,2O soit exprimée de façon constitutive chez la souche B-356 adaptée, il semble qu'elle puisse être réprimée en présence de certains analogues du benzoate. Il est cependant possible que ces deux substrats induisent si fortement la C2,3O que cette activité masque complètement la B1,2O.

### 3.3 Homologie entre les gènes codant pour les métapyrocatechases de la souche B-356 et les gènes métapyrocatechases du plasmide TOL.

Le gène bphC a une faible homologie avec xylE du plasmide pWW0 (voir figure 12, puits A2 et B2). L'ADN génomique de la souche parentale B-356 et celui de la

souche adaptée hybrident mais faiblement avec xylE (figure 8). Des résultats semblables ont été obtenus pour le gène xylEII du plasmide pWW15 (résultats non présentés). En dépit de la ressemblance des séquences en acides aminés entre XylEII et la C2,3O de la souche B-356, les gènes de métapyrocatechases des plasmides TOL ne pourraient donc pas servir de sonde pour cloner le gène de la C2,3O de la souche B-356.

Lorsque l'ADN du génome de B-356 (adaptée) était digéré par l'enzyme XhoI, on observait un enrichissement de segments d'ADN d'environ 11 kpb et de 1,3 kpb (figure 9, puits 9, 11, 13, et 14). Une légère hybridation Southern avec une sonde contenant le gène xylE démontre la présence d'un gène spécifiant une métapyrocatechase sur le segment XhoI de 11 kpb (figure 10). Il est à remarquer qu'à cause du peu d'homologie entre cette sonde et bphC on observe pas de bande d'hybridation qui correspondrait au fragment XhoI/XhoI de 2 kpb qui porte le gène bphC. Le fragment XhoI de 11 kpb pourrait donc être porteur d'au moins une partie du gène codant pour la C2,3O. Du fait que la bande de 11 kpb soit enrichie dans le patron de digestion de l'ADN génomique de la souche B-356 (adaptée) suggère une amplification de ce gène chez cette souche.

### 3.4 Essai de clonage de la C2,3O

Le recombinant cosmique pDA1 porte tous les gènes du tronçon supérieur (Ahmad *et al.*, 1990) ainsi que des gènes benA et benB (Sylvestre, communication personnelle). Le plasmide pDA2 contient les gènes bphAEFBC (Bergeron *et al.* 1994). Le gène bphD n'est pas exprimé sur pDA2, dû à un réarrangement en aval du gène bphC qui a provoqué la perte de ce gène (figure 11).

Le gène codant pour la C2,3O de la souche B-356 n'a pas encore été cloné. Afin de localiser le gène de la métapyrocatechase du tronçon inférieur, nous avons vaporisé avec du catéchol environ 2000 colonies d'une banque génomique de B-356 construite chez E. coli DH1 (voir Matériel et Méthodes). Plusieurs de ces colonies ont produit une coloration jaune révélant la présence d'une métapyrocatechase. Cependant,

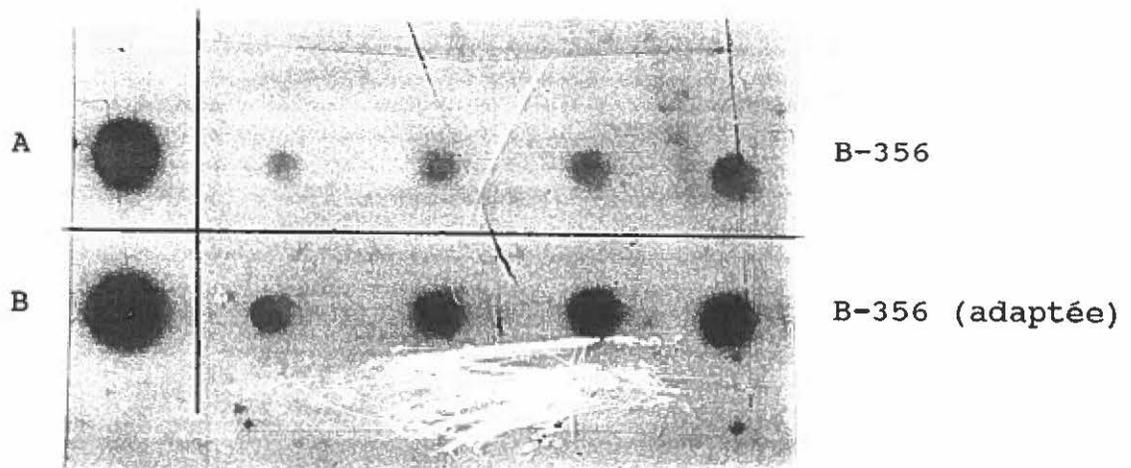


Figure 8 : "Dot blot" de l'ADN génomique de la souche B-356 et de la souche B-356 (adaptée) utilisant pour sonde un fragment d'ADN EcoRI/EcoRI de 2 kpb provenant du plasmide pMMB26 portant le gène xylE. La quantité d'ADN génomique de gauche à droite est de 8, 16, 24 et 32 µg. Le témoin (xylE) contient 0,3 µg (A) et 0,6 µg (B) d'ADN.

l'intensité de la couleur qui se développait variait. Les résultats de la digestion par les enzymes de restriction nous a montré que les plasmides de ces clones avaient des profils de digestion différents l'un de l'autre (résultats non présentés). Ces clones porteraient donc un gène de métapyrocatechase bordé de différents segments d'ADN, suggérant un réarrangement de la région génétique portant ce gène.

Parmi les clones repérés dans notre travail par vaporisation de catéchol, l'un d'eux développait rapidement une coloration stable caractéristique du produit de metaclivage. Ce clone (p1951) a été étudié plus en détail. Le clone p1951 hybridait avec un fragment XhoI de 2 kpb de pDA2, contenant bphB et bphC, et hybridait peu avec une sonde contenant le gène xylE du plasmide pWW0 (figure 12A et 12B).

Des colonies de p1951 vaporisées avec du catéchol développaient une coloration jaune qui pouvait persister pendant plusieurs jours. Ce clone n'exprimait pas de protéine capable de transformer le produit du metaclivage du catéchol. Cependant, un lysat cellulaire de E. coli DH1 portant p1951 synthétisait de l'acide benzoïque à partir de 2,3-DHBP (figure 13). Des essais enzymatiques préliminaires ont démontré que l'hydrolase spécifiée par le gène bphD est spécifique au produit de metaclivage du 2,3-DHBP et a peu d'activité envers le produit de metaclivage du catéchol. Tous ces résultats indiquent que le clone p1951 code pour une métapyrocatechase homologue à bphC.

Les digestions BglII, SmaI et XhoI de pDA2 permettent d'isoler bphC ou une partie de ce gène sur des fragments respectifs de 4 kpb, 3,6 kpb et de 2 kpb (figure 14). Une hybridation Southern utilisant pour sonde le fragment SmaI de 3,6 kpb de pDA2 sur des produits de digestion de pDA2 et p1951 a démontré qu'il existe plusieurs différences entre ces deux plasmides. Les bandes BglII de 10,5 kpb et de 12 kpb de p1951 hybrident avec cette sonde (figure 15). Ceci indique que seul le site BglII se trouvant à l'intérieur de bphC dans le plasmide pDA1 et pDA2, est présent dans l'insert de p1951. Le site BglII se trouvant à 4 kpb en amont dans pDA2, et le site BglII se trouvant à 2,7 kpb en aval dans pDA1 seraient absents dans p1951. Une digestion SmaI du plasmide p1951

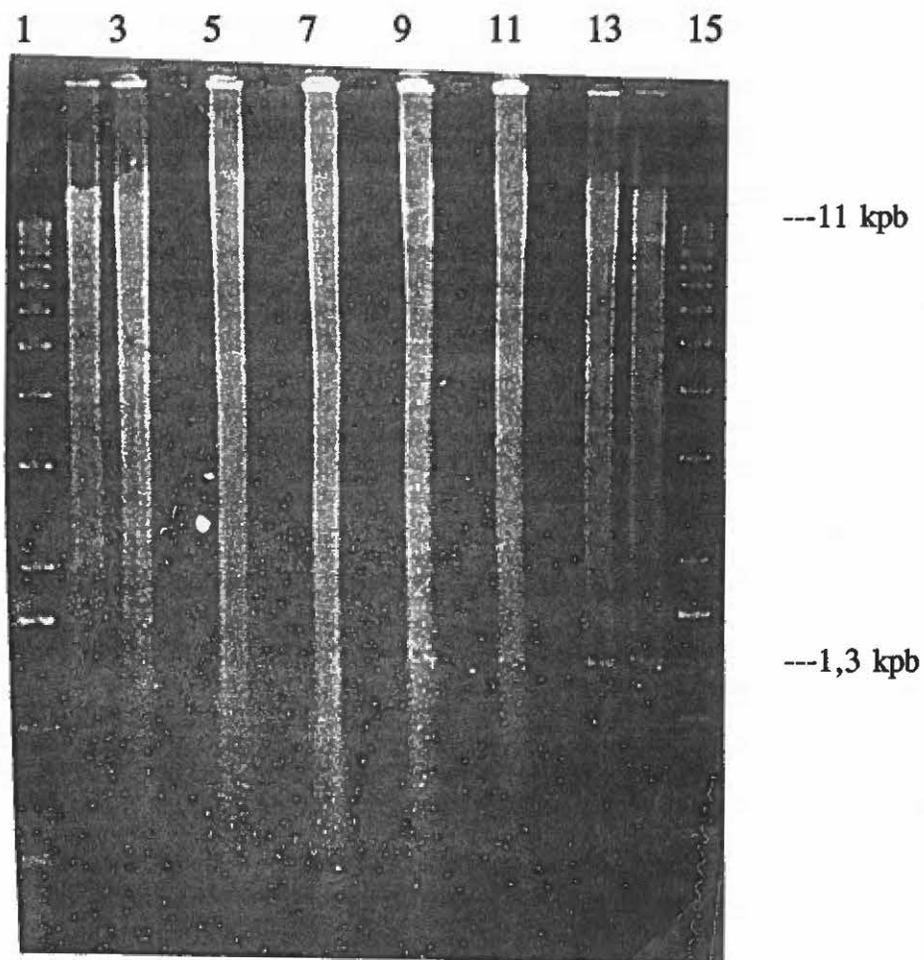


Figure 9 : Gel d'agarose de préparations d'ADN génomique de la souche B-356 (puits 2, 3, 5, 7) et de la souche B-356 adaptée (puits 14, 13, 11, 9) digérées avec l'enzyme XhoI. Les puits contiennent respectivement des quantités d'ADN de 8, 16, 24 et 32  $\mu$ g. Les puits 1 et 15 contiennent le standard "1 kb ladder".

