

Université du Québec

INRS Santé

Étude de la stabilité de la voie catabolique du biphényle et des
biphényles polychlorés de *Comamonas testosteroni* B-356

par

Lucy Clayton

Mémoire

présenté

pour l'obtention

du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

en Sciences expérimentales de la santé

19 décembre 1996

II

Résumé

Les biphényles polychlorés (BPC) sont des composés aromatiques portant des atomes de chlore et possédant des caractéristiques physico-chimiques qui ont grandement contribué à les rendre persistants dans l'environnement. Également, à l'instar de plusieurs composés xénobiotiques, ils sont sujets à la dégradation par les microorganismes. *Comamonas testosteroni* B-356 est une souche bactérienne capable de transformer les BPC en chlorobenzoates (CBA). Cette souche a été adaptée par transferts successifs de la souche sauvage sur les BPC, donnant lieu à l'obtention d'une souche possédant des capacités cataboliques accrues envers les BPC. Le projet décrit dans ce mémoire propose deux objectifs de recherche. Le premier visait à démontrer que la stabilité de la voie catabolique du BP était plus élevée chez la souche originale que chez la souche adaptée. Des essais préliminaires de mutations aux radiations ultraviolettes effectuées sur les deux souches allaient dans le sens de cette hypothèse. Par différents moyens (expositions aux radiations ultraviolettes, transposition) nous avons tenté d'obtenir des mutants de la souche originale incapables de croître sur le BP, pour en éprouver la stabilité. Aucune de ces deux techniques n'a généré les mutants escomptés suite à l'analyse de 3 500 et 10 000 colonies respectivement, confirmant que la voie catabolique du BP était très stable chez cette souche.

Par contre, la souche adaptée s'est montrée beaucoup moins stable. En effet, au moins un mutant incapable de croître sur le BP a été identifié sur 9 000 colonies analysées, qui provenaient d'une culture ayant été propagée sur le BP. D'autre part, contrairement à des observations faites chez d'autres souches microbiennes, le benzoate ne semble pas posséder la capacité de faire augmenter le taux de mutations spontanées chez *C. testosteroni* B-356 adaptée. Les essais de mutations effectués avec les deux souches confirment donc que la voie catabolique est plus stable chez la souche originale que chez la souche adaptée.

Le second objectif du projet visait à localiser les gènes spécifiant la dégradation des BPC chez la souche adaptée. Les capacités cataboliques accrues envers les BPC et la fréquence élevée de mutants incapables de croître sur le BP obtenus à partir de la souche adaptée constituaient des indices qui laissaient croire que chez cette souche, les gènes de dégradation étaient portés sur un plasmide. En utilisant différents protocoles de détection de plasmide de haut poids moléculaire, nous avons pu mettre en évidence que, contrairement à la souche originale, la souche adaptée

III

possédait un plasmide, ce qui laissait croire que la formation du plasmide chez la souche adaptée avait eu lieu durant l'adaptation de la souche originale sur le BP par excision d'un fragment d'ADN chromosomique. Puis par hybridation du plasmide avec les sondes appropriées, nous avons démontré que la plupart des gènes de la voie catabolique du BP étaient présents sur le plasmide. Ainsi, les gènes *bphA* et *bphG* ont été utilisés pour fabriquer les sondes qui ont répondu positivement avec le plasmide pB-356-ad isolé de la souche adaptée. Les gènes *bphA* (partiellement présent), *E*, *F*, *B* et *C* constituant un fragment de 4 kpb ont également servi pour la construction d'une sonde qui a hybridé avec le plasmide pB-356-ad. Malheureusement, pour des raisons inconnues, ce plasmide se digère difficilement (malgré les essais qui ont été tentés) et il n'a pas été possible de déterminer si tout le fragment de 4 kpb se trouvait sur le plasmide.

Pour obtenir la confirmation que tous les gènes spécifiant la dégradation des BPC étaient portés par le plasmide pB-356-ad, nous avons procédé à la transformation d'un mutant de la souche adaptée, le mutant M5, négatif pour la croissance sur le BP suite à une exposition aux radiations ultraviolettes ayant occasionné la perte du plasmide de dégradation. Suite à la transformation par le plasmide pB-356-ad, ce mutant a recouvré la capacité de croître sur le BP et la présence du plasmide chez le transformant a également été démontrée, confirmant que tous les gènes de dégradation étaient sur le plasmide pB-356-ad. L'étude des mutants de délétion a révélé que seul le mutant M5 avait perdu le plasmide alors que les autres mutants n'avaient perdu qu'une partie de la voie catabolique du BP. Il a été démontré que le mutant M3 avait conservé le gène *bphC* mais que son incapacité à croître sur le BP provenait de l'absence du gène *bphG* et d'une partie de la région en amont des gènes *bph*. Également, les mutants M3 et M5 nous ont permis de déterminer, suite aux essais enzymatiques réalisés, que le gène de la C_{2,3}O, impliquée dans le tronçon inférieur de la voie de dégradation, était localisé sur le chromosome et non sur le plasmide.

Selon toute vraisemblance, l'ensemble des résultats obtenus concernant la stabilité de la voie catabolique des BPC ainsi que la présence d'un plasmide chez la souche adaptée, laissent croire que l'instabilité de la voie catabolique chez cette souche est reliée à la présence du plasmide pB-356-ad.

IV

Remerciements

D'abord, j'aimerais remercier chaleureusement mon directeur de recherche, Michel Sylvestre, qui m'a accueillie avec promptitude dans son laboratoire à l'INRS-Santé. Sa présence constante et son empressement à répondre à mes interrogations ont été très appréciés durant ces deux dernières années.

Je tiens également à remercier tous les membres du groupe de recherche: Diane, Yves, Darakhshan, Isabelle et Carl qui m'ont toujours accordé leur temps et m'ont encouragée tout au long de mon projet. Votre amitié m'a été très précieuse.

Table des matières

Résumé	II
Remerciements	IV
Liste des tableaux et figures.....	VII
Introduction.....	1
Chapître 1 - Revue de littérature.....	3
1.1 Importance environnementale des BPC	3
1.2 Dégradation microbienne des BPC	4
1.2.1 Introduction	4
1.2.2 Voies cataboliques oxidative	6
1.2.3 Voie catabolique des BPC de <i>C. testosteroni</i> B-356	9
1.3 Les plasmides de dégradation.....	13
1.3.1 Introduction.....	13
1.3.2 La classification des plasmides	13
1.3.3 Les substrats ciblés par les plasmides cataboliques	15
1.3.4 La mobilité des plasmides cataboliques.....	16
1.3.5 La localisation et l'organisation des gènes de dégradation	16
1.3.6 Les gènes de dégradation portés par des transposons	18
1.3.7 Mécanismes de régulation des gènes cataboliques plasmidiques	18
1.3.8 Stabilité des plasmides de dégradation	21
Chapître 2 - Matériel et méthode	23
2.1 Produits chimiques	23
2.2 Souches bactériennes, plasmides et conditions de culture	24
2.3 Essais de mutations des souches	25
2.3.1 Mutations aux radiations ultraviolettes	25
2.3.2 Mutations par transposition.....	26
2.3.3 Adaptation de la souche originale de <i>C. testosteroni</i> B-356 à croître sur le BP	27
2.3.4 Détermination de la fréquence de mutations spontanées des gènes <i>bph</i> de <i>C. testosteroni</i> B-356 adaptée	27
2.4 Manipulations d'ADN	27
2.4.1 Protocoles généraux	27
2.4.2 Fabrication des sondes non radio actives	28
2.4.3 Transfert d'ADN et hybridation de type Southern	29
2.4.4 Transformation de souches bactériennes	30
2.5 Essais enzymatiques d'inductibilité.....	31
3. Chapître 3 - Résultats	32
3.1 Stabilité de la voie catabolique du BP.....	32
3.1.1 Souche adaptée de <i>C. testosteroni</i> B-356.....	32

3.1.2 Souche originale de <i>C. testosteroni</i> B-356.....	33
3.2 Mise en évidence et caractérisation d'un plasmide de dégradation chez la souche B-356 adaptée.....	34
3.2.1 Mise en évidence d'un plasmide chez la souche adaptée	34
3.2.2 Vérification de la présence des gènes cataboliques bph sur le plasmide pB-356-ad	36
3.2.3 Adaptation de la souche originale sur le BP	42
3.2.4 Caractérisation de mutants de délétion	42
3.2.5 Transformation du mutant M5 avec le plasmide de la souche adaptée.....	49
3.3 Voie catabolique du BA	51
Chapître 4 - Discussion.....	55
4.1. Stabilité des gènes de la voie catabolique du BP	55
4.2. Le plasmide de la souche adaptée et sa caractérisation	56
4.2.1. Formation du plasmide chez la souche adaptée	58
4.2.2. Caractérisation de mutants de délétion de la souche adaptée	59
4.3. Voie catabolique du BA	59
Conclusion	61
Bibliographie	62

Liste des tableaux et figures

Tableau 1: Taux de consommation d'oxygène obtenus avec les souches de <i>C. testosteroni</i> B-356 (originale et adaptée).....	11
Tableau 2: Souches bactériennes et plasmides utilisés dans cette étude	24
Figure 1: Voie catabolique majeure des BP/BPC en BA/CBA.	7
Figure 2: Voie catabolique du BP et des BPC chez la souche <i>C. testosteroni</i> B-356 et carte de restriction correspondante	10
Figure 3: Hybridation de type Southern d'un gel contenant l'ADN des souches originale et adaptée de B-356 digéré avec l'enzyme de restriction <i>EcoR</i> I et hybridé avec une sonde d'ADN contenant une partie du gène <i>bphC</i> de la voie catabolique	12
Figure 4: Gel d'agarose 0,7% (dans le tampon TAE) utilisé pour la migration de préparations d'ADN des souches originale et adaptée de <i>C. testosteroni</i> B-356, tel que décrit par Kado et Liu	35
Figure 5: Hybridation de type Southern d'un gel contenant des préparations d'ADN de la souche originale et adaptée de <i>C. testosteroni</i> B-356 obtenues par la technique de Kado et Liu (1981). L'hybridation a été faite avec la sonde non radioactive constituée d'un fragment de 4 kpb <i>Bgl</i> III tel que décrit dans le texte.....	37
Figure 6: Hybridation de type Southern d'un gel contenant le plasmide de la souche adaptée et l'ADN total de la souche originale digérés avec l'enzyme de restriction <i>Bgl</i> III durant 18 heures. La sonde était constituée d'un fragment de 1,3 kpb contenant la totalité du gène <i>bphA39</i>	
Figure 7: Hybridation de type Southern d'un gel contenant le plasmide pB-356-ad et l'ADN total de la souche originale digérés avec l'enzyme de restriction <i>Bgl</i> III durant 18 heures. L'hybridation a été effectuée avec une sonde d'ADN de 1,1 kpb <i>EcoR</i> I/ <i>Hind</i> III, contenant la totalité du gène <i>bphG</i>	41
Figure 8: Gel d'agarose 0,7% (dans le tampon TAE) utilisé pour la migration de préparations d'ADN selon le protocole de Kado et Liu (1981) pour vérifier la présence de plasmides chez les mutants M1 et M2 (figure 8a) et les mutants M3 et M5 (figure 8b)	44

VIII

- Figure 9: Hybridation de type Southern d'un gel contenant l'ADN total du mutant M3 et de la souche originale de *C. testosteroni* B-356 digérés avec 2 enzymes de restriction, *EcoR1* et *Sph1* et hybridés avec une sonde de 2,3 kpb contenant une partie du gène *bphG*46
- Figure 10: Hybridation de type Southern d'un gel contenant l'ADN total du mutant M3 et de la souche originale de *C. testosteroni* B-356 digérés avec différents enzymes de restriction et hybridés avec une sonde de 1,2 kpb constituant le fragment directement en amont de la région *bph*.....48
- Figure 11: Gel d'agarose 0,7% (dans le tampon TAE), utilisé pour la migration de préparations d'ADN des 4 transformants de M5 tel que décrit par Kado et Liu50
- Figure 12: Production de composé de *meta*-clivage à partir du DHB52
- Figure 13: Production de composé de *meta*-clivage à partir du 4-méthyl catéchol.....52
- Figure 14: Production de composé de méta-clivage à partir du catéchol53

Introduction

Les biphényles polychlorés (BPC) sont des composés obtenus suite à une chlorination catalytique de la molécule de biphenyle (BP). Leur grande stabilité chimique et thermique explique la popularité qu'ils ont connue et leur persistance dans l'environnement. Étant de nature lipophile, les BPC tendent à s'accumuler dans les chaînes trophiques. Il a été démontré que certaines espèces animales étaient contaminées par les BPC, ces derniers s'étant accumulés dans les tissus adipeux.

L'élimination des BPC dans l'environnement dépend en grande partie de leur dégradation par les micro-organismes. Au cours des vingt-cinq dernières années, plusieurs travaux ont été réalisés pour élucider les voies cataboliques bactériennes servant à les dégrader. La dégradation des BPC peut s'opérer en présence ou en absence d'oxygène mais dans chacun des cas, le nombre et la position des atomes de chlore portés par la molécule de BP demeurent la principale contrainte affectant leur dégradation. Afin de faciliter leur biodégradation, quelques moyens peuvent être envisagés tels l'emploi d'un surfactant, qui contribue à augmenter leur disponibilité pour les micro-organismes, l'ajout d'un co-substrat et la présence d'une souche effectuant la dégradation des chlorobenzoates (CBA).

La minéralisation des BPC nécessite la présence de plusieurs enzymes. Ceux-ci sont encodés par des gènes souvent organisés en opéron polycistroniques ou tronçons. D'abord, les BPC sont transformés en CBA (tronçon supérieur), puis ces derniers sont métabolisés, donnant comme produits finals du CO₂ et de l'eau. Quelques souches possédant les deux tronçons cataboliques ont été isolées mais dans la plupart des cas, seul le tronçon supérieur serait présent chez les bactéries effectuant la dégradation des BPC, d'où la nécessité d'ajouter dans le milieu une souche capable de dégrader les CBA afin d'éviter l'accumulation de métabolites inhibiteurs. Dans un contexte de biorémediation *in situ*, les deux types de souches doivent donc demeurer en équilibre afin d'assurer une minéralisation complète et efficace des BPC.

Toutefois, avant de pouvoir envisager d'introduire des souches bactériennes dans l'environnement, certaines mesures doivent être prises en considération. Notamment, on doit pouvoir déterminer si certains facteurs, autres que physico-chimiques, auront un effet sur

l'expression de la voie catabolique des BPC. Ainsi, une connaissance plus approfondie des mécanismes impliqués dans la dégradation s'inscrit dans l'objectif de nos recherches, qui portent principalement sur la souche *Comamonas testosteroni* B-356.

Cette souche originale, isolée pour sa capacité à utiliser le BP et le 4-CB comme sources de carbone, fut cultivée sur le BP durant plusieurs passages, permettant d'obtenir une souche adaptée offrant un meilleur rendement dans la dégradation de certains congénères. D'autres différences, portant sur l'ADN et sur la facilité à obtenir des mutants de la souche adaptée qui étaient incapables de croître sur le BP, furent remarquées entre les deux souches. Ces caractéristiques laissaient supposer que la stabilité de la voie catabolique n'était pas la même chez les deux souches et que la cause de ces différences provenait de la présence d'un plasmide présent chez la souche adaptée, mais absent chez la souche originale.

Plusieurs plasmides cataboliques ont été isolés de différentes souches et certains portent les gènes de dégradation des BP/BPC. Par contre, on ne rencontre dans la littérature aucun exemple d'adaptation de souche menant à la formation d'un plasmide catabolique. Ce projet visait donc principalement à vérifier l'hypothèse selon laquelle les différences observées entre la souche adaptée et la souche sauvage traduisent la présence des gènes cataboliques sur un plasmide chez la souche adaptée, probablement formé durant l'adaptation sur le BP.

D'autres part, nous avons utilisé les mutants incapables de croître sur le BP, qui avaient été obtenus de la souche adaptée, pour cibler certains gènes de la voie catabolique du BP et de la voie catabolique du BA qui lui est rattachée.

CHAPÎTRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE1.1. Importance environnementale des BPC

Durant environ cinquante ans, les BPC ont grandement été utilisés pour l'épandage de pesticides, comme lubrifiants, réfrigérants et isolants électriques (Fishbein, 1972). Leur popularité provenait de leur grande stabilité thermique, leur résistance aux acides, aux bases et aux produits corrosifs ainsi que leur faible réactivité chimique (Furukawa, 1982). La production mondiale de BPC, depuis 1930, a été estimée à 2 millions de tonnes et bien que leur fabrication ait cessé depuis la fin des années 70, les BPC demeurent, au même titre que le DDT, un des polluants les plus persistants de l'environnement (Ballschmiter, 1991).

Les BPC sont produits par une chlorination catalytique de la molécule de biphenyle (BP), résultant en un mélange de composés chlorés à divers degrés (Furukawa, 1982). Le degré de chlorination du mélange dépend de plusieurs facteurs, dont la température de la réaction et la quantité de catalyseur. Théoriquement, 209 congénères peuvent être obtenus, mais l'encombrement stérique causé par les atomes de chlore fait que seule la moitié d'entre eux peuvent être synthétisés. Les mélanges commerciaux contiennent environ cinquante congénères de BPC. Aux États-Unis, ces mélanges étaient vendus sous le nom Aroclor par la compagnie Monsanto. Les deux types principaux sont l'Aroclor 1254 et 1260 où les deux derniers chiffres représentent le pourcentage de chlore (en poids) retrouvé dans le mélange (Sawhney, 1986).

Les BPC, à cause de l'utilisation à l'échelle mondiale qui en a été faite, sont retrouvés pratiquement partout. Étant de nature lipophile, ils s'accumulent en grande concentration dans les sédiments mais leur solubilité (quoique faible) fait qu'on les retrouve également dans l'eau (Yong *et al*, 1977). Certaines espèces, tels les poissons (Westöo et Koren, 1970), les animaux marins (Jensen *et al*, 1969) et les oiseaux (Koeman *et al*, 1969) accumulent des BPC dans leurs tissus et organes, principalement dans les tissus adipeux.