donne une bande d'environ 22 kpb et deux bandes de faible poids moléculaire. La sonde SmaI de 3,6 kpb hybride seulement avec la bande de haut poids moléculaire indiquant que les sites SmaI sur p1951 se trouvent aux extrémités de l'insert et sont différents de ceux retrouvés sur pDA1 et pDA2. Dans le plasmide pDA2, le fragment SmaI de 3,6 kpb hybride aussi avec les fragments XhoI de 2,0 kpb et de 1,3 kpb. Le fragment SmaI de 3,6 kpb hybride aussi avec un fragment XhoI de 2,0 kpb de p1951 mais il n'y a pas de fragments correspondant à celui de 1,3 kpb. Ces hybridations indiquent: 1) que le site XhoI à 1,3 kpb en aval du gène bphB chez pDA1 et pDA2 est absent chez p1951, 2) que le segment XhoI de 6,6 kpb de p1951 contient au moins une partie de bphD puisque ce gène s'exprime (voir figure 13) et, 3) qu'il y a un site XhoI à 6,6 kpb en aval du site XhoI ce trouvant avant le gène bphB (voir figure 11). La digestion BglII de p1951 donne une bande de 11 kpb, une bande de 12 kpb et une bande originale du vecteur de 1,6 kpb. Le plasmide p1951 a une longueur d'environ 24,6 kpb dont 15,3 proviennent du vecteur. L'insert a donc une longueur approximative de 9,3 kpb. Les fragments XhoI de 2,0 kpb et de 6,6 kpb couvrent la presque totalité de l'insert. Un site XhoI se trouverait près de chaque extrémité de l'insert.

L'absence d'hybridation entre le plasmide p1951 et une sonde construite à partir du fragment SmaI de 2,8 kpb confirme l'absence de bphA et bphE (figure 16). En somme, il apparaît évident que le gène que nous avons cloné est bphC et que l'ADN cloné a subi des réarrangements ayant conduit à la perte d'une partie importante de l'opéron bph.

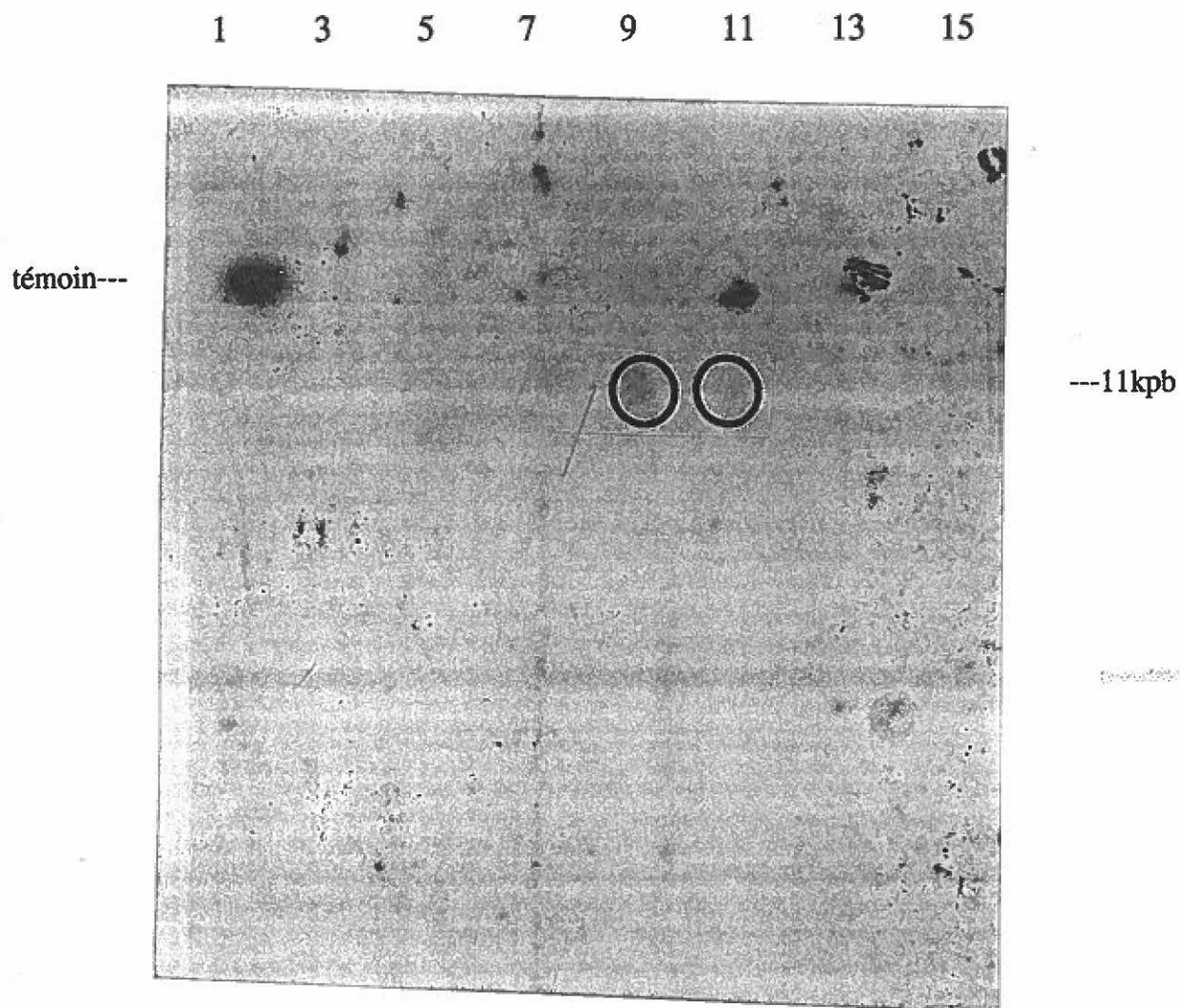


Figure 10 : Hybridation "Southern" du gel de la figure 8 avec la sonde d'ADN contenant xyIE. La sonde est décrite à la figure 8. On note une faible hybridation sur des segments d'ADN d'environ 11 kb pour les puits 9 et 11 qui contiennent les quantités les plus élevées d'ADN de la souche B-356. La numération des puits est la même qu'à la figure 8. Le témoin ("dot blot") d'un fragment d'ADN plasmidique portant le gène xyIE ce trouve au haut du puit 1.

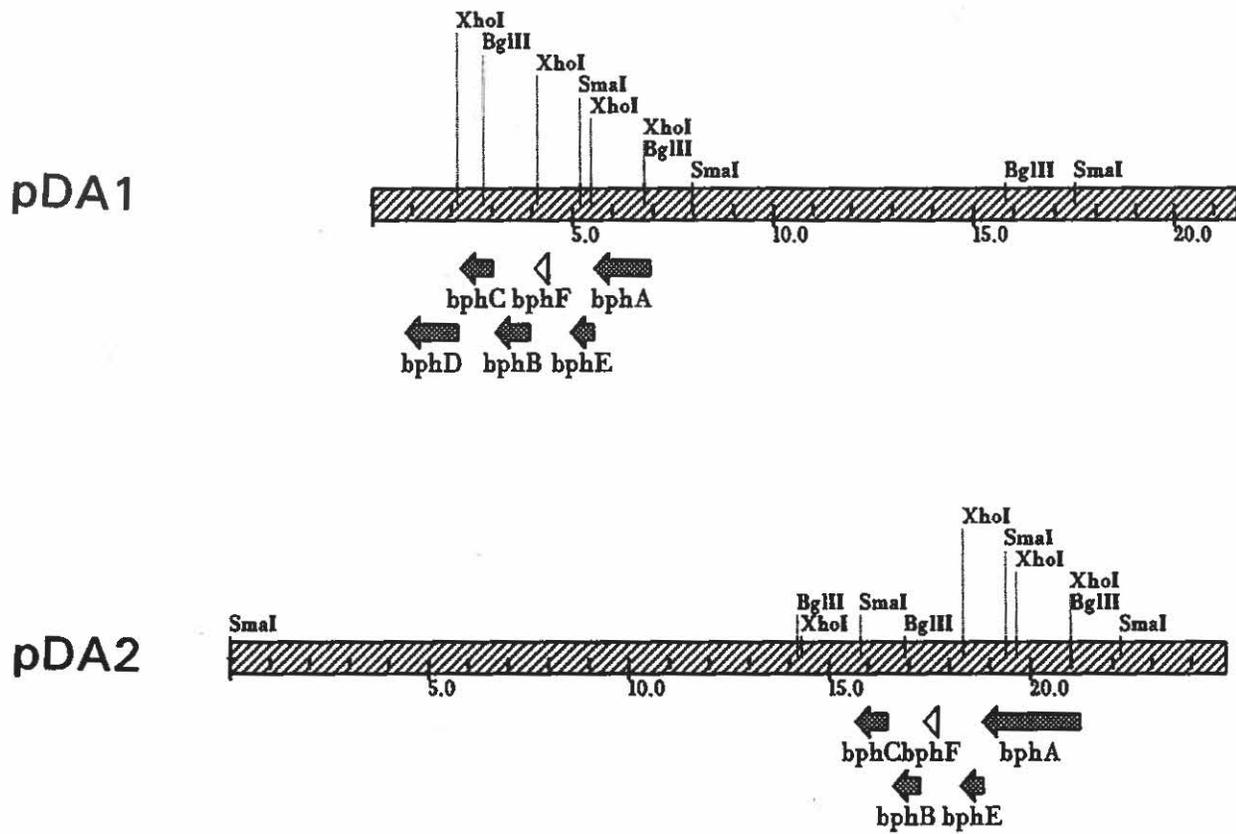


Figure 11 : Cartes de restriction de l'opéron *bph* retrouvé sur les inserts des plasmides pDA1 et pDA2 (Ahmad et al 1990).