Les congénères de BPC retrouvés le plus fréquemment sont ceux qui possèdent 5 atomes ou plus de chlore (Holmes *et al*, 1967). La persistance et le transport des BPC dans l'environnement dépendent de facteurs tels la volatilité, l'hydrophobicité, et la bioaccumulation alors que leur élimination dépend de la biodégradation et de la photodégradation (Furukawa, 1982). Depuis environ vingt ans, plusieurs travaux ont visé la compréhension des mécanismes de dégradation des BPC par les bactéries.

La biodégradation est influencée par différents facteurs: le nombre et la position des atomes de chlore, la volatilité, l'hydrosolubilité, la présence et la capacité des micro-organismes à dégrader les BPC, le pH, la température, la disponibilité de l'oxygène et de certains nutriments et l'adsorption sur certains matériaux (Furukawa, 1986). La biodégradation des BPC faiblement chlorés qui sont les premiers à être dégradés peut, dans certains cas, mener à la formation de métabolites dont la toxicité est accrue (Furukawa, 1982).

1.2. Dégradation microbienne des BPC

1.2.1. Introduction

Dans l'environnement, on retrouve plusieurs composés aromatiques pouvant être dégradés par les micro-organismes (Ghosal *et al*, 1985), dont le xylène et le toluène (Burlage *et al*, 1989) et les chlorophénols. Les BPC font également partie des composés fabriqués par l'homme qui sont sujets à la dégradation microbienne. Ce sont Ahmed et Focht (1972) qui ont été les premiers à isoler des micro-organismes ayant cette capacité. Les deux espèces d'*Achromobacter* qu'ils ont décrits provenaient d'effluents d'égouts et étaient en mesure d'utiliser le BP et le 4-chlorobiphényle (4-CB) comme seules sources de carbone.

Selon la souche bactérienne utilisée, le processus de dégradation a lieu en présence ou en absence d'oxygène. Des souches dégradant les BP/BPC en aérobiose ont été isolées par Ahmed et Focht (1972), Gibson *et al* (1973) Bédard *et al* (1986), Ahmad *et al* (1990) et par plusieurs auteurs. La dégradation microbienne des BPC en anaérobiose a également fait l'objet de recherches par Quensen *et al* (1988; 1990) et par Ye *et al* (1992). De façon générale, les micro-

organismes capables de dégrader les BPC en présence d'oxygène s'attaquent aux congénères les moins chlorés, alors que les congénères les plus fortement chlorés sont moins susceptibles à la biodégradation par ces micro-organismes (Abramowicz, 1990). Par contre, Quensen *et al* (1990) ont démontré que les micro-organismes dégradant les BPC en absence d'oxygène peuvent déchloriner les mélanges commerciaux d'Aroclor 1242, 1248, 1254 et 1260. Les atomes de chlores situés en position *meta* et *para* étaient retirés pour générer des métabolites à plus faible contenu en chlore et qui portaient les résidus de chlore en position *ortho* principalement. Ces métabolites devenaient donc disponibles pour l'attaque par les micro-organismes fonctionnant en aérobiose. Que le processus ait lieu en aérobiose ou en anaérobiose, la biodégradation dépend du nombre d'atomes de chlore portés par la molécule de BP (Furukawa *et al*, 1979; Quensen *et al*, 1990).

Pour effectuer la dégradation des BPC, les micro-organismes ont dû recourir à différents artifices puisque de telles molécules n'existaient pas dans la nature avant leur introduction par l'homme. Ils disposent principalement de deux moyens pour créer de nouvelles voies cataboliques. D'une part, les gènes existants et de nouveaux gènes peuvent être regroupés, comme ce fut le cas pour la dégradation du 3-chlorobenzoate (3-CBA) (Chatterjee *et al*, 1981). D'autre part, les micro-organismes peuvent utiliser des voies cataboliques pré-existantes dont les enzymes sont à large spectre d'activité. Par exemple, les micro-organismes utilisent la voie catabolique du BP pour la dégradation des BPC.

Quelques facteurs font varier la biodégradation des BPC. Par exemple, l'hydrophobicité des BPC les rend difficilement disponibles par les micro-organismes. Ainsi, la présence d'un surfactant peut améliorer la biodégradation de congénères portant 3 ou 4 atomes de chlore (Barriault et Sylvestre, 1993). Dans le processus de biodégradation, la première introduction d'oxygène sur la molécule fait appel à l'oxygénase du BP (BPO). Cet enzyme peut posséder une spécificité différente qui varie selon le patron de substitution de la molécule de BPC. À cause de la spécificité de cet enzyme, certaines souches vont dégrader préférentiellement les congénères portant les atomes de chlore en position *meta* ou *para*, alors que d'autres, telle *Pseudomonas* sp. LB400, préféreront les congénères portant les atomes de chlore en position *ortho* (Bédard *et al*, 1986).

La présence d'un co-substrat, comme le BP, peut également influencer la biodégradation de certains mélanges commerciaux de BPC (Barriault et Sylvestre, 1993) alors que la présence de certains métabolites peut lui nuire. Dans le cas de *Comamonas testosteroni* B-356, certains métabolites, comme le 3-CBA ou ses produits de dégradation peuvent inhiber certains enzymes de la voie de dégradation, interrompant ainsi la biodégradation (Sondossi *et al* 1992; Guilbeault *et al*, 1994). Puisque la présence de BA ou de CBA peut défavoriser la dégradation des BPC, il a été démontré que la co-inoculation d'un milieu contaminé par une souche capable de dégrader le BA/CBA pouvait améliorer le taux de biodégradation des BPC par les bactéries capables de les dégrader (Sylvestre *et al*, 1985; Hickey *et al*, 1993).

La position des atomes de chlore peut également affecter la dégradation des BPC. Furukawa *et al* (1979) ont fait ressortir quelques points concernant la biodégradation des BPC. D'abord, les taux de dégradation des congénères les plus chlorés sont les plus faibles. De plus, ils ont noté que la résistance à la biodégradation était élevée lorsque deux positions *ortho* sur le même cycle (2, 6) ou sur chacun des cycles (2, 2') étaient occupées par des atomes de chlore. Ils ont également remarqué que la biodégradation était plus efficace si tous les atomes de chlore étaient sur le même cycle que s'ils étaient répartis sur les deux. Le clivage du cycle se fait préférentiellement sur celui qui n'est pas substitué ou sur celui qui l'est le moins. Enfin, parmi les tétrachlorobiphényles et les pentachlorobiphényles, ce sont ceux portant des atomes de chlore en position 2 et 3 sur le même cycle qui sont les plus susceptibles d'être dégradés.

1.2.2. Voie catabolique oxidative

La voie catabolique des BPC est la même que celle empruntée pour la dégradation du BP. La dégradation complète (minéralisation) des BPC nécessite deux tronçons métaboliques. Dans le premier tronçon, les BPC sont transformés en CBA et ces derniers sont ensuite convertis en composés pouvant s'insérer dans le cycle de Krebs. La plupart des micro-organismes isolés qui dégradent les BPC ne possèdent que le premier tronçon, dit tronçon supérieur. Pour obtenir une minéralisation des BPC, l'utilisation de deux espèces microbiennes est nécessaire (Furukawa et Chakrabarty, 1982; Sylvestre *et al*, 1985). Il est tout de même possible de retrouver dans

l'environnement des micro-organismes effectuant la minéralisation des BPC sans recourir à une autre espèce (Pettigrew *et al*, 1990)

La voie catabolique responsable de la transformation des BP/BPC en BA/CBA fut d'abord proposée par Ahmed et Focht (1972). Les étapes enzymatiques de cette voie furent confirmées par les travaux de Furukawa *et al* (1979) et ceux de Massé *et al* (1989). Elles sont présentées dans la figure 1.

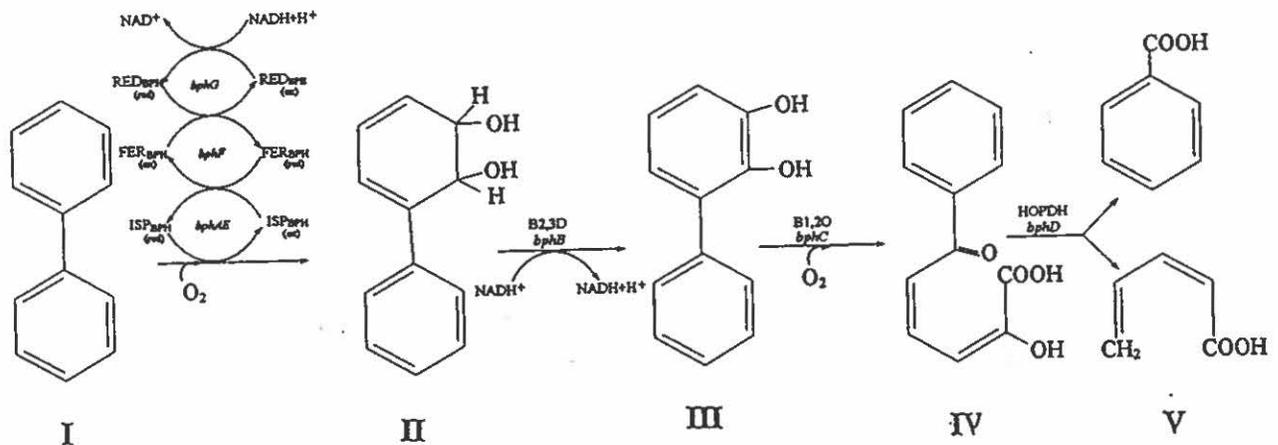


Figure 1: Voie catabolique majeure des BP/BPC en BA/CBA.

La transformation du BP/BPC en BA/CBA comporte quatre réactions successives. La première réaction produit un dérivé dihydrodiol (composé II) par introduction d'oxygène moléculaire en position 2 et 3. Dans le cas des BPC, cette hydroxylation se fait sur le cycle le moins chloré (ou sans chlore). Cette réaction est catalysée par la biphenyl dioxygénase (BPO). Cet enzyme, encodé par le gène *bphA*, est composé de quatre sous-unités. La seconde réaction transforme le dérivé dihydrodiol en 2,3-dihydroxybiphényle (DHB) (composé III) sous l'action d'une déshydrogénase (gène *bphB*). La réaction suivante donne comme produit l'acide 2-hydroxy-6-oxo-6-biphényle 2,4-hexadiénoïque suite à l'action d'une 2,3 dihydroxybiphényle dioxygénase (gène *bphC*). Ce composé (IV), souvent appelé "meta cleavage compound" (MCC), résulte de l'ouverture du cycle aromatique en position *meta* 1,2 et est caractérisé par une coloration jaune mesurable par spectrophotométrie. La dernière réaction, catalysée par une hydrolase (gène *bphD*), conduit à la formation de CBA et d'un acide aliphatique.

La BPO a été caractérisée chez deux souches: *Pseudomonas* sp. LB400 et *C. testosteroni* B-356. Cet enzyme est formé de trois composantes: une réductase, une ferrédoxine et une oxygénase du BP, cette dernière étant composée de deux sous-unités (α et β).

La réaction catalysée par la BPO peut provoquer une déshalogénéation du cycle aromatique en position *para*. Khan et Walia (1989) ont obtenu du CBA et du BA comme produits finals lorsqu'un clone de la souche *P. putida* OU83 portant les gènes *bph* était cultivé en présence de 4-chlorobiphényle (4CB). Ahmad *et al* (1991) sont arrivés à des résultats semblables avec des clones portant les gènes de *Comamonas-testosteroni* B-356 codant pour les deux premiers enzymes de la voie catabolique. Ils ont remarqué que les congénères portant les atomes de chlore en position *para* (4,4' et 2,4') étaient déhalogénés, donnant comme produit de dégradation des dérivés dihydroxylés avec et sans chlore. Haddock *et al* (1995) ont confirmé ces résultats en utilisant une préparation semi-purifiée de la BPO de *Pseudomonas* sp. LB400.

Malgré qu'en apparence les diverses voies cataboliques des BPC décrites à ce jour sont très semblables, certaines différences ont été notées particulièrement au niveau des patrons de réactivité des bactéries envers les BPC. Par exemple, contrairement à la plupart des bactéries capables de dégrader les BPC, *Pseudomonas* sp. LB400 dégradent préférentiellement les congénères qui portent des atomes de chlore en position *ortho*. Bien que plusieurs études portant sur la voie catabolique des BPC de la souche LB400 aient été effectuées à ce jour (Erickson et Mondello, 1992; Eltis *et al*, 1993; Haddock *et al*, 1995), nous ignorons encore les raisons qui expliquent la performance exceptionnelle de cette souche envers les BPC. D'autres bactéries comme *C. testosteroni* B-356 (Ahmad *et al*, 1990) ont également fait l'objet d'études approfondies de la voie catabolique des BPC. Malgré que ces souches soient moins performantes que la souche LB400, les connaissances tirées de ces études nous permettent de mieux comprendre les mécanismes d'évolution des voies cataboliques microbiennes ainsi que les mécanismes d'adaptation des bactéries à un nouveau substrat. Dans la section suivante, nous décrivons l'état de nos connaissances de la voie catabolique des BPC de la souche B-356 qui a fait l'objet de ce mémoire.

1.2.3. Voie catabolique des BPC de *C. testosteroni* B-356

La souche B-356 originale de *C. testosteroni* a été isolée par enrichissement sur le 4-CB, à partir d'un échantillon de boues activées (Ahmad *et al*, 1990). Les produits de dégradation du BP et du 4-CB sont respectivement le BA et le 4-CBA. Il a été démontré que le 4-CB pouvait induire la voie catabolique du BP/BPC puisque les cellules dégradent une plus grande quantité de 4-CB si elles avaient d'abord été incubées en présence de ce substrat (Ahmad *et al*, 1990). La voie catabolique des BPC et la carte génétique correspondante chez la souche *C. testosteroni* B-356 sont présentées dans la figure 2.

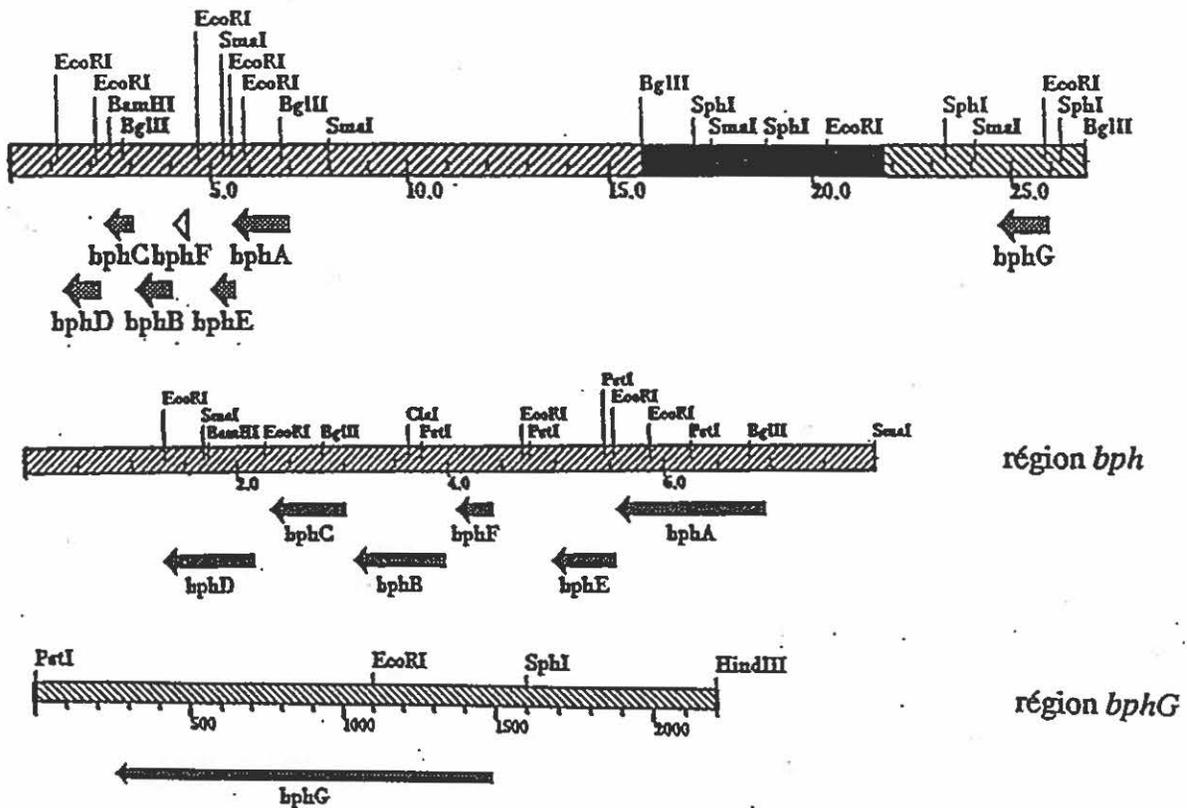
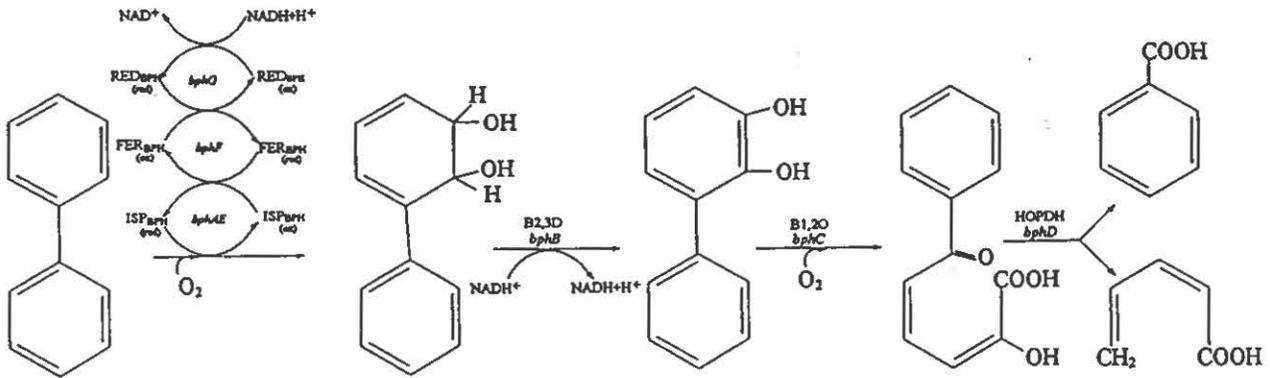


Figure 2: Voie catabolique du BP et des BPC chez la souche *C. testosteroni* B-356 et carte de restriction correspondante (tirée de Sylvestre *et al.*, 1996).

Afin de vérifier si un enrichissement soutenu en BP et/ou Aroclor pouvait mener à l'obtention d'une souche ayant la capacité de dégrader des congénères plus fortement chlorés, Guilbeault *et al* (1994) ont cultivé la souche originale en la transférant successivement dans un milieu frais contenant les substrats ci-hauts mentionnés, seuls ou en combinaison. Les transferts étaient effectués aux deux semaines. Ils ont remarqué que la souche adaptée possédait des caractéristiques quelques peu différentes de la souche originale. D'abord, la souche cultivée sur le BP+Aroclor offrait les meilleurs rendements de dégradation des différents congénères faiblement chlorés. Cette souche avait également une capacité accrue à dégrader les congénères contenant quatre atomes de chlore. Par contre, pour les congénères ayant cinq atomes de chlore ou plus, la dégradation n'était pas plus efficace, de telle sorte que ces congénères persistaient.

Dans cette même étude (Gilbeault *et al*, 1994), des mesures du taux de consommation d'oxygène ont été effectués pour comparer la dégradation de différents congénères de BPC par la souche originale et une souche adaptée par 19 transferts successifs sur BP utilisé comme seule source de carbone. Le tableau qui suit montre les résultats obtenus.

Tableau 1: Taux de consommation d'oxygène obtenus avec les souches de *C. testosteroni* B-356 (originale et adaptée)

Substrats utilisés pour la consommation d'oxygène	souches	
	B-356 adaptée	B-356 originale
2CB	66,7	57
3CB	85,7	52,4
4CB	71,4	48
2,2'DCBP	9,5	2,4
3,3'DCBP	14,3	4,8
4,4'DCBP	9,5	9,5

Les valeurs sont exprimées en nmoles d'oxygène consommées/min./ml par 1,5 ml d'une suspension cellulaire, ayant une D.O._{600nm} de 2 (tiré de Guilbeault *et al*, 1994).

Dans la plupart des cas, le taux de consommation d'oxygène s'est révélé être plus élevé pour la souche adaptée que pour la souche originale, démontrant que l'oxygénase du BP de la souche adaptée possédait une capacité accrue à attaquer certains congénères.

Les différences observées entre les deux souches ne se situent pas qu'au niveau biochimique. Une autre étude (Desnoyers, mémoire de maîtrise, 1991) suggère que le génome de la souche adaptée aurait subi des réarrangements puisqu'on peut y noter la présence d'un fragment d'ADN d'environ 20 kpb, absent chez la souche originale (figure 3) lorsque l'ADN total de la souche adaptée était digéré par l'enzyme de restriction *EcoR*I et révélé par la sonde *bphC*..

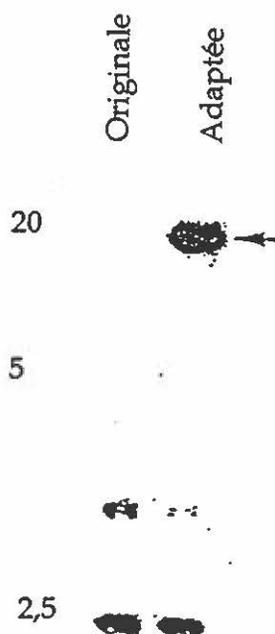


Figure 3: Hybridation de type Southern d'un gel contenant l'ADN des souches originale et adaptée de B-356 digéré avec l'enzyme de restriction *EcoR*I et hybridé avec une sonde d'ADN contenant une partie du gène *bphC* de la voie catabolique (tirée de Desnoyers, 1991)

1.3. Les plasmides de dégradation

1.3.1. Introduction

Les plasmides sont des entités d'ADN extrachromosomiques présents chez la plupart des espèces bactériennes (Wallace et Sayler, 1992). Les auteurs s'accordent généralement pour dire que les plasmides représentent 1 à 3% du matériel génétique, mais que dans certains cas, ce pourcentage peut s'élever jusqu'à 15% (Burlage *et al*, 1989), notamment lorsqu'on est en présence de plasmides de haut poids moléculaire, ou lorsqu'une cellule en contient plus d'un.

Pour persister chez les bactéries, les plasmides doivent apporter des avantages sélectifs. Les cellules sont rarement dans un milieu sans contrainte et c'est ainsi que les plasmides prennent toute leur importance du fait qu'ils confèrent aux cellules des avantages qui vont leur permettre de survivre dans un environnement plus hostile (Tomalsky *et al*, 1992). Conséquemment, les plasmides seront classés selon l'avantage qui les caractérise. Par exemple, les plasmides de résistance sont ceux qui permettent la résistance à des antibiotiques et les plasmides cataboliques sont ceux qui portent des gènes de dégradation de différents composés.

Les plasmides cataboliques ont un rôle important à jouer dans les sites contaminés. C'est d'ailleurs ce qui explique la corrélation qui existe entre la présence de plasmides cataboliques et la contamination des sites. Il semblerait que la taille des plasmides isolés de bactéries provenant de sites contaminés soit souvent plus importante que si la même bactérie avait été présente dans un site non contaminé, taille pouvant varier entre 40 et 400 kpb (Wallace et Sayler, 1992). Certaines études ont démontré que les bactéries d'un site contaminé contenaient un plus grand nombre d'un même plasmide, augmentant ainsi leur capacité de dégradation (Burlage *et al*, 1989).

1.3.2. La classification des plasmides

Devant le nombre croissant de plasmides isolés, il est devenu nécessaire de les classer. Un premier système de classification a été établi, reposant notamment sur les caractéristiques suivantes: la capacité de faire de la conjugaison, les fonctions spécialisées portées, le nombre de copies par cellule et la capacité de se propager dans une ou plusieurs espèces (Tomalsky, 1992).

Cependant, on s'est vite rendu compte que cette classification était inappropriée pour deux raisons principales: d'abord certains plasmides étaient non-conjugatifs et ensuite les gènes portant les fonctions spécialisées étaient mobiles. Il a donc fallu opter pour un autre système de classification.

Vers le début des années 1960, une propriété particulière aux plasmides est apparue: l'incompatibilité. Ce concept définit l'incapacité pour deux plasmides d'être maintenus dans une souche en absence d'agent de sélection. Cette impossibilité à coexister est la conséquence directe du partage d'éléments communs pour le contrôle de la réplication et le maintien dans la cellule (Heinemann, 1992). Si deux plasmides ont des régions identiques concernant ces deux éléments, ils ne vont pouvoir subsister dans une même cellule qu'en présence d'agents de sélection pour les deux plasmides. Indirectement, les groupes d'incompatibilité renseignent sur la proximité des plasmides puisque les plasmides d'un même groupe sont incompatibles et possèdent donc des régions identiques.

Un nouveau modèle de classification, basé sur l'homologie entre les régions impliquées dans la réplication, semble vouloir remplacer les groupes d'incompatibilité. Mais pour plusieurs plasmides la classification par incompatibilité ou par homologie donne les mêmes résultats (Heinemann, 1992). C'est pourquoi les chercheurs continuent d'attribuer des groupes d'incompatibilité aux plasmides isolés, d'autant plus que cette méthode est plus simple à utiliser.

Les plasmides de dégradation sont encore classés selon le groupe d'incompatibilité. À première vue, il ne semble pas y avoir de lien entre la classification dans un groupe et la structure du substrat dégradé. Ainsi, le plasmide pAC25, qui code pour des gènes spécifiant la dégradation du 3-chlorobenzoate (3-CBA) et le plasmide OCT qui spécifie la dégradation de l'octane font tous deux partie du même groupe (IncP2) (Wallace et Saylor, 1992). La majeure partie des plasmides de dégradation font partie du groupe P (pour *Pseudomonas*).

1.3.3. Les substrats ciblés par les plasmides cataboliques

Les substrats dégradés sont souvent des composés organiques hydrophobes et sont produits par deux sources: la nature et l'industrie. Les composés présents naturellement dans l'environnement sont dégradés par des enzymes encodés par des gènes plasmidiques, comme c'est le cas du camphre (plasmide CAM) et du naphthalène (plasmides Naph et NAH7). Ces composés sont présents depuis longtemps dans l'environnement et ainsi les micro-organismes ayant un plasmide catabolique possèdent un éventail d'enzymes impliqués dans leur dégradation (Wallace et Saylor, 1992). Plusieurs semblent croire que c'est d'ailleurs cette longue interaction entre les micro-organismes et les composés naturels qui favoriserait la sélection de souches capables de s'adapter rapidement pour dégrader les composés fabriqués par l'industrie et ayant des structures semblables (Burlage *et al.*, 1989).

Les BPC, produits par l'industrie, sont également susceptibles d'être la cible des plasmides de dégradation. On en compte d'ailleurs un certain nombre ayant cette capacité dont pSS50 (Hooper *et al.*, 1989), pKF1 (Furukawa et Chakrabarty, 1982) et pWW100 (Lloyd-Jones *et al.*, 1994). Parmi les plasmides qui dégradent les BPC, plusieurs ont été mis en évidence récemment. Mais certains plasmides, dégradant d'autres composés, ont été isolés depuis plus longtemps. C'est le cas du plasmide pWW0 qui dégrade le toluène (Williams et Murray, 1974). Il est le plus étudié des plasmides cataboliques, bien que d'autres plasmides de dégradation du toluène aient été mis en évidence par la suite.

La plupart des substrats peuvent être utilisés comme source de carbone car les produits finals peuvent s'insérer dans le cycle de Krebs ou sont généralement faciles à dégrader. Ainsi, pour le 3-CBA, on obtient du succinate comme produit final, alors que pour le naphthalène et le toluène, on obtient du pyruvate et de l'acétaldéhyde (Wallace et Saylor, 1992). La structure de la molécule à dégrader peut expliquer la variété de produits finals obtenus puisque l'attaque par les enzymes ne se fera pas de la même façon si la molécule est linéaire ou cyclique, si elle est substituée ou non. Également, la nature des enzymes impliqués dans la dégradation intervient dans la variété des produits obtenus.

1.3.4. La mobilité des plasmides cataboliques

Les plasmides cataboliques ont ceci de particulier que les recherches les concernant visent surtout la compréhension des voies cataboliques présentes. Par conséquent, certaines caractéristiques comme la réplication, la conjugaison et l'incompatibilité sont souvent reléguées au second plan.

Les plasmides peuvent être transmis d'une souche à une autre par conjugaison. La nouvelle souche hôte possède alors un avantage qu'elle n'avait pas auparavant et cet avantage pourrait être déterminant pour sa survie, par exemple si la souche était présente dans un milieu contaminé. La conjugaison favorise donc la dissémination des plasmides et des voies cataboliques à travers la population bactérienne (Heinemann, 1992).

Tous les plasmides cataboliques ne sont pas auto-transmissibles, mais la majorité le sont, ce qui explique que deux souches différentes puissent posséder le même plasmide, comme c'est le cas du plasmide pSS50, isolé chez *Alcaligenes* et chez *Acinetobacter* (Wallace et Sayler, 1992). Par contre, même si la majorité des plasmides cataboliques sont auto-transmissibles, certains ne peuvent se retrouver dans la même cellule simultanément parce qu'ils font partie du même groupe d'incompatibilité, à moins que le milieu n'exerce une pression de sélection sur les deux. L'incompatibilité s'oppose donc à la conjugaison en ce sens qu'elle peut limiter non pas la transmission d'un plasmide mais son maintien dans une souche qui en possède déjà un.

1.3.5. La localisation et l'organisation des gènes de dégradation

Les plasmides cataboliques peuvent posséder tous les gènes nécessaires à la dégradation du composé concerné, comme le plasmide NAH7 et le plasmide pWW0, ou bien ils peuvent ne posséder qu'une partie de ces gènes, l'autre partie étant localisée sur le chromosome de l'hôte bactérien (Wallace et Sayler, 1992).

Dans le cas du plasmide OCT, on observe une différence dans la localisation des gènes de dégradation. La transformation de l'octane en octanaldéhyde se fait en trois étapes et procède par l'entremise de trois gènes plasmidiques. La dégradation subséquente de l'octanaldéhyde se

poursuit à l'aide d'enzymes encodés par des gènes chromosomiques. Chez une souche de *Pseudomonas putida*, deux des trois gènes plasmidiques sont aussi retrouvés sur le chromosome. On assiste donc à un phénomène de duplication des gènes (Burlage *et al*, 1989).

Dans le cas du plasmide pWWO, les gènes de dégradation du toluène sont organisés en deux opérons distincts, le premier convertit les hydrocarbures en acide carboxylique (tronçon supérieur) et l'autre poursuit la dégradation pour générer des métabolites centraux (tronçon inférieur). Des études génétiques de cartographie avaient démontré que les deux opérons sont séparés physiquement (Burlage *et al*, 1989).

Le tronçon supérieur est constitué de cinq gènes couvrant une région d'environ 8 kpb. L'ordre des gènes a été déterminé par mutagenèse d'insertion et par sous-clonage. Par ce tronçon le toluène (ou tout autre substrat approprié) est converti en benzoate et ce, en trois étapes. La région promotrice et régulatrice a pu être localisée en amont des gènes de dégradation (à environ 1,7 kpb de *xylC*) (Assinder et Williams, 1990).

Le tronçon inférieur est quant à lui plus important, en termes de nombre de gènes qu'il regroupe. En effet, ce tronçon est formé de 13 gènes qui sont répartis sur plus de 10 kpb (Assinder et Williams, 1990). Ce tronçon est responsable de la dégradation du benzoate en pyruvate, acétaldéhyde et CO₂. Tout comme le tronçon supérieur, celui-ci a également son propre promoteur.

Puisqu'une des caractéristiques des opérons est d'être régulés, on doit considérer les gènes de régulation dans l'étude de la voie catabolique médiée par le plasmide pWWO. Ce plasmide possède deux gènes de régulation: *xylR* et *xylS* qui sont tous deux en aval du second opéron. Même s'il y a une proximité physique entre les deux gènes, qui ont chacun leur promoteur, la transcription de ces deux gènes se fait dans une direction opposée (Burlage *et al*, 1989).

1.3.6. Les gènes de dégradation portés par des transposons

Les gènes de dégradation portés sur des transposons sont un autre élément qui permet la dissémination d'une voie catabolique à travers une population bactérienne. La voie catabolique ayant la capacité de changer de support d'ADN, elle peut passer du plasmide au chromosome. Par exemple il a été observé que lorsque le plasmide pSS50, effectuant la dégradation du BP et du 4-CB, était transféré dans une souche réceptrice, cette dernière acquérait la capacité d'effectuer la dégradation des mêmes substrats. Par contre, si la souche réceptrice était "purgée" du plasmide pSS50, elle conservait son potentiel de dégradation car les gènes impliqués étaient portés par un transposon et celui-ci avait changé de support d'ADN (Springael *et al*, 1993).

Le fait que des gènes de dégradation puissent être portés par un transposon restreint l'importance de l'incompatibilité entre deux plasmides puisque si un des deux plasmides doit être éliminé d'une souche, cette dernière pourrait avoir conservé la voie catabolique si le transposon a changé de support et s'est intégré au chromosome ou à l'autre plasmide.

De fait, il semblerait que plusieurs gènes de dégradation soient portés par des transposons. Ainsi, les plasmides TOL (dégradation du toluène), pJP4, NAH7 et pSS50 ont leurs voies cataboliques respectives sur des transposons (Wallace et Saylor, 1992). Dans le cas du plasmide pSS50, le transfert du transposon portant les gènes cataboliques des BPC vers le chromosome permet à la bactérie porteuse de croître sur le BP même après l'élimination du plasmide (Wyndham *et al*, 1994).

1.3.7. Mécanismes de régulation des gènes cataboliques plasmidiques

La régulation est essentielle parce qu'elle permet à une cellule de s'ajuster rapidement aux changements de substrats dans le milieu et qu'elle évite de produire en grande quantité des enzymes non-spécifiques à la dégradation d'un composé particulier. L'étude de la régulation est importante dans la compréhension des voies cataboliques puisqu'elle permet de connaître les conditions à favoriser ou à éviter pour avoir une meilleure expression possible des gènes de dégradation. Voici quelques exemples de mécanismes de régulation de voies cataboliques.

Pour le plasmide pJP4 qui porte les gènes de dégradation du 2,4-dichlorophenoxyacétate (2,4-D), l'induction de l'expression des gènes se fait par le 2,4-D et le 3-CBA. La protéine TfdR (encodée par le plasmide pJP4) agirait à titre de répresseur puisque les souches *tfdR*⁻ expriment les enzymes de dégradation de façon constitutive en absence de l'inducteur (Wallace et Saylor, 1992).

Concernant le plasmide OCT, le mécanisme est moins bien connu. On sait que l'induction est spécifique. Ainsi, les n-alcanes C₆-C₁₀, qui sont considérés comme les substrats naturels de la monooxygénase de cette voie catabolique, induisent cet enzyme alors que les n-alcanes à plus longue chaîne (C₁₁-C₁₆) ne peuvent servir d'inducteurs, malgré le fait qu'ils puissent également être convertis en alcools primaires (Kok *et al*, 1992). Donc, les premiers enzymes sont inductibles par leur substrats alors que les suivants sont constitutifs. À l'encontre du plasmide pJP4, la répression pourrait être causée par un des composés de dégradation au lieu d'utiliser une protéine (Burlage *et al*, 1989).

En ce qui a trait au plasmide NAH7, l'induction se ferait par le salicylate qui est un métabolite du substrat à dégrader. Les premiers gènes de dégradation du naphthalène sont exprimés de façon constitutive à faible niveau. La production de salicylate active l'induction de ces gènes en se fixant à une protéine régulatrice NahR (Wallace et Saylor, 1992). Cette protéine irait stimuler l'expression des deux opérons.