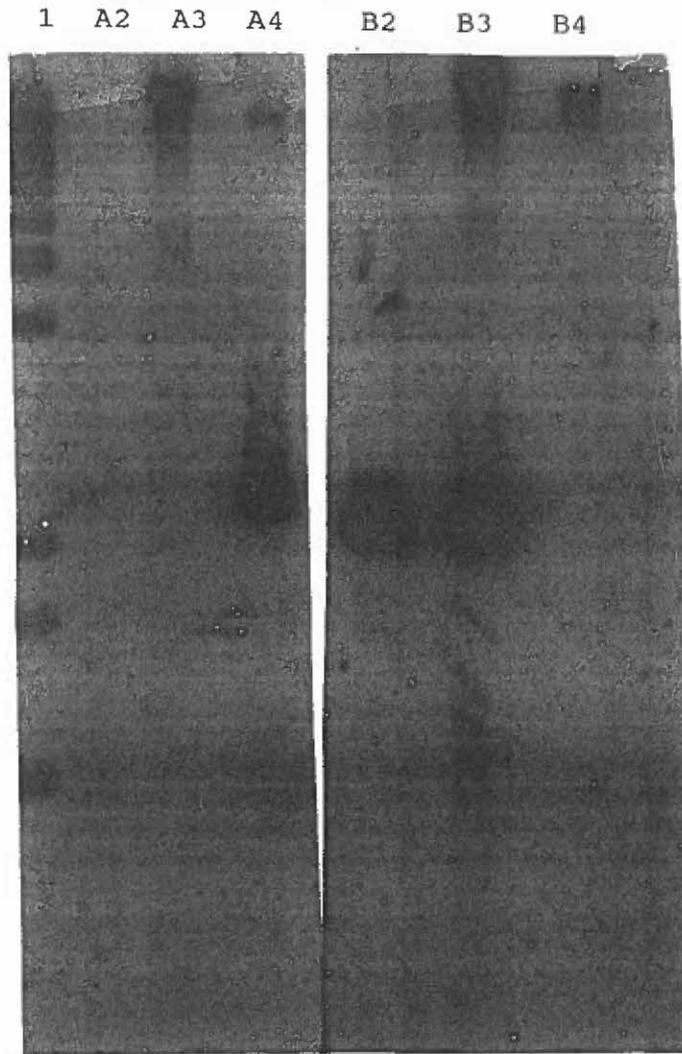


Figure 12 : Hybridation "Southern" d'un gel d'agarose avec une sonde constituée A) d'un fragment du plasmide pMMB26 portant le gène *xylE* (voir figure 8) ou B) d'un fragment *ClaI/SmaI* de 2,0 kpb originaire de l'opéron *bph* de la souche B-356 qui porte les gènes *bphBC* (voir Matériel et Méthodes, section 2.2). Puit 1, standard "1 kb ladder"; puits A2 et B2, digestion *XhoI* de pDA2; puits A3 et B3, digestion *XhoI* de p1951; puits A4 et B4, digestion *EcoRI* de pMMB26 contenant le gène *xylE*.

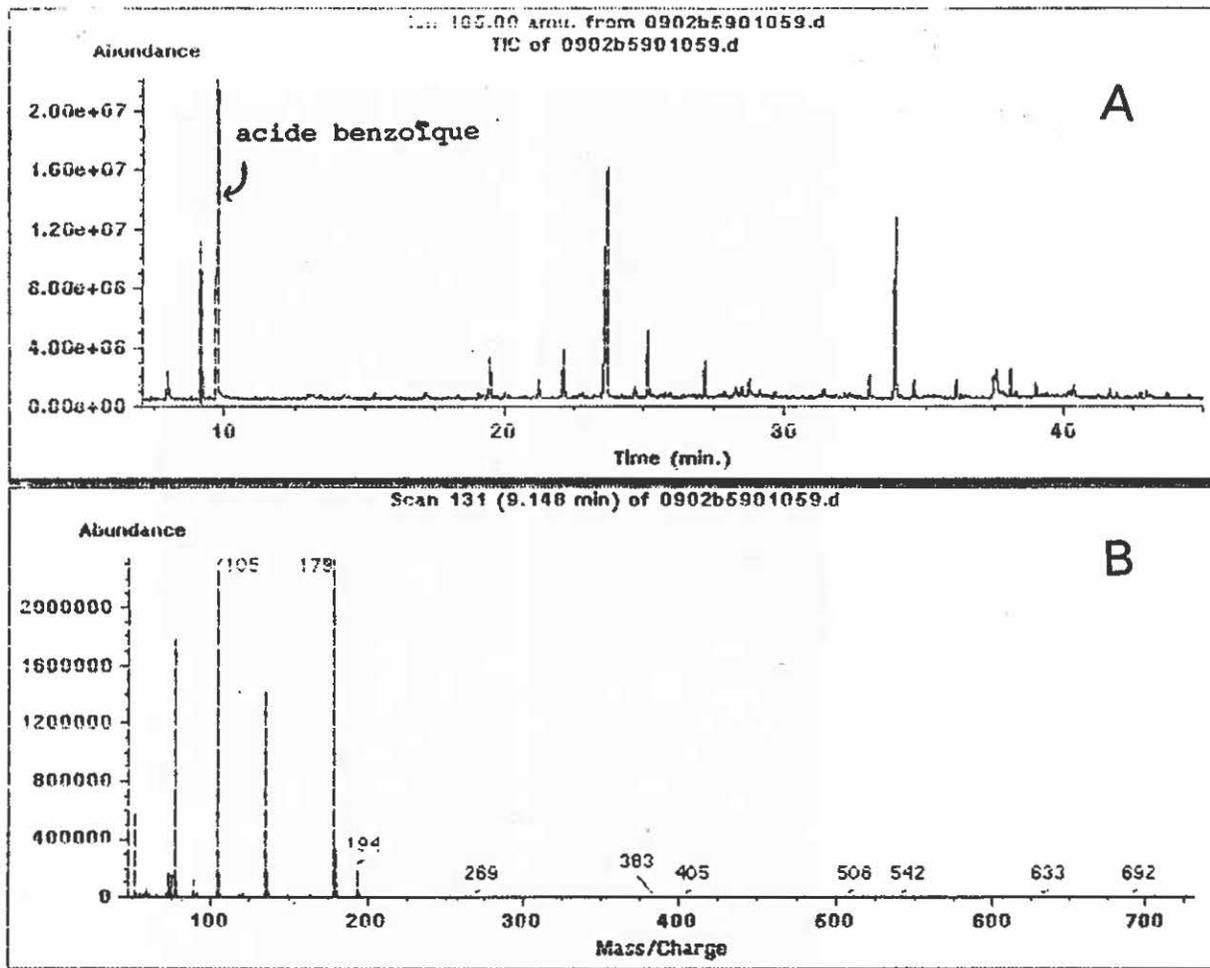


Figure 13 : A) Chromatogramme de l'extrait des dérivés triméthylsilyles des métabolites produits de la transformation du 2,3-DHBP par un extrait brut d'une culture d'un clone de *E. coli* DH1 portant le plasmide p1951. B) Spectre de masse de l'acide benzoïque.

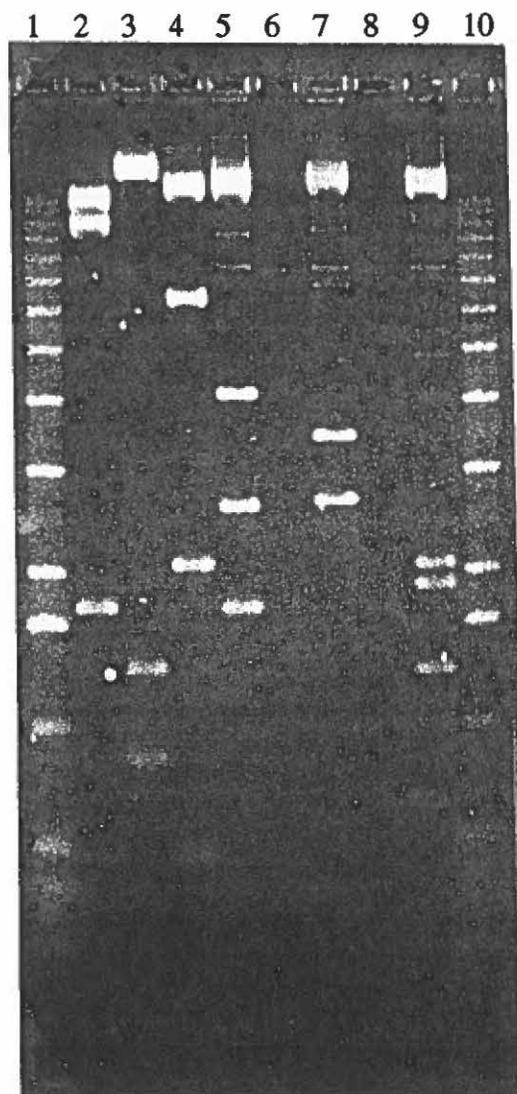


Figure 14 : Digestion par des endonucléases de p1951 et de pDA2. Puits 1 et 10 contiennent le standard "1 kb ladder"; puits 2, 3, 4, digestion de p1951 par BglII, SmaI et XhoI respectivement; puits 5, 7, 9, digestion de pDA2 par BglII, SmaI, et XhoI respectivement.

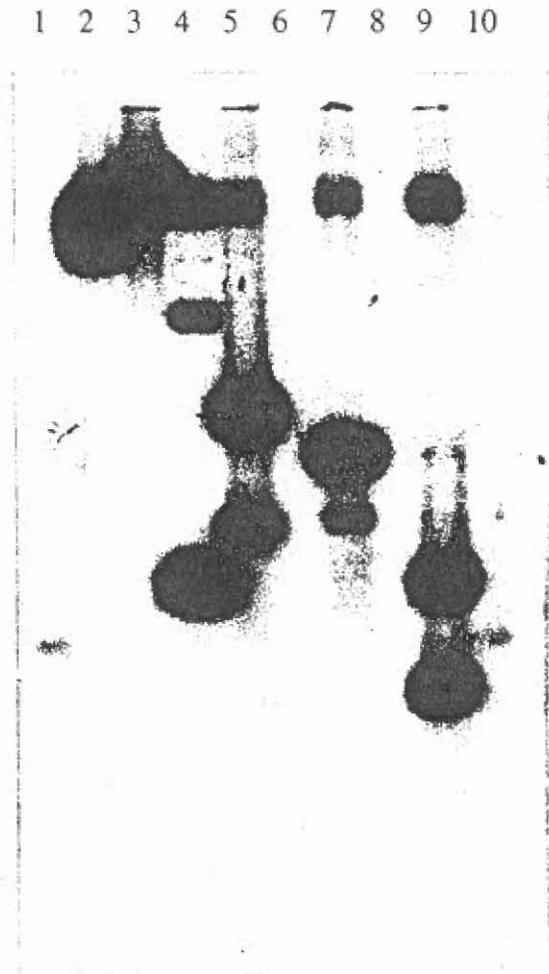


Figure 15 : Hybridation "Southern" du gel de la figure 14 avec une sonde portant le fragment SmaI de 3.6 kpb de pDA2.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Figure 16 : Hybridation "Southern" du gel de la figure 14 avec une sonde portant le fragment SmaI de 2.8 kpb de pDA2.



## CHAPITRE 4

### DISCUSSION

#### 4.1 Isolement et caractérisation des deux métapyrocatechases inducibles par le biphényle de la souche B-356.

L'ouverture du cycle des composés aromatiques procède souvent par l'introduction d'oxygène moléculaire en position meta d'un intermédiaire diol. Le biphényle et les BPC contiennent deux cycles aromatiques. Généralement la dégradation du cycle le moins chloré se fait par une série de quatre réactions (tronçon supérieur) conduisant à la formation d'une chaîne aliphatique et d'un acide (chloro) benzoïque (Ahmad *et al.*, 1990). Le cycle de l'acide benzoïque est ensuite ouvert par une série de réactions homologues (tronçon inférieur).

Le biphényle induit deux métapyrocatechases chez P. pseudoalcaligenes KF707 (Furukawa et Arimura, 1987). Il semble aussi chez Pseudomonas sp. IC (Carrington *et al.*, 1994) et Pseudomonas sp. CB405 (Lloyd-jones *et al.*, 1994), que les enzymes du tronçon supérieur et inférieur soient codés par deux opérons distincts. Nos travaux confirment les données de travaux préliminaires qui suggéraient la présence chez C. testosteroni B-356 de deux métapyrocatechases induites par le biphényle (Sondossi *et al.*, 1992). Il semblerait donc que le processus évolutif aurait conduit au développement de bactéries possédant deux séries d'enzymes homologues chacune catalysant l'ouverture de l'un ou l'autre des deux cycles aromatiques du biphényle. La présence d'une seule série d'enzymes aurait probablement été moins exigeante sur les mécanismes cellulaires responsables de la synthèse des protéines. Toutefois il y a possiblement des avantages phénotypiques importants associés à cette duplication qui contribueraient à diversifier

le nombre de réactions cataboliques favorisant la dégradation d'un plus grand éventail de composés aromatiques. Dans le cadre de notre travail, nous avons comparé les propriétés des métapyrocatechases du tronçon supérieur et inférieur qui sont induites par le biphényle chez la souche B-356.

Nous avons développé un protocole qui a permis de séparer la B1,2O de la C2,3O de la souche B-356. Ces protéines solubles demeurent actives après un traitement à 60°C pendant 15 minutes. Cette étape a permis d'éliminer les enzymes qui ont comme substrats les produits de la réaction de metaclivage, c'est-à-dire l'hydrolase produite du gène bphD, ainsi possiblement qu'une déshydrogénase qui nécessite le NAD comme co-facteur. Cette déshydrogénase montrait de l'activité face au produit de metaclivage du catéchol et non au produit de metaclivage du 2,3-DHBP. Ces résultats préliminaires suggèrent que le tronçon inférieur se ramifie au niveau de l'hydroxymuconate semialdéhyde (voir étapes H et K de la figure 1).

Les deux métapyrocatechases étaient toutes deux retenues par la colonne de Fast-Flow Phenyle-Sepharose indiquant la présence de régions hydrophobes sur leur surface. La B1,2O était retenue plus fortement que la C2,3O sur cette colonne, suggérant que son hydrophobicité superficielle est plus importante. Cependant, l'affinité de la B1,2O envers cette matrice pourrait résulter du fait que les groupements phényles qui la recouvrent sont des analogues du substrat naturel de l'enzyme.

La C2,3O était retenue plus fortement que la B1,2O sur les colonnes d'échangeurs d'ions Fast-Flow DEAE-Sepharose et d'hydroxyapatite. Ce fait suggère que la charge de surface de la C2,3O est plus négative que celle de la B1,2O (Gorbunoff, 1984). La C2,3O était co-purifiée avec une protéine d'environ 50 kD. Ces deux protéines pourraient être associées par des forces hydrophobes, ou électrostatiques (Powlowski *et al.*, 1993). Cependant, nous n'avons pas déterminé si la protéine de 50 kD jouait un rôle dans le métabolisme du catéchol.

La stabilité de la B1,2O et de la C2,3O varie d'une préparation à l'autre; un problème souvent rapporté durant la purification des métapyrocatechases (Nozaki *et al.*, 1968; Sanschagrín, 1988). Ces enzymes pouvaient en certains temps perdre leur activité entièrement en quelques jours, ou pouvaient demeurer stables pour plusieurs mois. Les facteurs conduisant à ces variations restent incompris. Les métapyrocatechases semblent en certains cas moins stables en solution diluée (Patel et Barnsley, 1980). Afin de tenter de contourner ce problème, nous avons utilisé des colonnes dont la quantité de phase stationnaire était réduite au minimum de façon à diminuer les volumes d'élution, évitant ainsi de diluer l'enzyme. Cependant, il n'est pas évident que ces mesures aient contribué significativement à l'obtention de préparations plus stables de ces enzymes.

Selon leur mécanisme de réactivation, les métapyrocatechases peuvent être classées en deux groupes. Le premier, dont ferait partie la C2,3O de pWW0, est constitué d'enzymes qui peuvent être réactivés en milieu neutre (Nozaki *et al.*, 1968). Les enzymes d'un deuxième groupe se réactiveraient seulement en milieu acide (Takemori *et al.*, 1971).

Selon nos résultats, la B1,2O ferait partie du premier groupe. Elle peut être activée par l'ajout d'ions ferreux ou en présence de DTT séparément, à un pH de 7,3. L'addition simultanée des deux activateurs accélère le processus. L'action de l'ion ferreux et du DTT semble concertée.

Aucune réactivation de la C2,3O n'était obtenue à un pH supérieur à 6,1. Ceci pourrait suggérer l'importance d'un résidu d'histidine sous forme protonée dans la réaction catalytique. Cet effet pourrait être dû à l'état des résidus d'histidine semblent être importants pour l'association des atomes de fer aux métapyrocatechases (Hirose *et al.*, 1994), ou possiblement d'autres résidus se trouvant au site catalytique. Contrairement à la B1,2O, la réactivation de la C2,3O nécessite la présence simultanée de l'ion ferreux et de DTT. Il semble donc que leur action soit synergique pour la réactivation de cet enzyme.

Les activités relatives de la B1,2O ainsi que celle de la C2,3O ont été déterminées en mesurant le taux de conversion du substrat en produit à des concentrations de substrats saturantes envers l'enzyme, mais qui ne soient pas inhibitrices. Les études de la cinétique de la B1,2O et de la C2,3O ont montré que l'activité respective de ces enzymes est complémentaire en regard de leurs substrats préférentiels. Ainsi, la B1,2O est plus réactive envers le 2,3-DHBP qu'elle ne l'est envers le catéchol, et plus réactive envers le 3-méthylcatéchol qu'envers le 4-méthylcatéchol. De plus, la B1,2O est peu active envers le 4-chlorocatéchol. Ce patron d'activité est semblable à celui d'autres produits géniques de *bphC* (Asturias et Timmis, 1993; Hirose *et al.*, 1994). Bien que la spécificité de la C2,3O envers son substrat de prédilection soit beaucoup moins marquée, elle a un patron d'activité inverse à la B1,2O. Ainsi, elle est plus active envers le catéchol que le 2,3-DHBP et elle est plus active envers le 4-méthylcatéchol que le 3-méthylcatéchol. De plus, elle est plus active envers le 4-chlorocatéchol que ne l'est la B1,2O. Une complémentarité semblable a été mise en évidence dans le cas des métapyrocatéchases des tronçons supérieur et inférieur de deux autres souches bactériennes capables de dégrader le biphenyle (Lloyd-jones *et al.*, 1994; Carrington *et al.*, 1994).

Les valeurs de  $V_{max}$  de la B1,2O et de la C2,3O ont été obtenues par extrapolation et n'ont pas tenu compte de l'inhibition que certains substrats auraient pu avoir à haute concentration. Il faut donc interpréter ces résultats avec précaution, particulièrement dans le cas de la C2,3O lorsque le substrat est le 3-méthylcatéchol ou le 4-méthylcatéchol.

Le  $K_m$  est défini comme étant la concentration de substrat à laquelle le taux de conversion du substrat en produit est égal à la moitié de la vitesse maximale. Elle représente l'affinité catalytique de l'enzyme envers le substrat. Dans le cas de la B1,2O la nature et la position du substituant hydrophobe sur le diol pourrait contribuer à diminuer la valeur du  $K_m$ . L'affinité élevée de l'enzyme envers le 2,3-DHBP (3-phénylcatéchol) et le 4-méthylcatéchol est possiblement attribuable à la grosseur et à l'orientation des substituants, qui pourraient permettre de maximiser les interactions entre

le substrat et une région hydrophobe près du site actif de l'enzyme. Le 3,4-DHBP (4-phénylcatéchol) inhibe faiblement l'activité de la B1,2O. Contrairement au 4-méthylcatéchol, le 3,4-DHBP semble avoir peu d'affinité pour le site actif. Il est fort possible que le substituant phényle en position 4 ayant un plus gros volume que le substituant méthyle, rencontrerait un encombrement stérique pour rejoindre la région hydrophobe près du site actif.

La spécificité ( $V_{max}/K_m$ ) reflète le degré d'adaptation d'un enzyme envers son substrat. Cette adaptation repose sur l'optimisation de l'énergie d'association entre l'enzyme et son ligand pendant son état de transition. La stabilisation qui résulte de cet état de transition se traduit par une diminution de l'énergie d'activation de la réaction (Fersht, 1985). La spécificité élevée de la B1,2O envers le 2,3-DHBP suggère que cet enzyme est associé au métabolisme du biphényle et résulterait d'un processus de sélection stringent.

La C2,3O montre une spécificité similaire envers tous les substrats étudiés. Cette observation n'est pas unique à la C2,3O de la souche B-356, puisque plusieurs C2,3O codées par les plasmides TOL montrent aussi des spécificités d'action semblables envers plusieurs diols. La C2,3O de B-356 et celles codées par les plasmides TOL, pourraient donc être issues d'un mécanisme de sélection similaire. L'homologie à 72% entre les séquences en acides aminés de la C2,3O de B-356 et du produit génique de *xyIEII* du plasmide TOL pWW15, (Keil *et al.*, 1985) suggère que ces deux gènes ont une origine phylogénique commune.