La conversion du catéchol à partir du BA est suivie de l'ouverture du cycle aromatique, qui peut se faire en deux positions: en *ortho* ou en *meta*. Chaque voie aboutit à des produits finals différents. Le clivage en position *ortho* est catalysé par la catéchol 1,2 dioxygénase (C1,2O) qui fait partie de la voie du β-cétoadipate (Assinder et Williams, 1990). Cet enzyme est encodé par un gène chromosomique chez *Pseudomonas putida*. L'expression des enzymes de cette voie dépend de la conversion du catéchol par de faibles niveaux de la C1,2O en *cis,cis*-muconate, qui est son inducteur.

Le clivage en position *meta* est catalysé par la catéchol 2,3 dioxygénase (C2,3O). Le gène de la C2,3O est porté par le plasmide TOL qui spécifie la dégradation du toluène et est induit par le BA. Lorsque l'on fait croître des cellules de *P. putida* TOL⁺ sur le BA, la voie catabolique

subséquente au clivage en position *mé*ta est induite et les enzymes métabolisent rapidement le catéchol formé. Ainsi, il n'y a aucune formation de *cis,cis*-muconate et par conséquent pas d'induction de la voie du β -cétoadipate (voie du clivage en position *ortho*) (Assinder et Williams, 1990).

Des études physiologiques de mutants de régulation (Assinder et Williams, 1990) ont démontré les deux points suivants: l'expression des gènes des deux opérons pour la dégradation du toluène est sous le contrôle des substrats du tronçon supérieur, le toluène et le xylène, et de leurs métabolites alcools respectifs alors que le BA et le m-toluate n'induisent que le tronçon inférieur.

Un modèle pour la régulation du plasmide pWWO a été proposé par Assinder et Williams (1990). Il est complexe et fait intervenir plusieurs composés mais il peut être résumé en étapes successives:

- Le produit primaire de *xylR* est une protéine inactive qui retrouve son activité en présence des substrats du tronçon supérieur (toluène, xylène, etc.).
- XylR activée induit la transcription des gènes du tronçon supérieur et de *xylS*.
- La protéine XylS interagit avec le promoteur du tronçon inférieur pour stimuler la transcription de ses gènes.

L'expression de *xylS* est constitutive, mais à un niveau très faible. Son produit primaire est inactif, tout comme la protéine XylR. Il y aurait changement de conformation de la protéine XylS après liaison au substrat du tronçon inférieur, ce qui la rendrait active (Assinder et Williams, 1990). D'autres études tendent à démontrer que les substrats du tronçon supérieur peuvent induire le tronçon inférieur si *xylR* et *xylS* sont tous deux présents (Burlage *et al*, 1989). On croit que les produits du métabolisme du tronçon supérieur sont suffisants pour induire l'activation du tronçon inférieur par la protéine XylS. Selon un autre modèle plus raffiné (Assinder et Williams, 1990) la protéine XylR pourrait activer les deux tronçons en même temps. Le BA peut aussi servir d'agent inducteur sans l'apport d'aucune protéine régulatrice, suggérant qu'une régulation chromosomique pourrait être impliquée. Plusieurs facteurs intervenant dans la régulation et le contrôle des deux

tronçons métaboliques, il n'a pas été possible jusqu'à maintenant de dégager un modèle qui puisse faire l'unanimité.

1.3.8. Stabilité des plasmides de dégradation

La stabilité et le maintien dans une souche hôte dépend de quelques facteurs (Wallace et Saylor, 1992). D'abord, le plasmide doit posséder son propre système de réplication et ne doit pas dépendre des fonctions encodées par l'hôte. Deuxièmement, la cellule hôte ne doit pas posséder un système de recombinaison fonctionnel (elle doit être *rec⁻*). Ensuite, son système relatif à la restriction doit être déficient, la rendant incapable de reconnaître l'ADN étranger et de le dégrader. Finalement, la cellule hôte ne doit pas posséder de plasmide faisant partie du même groupe d'incompatibilité.

Il y a d'autres facteurs qui interviennent dans la stabilité du plasmide. Ainsi, certains plasmides seraient sensibles à la présence de benzoate comme substrat. Les souches contenant les plasmides TOL qui croissent sur le benzoate et le métabolisent via le tronçon inférieur perdent, après plusieurs générations, une partie de la voie catabolique du plasmide original (Assinder et Williams, 1990). On retrouve le même type de délétions avec le plasmide pWW100 qui perd sa capacité à utiliser le biphényle après croissance sur le benzoate. Pour ces souches, les substrats habituels du plasmide TOL ne conviennent plus car ils ne sont plus métabolisés. En effet, on retrouve souvent des délétions de l'ordre de 39 kpb qui concernent les gènes de dégradation. Selon le plasmide retrouvé dans la cellule, il y aura perte ou non des premières fonctions du tronçon supérieur durant la croissance sur le benzoate. Dans certains cas, le tronçon inférieur devient lui aussi inactif, seule la voie catabolique du β -cétoadipate est fonctionnelle et permet le métabolisme du benzoate puisque les gènes sont chromosomiques (Assinder et Williams, 1990). Ce qui est commun aux cellules ayant poussé sur le benzoate, c'est que la voie du β -cétoadipate est suffisante pour métaboliser tout le catéchol formé et que la voie de dégradation habituelle, qui est sur le plasmide TOL, n'est plus fonctionnelle.

On a tenté d'expliquer pourquoi des mutants de délétion et des souches ayant perdu le plasmide apparaissent durant la croissance sur le benzoate (Assinder et Williams, 1990). Les explications sont variées et ne font pas l'unanimité. Au départ, il avait été suggéré que ces

mutants apparaissaient spontanément à une faible fréquence mais qu'ils devenaient prédominant dans la population parce qu'ils croissaient plus rapidement sur le benzoate (Nakazawa et Yokotoa, 1973; Williams et Murray, 1974). Cette idée a été contestée par Clarke et Laverack (1984, cités par Assinder et Williams, 1990) à cause d'une série de résultats expérimentaux dont l'un concerne une souche ayant perdu son plasmide NAH après avoir utilisé le benzoate dont la concentration dans le milieu était juste sous la limite inhibitrice de croissance. Selon les auteurs, l'hypothèse selon laquelle les souches ayant perdu le plasmide changent de voie d'utilisation du benzoate ne peut être supportée parce que le benzoate n'est pas un intermédiaire dans le catabolisme du naphthalène et que la souche n'aurait pas dû perdre son plasmide.

Stephens et Dalton (1987, cités par Assinder et Williams, 1990) ont suggéré que certains acides organiques tels l'acétate, le butyrate et même le *m*-toluate pourraient influencer la perte ou la délétion des plasmides. Ils ont proposé que le benzoate, en association avec les acides organiques mentionnés perturbent la fonction de la membrane résultant en une mauvaise répartition des plasmides et la formation de délétions chez ces derniers. Dans une autre étude, ils ont proposé que le benzoate agissait de deux façons: premièrement, en inhibant le taux de croissance des cellules qui ont un plasmide et deuxièmement en induisant une instabilité dans la ségrégation du plasmide.

Williams *et al* (1988) ont démontré que le plasmide pWWO et sa souche hôte *P. putida* mt-2 ne sont pas sujets à l'influence d'acides organiques et que l'apparition de mutants spontanés serait suffisante pour expliquer le phénomène, comme cela avait d'abord été suggéré. Il semble donc que l'effet du benzoate sur les souches portant un plasmide TOL varie d'un plasmide à l'autre parce que les mécanismes de ségrégation du plasmide sont eux-mêmes différents.

CHAPÎTRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES2.1. Produits chimiques

Le BP, le BA, le catéchol et le 4-méthyl-catéchol provenaient de la compagnie Aldrich (Milwaukee, Wisconsin). Quant aux antibiotiques, ils provenaient de chez Sigma (Saint-Louis, Missouri). Les autres produits utilisés étaient de la meilleure qualité retrouvée sur le marché.

Les tampons employés ont été préparés suivant les instructions de Sambrook *et al* (1989). Les tampons TAE 1X (Tris-acétate 40 mM, EDTA 1 mM) et TBE 1X (Tris 45 mM, acide borique 45 mM, EDTA 2 mM) étaient tous deux utilisés pour les électrophorèses et la préparation des gels d'agarose. Le tampon SSC 20X (NaCl 3 M, citrate de sodium 0,3 mM) était employé pour les transferts d'ADN et le tampon TE (Tris 10 mM pH 8,0 et EDTA 1 mM) pour dissoudre l'ADN. Le tampon phosphate (0,1 M, pH 8,0) était utilisé pour le lavage des cellules.

Le 2,3-dihydroxybiphényle (DHB) a été obtenu par voie enzymatique en utilisant la souche de *P. putida* pDA261 selon le protocole décrit par Ahmad *et al* (1991). Le DHB fut purifié sur une colonne de 20 ml de fluorisil saturée avec l'acétate d'éthyle. L'échantillon était déposé sur la colonne et était élué avec 200 ml d'acétate d'éthyle. L'éluat recueilli contenait le DHB purifié qui a servi à nos travaux.

2.2. Souches bactériennes, plasmides et conditions de culture

La liste des souches bactériennes et des plasmides utilisés est présentée au tableau 2.

Tableau 2: Souches bactériennes et plasmides utilisés dans cette étude

SOUCHES BACTÉRIENNES ET PLASMIDES	GÉNOTYPE, PHÉNOTYPE ¹ OU MARQUEUR ²	RÉFÉRENCE
<i>Comamonas testosteroni</i>		
B-356 originale	BPC ⁺	Ahmad <i>et al</i> (1990)
B-356 adaptée	BPC ⁺	Sondossi <i>et al</i> (1995)
mutant M3	BPC ⁻	cette étude
mutant M5	BPC ⁻	cette étude
<i>Escherichia coli</i>		
DH1	<i>RecA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44</i>	Sambrook <i>et al</i> (1989)
NK5336	tc ^s	Kleckner <i>et al</i> (1991)
plasmides		
pNK2883	tc ^r	Kleckner <i>et al</i> (1991)
RP4	tc ^r , kn ^r , ap ^r	Thomas (1981)
pB-356 ad	BPC ⁺	cette étude

¹ BPC⁺: capacité à dégrader les BPC; BPC⁻: incapacité à dégrader les BPC; tc^s: sensible à la tétracycline. tc^r: résistance à la tétracycline;

² kn^r: résistance à la kanamycine; ap^r: résistance à l'ampicilline.

La souche *C. testosteroni* B-356 adaptée a été obtenue au terme de 21 transferts successifs sur le BP réalisés à partir de la souche *C. testosteroni* B-356 originale (Sondossi *et al*, 1995).

Le milieu H (Ausubel, 1994) a été utilisé pour la propagation des cellules sur milieu riche solide. Les cultures en milieu riche liquide ont été effectuées dans le bouillon Luria Bertani (LB) (Sambrook *et al*, 1989). Le milieu solide Simmon's Citrate (Difco, Détroit, Michigan) a servi à sélectionner *C. testosteroni* au détriment des souches de *E. coli* suite aux croisements génétiques. Le milieu minimal #30 (MM #30) (Sylvestre, 1980) a servi pour la croissance des cellules en milieu minimal, liquide ou solide. Les sources de carbone utilisées dans ce cas étaient le BP 0,1% (p/v), 0,05% (p/v) ou 0,01% (p/v), le BA 0,03% (p/v) ou le succinate 0,5% (p/v).

La kanamycine et la streptomycine ont été utilisées à des concentrations de 25 µg/ml et 30 µg/ml, respectivement pour le maintien des plasmides chez *E. coli*. L'ampicilline fut utilisée à des concentrations variables (entre 25 et 50 µg/ml de milieu de culture) selon le clone utilisé lors de la construction des sondes. La tétracycline à 25 µg/ml a servi à la sélection des transconjugants de *C. testosteroni*.

La croissance des souches de *E. coli* était effectuée à 37°C, et celle des souches de *C. testosteroni* était effectuées à 29°C. Lorsque les cultures étaient effectuées dans des flacons Erlenmeyer, le volume de milieu de culture était généralement établi à environ 20% du volume total du flacon pour assurer une oxygénation adéquate du milieu. Les cultures étaient agitées à 250 RPM. Les cellules étaient conservées à -70°C dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) 10% (v/v).

2.3. Essais de mutations des souches

2.3.1. Mutations aux radiations ultraviolettes

La souche originale de *C. testosteroni* B-356 fut cultivée dans du MM30 + succinate 0,5% (p/v) pendant 18 heures. Les cellules furent récupérées et suspendues dans une solution saline (NaCl 0,85%, p/v) pour obtenir une D.O.600nm de 1,0. De cette suspension, 20 ml ont été prélevés et soumis durant 60 secondes à une exposition aux radiations ultraviolettes à une

longueur d'onde de 234 nm, dont l'intensité était de $200 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, mesurée à l'aide d'un UV mètre. Les suspensions de cellules traitées ont été diluées et étalées sur le milieu MM30 + succinate 0,5% (p/v) de façon à obtenir un nombre significatif de colonies par boîte de milieu de culture après croissance à 29°C . Les colonies ayant perdu leur capacité à croître sur le BP ont été repérées en les répliquant par la technique du "réplica plating" sur des plaques de MM30 + BP et sur MM30 + succinate 0,5% (p/v). Les colonies incapables de croître sur le BP ont été identifiées par comparaison des répliquats.

2.3.2. Mutations par transposition

La mutagenèse par transposition a été réalisée avec la souche B-356 originale. Chacune des souches, *C. testosteroni* B-356, *E. coli* NK 5336/pNK 2883 et *E. coli* DH1/RP4, fut cultivée pendant 18 heures dans le milieu LB contenant les suppléments d'antibiotiques appropriés. Par la suite, un volume déterminé de chaque culture fut prélevé pour effectuer un mélange des trois souches. La suspension ainsi obtenue fut centrifugée et les cellules furent resuspendues dans un volume minimal de solution saline (NaCl 0,85%, p/v). Les cellules furent déposées sur un filtre stérile de $0,45 \mu\text{m}$ qui recouvrait la surface d'une plaque de milieu LB contenant $100 \mu\text{M}$ d'isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG). Les cellules étaient incubées à 29°C pendant toute une nuit afin de favoriser au maximum les échanges d'ADN plasmidique.

Les cellules étaient ensuite prélevées des filtres, diluées et étalées sur des plaques de milieu Simmon's Citrate contenant de la tétracycline et de la kanamycine, chacune à des concentrations de $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ de milieu de culture. Ces conditions de sélection favorisaient la croissance des cellules transconjugantes de *C. testosteroni* B-356 portant le plasmide pNK 2883. Les plaques étaient incubées à 29°C . Les colonies ayant perdu la capacité de croître sur le BP ont été repérées en utilisant la technique du replica plating telle que décrite à la section 2.3.1.

2.3.3. Adaptation de la souche originale de *C. testosteroni* B-356 à croître sur le BP

Les cellules de la souche B-356 originale provenant d'une culture congelée à -70°C ont servi à inoculer 50 ml de MM30 contenant du BP (0,5%, p/v). Cette culture fut incubée 48 heures à 29°C avec agitation (250 RPM). Après ce temps, la culture a été filtrée sur laine de verre pour enlever les particules de BP. Une partie du filtrat a servi à inoculer en duplicata 50 ml du même milieu et le reste fut lavé puis congelé à -70°C dans 10% de DMSO (v/v). La souche B-356 fut propagée de cette façon pendant 20 transferts où une partie de chaque culture était conservée par congélation.

2.3.4. Détermination de la fréquence de mutations spontanées des gènes *bph* de *C. testosteroni* B-356 adaptée

La souche B-356 adaptée fut cultivée dans 30 ml de MM30 contenant l'une ou l'autre des combinaisons de substrats suivants: le BP 0,1% (p/v), un mélange de BA 0,03% (p/v) et de BP 0,01% (p/v) ou le BA seul à 0,03% (p/v). Les cultures étaient incubées pendant 24 heures au terme desquelles chacune d'elle était transférée dans 10 cultures de 1 ml à raison de 150 μl de culture par ml du même milieu. Après une incubation de 24 heures, les petites cultures étaient diluées et étalées sur MM30 + succinate 0,5% (p/v). Comme dans les autres cas, les mutants négatifs pour la croissance sur le BP pouvaient être identifiés par réplica plating.

2.4. Manipulations d'ADN

2.4.1. Protocoles généraux

Au cours de ce travail, les conditions d'utilisation des enzymes de restriction pour la digestion de l'ADN étaient conformes aux recommandations des fabricants (Pharmacia, Baie d'Urfée, Canada ou Boehringer Mannheim, Laval, Canada).

Les électrophorèses ont été effectués à l'aide d'appareils horizontaux (BioRad Richmond, Californie), modèles "mini sub DNA cell", "Wide mini sub cell" ou "DNA sub cell" (selon la taille du gel). Les tampons de migration employés étaient le TBE 1X ou le TAE 1X selon la taille des fragments à séparer. En aucun cas, le voltage de la migration ne dépassait 12 Volts/cm.

La concentration en agarose était toujours de 0,7% (p/v). Par contre, selon la nécessité, l'agarose utilisé était standard (Sigma, St-Louis, Missouri) ou à faible point de fusion (J.T. Baker Chemicals, Phillipsburg, New Jersey).

La coloration du gel était effectuée dans une solution de bromure d'éthidium (BrEt) (0,1%, p/v) et la décoloration, dans l'eau distillée (Sambrook *et al*, 1989).

L'ADN génomique a été obtenu en utilisant la technique décrite par Sambrook *et al* (1989). L'extraction d'ADN plasmidique à partir de clones a été réalisée en faisant croître les cellules dans un milieu riche liquide contenant l'antibiotique approprié puis en utilisant la trousse Flexi-Prep (Pharmacia, Baie d'Urfée, Canada). Les méthodes de Casse *et al* (1979), d'Eckhardt (1978) et de Kado et Liu (1981) ont été utilisés pour rechercher le plasmide de *C. testosteroni* B-356 (adaptée et originale). L'isolement du plasmide de la souche B-356 adaptée a été effectuée par la méthode de Kado et Liu (1981). Dans ce cas, la préparation d'ADN était déposée sur un gel d'agarose (0,7 %, p/v) à faible point de fusion. Après la migration à 75 V, le gel était coloré au BrEt, décoloré dans l'eau et la bande correspondant au plasmide était prélevée à la noirceur puis élue selon le protocole établi par Hopwood *et al* (1985). Ce protocole prévoit une étape de purification par précipitation au phénol. Après l'élution, l'ADN était précipité et resuspendu dans le tampon TE. Le plasmide était conservé à -20° C.

2.4.2. Fabrication des sondes non radioactives

Toutes les sondes ont été préparées à partir de fragments d'ADN purifiés, isolés des plasmides appropriés. En utilisant les enzymes de restriction adéquats, on libérait le fragment d'intérêt, qui était purifié par électrophorèse sur gel d'agarose. La bande était extraite du gel à l'aide de la trousse Qiaex (Quiagen, Hilden, Allemagne). Le marquage des sondes était effectué

en suivant le protocole fourni par le fabricant de la trousse de marquage à la dioxygénine (Boehringer Mannheim, Laval, Canada) et elles étaient conservées à -20° C.

La sonde constituée du fragment de 4 kpb *Bgl*III, qui contient les gènes *bphA*, *E*, *F B et C* de la souche B-356 (Bergeron *et al*, 1994) a été obtenue à partir du plasmide pDA2 (Ahmad *et al*, 1990). Deux sondes portant le gène *bphG* furent fabriquées. La première était constituée d'un fragment d'ADN *Sph*I/*Sph*I de 2,3 kpb et la seconde était formée d'un fragment d'ADN *Eco*RI/*Hind*III de 1,1 kpb (Sylvestre *et al*, Gene, sous presse). Toutes deux contenaient une partie du gène *bphG*. La sonde utilisée pour repérer *bphA* était constituée d'un fragment de 1,3 kpb obtenue par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et qui contient *bphA* uniquement (Hurtubise *et al*, 1995).

2.4.3. Transfert d'ADN et hybridation de type Southern

L'ADN à hybrider fut mis à migrer sur gel d'agarose avec ou sans digestion préalable selon le cas. Après l'électrophorèse, le gel fut traité selon le protocole décrit par Sambrook *et al* (1989). Le montage fut assemblé en utilisant le tampon SSC 20X et une membrane de nylon chargée positivement (MSI, Westboro, Massachussets) préalablement imbibée de tampon SSC 2X. La fixation de l'ADN à la membrane s'est effectuée par exposition aux radiations ultraviolettes durant 3 minutes.

La préhybridation (saturation des sites avec l'agent bloquant) durait environ 6 heures alors que l'hybridation (agent bloquant + sonde non radioactive) duraient 18 heures. Les lavages ont été effectués en augmentant la stringence, la sonde était marquée la dioxygénine et l'exposition des filtres d'hybridation en présence de films Kodak était conforme aux recommandations de Boehringer Mannheim (Laval, Canada), producteur de la trousse d'hybridation.

2.4.4. Transformation de souches bactériennes

Les cellules à transformer étant du genre *Comamonas*, il a fallu utiliser un protocole de préparation et de transformation de cellules qui leur était adapté.

La préparation de cellules compétentes a donc été réalisée suivant un protocole qui avait été établi pour certaines souches de *Pseudomonas* (Sylvestre, communication personnelle). Les cellules qui ont été cultivées durant 18 heures dans le milieu LB servaient à inoculer du milieu LB frais (dilution 1:100) dans lequel elles croissaient jusqu'à une D.O._{600 nm} de 0,5-0,6. Elles étaient ensuite centrifugées et resuspendues dans une solution de CaCl₂ froid (0,1 M) (dans 1/10 du volume). Elles étaient déposées sur la glace durant 20 minutes au terme desquelles elles étaient à nouveau centrifugées et suspendues dans une solution froide contenant du CaCl₂ 0,1 M: glycérol (85:15). Des aliquotes de 50 µl furent prélevés et transférés dans des tubes Eppendorff froids et stériles. Les cellules furent congelées rapidement et conservées à -70° C. La transformation des cellules compétentes par le plasmide isolé de *C. testosteroni* B-356 a été réalisée en utilisant 5 µl d'ADN. Les cellules ont été gardés durant 1 hre sur la glace avant d'être soumises au choc thermique (42°C, 90 sec). Par la suite, les cellules ont reposé 5 minutes à 20°C. Afin de permettre la réplication du plasmide dans les cellules réceptrices, ces dernières ont été incubées dans le milieu LB durant quelques heures. Par la suite, les cellules ont été centrifugées et lavées avec du MM30 avant d'être incubées dans 20 ml de MM30 + BP 0,05% (p/v) pour quelques jours à 29°C sous agitation. Après ce délai, la culture fut filtrée sur laine de verre stérile, centrifugée, resuspendue dans 1 ml de solution saline (NaCl 0,85%, p/v) puis des aliquotes ont été étalées sur des plaques de MM30 auxquelles on a ajouté des cristaux de BP dans le couvercle. Après quelques jours d'incubation à 29°C, les recombinants portant les gènes de l'opéron *bph* étaient repérées par la présence d'un halo jaune, caractéristique due à la formation du métabolite de *meta*-clivage du BP. Ces colonies ont été purifiées par étalements successifs sur MM30 + BP puis elles ont été analysées pour confirmer la présence du plasmide par la méthode de Kado et Liu (1981).

2.5. Essais enzymatiques d'inductibilité

Les cellules ont été incubées dans le milieu LB avec ou sans BP (0,1%, p/v) pendant 18 heures. Les cultures étaient filtrées sur laine de verre, récupérées et lavées trois fois avec du tampon phosphate 0,1 M pH 8,0. La densité optique (600 nm) de la suspension était ajustée à 1,0 dans le même tampon.

La réaction était effectuée en utilisant 1,5 ml de cette suspension cellulaire à laquelle était ajouté l'un ou l'autre des substrats suivants: le catéchol, le 4-méthyl-catéchol ou le DHB. Après ajout et mélange du substrat (par inversion) les suspensions cellulaires étaient incubées à 20° C pendant 60 secondes puis centrifugées 30 secondes. Des échantillons de 1 ml du surnageant étaient prélevés et conservés sur la glace jusqu'à la lecture de la D.O. Celles-ci se faisaient à des longueurs d'ondes qui variaient selon le substrat utilisé. Pour le catéchol et le 4-méthyl-catéchol la longueur d'onde était de 380 nm, alors que pour le DHB, elle était de 434 nm. La quantité de produit de *meta*-clivage formé était calculé en utilisant les valeurs de coefficient d'extinction molaire déterminées à pH 8,0 par Eltis *et al* (1993).

CHAPÎTRE 3

RÉSULTATS3.1. Stabilité de la voie catabolique du BP3.1.1. Souche adaptée de *C. testosteroni* B-356.

Les deux souches de *C. testosteroni* B-356 (originale et adaptée) peuvent procéder à la dégradation du BP. Cependant, des résultats préliminaires à cette étude suggèrent des différences entre les deux souches. D'abord, la souche adaptée possède une capacité accrue à dégrader les BPC, comme l'ont démontré des tests de consommation d'oxygène effectués avec différents congénères de BPC (Sondossi *et al*, 1995). Ensuite, des études menées sur l'ADN total des deux souches ont laissé entrevoir la possibilité de réarrangements dans le génome de la souche adaptée puisqu'une bande d'ADN de haut poids moléculaire résistante à la digestion par l'enzyme de restriction *EcoRI* a été détectée par électrophorèse sur gel d'agarose (Desnoyers, mémoire de maîtrise, 1991). Dans une recherche précédente, les taux de mutation aux radiations ultraviolettes ont atteint 1% des cellules exposées de la souche B-356 adaptée pour les mutations provoquées dans la voie catabolique du BP (Sylvestre, communication personnelle). Ces résultats laissent croire que chez la souche adaptée, les gènes spécifiant la dégradation des BPC seraient localisés dans une région instable du génome.

Considérant que la souche adaptée était sensible à la mutagenèse aux radiations ultraviolettes, nous nous sommes questionnés sur la stabilité de ses gènes qui sont impliqués dans la voie catabolique du BP, à savoir si cette susceptibilité était causée par le type de mutagenèse employé ou si les gènes de l'opéron *bph* étaient localisés dans une région du génome naturellement instable. Pour vérifier la stabilité des gènes *bph*, nous avons tenté de déterminer la fréquence de mutations spontanées conduisant à l'incapacité de dégrader le BP dans les cultures ayant cru sur le BP, le BA ou sur un mélange des deux. Malgré le fait que la souche B-356 ait été cultivée dans un milieu hautement sélectif (MM30 + BP), au moins un mutant spontané incapable de croître sur le BP a été retrouvé pour les 9 000 colonies analysées. Par contre, dans le cas des cellules ayant cru sur le BA et le BA + BP nous avons analysé 3850 et 2298 colonies de chacun des milieux et aucun mutant incapable de croître sur le BP n'a été détecté. Ces résultats suggèrent

que malgré l'instabilité des gènes cataboliques des BPC, la croissance sur le BA, contrairement à ce qui avait été rapporté pour d'autres voies cataboliques plasmidiques (Assinder et Williams, 1990; Lloyd-Jones, 1994) ne semble pas favoriser le développement de mutants spontanés pour la voie du BP.

3.1.2. Souche originale de *C. testosteroni* B-356.

Dans le but de vérifier la stabilité de la voie catabolique du BP et d'en obtenir des mutants, nous avons procédé à des essais de mutagenèse chez la souche originale. Deux types d'agents mutagènes ont été utilisés: les radiations ultraviolettes et les transposons. Dans le premier cas, un peu plus de 3 500 colonies ont été testées pour leur incapacité à croître sur le BP après exposition aux radiations ultraviolettes. De ce nombre, aucun mutant négatif ne fut détecté. Il est particulièrement surprenant de constater que contrairement à la souche B-356 adaptée, la souche originale ne présente pas un taux de mutation élevé lorsqu'elle est soumise à l'action de radiations ultraviolettes. Devant cette difficulté à obtenir des mutants, nous nous sommes tournés vers la mutagenèse par transposition. Cette méthode consistait à mobiliser le plasmide pNK2883 (Kleckner *et al*, 1991) de *E. coli* vers la souche B-356 originale. Le plasmide portait un gène de résistance à la tétracycline sur le transposon *Tn10*. Ce dernier devait se déplacer du plasmide pNK2883 vers le génome de la souche hôte. Les cellules de *C. testosteroni* ayant reçu le plasmide pendant le croisement étaient sélectionnées sur le milieu Simmon's Citrate contenant la tétracycline pour forcer l'insertion du transposon dans le génome. Un peu plus de 10 000 recombinants résistants à la tétracycline ont été analysés afin de déterminer lesquels avaient perdu leur capacité à croître sur le BP. Aucune de ces colonies ne s'est révélée incapable de croître sur le BP. Il semblerait donc que la région de l'ADN responsable de la dégradation des BPC chez la souche B-356 originale soit peu susceptible de subir des modifications par les méthodes de mutagenèse employées dans cette étude.

3.2. Mise en évidence et caractérisation d'un plasmide de dégradation chez la souche B-356 adaptée

3.2.1. Mise en évidence d'un plasmide chez la souche adaptée

Les résultats préliminaires concernant la capacité accrue de la souche adaptée à dégrader les BPC, les réarrangements possibles dans son génome et la fréquence élevée de mutations aux radiations ultraviolettes laissaient supposer que le transfert des gènes cataboliques des BPC du génome vers un plasmide aurait été la cause de ces nouvelles caractéristiques. Il s'avérait donc pertinent de vérifier cette hypothèse. Dans un premier temps, nous avons vérifié la présence d'un plasmide chez la souche adaptée. Cette vérification a été effectuée à l'aide de trois techniques: celle de Casse *et al* (1979), d'Eckhardt (1978) et celle de Kado et Liu (1981).

Ces trois techniques nous ont permis de constater que la souche originale ne portait aucun plasmide alors qu'on pouvait en détecter un chez la souche adaptée. Elles ont tour à tour permis de confirmer que la bande que nous observions était bien un plasmide et non un artefact. La figure 4 représente la mise en évidence du plasmide chez la souche adaptée en utilisant la méthode de Kado et Liu (1981).

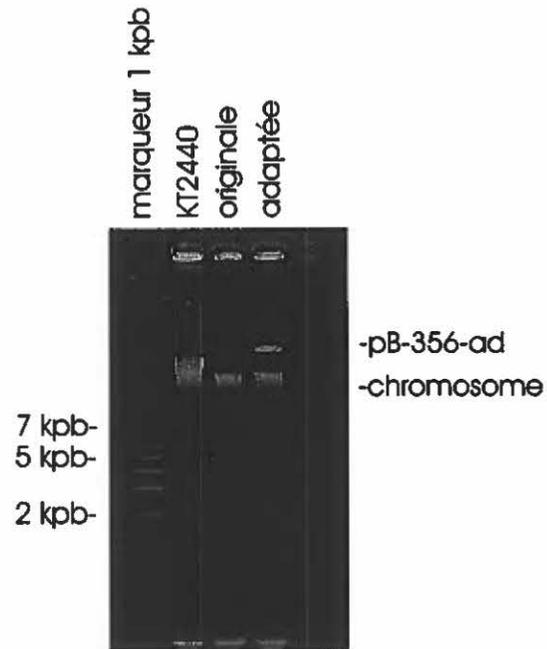


Figure 4: Gel d'agarose 0,7% (p/v) (dans le tampon TAE) utilisé pour la migration de préparations d'ADN des souches originale et adaptée de *C. testosteroni* B-356, tel que décrit par Kado et Liu (1981).

La bande du bas représente l'ADN linéaire (soit le chromosome et les molécules de plasmides abîmés, donc linéarisés) alors que celle du haut correspond au plasmide demeuré intact. On peut noter que seule la souche adaptée possède une bande correspondant à de l'ADN plasmidique et que cette dernière est de haut poids moléculaire. Des résultats obtenus (mais non présentés) indiquent que cette bande serait supérieure à 20 kpb. Ce nouveau plasmide a été désigné pB-356-ad.

3.2.2. Vérification de la présence des gènes cataboliques *bph* sur le plasmide pB-356-ad

Puisque la souche adaptée perdait facilement sa capacité à croître sur le BP lorsqu'elle était soumise aux radiations ultraviolettes, il était probable que certains gènes *bph* soient localisés sur le plasmide de la souche adaptée. Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons procédé à des hybridations en utilisant différentes sondes. D'abord, une sonde qui contient un fragment *Bgl*III de 4 kpb, comprenant les gènes *bphA*, *E*, *F*, *B* et *C*, fut utilisée pour déterminer si l'un de ces gènes était présent sur le plasmide. Le résultat de cette hybridation est présenté à la figure 5.

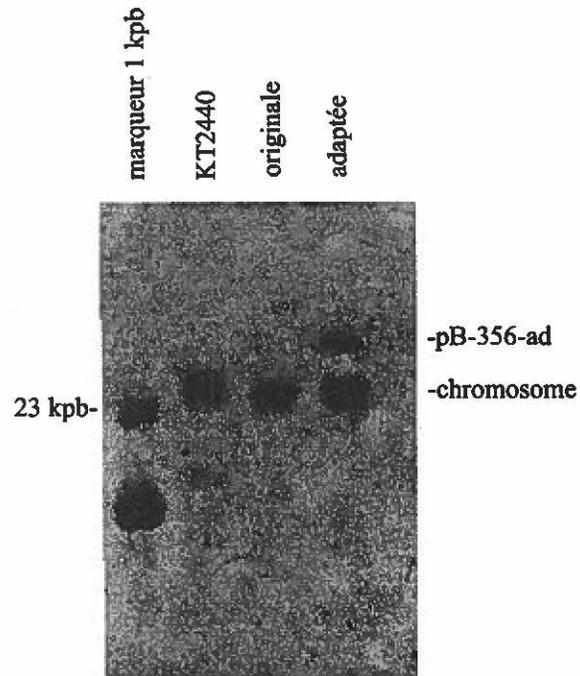


Figure 5: Hybridation de type Southern d'un gel contenant des préparations d'ADN de la souche originale et adaptée de *C. testosteroni* B-356 obtenues par la technique de Kado et Liu (1981). L'hybridation a été faite avec la sonde non radioactive constituée d'un fragment de 4 kpb *Bgl*II tel que décrit dans le texte.

Ces résultats confirment la présence d'au moins certains gènes du fragment de 4 kpb sur le plasmide de la souche adaptée. L'ADN linéaire (chromosomique et plasmidique abîmé) répond également lors de l'hybridation avec cette sonde.

Afin de vérifier si le gène *bphA* était présent sur le plasmide, nous avons isolé le plasmide de la souche adaptée à partir d'un gel d'agarose (technique de Kado et Liu, 1981), puis nous l'avons digéré, transféré par Southern et hybridé avec une sonde marquée non radioactivement qui portait uniquement le gène *bphA*. Le résultat de cette hybridation est présenté à la figure 6.

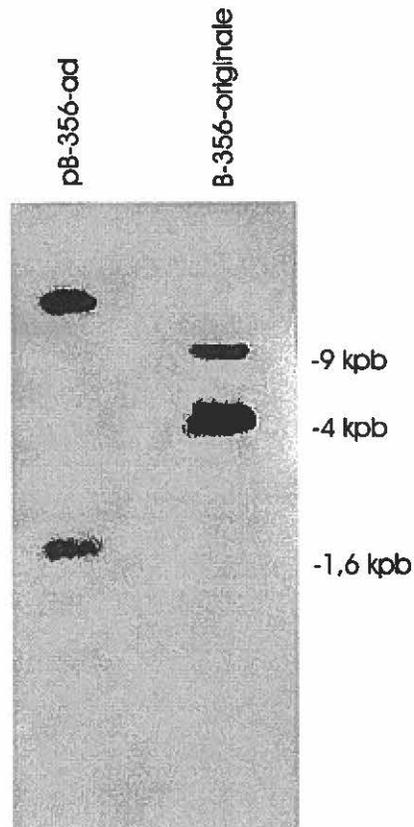


Figure 6: Hybridation de type Southern d'un gel contenant le plasmide de la souche adaptée et l'ADN total de la souche originale digérés avec l'enzyme de restriction *Bgl*III durant 18 heures. La sonde était constituée d'un fragment de 1,3 kpb contenant la totalité du gène *bphA*.