Le processus de conversion de l'énergie d'association à l'abaissement de l'énergie d'activation est flexible pour la C2,3O. Ainsi, la spécificité de l'enzyme envers le 3-méthylcatéchol et le 4-méthylcatéchol est équivalente et supérieure à la spécificité envers le catéchol.

Sondossi *et al.*, (1992) ont démontré que le 4-chlorobiphényle est transformé en

4-chlorocatéchol chez la souche B-356. Ce métabolite pourrait ensuite subir une fission en position meta par la C2,3O du tronçon inférieur. Nos résultats démontrent qu'une forte concentration de 4-chlorocatéchol inhibe l'activité de cet enzyme. Le métabolisme du 4-chlorobiphényle pourrait conduire à une accumulation de 4-chlorocatéchol qui ensuite serait canalisé vers des réactions non-spécifiques dans la cellule.

Le 4-chlorocatéchol inhibe plus fortement la B1,2O et la réaction catalytique envers ce diol est plutôt faible. Cette inhibition pourrait être utilisée par B-356 comme moyen de régir le métabolisme du 4-chlorobiphényle au niveau du tronçon supérieur, afin de prévenir l'accumulation de métabolites qui pourraient mener à une interruption du flux métabolique (Sylvestre, en soumission).

L'incapacité de B-356 à croître sur le 3-chlorobiphényle, démontrée par Sondossi *et al.*, (1992), résulte probablement de l'inhibition des métapyrocatechases par le 3-chlorocatéchol. La B1,2O est plus sensible à l'effet inhibiteur du 3-chlorocatéchol que la C2,3O. Nos résultats suggèrent qu'à faible concentration de 3-chlorocatéchol, l'inhibition de la B1,2O se fait par un mécanisme compétitif. L'inhibition de la C2,3O semble non-compétitive. Ce dernier type d'inhibition pourrait être attribuable à la chélation du co-facteur ferreux par le diol (Klecka et Gibson, 1981) ou une inhibition de type suicidaire (Bartels *et al.*, 1984). Des essais d'inhibition en milieu anaérobie nous permettraient de distinguer entre ces deux modes d'inhibition.

L'inhibition de la B1,2O et de la C2,3O par le 3-chlorocatéchol étant très forte, il est peu probable que la souche actuelle de B-356 puisse croître sur le 3-chlorobiphényle. Cette sensibilité suggère que la B1,2O et la C2,3O de la souche B-356 n'ont pas été sélectionnées pour dégrader ce substrat. Les différents modes d'inhibition découleraient de la différence structurale de ces enzymes (Wasserfallen *et al.*, 1991) plutôt que de leur faible adaptabilité envers le 3-chlorocatéchol.

L'effet inhibiteur des chlorocatéchols est un facteur important à considérer dans la construction de souches capables de biodégrader efficacement les BPC. La compréhension du mode d'inhibition des chlorocatéchols et de leur produit de metaclivage sur la B1,2O et la C2,3O, nous permettra de construire de telles souches.

#### 4.2 Induction des métapyrocátéchases

Le mécanisme d'induction des tronçons métaboliques du biphényle chez C. testosteroni B-356 est encore mal connu. La découverte récente de cadres de lecture présentant une homologie avec benA et benB, deux unités de la benzoate dioxygénase, situées à environ 9 kpb en amont du tronçon supérieur et dont la lecture se fait dans le sens opposé à l'opéron bph (M. Sylvestre, communication personnelle), suggère que la transcription et la traduction des tronçons supérieur et inférieur se font indépendamment.

Le tronçon supérieur et le tronçon inférieur contiennent tous deux une métapyrocátéchase. La B1,2O du tronçon supérieur montre 10 fois plus d'activité envers le 2,3-DHBP que le catéchol, et la C2,3O du tronçon inférieur montre 2,8 fois plus d'activité envers le catéchol que le 2,3-DHBP. Des activités intermédiaires indiquent la présence d'un mélange de ces deux enzymes.

Les mesures d'activité métapyrocátéchase en utilisant le 2,3-DHBP ou le catéchol individuellement nous a permis d'estimer la proportion d'activité métapyrocátéchase attribuable à la B1,2O du tronçon supérieur et à la C2,3O du tronçon inférieur d'extraits cellulaires. La mesure de l'expression de ces deux enzymes est un outil intéressant pour évaluer le degré de l'expression des deux tronçons respectifs dans la dégradation du biphényle.

Utilisant ces informations, nous avons pu déterminer la proportion relative de ces activités dans les cellules de la souche B-356 adaptée au biphényle, lorsqu'elles étaient cultivées sous diverses conditions d'incubation. La souche B-356 adaptée a été obtenue par transferts successifs en milieu minimal contenant du biphényle comme seule source

de carbone. Cette population mutante est plus performante quant à sa capacité de dégrader le biphenyle et quelques congénères de BPC (M. Sylvestre, communication personnelle). Les résultats obtenus suggèrent que les enzymes du tronçon supérieur et les enzymes du tronçon inférieur sont induits différemment.

Le biphenyle induit les deux métapyrocatechases. Celles-ci étaient aussi induites dans des proportions similaires lorsque la souche B-356 était cultivée en présence de biphenyle et d'un deuxième substrat aromatique. De ces composés, seuls le para-toluate et le salicylate pouvaient, comme seule source de carbone, permettre une croissance, quoique lente, de la souche B-356 adaptée. Dans ces milieux, l'activité métapyrocatechase était entièrement attribuable à la C2,3O du tronçon inférieur. Aucune activité métapyrocatechase n'était observée dans les cellules de la souche B-356 cultivée sur le benzoate. En réalité, cette souche croît très lentement sur le benzoate. Le fait que le benzoate n'ait pas induit la C2,3O alors que le salicylate et le biphenyle l'aient induite suggère la présence de deux voies cataboliques du benzoate chez cette souche. Nous n'avons pas de données permettant d'identifier la voie catabolique qui sert à dégrader le benzoate lorsque celle-ci sert de source de carbone. Cependant, nos résultats donnent à penser, qu'en présence de biphenyle, le benzoate découlant de l'action des enzymes du tronçon supérieur n'est pas transformé par l'action d'une dioxygénase, comme il est schématisé à la figure 1. Le benzoate serait plutôt transformé par l'action d'une monooxygénase qui incorporerait un groupement hydroxyle en position ortho. Cette hypothèse est supportée par l'observation récente selon laquelle le salicylate serait un intermédiaire dans le métabolisme du biphenyle chez la souche P. putida KF715 (Lee *et al.* 1995)

Il a déjà été démontré chez la souche B-356 adaptée, que les enzymes du tronçon supérieur sont synthétisés de façon constitutive en milieu LB (Desnoyer, 1991). Selon nos résultats, en milieu de culture contenant comme unique source de carbone le succinate, cette constitutivité semble se limiter au tronçon supérieur. L'absence d'activité C2,3O en milieu contenant du succinate en combinaison avec du biphenyle, suggère que le succinate aurait un effet répresseur sur l'expression des

métapyrocatechase chez B-356. La souche B-356 adaptée hybride davantage à xyIE et xyIEII, indiquant que ce deuxième gène métapyrocatechase est amplifié chez cette souche.

L'amplification des gènes du tronçon supérieur implique des fragments d'ADN de haut poids moléculaire difficilement digestibles (Desnoyer, 1991). Dans le cas de la C2,3O, celle-ci est associée à un fragment XhoI de 11 kpb qui est aussi amplifiable. L'apparition d'une telle bande serait due à la perte de sites de restriction durant l'amplification de l'ADN, ou à un rassemblement de brins d'ADN homologues qui inhiberait stériquement l'action des endonucléases.

#### 4.4 Essai de clonage

Parmi les clones que nous avons analysés d'une librairie cosmique, aucun portant le gène de la C2,3O n'a pu être repéré. Les résultats obtenus nous ont permis de faire quelques conclusions sur le réarrangement du gène bphC.

La présence d'ADN résistant à la digestion pourrait résulter de la perte de sites de restriction. Plusieurs clones obtenus d'une librairie cosmique du chromosome de la souche B-356 adaptée, dont p1951, exprimaient une activité métapyrocatechase. Des résultats préliminaires ont montré que les plasmides de ces clones avaient des profils de digestion différents les uns des autres. Ces clones possèderaient donc une métapyrocatechase bordée de différents segments d'ADN. La présence de plusieurs fragments différents contenant le gène métapyrocatechase pourrait être due à des réarrangements qui se sont produits au cours d'un mécanisme d'amplification des gènes, ou durant les manipulations de la construction de la librairie génomique.

Le fait que nous avons observé une bande d'ADN amplifiable de 11 kpb, lorsque l'ADN total de la souche B-356 était digéré avec l'enzyme XhoI nous amène à suggérer d'effectuer un clonage de cette bande dans un plasmide vecteur d'expression, tel que pT7

enzymes du tronçon inférieur. Les intermédiaires du cycle de Krebs (sauf l'acide pyruvique) répriment l'expression de plusieurs tronçons métaboliques (MacGregor *et al.* 1992). Un mécanisme similaire de répression catabolique pourrait expliquer l'effet de répression du succinate sur la C2,3O. Il serait donc intéressant d'évaluer l'expression des activités B1,2O et C2,3O chez des cellules de la souche B-356 ayant cru sur d'autres sources de carbone.

Le fait que les cellules de la souche adaptée ayant cru sur le salicylate n'expriment aucune activité B1,2O suggère que le salicylate réprime les enzymes du tronçon supérieur. En effet, chez la souche adaptée, il a été démontré que les enzymes du tronçon supérieur sont exprimés de façon constitutive et l'activité B1,2O devrait être présente même en absence de biphényle. Pour vérifier l'effet inhibiteur du salicylate (ou d'un dérivé métabolique) sur la B1,2O, il serait intéressant de préciser l'effet de concentrations variables de salicylate dans le milieu de croissance de la souche B-356 sauvage (non-adaptée) crue en présence d'une concentration fixe, inductible, de biphényle.

#### 4.3 Amplification des gènes

Comme nous avons discuté dans la section Revue de Littérature, les mutants dont les gènes appropriés sont amplifiés, sont favorisés par rapport à la souche parente lorsque les cellules sont placées sous pression de sélection. Le phénomène d'amplification de gènes semble être l'un des mécanismes favorisant l'adaptation de la souche B-356 à croître sur le biphényle. Aussi, quelques données semblent indiquer que la souche B-356 adaptée à croître sur le biphényle contiendrait plusieurs copies des gènes du tronçon supérieur (Desnoyers, 1991). Nous avons obtenu des résultats qui suggèrent que les enzymes du tronçon inférieur sont aussi amplifiées.

Le gène bphC hybride faiblement avec xylE du plasmide pWWO et xylEII du plasmide pWW15. Par contre l'ADN chromosomique de la souche parentale de B-356 hybride avec xylE et xylEII. Ceci démontre la présence d'un autre gène de

pour tenter d'isoler rapidement ce gène.



## BIBLIOGRAPHIE

ADAMS, R.H., HUANG, C.M., HIGSON, F.K., BRENNER, U. et D.D. FOCHT. 1992. Construction of a 3-chlorobiphenyl utilizing recombinant from an intergeneric mating. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:647-654.

AHMAD, D., MASSÉ, R. 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* 86:53-61.

AHMAD, D., SYLVESTRE, M., SONDOSSI, M. et R. MASSÉ. Bioconversion of 2-hydroxy-6-oxo-6-(4'-chlorophenyl)hexa-2,4-dienoic acid, the meta-cleavage product of 4-chlorobiphenyl. *J. Gen. Microbiol.* 137:1375-1385.

AMICON. 1980. Dye-ligand chromatography methods. Theory of matrix media. Amicon Corporation, Lexington, Mass.

ANDERSON, R.P. et J.R. ROTH. 1977. Tandem genetic duplication in phage and bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 31:473-506.

ANDERSON, P. et J. ROTH. 1981. Spontaneous tandem genetic duplication in *Salmonella typhimurium* arise by unequal recombination between rRNA (rrn) cistrons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78:3113-3117.

ARCIERO, D.M. et J.D. LIPSCOMB. 1986. Binding of <sup>17</sup>O-labeled substrat and inhibitors to protocatechuate-4,5-dioxygenase-nitrosyl complex. *J. Biol. Chem.* 261:2170-2178.

ARCIERO, D.M., ORVILLE, A.M. et J.D. LIPSCOMB. 1985. [<sup>17</sup>O]Water and nitric oxide binding by protocatechuate-4,5-dioxygenase and catechol-2,3-dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 260:14035-14044.

ASSINDER, S.J. et P.A. WILLIAMS. 1990. The TOL plasmids: determinants of the catabolism of toluene and the xylenes. *Adv. Microbiol. Physiol.* 31:1-69.

ASTURIAS, J.A. et K.N. TIMMIS. 1993. Three different 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase genes in the gram-positive polychlorobiphenyl degrading bacterium *Rhodococcus globerulus* P.6. *J. Bacteriol.* 175:4631-4640.

ASTURIAS, J.A., ELTIS, L.D., PRUCHA, M. et K.N. TIMMIS. 1994. Analysis of three 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase found in *Rhodococcus globerulus* P6: identification of a new family of extradiol dioxygenases. *J. Biol. Chem.* 269:7807-7815

BAGDASARIAN, M. M., AMANN, E., LURZ, R., RÜCKERT, B. et M. BAGDASARIAN. 1983. Activity of the hybrid *trp-lac(tac)* promoter of *Escherichia coli* in *Pseudomonas putida*. Construction of broad-host-range, controlled-expression vectors. *Gene* 26:273-282.

BAGDASARIAN, M., LURZ, R., RÜCKERT, FRANKLIN, F.C.H., BAGDASARIAN, M.M. ET K.N. TIMMIS. 1981. Specific purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high colpy number RSF1010-derived vectors, and a host vector system for cloning in *Pseudomonas*. *Gene* 16:237-247.

BARTELS, I., KNACKMUSS, H. et W. REINEKE. 1984. Suicide inactivation of catechol-2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2 by halocatechols. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:500-505.

BARTILSON, M. et V. SHINGLER. 1989. Nucleotide sequence and expression of the catechol 2,3-dioxygenase-encoding gene of phenol-catabolizing *Pseudomonas* CF600. *Gene* 85:233-238.

BEEFNICK, F., LUNI, R. et N. GLANSDORFF. 1974. Arginine gene duplication in recombination proficient and deficient strains of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* 132:241-253.

BERGERON, J., AHMAD, D., BARRIAULT, D., LAROSE, A. et M. SYLVESTRE. 1994. Identification and mapping of the gene translation products involved in the first steps of the *Comamonas testosteroni* B-356 biphenyl/chlorobiphenyl biodegradation pathway. *Can. J. Microbiol.* 40:743-753.

BERTINI, I., BRIGANTI, F. et A. SCOZZAFAVA. 1994. Aliphatic and aromatic inhibitors binding to the active site of catechol-2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2. *FEBS letters* 343:56-60.

BOPP, L.H. 1986. Degradation of highly chlorinated PCBs by *Pseudomonas* strain LB400. *J. Ind. Microbiol.* 1:23-29.

BURLAGE, R.S., HOOPER, S.W. et G.S. SAYLER. 1989. The TOL (pWW0) catabolic plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1323-1328.

BURLAGE, R.S., BEMIS, L.A., LAYTON, A.C., SAYLER, G.S. et F. LARIMER. 1990. Comparative genetic organization of incompatibility group P degradative plasmids. *J. Bacteriol.* 172:6818-6825.

CANDIDUS, S., VAN PÉE, K.H. et F. LINGENS. 1994. The catechol 2,3-dioxygenase gene of *Rhodococcus rhodochrous* CTM; nucleotide sequence, comparison with isofunctional dioxygenase and evidence for an active-site histidine. *Microbiology* 140:321-330.

- CANE, P.A. et P.A. WILLIAMS. 1986. A restriction map of naphthalene catabolic plasmid pWW60-1 and the location of some of its catabolic genes. *J.Gen.Microbiol.* 132:2919-2929.
- CARRINGTON, B., LOWE, A., SHAW, L.E. et P.A. WILLIAMS. 1994. The lower pathway operon for benzoate catabolism in biphenyl-utilising *Pseudomonas* sp. strain IC and the nucleotide sequence of the *bphE* gene for catechol-2,3-dioxygenase. *Microbiology* 140:499-508.
- CATELANI, D., COLOMBI, A., SORLINI, C. et V. TRECCANI. 1973. Metabolism of biphenyl. 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoate: The meta-cleavage product from 2,3-dihydroxybiphenyl by *Pseudomonas putida*. *Biochem.J.* 134:1063-1066.
- CERDAN, P., WASSERFALLEN, A., REKIK, M., TIMMIS, K. et S. HARAYAMA. 1994. Substrate specificity of catechol 2,3-dioxygenase encoded by TOL plasmid pWW0 of *Pseudomonas putida* and its relationship to cell growth. *J.Bacteriol.* 176:6074-6081.
- COHEN, S.N. 1976. Transposable genetic elements and plasmid evolution. *Nature* 263:731-738.
- DESNOYER, M.. 1991. Clonage et étude préliminaire de la régulation des gènes de la voie catabolique du 4-chlorobiphényl de *Pseudomonas testosteroni*. Mémoire de maîtrise présenté à l'UQAM.
- DIJKSTRA, B.W., WEIJER, W.J. et R.K. WIERENGA. 1983. Polypeptide chains with similar amino acid sequences but a distinctly different conformation. *FEBS Letters* 164:25-27.
- DILL, K.A.. 1990. Dominant forces in protein folding. *Biochemistry* 29:7133-7155.
- DON, R.H. et J.M. PEMBERTON. 1981. Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. *J.Bacteriol.* 145:681-686.
- DONNELLY, P.K., HEYDE, R.S. et J.S. FLETCHER. 1994. Growth of PCB-degrading bacteria on compounds from photosynthetic plants. *Chemosphere.* 28:981-988.
- DYSON, P. et H. SCHREMPF. 1987. Genetic instability and DNA amplification in *Streptomyces lividans* 66. *J.Bacteriol.* 169:4796-4803.
- EDLUND, T. et S. NORMARK. 1981. Recombination between short DNA homologies causes tandem duplication. *Nature* 292:269-271.
- EDMAN, P., et G. BEGGS. 1967. A protein sequenator. *Eur.J.Biochem.* 1:80-91

ELTIS, L.D., HOFMANN, B., HECHT, H., LUNSDORF, H., et K.N. TIMMIS. 1993. Purification and crystallization of 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase. *J.Biol.Chem.* 268:2727-2732.

FERSHT, A.. 1985. Enzyme structure and mechanism. Second Edition. W.H. Freeman and Company. New York.

FRANKLIN, F.C.H., BAGDASARIAN, M., BAGDASARIAN, M.M. et K.N. TIMMIS. 1981. Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWW0 from Pseudomonas putida and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta-cleavage pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 78:7458-7458

FUNABIKI, T., MIZOGUCHI, A., SUGIMOTO, T., TUDA, S., TSUJI, M., SAKAMOTO, H. et S. YOSHIDA. 1986. Oxygenase model reactions: 1. intra and extradiol oxygenation of 3,5-di-tert-butylcatechol catalyzed by (bipyridine)-(pyridine)iron(III) complex. *J.Am.Chem.Soc.* 108:2921-2932.

FURUKAWA, K. et N. ARIMURA. 1987. Purification and properties of 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase from polychlorinated biphenyl-degrading Pseudomonas pseudoalcaligenes and Pseudomonas aeruginosa carrying the cloned bphC gene. *J.Bacteriol.* 169:924-927.

FURUKAWA, K., ARIMURA, N. et T. MIYAZAKI. 1987. Nucleotide sequence of the 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase gene of Pseudomonas pseudoalcaligenes. *J.Bacteriol.* 169:427-429.

FURUKAWA, K., SIMON, J.R. et A.M. CHAKRABARTY. 1983. Common induction and regulation of biphenyl, xylene/toluene and salicylate catabolism in Pseudomonas paucimobilis. *J.Bacteriol.* 154:1356-1362.

FURUKAWA, K., HAYASE, N., TAIRA, K., ET N. TOMIZUKA. 1989. Molecular relationship of chromosomal genes encoding biphenyl/polychlorinated biphenyl catabolism: Some soil bacteria possess a highly conserved bph operon. *J.Bacteriol.* 171:5467-5472.

GHOSAL, D., YOU, I.S., CHATTERJEER, D.K. ET A.M. CHAKRABARTY. 1985. Microbial degradation of halogenated compounds. *Science* 228:135-142.