Ce résultat indique que le gène *bphA* est présent sur le plasmide de la souche adaptée. Chez la souche originale, on obtient deux bandes respectives de 9 kpb et 4 kpb qui répondent positivement à l'hybridation car il y a un site de restriction pour l'enzyme *BglIII* dans le gène *bphA* (figure 2, page 10). Ces deux bandes ne se retrouvent pas chez la souche adaptée. On détecte plutôt une bande (faible) de 1.6 kpb et une bande intense de haut poids moléculaire qui pourrait correspondre à du plasmide non-digéré. L'absence de bandes à 9 kpb et à 4 kpb et la présence d'une bande à 1,6 kpb chez la souche adaptée démontre que la région *bph* a subi des réarrangements chez cette souche. Malheureusement, malgré tous les essais de digestion qui ont été réalisés, il semblerait que le plasmide soit difficilement digérable, ce qui nous empêche de le caractériser rapidement quant aux gènes de dégradation qu'il porte. La difficulté de digérer le plasmide nous limite également dans la détermination de sa taille par des techniques traditionnelles. Afin d'être certains que la préparation du plasmide pB-356-ad ne contenait pas d'agents inhibiteurs pour la digestion, nous avons mélangé une quantité déterminée d'ADN total de la souche adaptée au plasmide pB-356-ad puis procédé à la digestion. Le patron de digestion de l'ADN de la souche adaptée était identique en présence ou en absence du plasmide pB-356-ad. De cette façon, nous pouvons affirmer que la préparation ne contenait pas de contaminants qui auraient pu empêcher une digestion efficace de l'ADN.

Nous avons également vérifié la capacité du plasmide de la souche adaptée à hybrider avec une sonde constituée d'une partie du gène *bphG*. Ce gène, qui est essentiel à une dégradation efficace du BP, est localisé en amont de l'opéron *bph* à environ 25 kpb de *bphA* (figure 2, page 10). Le résultat de cette hybridation est présenté à la figure 7.

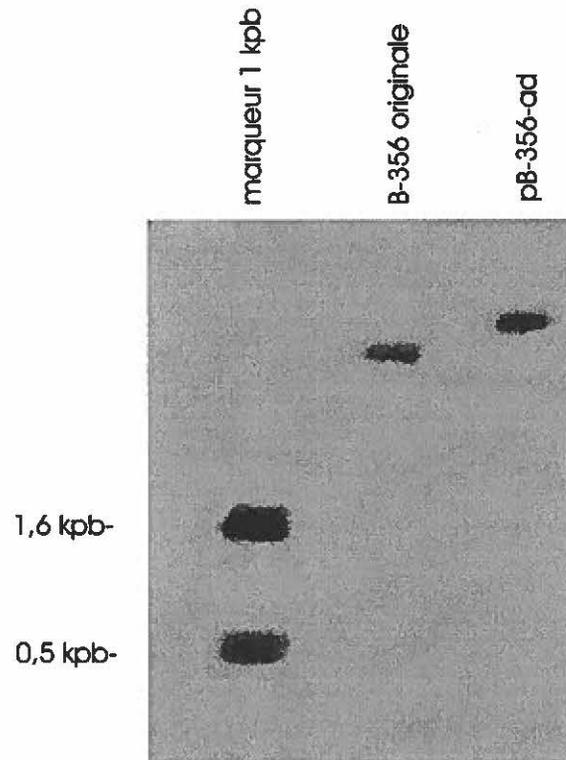


Figure 7: Hybridation de type Southern d'un gel contenant le plasmide pB-356-ad et l'ADN total de la souche originale digérés avec l'enzyme de restriction *Bg*III durant 18 heures. L'hybridation a été effectuée avec une sonde d'ADN de 1,1 kpb *Eco*R1/*Hind*III, contenant la totalité du gène *bphG*.

Le fait que la bande plasmidique hybride avec cette sonde démontre que le gène *bphG* est aussi présent sur le plasmide. Nous savons maintenant que deux sondes portant les gènes *bphA* et *bphG*, ainsi qu'une sonde de 4 kpb *BglIII* portant les gènes *bphA*, *E*, *F*, *B* et *C* hybrident avec le plasmide. De plus, du fait que l'ADN total des mutants de délétion M1, M2 et M5, décrits à la section 3.2.4 n'hybride pas avec cette sonde de 4 kpb *BglIII* (résultats non-présentés), il est fort probable que malgré les ré-arrangements des gènes *bph* chez la souche adaptée, ceux-ci soient associés à une même région du plasmide pB-356-ad.

3.2.3. Adaptation de la souche originale sur le BP.

La détection d'un plasmide portant les gènes de l'opéron *bph* chez la souche adaptée est inusitée puisqu'aucun plasmide n'a pu être détecté chez la souche originale de *C. testosteroni* B-356. Il semblerait donc que chez la souche adaptée nous assistions à un phénomène d'excision d'ADN pour former un plasmide à partir du génome ou qu'il existe dans la population de la souche originale un plasmide en très faible nombre de copies qui s'amplifie durant l'adaptation. Comme la souche B-356 adaptée a été obtenue par transferts successifs de la souche originale sur un milieu minimal contenant du BP comme seule source de carbone, nous avons voulu reproduire le processus d'adaptation pour vérifier si un plasmide apparaissait dans la population.

Au total, 21 transferts successifs (faits aux deux jours) ont été effectués à partir de la souche originale. Les cellules issues de chacun des transferts ont été testées par la technique de Kado et Liu (1981) afin de vérifier la présence d'un plasmide nouvellement formé. Malheureusement, au terme des 21 transferts, nous n'avions détecté encore aucun plasmide. Il semblerait donc que l'occurrence de formation de ce plasmide soit malgré tout un phénomène rare. Cette approche ne nous a pas permis de caractériser davantage le plasmide.

3.2.4. Caractérisation de mutants de délétion.

Antérieurement à cette étude, des mutants de la souche adaptée avaient été obtenus par l'action des radiations ultraviolettes. Ces mutants étant incapables de croître sur le BP, des hybridations avaient été effectuées avec une sonde d'ADN portant les gènes *bphAEFBC* et démontraient qu'ils étaient des mutants de délétion ayant perdu l'ensemble de ces gènes. Ces dernières concernaient les gènes de dégradation du BP, qui dans la majeure partie des cas, étaient

absents chez les mutants. Nous avons donc voulu utiliser ces mutants pour tenter de caractériser davantage le plasmide de la souche adaptée. Dans un premier temps, nous avons vérifié si ces mutants avaient perdu le plasmide. La technique de Kado et Liu (1981) a permis de démontrer qu'une fraction seulement des mutants l'avaient perdu. Les figures 8a) et 8b) montrent les résultats obtenus pour 4 de ces mutants.

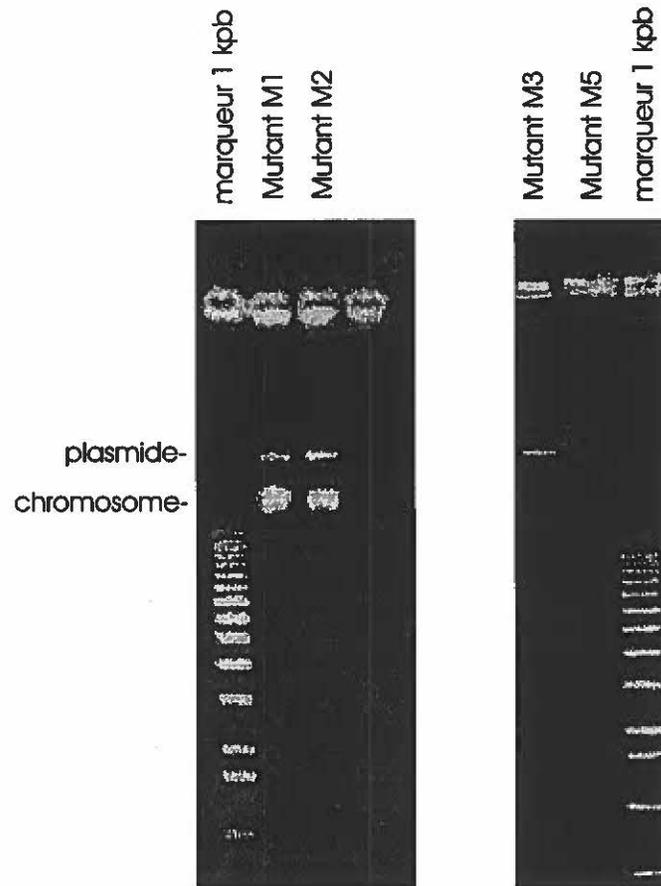


Figure 8: Gel d'agarose 0,7% (p/v) (dans le tampon TAE) utilisé pour la migration de préparations d'ADN selon le protocole de Kado et Liu (1981) pour vérifier la présence de plasmides chez les mutants M1 et M2 (figure 8a) et les mutants M3 et M5 (figure 8b).

Seul le mutant M5 a perdu le plasmide. L'absence pour le mutant M5 d'une bande correspondant à de l'ADN plasmidique sur les gels d'agarose a été confirmée à cinq reprises au cours de l'exécution de ces travaux. Les autres mutants ont conservés un plasmide malgré qu'ils aient perdu par délétion l'ensemble des gènes *bph*. Le mutant M3 montrait toutefois une certaine particularité puisque au cours d'expériences préliminaires nous avons constaté qu'il répondait positivement aux hybridations faites avec le gène *bphC*, qu'il avait conservé le plasmide et qu'il pouvait convertir le BP en BA à très faible rendement. Son incapacité partielle à croître sur le BP pouvait donc provenir d'une délétion dans la partie régulatrice de la voie catabolique ou dans le gène *bphG* qui est situé en amont de la région *bph*. Nous avons donc construit une sonde de 2,3 kpb (*SphI/SphI*) comprenant une partie du gène *bphG* pour vérifier la présence de ce gène chez le mutant M3 (figure 2, page 10). La figure 9 montre le résultat de l'hybridation.

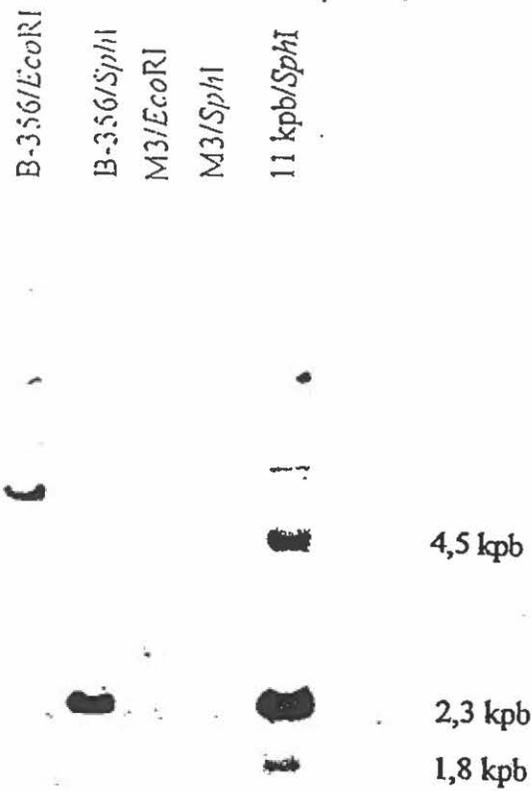


Figure 9: Hybridation de type Southern d'un gel contenant l'ADN total du mutant M3 et de la souche originale de *C. testosteroni* B-356 digérés avec deux enzymes de restriction, *EcoRI* et *SphI* et hybridés avec une sonde de 2,3 kpb contenant une partie du gène *bphG*.

Le patron d'hybridation montre que le gène *bphG* hybride avec le témoin positif constitué d'un fragment d'ADN de 11 kpb/*SphI* portant le gène *bphG*, mais que ce fragment n'est plus présent chez le mutant M3 puisque l'on obtient une bande de 2,3 kpb avec l'ADN de la souche originale pour la digestion faite avec *SphI* qui n'est pas présente dans l'ADN du mutant M3. Puisque le gène *bphG* est situé à 25 kpb en amont de *bphA* (figure 2, page 10), nous voulions également vérifier si la région plus en amont des gènes *bph* avait été déléetée. Pour ce faire, nous avons construit une sonde de 1,2 kpb (*SmaI/PstI*). Ce fragment débute dans le gène *bphA* et se termine à environ 1 kpb devant le début du gène *bphA* (figure 2, page 10). La figure qui suit montre le résultat obtenu suite à l'hybridation.

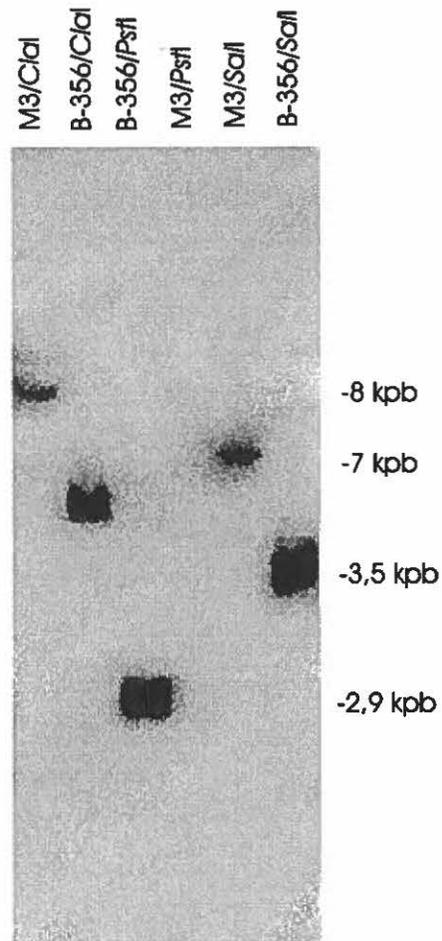


Figure 10: Hybridation de type Southern d'un gel contenant l'ADN total du mutant M3 et de la souche originale de *C. testosteroni* B-356 digérés avec différents enzymes de restriction et hybridés avec une sonde de 1,2 kpb constituant le fragment directement en amont de la région *bph*.

Pour la souche originale, nous avons obtenu la réponse positive attendue avec la sonde de 1,2 kpb qui hybridait avec des fragments de 2,9 kpb, 3,5 kpb et 5 kpb générés par les enzymes de restriction *Pst*I, *Sal*I et *Cla*I respectivement. Par contre, dans le cas du mutant M3, des fragments de 7 et 8 kpb hybridant avec la sonde de 1,2 kpb ont été générés avec les enzymes de restriction *Cla*I et *Sal*I respectivement. Ainsi, la taille des fragments générés et l'intensité des bandes, différentes de celles retrouvées chez la souche originale, indiquent que seule une partie du fragment de 1,2 kpb est toujours présente chez ce mutant (figure 2, page 10). Concernant la digestion de l'ADN du mutant M3 avec l'enzyme de restriction *Pst*I, nous n'avons pas pu visualiser une bande car celle qui était attendue était de trop petite taille pour être détectable.

3.2.5. Transformation du mutant M5 avec le plasmide de la souche adaptée.

Les résultats d'hybridations effectuées avec l'ADN total et plasmidique de la souche B-356 adaptée et des mutants de délétion avec différentes sondes démontraient que les gènes de dégradation du BP étaient très probablement tous présents sur le plasmide pB-356-ad. Afin de confirmer cette hypothèse, nous devions introduire le plasmide dans une souche dont nous savions qu'elle ne pouvait croître sur le BP. Notre choix s'est porté sur le mutant M5 puisqu'ayant perdu le plasmide, il ne pouvait être cultivé sur le BP. Pour la préparation et la transformation des cellules, nous avons utilisé des méthodes adaptées aux souches de *Pseudomonas* (voir section 2.4.5). Les recombinants ayant reçu le plasmide ont été sélectionnés sur MM30 contenant du BP comme seule source de carbone et leur purification par transferts successifs sur un milieu solide contenant du BP. Quatre de ces recombinants ont été analysés par la technique de Kado et Liu (1981) pour vérifier la présence de plasmides. La figure 11 montre les résultats obtenus.

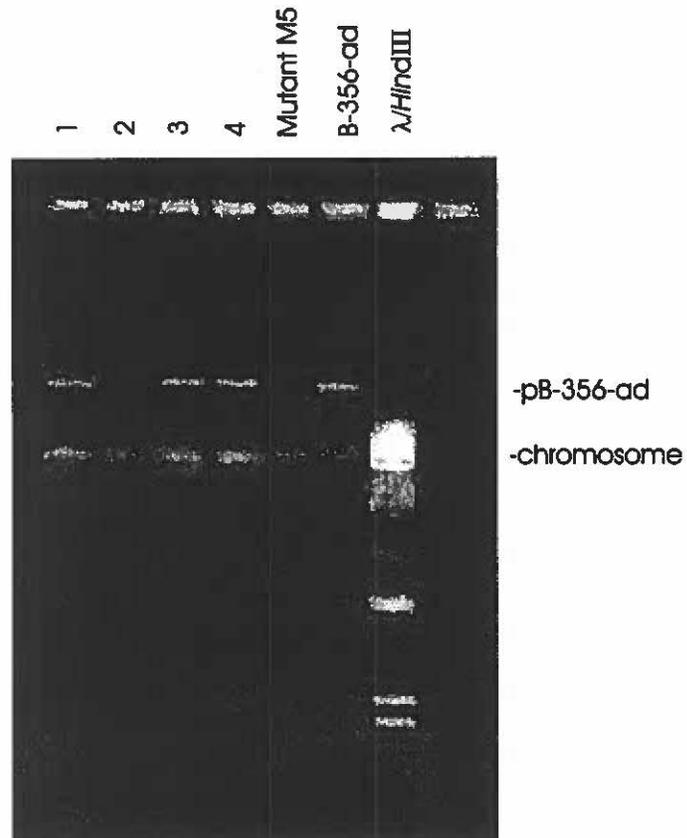


Figure 11: Gel d'agarose 0,7% (p/v) (dans le tampon TAE), utilisé pour la migration de préparations d'ADN des quatre transformants de M5 tel que décrit par Kado et Liu (1981).