GIBELLO, A., FERRER, E., MARTIN, M. et A. PERTIERRA-GARRIDO. 1994. 3,4-dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase from Klebsiella pneumoniae, a Mg<sup>+2</sup> containing dioxygenase involved in aromatic catabolism. *Biochem.J.* 301:145-150.

GIBSON, D.T., CRUDEN, D.L., HADDOCK, J.D., SYLSTRA, G.J. et J.M. BRAND. 1993. Oxidation of polychlorinated biphenyls by Pseudomonas sp. strain LB400 and Pseudomonas pseudoalcaligenes KF707. *J.Bacteriol.* 175:4561-4564.

GORBUNOFF, M.J. 1984. The interaction of proteins with hydroxyapatite II. Role of acidic and basic groups. *Anal.Biochem.* 136:433-439.

HAMPSEY, D.M., DAS, G. et F. SHERMAN. 1986. Amino acid replacement in yeast iso-1-cytochrome C. *J.Biol.Chem.* 261:3259-3271.

HAPPE, B., ELTIS, L.D., POTH, H., HEDDERICH, R. et K.N. TIMMIS. 1993. Characterization of 2,2',3-trihydroxybiphenyl dioxygenase, an extradiol dioxygenase from the dibenzofuran- and dibenzo-p-dioxin-degrading bacterium *Sphingomonas* sp. strain RW1. *J.Bacteriol.* 175:7313-7320.

HARAYAMA, S. et M. REKIK. 1989. Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. *J.Biol.Chem.* 264:15328-15333.

HARAYAMA, S. et M. REKIK. 1993. Comparison of the nucleotide sequences of the meta-cleavage pathway genes of TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* with other meta-cleavage genes suggest that both single and multiple nucleotide substitutions contribute to enzyme evolution. *Mol.Gen.Genet.* 239:81-89.

HARAYAMA, S., REKIK, M., WASSERFALLEN, A. et A. BAIROCH. 1987. Evolutionary relationships between catabolic pathways for aromatics: Conservation of gene order and nucleotide sequences of catechol oxidation genes of pWW0 and NAH7 plasmids. *Mol.Gen.Genet.* 210:241-247.

HARAYAMA, S., POLISSI, A. et M. REKIK. 1991. Divergent evolution of chloroplast-type ferredoxin. *FEBS letters* 285:85-88.

HARAYAMA, S., WASSERFALLEN, CERDAN, P. et M. REKIK. 1992. Mutational modification of the substrate specificity of catechol 2,3-dioxygenase encoded by TOL plasmid pWW0 of *Pseudomonas putida*. dans: *Pseudomonas: Molecular biology and biotechnology.* Ed.: American Society for Microbiology. Washington, D.C.

HARKNESS, M.R., McDERMOTT, J.B., ABRAMOWICZ, D.A., SALVO, J.J., FLANAGAN, W.P., STEPHENS, M.L., MONDELLO, F.J., MAY, R.J., LOBOS, J.H., CARROLL, K.M., BRENNAN, M.J., BRACCO, A.A., FISH, K.M., WARNER, G.L., WILSON, P.R., DIETRICH D.K., LIN, D.T. MORGAN, C.B. et W.L. GATELY. 1993. In situ imulation of aerobic PCB biodegradation in Hudson river sediments. *Science* 259:503-507.

HAYASE, N., TAIRA, K. et K. FURUKAWA. 1990. *Pseudomonas putida* KF715 bphABCD operon encoding biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation: cloning analysis, and expression in soil bacteria. *J.Bacteriol.* 172:1160-1164.

HILL, C.W., GRANFSTROM, R.H., HARNISH, B.W. et B.S. HILLEMANN. 1977. Tandem duplication resulting from recombination between ribosomal RNA genes in *Escherichia coli*. *J.Mol.Biol.* 116:407-428.

- HIRATA, F., NAKAZAWA, A., NOZAKI, M. et O. HAYAISHI. 1971. Studies on metapyrocatechase. IV. Circular dichroism and optical rotatory dispersion. *J.Biol.Chem.* 246:5882-5887.
- HIROSE, J., KIMURA, N., SUYAMA, A., KOBAYASKI, A., HAYASHIDA, S. et K. FURUKAWA. 1994. Functional and structural relationship of various extradiol aromatic ring-cleavage dioxygenases of *Pseudomonas* origin. *FEMS Microbiol. letters.* 118:273-278.
- HOFER, B., ELTIS, L.D., DOWLING, D.N. et K.N. TIMMIS. 1993. Genetic analysis of a *Pseudomonas* locus encoding a pathway for biphenyl/polychlorinated biphenyl degradation. *Gene* 130:47-55.
- HORI, K., HASHIMOTO, T. et M. NOZAKI. 1973. Kinetic studies on the reaction mechanism of dioxygenases. *J.Biochem.* 74:375-384.
- HURTUBISE, Y., BARRIAULT, D., POWLOWSKI, J. et M. SYLVESTRE. 1995. Purification and characterization of the *Comamonas testosteroni* B-356 biphenyl dioxygenase components. *J.Bacteriol.* 177:6610-6618.
- KATAEVA, I.A. et L.A. GOLOULEVA. 1990. Catechol-2,3-dioxygenases from *Pseudomonas aeruginosa* 2x. *Methods in Enzymology.* 188:115-126.
- KEIL, H. LEBENS, M.R. et P.A. WILLIAMS. 1985. TOL plasmid pWW15 contains two nonhomologous independently regulated catechol 2,3-dioxygenase genes. *J.Bacteriol.* 163:248-255.
- KELLIS, J.T., NYBERG, K. et A.R. FERSHT. 1989. Energetics of complementary side chain packing in a protein hydrophobic core. *Biochemistry* 29:4914-4922.
- KHAN, A., TEWARI, et S. WALIA. 1988. Molecular cloning of 3-phenylcatechol-dioxygenase involved in the catabolic pathway of chlorinated biphenyl from *Pseudomonas putida* and its expression in *Escherichia coli*. *Appl.Environ.Microbiol.* 54:2664-2671.
- KIKUCHI, Y., YASUKOCHI, Y., NAGATA, Y., FUKUDA, M. et M. TAKAGI. 1994. Nucleotide sequence and functional analysis of the meta-cleavage pathway involved in biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation in *Pseudomonas* sp. strain KKS102. *J.Bacteriol.* 176:4269-4276.
- KIM, E. et G.J. ZYLSTRA. 1995. Molecular and biochemical characterization of two meta-cleavage dioxygenases involved in biphenyl and m-xylene degradation by *Beijerinckia* sp. strain B1. *J.Bacteriol.* 177:3095-3103.

KIMBARA, K., HASHIMOTO, T., FUKUDA, M., KOANA, T., TAKAGI, M., OISHI, M. et K. YANO. 1989. Cloning and sequencing of two tandem genes involved in the degradation of 2,3-dihydroxybiphenyl to benzoic acid in the polychlorinated biphenyl-degrading soil bacterium *Pseudomonas* sp. strain KKS102. *J.Bacteriol.* 171:2740-2747.

KLECKA, G.M. et D.T. GIBSON. 1981. Inhibition of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* by 3-chlorocatechol. *Appl.Environ.Microbiol.* 41:1159-1165.

KUHM, A.E., STOLZ, A., NGAI, K. et H. KNACKMUSS. 1991. Purification and characterisation of a 1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase from bacterium that degrades naphthalenesulfonic acids. *J.Bacteriol.* 173:3795-3802.

KUSHNER, S.R. 1978. An improved method for transformation of *Escherichia coli* with *COE1* derived plasmids. dans: Genetic engineering. Ed.: Elsevier/North-Holland, Amsterdam.

LAEMMLI, U.K.. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

LEE, J., MIN, K.R., KIM, Y., KIM, C., LIM, J., YOON, H., MIN, K. et Y. KIM. 1995. Cloning of salicylate hydroxylase gene and catechol 2,3-dioxygenase gene and sequencing of an intergenic sequence between the two genes of *Pseudomonas putida* KF715. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 211:382-388

LINDAHL, L. et J. ZENGEL. 1982. Expression of ribosomal genes in bacteria. *Adv.Genet.* 21:53-121.

LLOYD-JONES, G., deJONG, C., OGDEN, R.C., DUETZ, W.A., et P.A. WILLIAMS. 1994. Recombination of the *bph* (biphenyl) catabolic genes from plasmid pWW100 and their deletion during growth on benzoate. *Appl.Environ.Microbiol.* 60:691-696.

LUPSKI, J.R., et G.M. WEINSTOCK. 1992. Short interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J.Bacteriol.* 174:4525-4529.

MABROUK, P.A., ORVILLE, A.M., LIPSCOMB, J.D. et E.I. SOLOMON. 1991. Variable-temperature variable-field magnetic circular dichroism studies of the Fe(II) active site in metapyrocatechase: Implication for the molecular mechanism of extradiol dioxygenase. *J.Am.Chem.Soc.* 113:4053-4061.

MACGREGOR, C.H., WOLFF, J.A., ARORA, S.K., HYLEMON, P.B. et P.V. PHIBBS Jr. 1992. Catabolic repression control in *Pseudomonas aeruginosa*. dans: *Pseudomonas: Molecular biology and biotechnology.* Ed.: American society for Microbiology. Washington D.C.

MATSUDAIRA, P.. 1987. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J.Biol.Chem.* 262:10035-10038.

MASSÉ, R., MESSIER, F., AYOTTE, C., LÉVESQUE, M.F. et M. SYLVESTRE. 1989. A comprehensive gas chromatographic/mass spectrometric analysis of 4-chlorobiphenyl bacterial degradation product. *Biomed.Environ.Mass Spectrom.* 18:27-47.

McDONALD, C.J. et R.E. TOURANGEAU. 1988. BPC: Guide question-réponses sur les biphényles polychlorés. Ministre des Approvisionnements et Service Canada.

MEER, J.R., VOS, W.M., HARAYAMA, S. et A.J.B. ZEHNDER. 1992. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol.Rev.* 56:677-694.

MONDELLO, F.J. 1989. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Pseudomonas* strain LB400 genes encoding polychlorinated biphenyl degradation. *J.Bacteriol.* 171:1725-1732.

NAKAI, C., KAGAMIYAMA, H. et M. NOZAKI. 1983a. Complete nucleotide sequence of the metapyrocatechase gene on the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. *J.Biol.Chem.* 258:2923-2928.

NAKAI, C., HORI, K., KAGAMIYAMA, H., NAKAZAWA, T. et M. NOZAKI. 1983b. Purification, subunit structure, and partial amino acid sequence of metapyrocatechase. *J.Biol.Chem.* 258:2916-2922.