Nous avons constaté que dans trois des quatre transformants, un plasmide qui co-migrerait avec le plasmide B-356-ad a été observé. La présence du plasmide confère donc au mutant M5 la capacité de croître à nouveau sur le BP. Combinée à l'expérience d'hybridation avec les gènes *bph*, cette expérience confirme que le plasmide code pour une bonne partie, sinon la totalité, de la voie catabolique du BP

3.3. Voie catabolique du BA

La voie catabolique du BP comporte deux tronçons. Un tronçon supérieur qui sert à convertir le BP en BA et un tronçon inférieur qui minéralise le BA. La séquence en acides nucléiques des gènes *bph* de la souche *C. testosteroni* B-356 adaptée indique la présence de gènes de l'oxygénase du BA entre la région codant pour les gènes *bphA*, *E*, *F*, *B*, *C* et le gène *bphG* (figure 2, page 10). Nous avons voulu vérifier si le gène de l'oxygénase du catéchol (C2,3O), qui fait également partie du tronçon inférieur, s'y retrouvait. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé les mutants M3 et M5.

Voulant vérifier si le mutant M3 avait subi une délétion du gène spécifiant l'oxygénase du catéchol, nous avons mesuré la formation de composé de *meta*-clivage produit par des cellules cultivées en absence et en présence de BP à partir des substrats spécifiques des deux *metapyrocatechases* du tronçon supérieur, la 2,3-dihydroxy 1,2 dioxygénase (B1,2O) et du tronçon inférieur l'oxygénase du catéchol (C2,3O). Des travaux antérieurs (Hein, mémoire de maîtrise, 1996) avaient démontré que la B1,2O et la C2,3O pouvaient toutes deux transformer le DHB et le catéchol mais que seule la C2,3O était capable de transformer le 4-méthylcatéchol en composé de *meta*-clivage.

Dans cette expérience, chaque souche cultivée sur le milieu LB avec ou sans BP, était incubée durant 1 minute, à la température de la pièce, en présence de chacun des substrats suivants: le DHB, le 4-méthyl catéchol et le catéchol. Les mesures de densité optique reflétant la production du composé de *meta*-clivage ont été converties en concentrations molaires en utilisant les coefficients d'extinction molaire déterminés par Eltis *et al* (1993). Les trois figures qui suivent nous montrent les résultats obtenus.

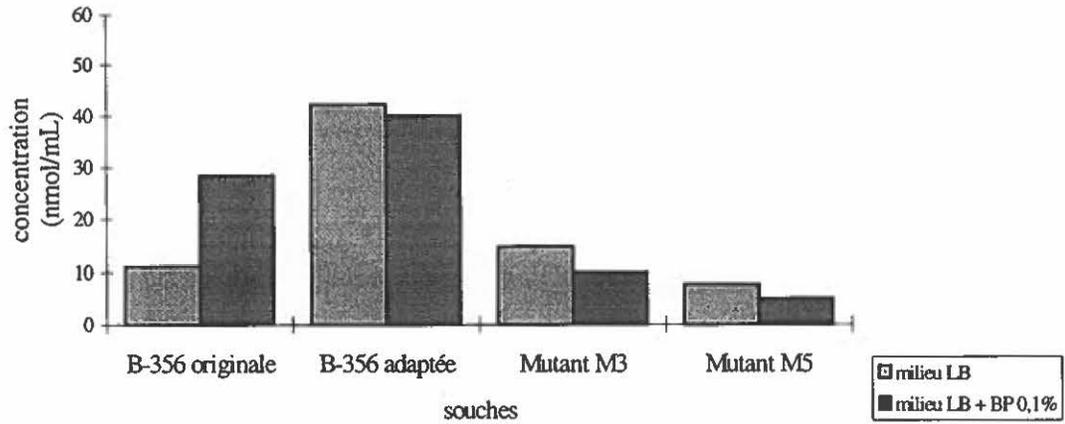


Figure 12: Production de composé de *meta*-clivage à partir du DHB.

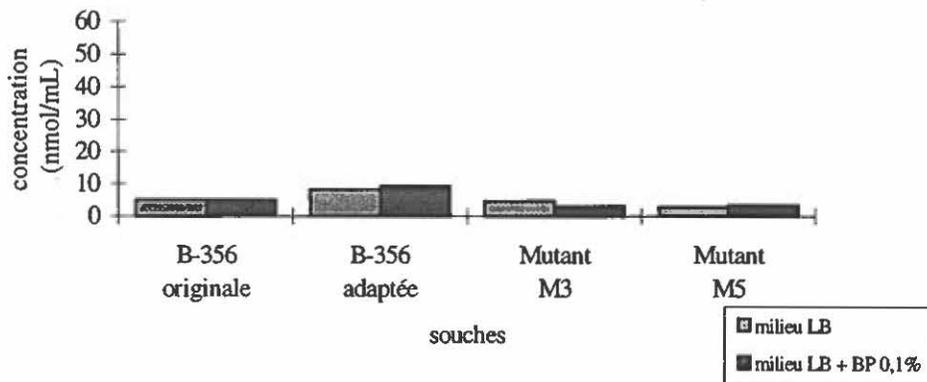


Figure 13: Production de composé de *meta*-clivage à partir du 4-méthyl catéchol.

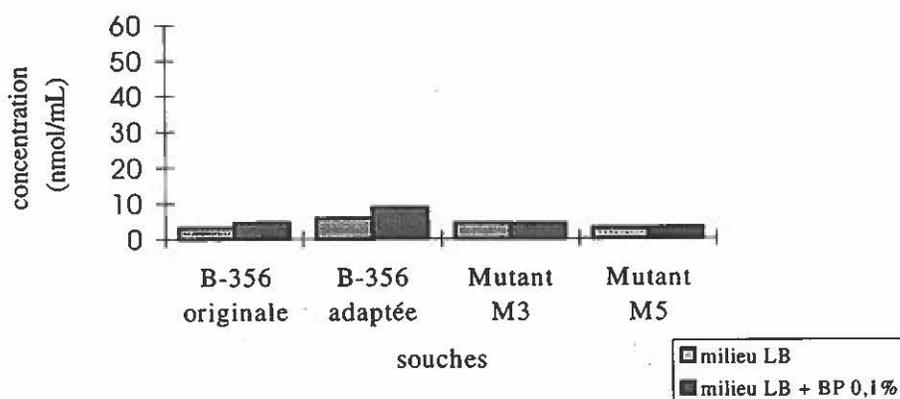


Figure 14: Production de composé de *meta*-clivage à partir du catéchol

On peut constater à la figure 12 que le BP induit une activité de *meta*-clivage chez la souche B-356 originale. Chez la souche adaptée, cette activité est constitutive et la présence de BP dans le milieu de culture n'a pas d'effet. À la figure 13, on voit que l'activité envers le 4-méthyl catéchol n'est pas augmentée chez la souche B-356 originale cultivée en présence de BP, montrant que l'activité de la C2,3O est présente à un niveau basal chez cette souche et que la présence de BP dans le milieu de culture ne l'induit pas. D'autre part, à la figure 14 on observe une légère augmentation de l'activité de *meta*-clivage envers le catéchol lorsque les cellules sont cultivées sur le BP. Cette augmentation est très probablement attribuable à l'induction de la B1,2O qui est aussi active envers le catéchol (Paul Hein, mémoire de maîtrise, 1995). Ces résultats suggèrent donc que la C2,3O est présente à un niveau basal chez la souche B-356 et qu'elle n'est pas induite par le BP. Le mutant M3 porte les gènes de la B1,2O, cependant ceux-ci ne sont pas induits par le BP puisqu'à la figure 12 on note que le niveau d'activité observé envers le DHB n'augmente pas lorsque le mutant est cultivé en présence de BP. Par contre, comme nous observons une activité de ce mutant envers le catéchol et le 4-méthylcatéchol qui est équivalente à celle observée chez la souche parentale, il semblerait que le mutant M3 ait retenu le gène de la C2,3O.

Considérant que le mutant M3 avait conservé le gène de la C2,3O, il était intéressant de vérifier si ce gène était plasmidique ou chromosomique. Pour ce faire, nous avons utilisé le

mutant M5 qui avait perdu le plasmide. À la figure 13, on peut constater un niveau basal de production de composé de *meta*-clivage avec tous les substrats, y compris le 4-méthylcatéchol. On peut donc conclure que puisque le gène ne peut se retrouver sur le plasmide pB-356-ad de la souche M5, il doit nécessairement être sur le chromosome, expliquant ainsi pourquoi il n'a pas été délété durant la mutagenèse aux radiations ultraviolettes.

CHAPÎTRE 4

DISCUSSION4.1. Stabilité des gènes de la voie catabolique du BP

Les essais de mutations qui ont été réalisés avec la souche originale permettent de penser que les gènes de la voie catabolique du BP sont particulièrement stables chez cette souche. Il est surprenant de constater qu'aucune des deux méthodes employées n'ait conduit à l'obtention de mutants. Les fréquences de mutations par transposition habituellement générées, de l'ordre de 1/1000, auraient dû être obtenues chez la souche originale. Il est donc possible que les gènes de dégradation du BP soient situés dans une région du chromosome présentant une stabilité particulière, peut-être dû à un repliement de l'ADN la protégeant contre des agents mutagènes.

Par contre, chez la souche adaptée, la voie catabolique est beaucoup moins stable. Tout comme les fréquences de mutation obtenues suite à l'exposition aux radiations ultraviolettes, le nombre de mutations spontanées générées chez la souche adaptée lors de l'utilisation du BP comme seule source de carbone peut être considéré comme élevé. Généralement, les fréquences de mutations spontanées atteignent environ 1 cellule/10⁷-10⁹, alors que dans notre cas, nous avons obtenus au moins un mutant sur 9000 colonies testées alors que ses cellules avaient été cultivées dans des conditions sélectives favorisant le maintien de la capacité à dégrader le BP.

Par contre, le benzoate n'a pas eu pour effet de faire augmenter le taux de mutations spontanées chez la souche adaptée comme l'observation en avait été faite chez d'autres souches qui avaient perdu une partie du tronçon supérieur de la voie catabolique du BP suite à leur croissance sur le benzoate (Lloyd-Jones *et al*, 1994). Par ailleurs, les souches ayant la capacité de croître sur le toluène sont également sujettes à la perte d'une partie du tronçon supérieur suite à la croissance sur le BA (Assinder et Williams, 1990).

4.2. Le plasmide de la souche adaptée et sa caractérisation

Après avoir démontré que l'instabilité de la voie catabolique des BPC chez la souche adaptée était beaucoup plus élevée que celle de la souche originale, nous avons pu mettre en évidence chez cette souche la présence d'un plasmide auquel pouvait être reliée l'instabilité génétique. L'utilisation de la technique de Kado et Liu (1981) a non seulement permis de visualiser le plasmide chez la souche adaptée, mais elle a également permis de déterminer qu'il était de haut poids moléculaire puisque la bande d'ADN correspondant au plasmide a migré à une hauteur supérieure à celle correspondant au chromosome et également bien au-delà du marqueur de poids moléculaire le plus élevé (20 kpb) (résultat non présenté). Puisque le plasmide ne se digère pas facilement par les enzymes de restriction, il serait peut-être approprié d'envisager une électrophorèse en champ pulsé pour déterminer la taille du plasmide, comme il a été utilisé par Cheng et Lessie (1994) pour mettre en évidence des plasmides ayant des tailles allant jusqu'à 3,4 Mb.

À l'aide de différents essais d'hybridations, nous avons pu déterminer que les gènes de la voie catabolique des BPC se trouvaient sur le plasmide. D'abord, la sonde formée à partir du fragment de 4 kpb *Bgl*III portant les gènes *bphAEFBC* hybridait avec la bande correspondant au plasmide et avec celle correspondant au chromosome. L'hybridation avec cette dernière peut avoir deux causes possibles: Ou bien les gènes de dégradation sont également portés sur le chromosome, ou alors la quantité de plasmides abîmés durant la préparation de l'ADN est suffisamment élevée pour provoquer un signal de cette intensité puisqu'une fois linéarisés, les plasmides de cette taille migrent à la même hauteur que le chromosome. Puisque la technique que nous avons utilisée ne nous a pas permis d'obtenir une préparation d'ADN ne contenant pas de plasmides abîmés, nous ne pouvons déterminer laquelle des deux explications s'avère être la bonne. Par contre, nous pouvons dire qu'à notre connaissance, aucun cas de duplication de voie catabolique entière présente à la fois sur le chromosome et sur un plasmide n'a pas été répertoriée dans la littérature, bien que chez plusieurs souches de *Streptomyces*, des cas d'amplification de séquences d'ADN ont été reportés et associés à la perte de certains gènes (Birch *et al*, 1990). Les gènes perdus sont souvent impliqués dans le métabolisme secondaire et chacun est susceptible

d'être délété. D'autres exemples de duplication de gènes ont été rapportés, notamment pour le gène de la C2,3O (Williams *et al*, 1992) de *Pseudomonas putida* mt-2.

Les gènes *bphA* et *bphG* ont servi à la construction de sondes qui ont hybridé avec le plasmide pB-356-ad purifié et digéré avec divers enzymes de restriction. Dans chacun des cas, les réponses positives indiquaient que les deux gènes étaient portés par le plasmide. Lors de l'hybridation avec la sonde constituée du gène *bphA* (figure 6), nous avons observé la présence d'une bande à environ 1,6 kpb chez la souche adaptée absente chez la souche originale. Cette bande suggère un réarrangement des gènes chez la souche adaptée, suite au processus d'adaptation. Par exemple, l'expérience illustrée à la figure 10 indique la perte de sites de restriction dans l'ADN de cette souche. La présence d'une bande de haut poids moléculaire pour chacune des hybridations suggère que le plasmide est difficilement digérable et nous avons pu déterminer que cette difficulté n'était pas liée à la présence d'agents inhibiteurs pour les enzymes de restriction. À notre connaissance, il n'y a pas d'exemple dans la littérature décrivant un plasmide difficile à digérer. Cette situation demeure inexplicée. Cependant, puisque nous n'avons pas effectué d'électrophorèse à champ pulsé, nous ne pouvons pas éliminer la possibilité que la bande de haut poids moléculaire observée sur les gels d'agarose, pour les préparations plasmidiques digérés par des enzymes de restriction, soit constituée de quelques bandes de haut poids moléculaire résultant de coupures rares du plasmide. Une situation semblable a déjà été rapportée pour des plasmides linéaires géants de *Streptomyces* (Kanashi et Shimanji-Murayama, 1991) et la résolution des bandes de haut poids moléculaire avait été réalisée par électrophorèse à champ pulsé.

Après avoir démontré que la plupart des gènes spécifiant la dégradation des BPC se retrouvaient sur le plasmide, nous avons voulu confirmer que seul le plasmide pouvait conférer à une cellule la capacité de croître sur le BP. Pour ce faire, nous avons utilisé un mutant de la souche adaptée incapable de croître sur le BP suite à la perte de son plasmide. Des transformants de ce mutant ont donc été obtenus. Chez ces transformants, la capacité de croître sur le BP a été rétablie suite à l'introduction du plasmide dans la souche, confirmant que le plasmide avait tous les gènes nécessaires pour la dégradation du BP. La présence sur le plasmide de gènes cataboliques spécifiant la dégradation du BP a été démontrée dans la littérature à quelques

reprises (Furukawa et Chakrabarty, 1982; Pettigrew *et al*, 1990; Wallace et Sayler, 1992; Lloyd-Jones *et al*, 1994) et confirme qu'il n'est pas inusité de retrouver chez notre souche un tronçon catabolique sur le plasmide. D'ailleurs, le fait de porter une voie catabolique sur un plasmide doit apporter des avantages sélectifs importants puisque la souche *Pseudomonas cepacia* 17616 (Cheng et Lessie, 1994) reconnue pour son potentiel élevé pour la biodégradation ne possède pas de chromosome mais plutôt 3 réplicons sur lesquels sont distribués tous ses gènes.

4.2.1. Formation du plasmide chez la souche adaptée

Deux possibilités peuvent expliquer la présence du plasmide chez la souche adaptée. D'abord, il se peut qu'une très faible proportion de la population de la culture de la souche originale possède le plasmide et que l'adaptation provoque une pression sur les cellules les plus performantes, c'est-à-dire celles ayant le plasmide. Puisque ces cellules ont un avantage sélectif, elles ont la capacité de croître plus rapidement et ainsi le plasmide peut devenir détectable dans la population. L'autre hypothèse impliquerait l'excision d'un fragment d'ADN chromosomique pour former un plasmide portant la voie catabolique du BP. Ce phénomène, bien que rare, a tout de même été observé par Ka et Tiedje (1994) dans le cas du plasmide pKA2 porteur des gènes de dégradation du 2,4-dichlorophenoxyacétate (2,4D) qui peut s'intégrer et s'exciser du chromosome de *Pseudomonas paradoxus*. Dans le cas de la souche B-356, la présence d'une transposase et d'éléments d'insertion ont été mis en évidence par séquençage de l'ADN, dans le voisinage des gènes de dégradation du BP (Sylvestre, communication personnelle).

Plusieurs voies cataboliques sont portées par des transposons. Les tronçons supérieur (Springael *et al*, 1993) et inférieur (Nakatsu *et al*, 1991; van der Meer *et al*, 1991) de la voie catabolique du BP ont été associés à la présence de transposons chez les souches étudiées. La présence de ce type d'éléments pourrait donc favoriser la formation d'un plasmide par transposition de la voie catabolique du BP.

L'essai d'adaptation que nous avons tenté avec la souche originale avait pour but de déterminer à quel moment le plasmide apparaissait dans la population. Toutefois, cet essai s'est avéré infructueux. Il est possible que la formation d'un plasmide soit un phénomène

suffisamment rare pour obtenir une bonne reproductibilité. Il se peut également que la fréquence des transferts que nous avons employée (aux deux jours) n'ait pas provoqué une pression de sélection suffisamment forte pour mener à la formation d'un plasmide.

4.2.2. Caractérisation de mutants de délétion de la souche adaptée.

L'étude des mutants de délétion (BPC⁻) a démontré que chez la plupart d'entre eux, une partie de la voie catabolique du BP avait été perdue. Un seul des mutants avait perdu le plasmide au complet. C'est d'ailleurs ce dernier qui a été utilisé pour la transformation par le plasmide pB-356-ad. La perte de fragments d'ADN de grande taille pouvant atteindre une voie catabolique entière est fort possible puisque les radiations ultraviolettes peuvent provoquer de tels types de délétions et ce, en différents endroits dans l'ADN des cellules exposées (Freifelder, 1987).

Par les hybridations faites avec le mutant M3, nous avons démontré qu'un des gènes essentiels à une dégradation efficace du BP, le gène *bphG*, a été déléte suite à l'exposition aux radiations ultraviolettes. Également, la région en amont de la voie catabolique du BP a été partiellement déléte. Par contre, il nous a été impossible de caractériser davantage cette délétion. Puisque le mutant M3 peut convertir le BP en BA avec un faible rendement, il devrait donc posséder tous les gènes de dégradation sauf *bphG* et une partie de la région de régulation. Le faible rendement obtenu provient probablement du fait que d'autres réductases sont présentes dans la cellule et peuvent partiellement substituer celle du tronçon catabolique.

4.3. Voie catabolique du BA

Comme les gènes de la dioxygénase du benzoate, premier enzyme du tronçon inférieur de la voie du BP a été localisé par séquençage dans la région des gènes *bph* (figure 2, page 10, nous voulions vérifier si le gène de l'oxygénase du catéchol (C2,3O) qui est un autre enzyme clé de la voie catabolique du BA était présent chez le mutant M3. Puisque ce gène n'a pas été cloné, il n'a pas été possible de l'utiliser pour en faire une sonde. Toutefois il a été possible d'en déterminer la présence par essai enzymatique du fait que nous connaissons des substrats qui lui sont spécifiques (Hein, mémoire de maîtrise, 1996). Les essais effectués ont démontré que le mutant

M3 avait conservé le gène de la C2,3O. Puisque ce gène était pressenti pour être situé dans les environs de la région des gènes *bph* et du gène *bphG*, nous avons voulu déterminer sa localisation. Par l'utilisation du mutant M5, nous avons démontré que le gène de la C2,3O était porté par le chromosome puisque l'essai enzymatique a révélé une activité de *meta*-clivage envers son substrat spécifique avec le mutant M5 et que ce mutant ne possède plus de plasmide. Donc, une partie de la voie catabolique du BA serait portée par le chromosome de la souche adaptée. On retrouve cette situation chez la souche *Alcaligenes eutrophus* portant le plasmide pJP4. Les gènes de dégradation du 3-CBA et du 2,4-D sont portés par le plasmide pJP4, alors que les gènes pour le catabolisme subséquent du catéchol sont situés sur le chromosome (Wallace et Saylor, 1992) de *A. eutrophus*.

Conclusion

En prenant en considération les résultats obtenus, il semblerait que la présence du plasmide soit la cause de l'instabilité de la voie catabolique chez la souche adaptée. En conséquence, l'adaptation d'une souche pour la rendre plus performante peut apporter une augmentation dans la dégradation mais peut également, dans certains cas, entraîner une perte des capacités cataboliques. Il est donc important de connaître les facteurs occasionnant une perte de ces fonctions si l'utilisation d'une souche adaptée paraissait incontournable.

Également, il serait souhaitable de comprendre les mécanismes par lesquels les souches peuvent former un plasmide et de vérifier si une fois le plasmide formé, il demeure stable dans la cellule. La transmission d'un tel plasmide chez d'autres souches par la conjugaison est également un facteur important à considérer dans un contexte de biorémediation *in situ*, car elle permettrait la dissémination des fonctions cataboliques à travers la flore indigène.

Bibliographie

Abramowicz, D.A., 1990, Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs: a review, *Crit. Rev. Microbiol.*, 10: 241-251.

Ahmad, D., M. Sylvestre et M. Sondossi, 1991, Subcloning of *bph* genes from *Pseudomonas testosteroni* B-356 in *P. putida* and *Escherichia coli*: Evidence for dehalogenation during initial attack on chlorobiphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 2880-2887.

Ahmad, D., R. Massé et M. Sylvestre, 1990, Cloning and expression of genes involved in 4-chlorobiphenyl transformation by *Pseudomonas testosteroni*: homology to polychlorinated-degrading genes in other bacteria, *Gene*, 86: 53-61.

Ahmed M. et D.D. Focht, 1972, Degradation of polychlorinated biphenyls by two species of *Achromobacter*, *Can. J. Microbiol.*, 19: 47-52.

Assinder, S.J. et P.A. Williams, 1990, The TOL plasmids: Determinants of the catabolism of toluene and the xylene dans *Advances in microbial physiology*, vol 31, Academic Press, San Diego.

Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Saidman, J.A. Smith et K. Struhl, 1994, *Current protocols in molecular biology*, John Wiley & Sons, New York.

Ballschmiter, K., 1991, Global distribution of organic compounds, *Environ. Carcino. And Ecotox. Revs.*, 9:1-46.

Barriault D. et M. Sylvestre, 1993, Factors affecting PCB degradation by an implanted bacterial strain in soil microcosms, *Can. J. Microbiol.*, 39: 594-602.

Bédard, D.L., R. Unterman, L.H. Bopp, M.J. Brennan, M.L. Harberl et C. Johnson, 1986, Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade polychlorinated biphenyls, *App. Env. Microbiol.*, 51: 761-765.

Bergeron, J., D. Ahmad, D. Barriault, A. Larose, J. Powlowski, et M. Sylvestre, 1994, Identification and mapping of the gene translation products involved in the first steps of the *Pseudomonas testosteroni* B-356 Biphenyl/chlorobiphenyl biodegradation pathway, *Can. J. Microbiol.*, 40:743-753.

Birch, A., A. Hausler et R. Hütter, 1990, Genome rearrangement and genetic instability in *Streptomyces* spp., *J. Bacteriol.*, 172:4138-4142.

Burlage, R.S., S.W. Hooper et G.S. Saylor, 1989, The TOL (pWWO) catabolic plasmid, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 1323-1328.

Casse, F., C. Boucher, J.S. Julliot, M. Michel et J. Dénarié, 1979, Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis, *J. Gen. Microbiol.*, 113: 229-242.

Chatterjee, D.K., S.T. Kellogg, S. Hamada et M. Chakrabarty, 1981, Plasmid specifying total degradation of 3-chlorobenzoate by a modified *ortho* pathway, *J. Bacteriol.* 146: 639-646.

Cheng, H-P. et T.G. Lessie, 1994, Multiple replicons constituting the genome of *Pseudomonas cepacia* 17616, *J. Bacteriol.*, 176: 4034-4042.

Desnoyers, M., 1991, Clonage et étude préliminaire de la régulation des gènes de la voie catabolique du 4-chlorobiphényl de *Pseudomonas testosteroni* B-356, mémoire de maîtrise, Université du Québec à Montréal.

Eckhardt, T., 1978, A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria, *Plasmid*, 1: 584-588.

Eltis, L.D., B. Hoffmann, H.J. Hecht, H. Lunsdorf et K.N. Timmis, 1993, Purification and crystallization of 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase, *J. Biol. Chem.*, 4:2727-2732.

Erickson, B.D. et F.J. Mondello, 1992, Nucleotide sequencing and transcriptional mapping of the genes encoding biphenyl dioxygenase, a multicomponent polychlorinated-biphenyl-degrading enzyme in *Pseudomonas* strain LB400, *J. Bacteriol.*, 174:2903-2912.

Fishbein, L., 1972, Chromatographic and biological aspects of polychlorinated biphenyls, J. Chromatogr., 68, 345.

Freifelder, D., 1987, *Microbial genetics*, Jones et Barlett, San Diego, Californie, 601 pp.

Furukawa K. et M. Chakrabarty, 1982, Involvement of plasmids in total degradation of chlorinated biphenyls, Appl. Env. Microbiol., 44: 619-626.

Furukawa K., K. Tonomura et A. Kamibayashi, 1978, Effects of chlorine substitution on the biodegradability of polychlorinated biphenyls, Appl. Environ. Microbiol, 35: 223-227.

Furukawa, K., 1982, Microbial degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs)(pp. 33-57) dans *Biodegradation and detoxification of environmental pollutants*, édité par A.M. Chakrabarty, Boca Raton, Floride, CRC Press Inc.

Furukawa, K., 1986, Modification of PCBs by bacteria and other microorganisms dans *PCBs in the environment*, vol II, chapitre 6, édité par J.S.Waid, CRC Press Inc, Boca Raton, Floride.

Furukawa, K., N. Tomizuka et A. Kamibayashi, 1979, Effect of chlorine substitution on the bacterial metabolism of various polychlorinated biphenyls, Appl. Environ. Microbiol., 38: 301-310.

Ghosal, D., I.S. You, D.K. Chatterjee et A.M. Chakrabarty, 1985, Microbial degradation of halogenated compounds, Science, 228: 135-142.

Gibson, D.T., R.L. Roberts, M.C. Wells et V. M. Kobals, 1973, Oxidation of biphenyl by *Beijerinckia* species, Biochem. Biophys. Res. Commun., 50:211-219.

Guilbeault, B., M. Sondossi, D. Ahmad et M. Sylvestre, 1994, Factors affecting the enhancement of PCB degradative ability of soil microbial populations, Intern. Biodeter. and Biodegrad., 33: 73-91.

Haddock, J.D. J.R. Horton et D.T. Gibson, 1995, Dihydroxylation and dechlorination of chlorinated biphenyls by purified biphenyl 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. Strain LB400, J. Bacteriol, 177: 20-26.

Hein, P., 1996, Mémoire de maîtrise, Université du Québec - Institut National de la Recherche Scientifique-Santé.

Heinemann, J.A., 1992, Conjugation, genetics dans *Encyclopedia of microbiology*, vol. 1, pp. 547-558.

Hickey, W.J., D.B. Searles et D.D. Focht, 1993, Enhanced mineralization of polychlorinated biphenyls in soil inoculated with chlorobenzoate-degrading bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 1194-1200.

Holmes, D.C., J.H. Simmons et O'G. J. Tallon, 1967, Chlorinated hydrocarbons in British wildlife, *Nature*, 216, 227.

Hooper, S.C., T.C. Dockendorff et G.S. Saylor, 1989, Characteristics and restriction analysis of the 4-chlorobiphenyl catabolic plasmid, pSS50, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55:1268-1288.

Hopwood, D.A., M.J. Bibb, K.F. Chater, T. Kieser, C.J. Bruton, H.M. Kieser, D.J. Lydiate, C.P. Smith et H. Scheurempf, 1985, *Genetic manipulation of Streptomyces-a laboratory manual*, The John Innes Foundation, Norwich.

Hurtubise, Y., D. Barriault, J. Polowski et M. Sylvestre, 1995, Purification and Characterization of the *Comamonas testosteroni* B-356 biphenyl dioxygenase components, *J. Bacteriol.*, 177: 6610-6618.

Jensen, S., A.G. Johnels, M. Olsson, et G. Otterlind, 1969, DDT and PCB in marine animals from Swedish waters, *Nature*, 224, 247.

Ka, J.O. et J.M. Tiedje, 1994, Integration and excision of a 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmid in *Alcaligenes paradoxus* and evidence of its natural intergeneric transfert, *J. Bacteriol.*, 176: 5284-5289.

Kado, C.I., S.-T. Liu, 1981, Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids, *J. Bacteriol.*, 145: 1365-1373.

Kanashi, H. et M Shimaji-Murayama, 1991, Physical characterization of SCP1, a giant linear plasmid from *Streptomyces coelicolor*, *J. Bacteriol.*, 173:1523-1529.

Khan, A. et S. Walia, 1989, Cloning of bacterial genes specifying degradation of 4-chlorobiphenyl from *Pseudomonas putida* OU83, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 798-805.

Kleckner, N., J. Bender et S., Gottesman, 1991, Uses of transposons with emphasis on Tn10, dans *Bacterial genetic system (Methods in Enzymology, vol 204)*, édité par J.H. Miller, Academic Press, San Diego, pp. 139-180.

Koeman, J.H., M.C. Ten Noever De Brauw et R.H. De Vos, 1969, Chlorinated biphenyls in fish, mussels and birds from the River Rhine and the Netherland coastal area, *Nature*, 221, 1126.

Kok, M., J.P. Shaw et S. Harayama, 1992, Comparison of two hydrocarbon monooxygenases of *Pseudomonas putida* dans *Pseudomonas, molecular biology and biotechnology*, chapitre 25, édité par E. Galli, S. Silver et B. Witholt, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Lloyd-Jones, G., C. de Jong, R.C. Ogden, W.A. Duetz 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: 416-423.

Massé, R., F. Messier, C. Ayotte, M.-F. Lévesque et M. Sylvestre, 1989, A comprehensive gas chromatographic / mass spectrometric analysis of 4-chlorobiphenyl bacterial degradation products, *Biomed. Env. Mass. Spec.*, 18: 27-47.

Nakatsu, C., J. Ng, R. Singh, N. Straus et C.R. Wyndham, 1991, Chlorobenzoate catabolic transposon Tn5271 is a composite class I element with flanking class II insertion sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* 88:8312-8316.

Nakazawa T. et T. Yokota, 1973, Benzoate metabolism in *Pseudomonas putida (arvilla)* mt-2: demonstration of two benzoate pathways, *J. Bacteriol*, 115:262-267.

Pettigrew, C.A., A. Breen, C. Corcoran et G.S. Sayler. 1990, Chlorinated biphenyl mineralization by individual populations and consortia of freshwater bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 2036-2045.

Quensen, J.F., J.M. Tiedje et S.A. Boyd, 1988, Reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls by anaerobic microorganisms from sediments, *Science*, 242: 752-755.

Quensen, J.F., S.A. Boyd et J.M. Tiedje, 1990, Dechlorination of four commercial polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclor) by anaerobic microorganisms from sediments, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 2360-2369.

Sambrook, J., E.F. Fritsch et T. Maniatis, 1989, *Molecular cloning, a laboratory manual*, 2^e édition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Sawhney, B.L., 1986, Chemistry and properties of PCBs in relation to environmental effects dans *PCB's and the environment*, édité par J.S. Waid, chapitre 2, pp 47-64, CRC Press, Boca Raton, Floride.

Sondossi *et al*, 1995, Importance of stringent control of biphenyl - induced biphenyl and chlorobenzoate catabolic pathways for chlorobiphenyl degradation in enhanced strain of *Pseudomonas testosteroni* B-356 dans *Biodeterioration and Biodegradation* "The 9th International Biodeterioration and biodegradation Symposium", édité par A. Bousher, pp. 456-459.

Sondossi, M., M. Sylvestre et D. Ahmad, 1992, Effects of chlorobenzoate transformation of the *Pseudomonas testosteroni* biphenyl and chlorobiphenyl degradation pathway, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 485-495.

Springael, D., S. Kreps et M. Mergeay, 1993, Identification of a catabolic transposon, Tn4371, carrying biphenyl and 4-chlorobiphenyl degradation genes in *Alcaligenes eutrophus* A5, *J. Bacteriol.* 175: 1674-1681.

Sylvestre, M., 1980, Isolation method for bacterial isolates capable of growth on *p*-chlorobiphenyl, *Appl. Environ. Microbiol.*, 39: 1223-1224.

Sylvestre, M., R. Massé, C. Ayotte, F. Messier et J. Fauteux, 1985, Total degradation of 4-chlorobiphenyl (4CB) by a two membered bacterial culture, *J. Appl. Microbiol Biotechnol*, 21: 192-195.

Sylvestre, M., M. Sirois, Y. Hurtubise, J. Bergeron, D. Ahmad, F. Shareck, D. Barriault, I. Guillemette et J-M. Juteau, 1996, Sequencing of *Comamonas testosteroni* strain B-356-biphenyl/chlorobiphenyl dioxygenase genes: evolutionary relationship among Gram-negative bacterial biphenyl dioxygenases, *Gene*, 174: 195-202.

Thomas, C.M., 1981, Molecular genetics of broad host range plasmid RK2, *Plasmid*, 5: 10-19.

Tomalsky, M.E., L.A. Actis et J.H. Crossa, 1992, Plasmids dans *Encyclopedia of microbiology*, volume 3, édité par J. Lederberg, Academic Press, New York, pp 431-442.

Van der Meer, J.R., A.J.B. Zehnder et W.M. de Vos, 1991, Identification of a novel composite transposable element, Tn5280, carrying chlorobenzene dioxygenase genes of *Pseudomonas* sp. Strain P51, *J. Bacteriol*, 173: 7077-7083.

Wallace, W.H. et G.S. Saylor, 1992, Catabolic plasmids in the environment dans *Encyclopedia of microbiology*, vol 1, pp. 417-430.

Westöö, G. et K. Koren, 1970, Levels of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in fish caught in Swedish water areas or kept for sale in Sweden, 1967-1970, *Var Foeda*, 22, 93.

Williams, P.A. et K. Murray, 1974, Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for the existence of new TOL plasmids, *J. Bacteriol.*, 125: 818-828.

Williams, P.A., S.D. Taylor et L.E. Gibb, 1988, Loss of the toluene-xylene catabolic genes of the TOL plasmid pWW0 during growth of *Pseudomonas putida* on benzoate is due to a selective growth advantage of "cured" segregants, *J. Gen. Microbiol.*, 134: 2039-2048.

Williams, P.A., S.J. Assinder, P. de Marco, K.J. O'Donnell, C.L. Poh, L.E. Shaw et M.K. Winson, 1992, Catabolic gene duplication in TOL plasmids dans *Pseudomonas*, *molecular biology and biotechnology*, chapitre 37, édité par E. Galli, S. Silver et B. Witholt, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Wyndham, C.R., A.E. Cashore, C.H. Nakatsu, M.C. Peel, 1994, Catabolic transposons, *Biodegradation*, 5:323-342.

Ye, D., J.F. Quensen III, J.M. Tiedje et S.A. Boyd, 1992, Anaerobic dechlorination of polychlorobiphenyls (Aroclor 1242) by pasteurized and ethanol-treated microorganisms from sediments, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 1110-1114.

Yong, D.R., D.M. Erlich et T.C. Heessen, 1977, Sediments as sources of DDT and PCB, *Mar. Pollut. Bull.* 8, 24.