NAKAI, C., KAGAMIYAMA, H., NOZAKI, M., NAKAZAWA, S., INOUE, S., EBINA, Y. et A. NAKAZAWA. 1983c. Complete nucleotide sequence of the metapyrocatechase gene on the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. *J.Biol.Chem.* 258:2923-2928.

NEGORO, S., TANIGUCHI, T., KANAOKA, M., KIMURA, H. et H. OKADA. 1983. Plasmid determined enzymatic degradation of nylon oligomers. *J.Bacteriol.* 155:22-31.

NORDLUND-MÖLLER, L., ANDERSON, O., AHLGREN, R., SCHILLING, J., GILLNER, M., GUSTAFSSON, et J. LUND. 1990. Cloning, structure and expression of a rat binding protein for polychlorinated biphenyls. *J.Biol.Chem.* 265:12690-12693.

NORMARK, S., EDLUND, T., GRUNDTROM, T., BERGSTROM, S. et H. WOLF-WATZ. 1977. *Escherichia coli* K-12 mutants hyperproducing chromosomal beta-lactamase by gene repetitions. *J.Bacteriol.* 132:912-922.

NOZAKI, M. 1970. Metapyrocatechase (*Pseudomonas*). *Methods in Enzymology.* 17A:522-525.

NOZAKI, M., ONO, K., NAKAZAWA, T., KOTANI, S. et O. HAYAISHI. 1968. Metapyrocatechase. II. The role of iron and sulfhydryl groups. *J.Biol.Chem.* 243:2682-2690.

NOZAKI, M., KOTANI, S., ONO, K. et S. SENCH. 1970. Metapyrocatechase. III. Substrate specificity and mode of ring fission. *Biochim.Biophys.Acta.* 220:213:223.

OKADA, H., NEGORO, S., KIMURA, H. et S. NAKAMURA. 1983. Evolutionary adaptation of plasmid-encoded enzymes for the degrading nylon oligomers. *Nature* 306:203-206.

PATEL, T.R. et E.A. BARNSELY. 1980. Naphthalene metabolism by Pseudomonads: Purification and properties of 1,2-dihydronaphthalene oxygenase. *J.Bacteriol.* 143:668-673.

PETES, T.D.. 1988. Recombination between repeated genes in microorganisms. *Ann.Rev.Genet.* 22:147-168.

POLISSI, A. et S. HARAYAMA. 1993. In vivo reactivation of catechol 2,3-dioxygenase mediated by a chloroplast-type ferredoxin: A bacterial strategy to expand the substrate specificity of aromatic degradative pathways. *Embo.J.* 12:3339-3347.

POWLOWSKI, J., SAHLMAN L. et V. SHINGLER. 1993. Purification and properties of the physically associated meta-cleavage pathway enzymes 4-hydroxy-2-ketovalerate aldolase and aldehyde dehydrogenase (acylating) from Pseudomonas sp. strain CF600. *J.Bacteriol.* 175:377-385.

QUE. L. jr.. 1983. Metalloproteins with phenolate coordination. *Coord.Chem.Rev.* 50:73-108.

RAMOS, I.L., WASSERFALLEN, A., ROSE, K. et K. TIMMIS. 1987. Redesigning metabolic routes: Manipulation of TOL plasmid pathway for catabolism of alkylbenzoates. *Science* 235:593-596.

RANGNEKAR, V.M.. 1988. Variation in the ability of Pseudomonas sp. strain B13 cultures to utilize meta-chlorobenzoate is associated with tandem amplification and deamplification of DNA. *J.Bacteriol.* 170:1907-1912.

ROSE, G.D., GESELOWITZ, A.R., LESSER, G.L., LEE, R.H. et M.H. ZEHFUS. 1985a. Hyphobicity of amino acid residues in globular proteins. *Science* 229:834-838.

ROSE, G.D., GIERACSH, L.M. et J.A. SMITH. 1985b. Turns in peptides and proteins. *Adv.Prot.Chem.* 37:1-109.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. et T. MANIATIS. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual (deuxième édition). Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York.

SANSCHAGRIN, S. 1988. Contribution à l'étude des systèmes enzymatiques impliqués dans la conversion des chlorobiphényles par la souche bactérienne B-206. Mémoire de maîtrise présenté à l'UQAM.

SCHELL, M.A.. 1990. Regulation of the naphthalene degradation genes of plasmid NAH7: Example of a generalized positive control system in Pseudomonas and related bacteria. dans: Pseudomonas: Biotransformation, pathogenesis, and evolving biotechnology. Ed.: American Society for Microbiology, Washington, D.C..

SEEGAL, R.F. et W. SHAIN. 1992. Neurotoxicity of polychlorinated biphenyls. The role of ortho-substituted congeners in altering neurochemical function. dans: The vulnerable brain and environmental risks. Plenum Press, New York.

SMITH, P.K., KROHN, R.I., HERMANSON, G.T., MALIA, A.K., GARTNER, F.H., PROVENZANO, M.D., FUJIMOTO, E.K., GOEKE, N.M., OLSON, B.J. et D.C. KLENK. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal.Biochem.* 150:76-85.

SONDOSSI, M. et M. SYLVESTRE. 1990. Adaptation of a soil Pseudomonas sp. B-300 grown on biphenyl and monochlorobiphenyls. Abstract of the 90th Annual Meeting of the American Society for Microbiology (Anaheim, California). ASM Press. p.305

SONDOSSI, M., SYLVESTRE, M. et D. AHMAD. 1992. Effects of chlorobenzoate transformation on the Pseudomonas testosteroni biphenyl and chlorobiphenyl degradation pathway. *Appl.Env.Microbiol.* 58:485-495.

SOUTHERN, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.* 98:503-517.

STRACHAN, W.M.J. 1988. Devenir et effets des BPC dans l'environnement canadien. Rapport rédigé pour le Comité directeur des produits chimiques toxiques. Conseil canadien des ministres des ressources et l'environnement.

SUMMERS, N.L., CARLSON, W.D., et M. KARPLUS. 1987. Analysis of side-chain orientation in homologous proteins. *J.Mol.Biol.* 196:175-198.

SYLVESTRE, M.. 1980. Isolation method for bacterial isolates capable of growth on p-chlorobiphenyl. *Appl.Environ.Microbiol.* 39:1222-1224.

TABOR, S. et C.C. RICHARDSON. 1985. A bacteriophage T7RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 82:1074-1078.

- TAIRA, K., HAYASE, N., ARIMURA, N., YAMASITA, S., MIYAZAKI, T. et K. FURUKAWA. 1988. Cloning and nucleotide sequence of the 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase gene from the PCB-degrading strain of *Pseudomonas paucimobilis* O1. *Biochemistry* 27:3990-3996.
- TAIRA, K., HIROSE, J., HAYASHIDA, S. et K. FURUKAWA. 1992. Analysis of bph operon from the polychlorinated biphenyl-degrading strain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *J.Biol.Chem.* 267:4844-4853.
- TAKEMORI, S., KOMIYAMA, T. et M. KATAGIRI. 1971. Apo- and reconstituted holoenzymes of metapyrocatechase from *Pseudomonas putida*. *Eur.J.Biochem.* 23:178-184.
- TLSTY, T.D., ALBERTINI, A.M. et J.H. MILLER. 1984. Gene amplification in the lac region of *E. coli*. *Cell* 37:217-224.
- TSUDA, M. et T. INO. 1987. Genetic analysis of a transposon carrying toluene degrading genes on a TOL plasmid pWW0. *Mol.Gen.Genet.* 210:270-276.
- VILLAWOEL, R., HEDGES, R.W., MAENCHANT, R., LEEMANS, J., ENGLER, G., MONTAGU, M. et J. SCHELL. 1983. Heteroduplex analysis of P-plasmid evolution. The role of insertion and deletion of transposable elements. *Mol.Gen.Genet.* 189:390-399.
- WASSERFALLEN, A., REKIK, M. et S. HARAYAMA. 1991. A *Pseudomonas putida* strain able to degrade m-toluate in the presence of 3-chlorocatechol. *Bio/Technology* 9:296-298.
- WHITTAKER, J.W. et J.D. LIPSCOMB. 1984. Transition state analogs for protocatechuate-3,4-dioxygenase. *J.Biol.Chem.* 256:4476-4486.
- WILLIAMS, P.A. et L.K. CHATFIELD. 1986. Naturally occurring TOL plasmids in *Pseudomonas* strains carry either two homologous or two nonhomologous catechol 2,3-dioxygenase genes. *J.Bacteriol.* 168:878-885.
- WILLIAMS, P.A., ASSINDER, S.J. et L.E. SHAW. 1990. Construction of hybrid xylE genes between the two duplicate homologous genes from TOL plasmid pWW53: Comparison of the kinetic properties of the gene products. *J.Gen.Micobiol.* 136:1583-1589.
- WILLIAMS, P.A., ASSINDER, S.J., DeMARDO, P., O'DONELL, K.J., POH, C.L., SHAW, L.E. et K. WINSON. 1992. Catabolic gene duplication in TOL plasmids. Dans: *Pseudomonas*: Molecular Biology and Biotechnology. Ed.: American Society for Microbiology, Washington D.C.

WORSEY, M.J., et P.A. WILLIAMS. 1975. Metabolism of toluene and xylene by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: Evidence for a new function of the TOL plasmid. *J.Bacteriol.* 124:7-13.

YAMAMOTO, S. et Y. ISHIMURA. 1991. Dioxygenases and monooxygenases. Dans "A study of enzymes". Ed.: Stephen J. Kudy edition. CRC Press, Boca Raton Fla. 2:315-344.

YANISCH-PERRON, C., VIEIRA, J. et J. MESSING. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains; nucleotide sequences and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-119.

YEN, K. et C.M.SERDAR. 1988. Genetics of naphthalene catabolism in *Pseudomonads*. *CRC Crit.Rev.Microbiol.* 15:247-265.

YRJÄLÄ, K., LARS, P., KILPI, S. et M. ROMANTSCHUK. 1994. Cloning of *cmpE*, a plasmid born catechol 2,3-dioxygenase-encoding gene from the aromatic- and chloroaromatic-degrading *Pseudomonas* sp.HV3. *Gene* 138:119-121.

ZIFFER, H., KABUTO, K., GIBSON, D.T., KOBAL, V.M. et D.M. JERINA. 1977. The absolute stereochemistry of several *cis*-dihydrodiols microbially produced from substituted benzenes. *Tetrahedron* 33:2491-2496.



