

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ À
L'INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE

PAR
ANNIE BOYER

ÉTUDE DES DÉSHALOGÉNASES I ET II PRODUITES PAR
DESULFITOBACTERIUM FRAPPIERI SOUCHE
PCP-1

SEPTEMBRE 1999

TABLE DES MATIÈRES

| | Page |
|--|------|
| Table des matières | ii |
| Liste des tableaux | vi |
| Liste des figures | vii |
| Listes des abréviations | ix |
| Sommaire | x |
| Introduction | 1 |
| Revue Bibliographique | 5 |
| 1. Pentachlorophénol et autres polluants..... | 6 |
| 2. La déshalogénéation..... | 8 |
| 2.1 Généralités..... | 8 |
| 2.2 Mécanismes..... | 8 |
| 2.3 Déshalogénéation réductrice..... | 10 |
| 3. Souches bactériennes utilisant la déshalogénéation réductrice..... | 12 |
| 3.1 <i>Desulfomonile tiedjei</i> souche DCB-1..... | 13 |
| 3.2 <i>Desulfitobacterium dehalogenans</i> | 15 |
| 3.3 <i>Desulfitobacterium hafniense</i> souche DCB-2..... | 17 |
| 3.4 <i>Desulfitobacterium</i> sp. souche PCE-1..... | 19 |
| 3.5 <i>Desulfitobacterium chlororespirans</i> souche Co23..... | 20 |
| 3.6 <i>Desulfitobacterium frappieri</i> souche PCP-1..... | 21 |
| 3.7 <i>Dehalospirillum multivorans</i> | 24 |
| 3.8 <i>Dehalobacter restrictus</i> souche PER-K23..... | 26 |
| 3.9 <i>Dehalococcoides ethenogenes</i> souche 195..... | 28 |
| 3.10 Souche TT4B..... | 28 |
| 3.11 Souche 2-CP1..... | 30 |
| 4. Les déshalogénases..... | 33 |
| 4.1 La 3-chlorobenzoate déshalogénase réductrice de <i>Desulfomonile tiedjei</i> souche DCB-1..... | 33 |
| 4.2 La 3-chloro-4-hydroxyphénylacétate déshalogénase réductrice de <i>Desulfitobacterium hafniense</i> DCB-2..... | 36 |
| 4.3 La déshalogénase aryle-réductrice de <i>Desulfitobacterium</i> <i>chlororespirans</i> souche Co23..... | 37 |

| | |
|--|-----------|
| 4.4 La tétrachloroéthylène déshalogénase réductrice de <i>Dehalospirillum multivorans</i> | 39 |
| 4.5 Les déshalogénases réductrices de <i>Dehalococcoides ethenogenes</i> souche 195..... | 42 |
| 4.6 La déshalogénase réductrice de <i>Desulfitobacterium</i> sp. souche PCE-S..... | 46 |
| Matériels et Méthodes | 50 |
| 1. Provenance de <i>Desulfitobacterium frappieri</i> souche PCP-1..... | 51 |
| 2. Milieu et culture de la souche PCP-1..... | 51 |
| 3. Manipulations effectuées en conditions anaérobies..... | 53 |
| 3.1 Préparation de solutions anaérobies..... | 53 |
| 4. Production des déshalogénases..... | 54 |
| 4.1 Production d'une biomasse..... | 54 |
| 4.2 Collecte et fractionnement cellulaire..... | 55 |
| 4.2.1 Pour la déshalogénase I..... | 55 |
| 4.2.2 Pour la déshalogénase II..... | 57 |
| 5. Suspension des fractions membranaires..... | 57 |
| 6. Solubilisation des déshalogénases..... | 58 |
| 7. Essai standard pour le dosage de l'activité de déshalogénéation..... | 58 |
| 7.1 Pour la déshalogénase I..... | 58 |
| 7.2 Pour la déshalogénase II..... | 59 |
| 8. Analyse des chlorophénols par chromatographie liquide à haute performance (CLHP)..... | 60 |
| 9. Dosage des protéines..... | 61 |
| 10. Cinétique enzymatique et détermination de la stabilité des enzymes..... | 61 |
| 10.1 Cinétique enzymatique..... | 62 |
| 10.2 Stabilité..... | 62 |
| 11. Détermination du pH optimal..... | 63 |
| 11.1 Pour la déshalogénase I..... | 63 |
| 11.2 Pour la déshalogénase II..... | 64 |
| 12. Détermination de la température optimale de l'activité enzymatique et de la stabilité thermique..... | 65 |
| 13. Effet du sulfate, du sulfite et du nitrate sur l'activité de l'enzyme solubilisée..... | 66 |
| 13.1 Pour la déshalogénase I..... | 66 |

| | |
|---|-----|
| 13.2 Pour la déshalogénase II..... | 66 |
| 14. Effet de l'air sur l'activité de l'enzyme solubilisée..... | 67 |
| 15. Effet des métaux sur l'activité de l'enzyme solubilisée..... | 67 |
| 16. Effet d'agents chélateurs et du Triton X-100 sur l'activité de l'enzyme solubilisée..... | 68 |
| 16.1 Pour la déshalogénase I..... | 68 |
| 16.2 Pour la déshalogénase II..... | 69 |
| 17. Spectre d'activité des préparations d'enzymes solubilisées..... | 70 |
| 17.1 Les chlorophénols et bromophénols..... | 70 |
| 17.2 Le tétrachloroéthylène (PCE)..... | 72 |
| 18. Essais d'inhibition de l'activité des déshalogénases par l'iodopropane..... | 74 |
| 19. Essais de purification de la déshalogénase II solubilisée..... | 75 |
| 20. Électrophorèse en gel de polyacrylamide..... | 78 |
| Résultats | 81 |
| 1. Cinétique enzymatique et détermination de la stabilité des enzymes..... | 82 |
| 1.1 Cinétique enzymatique..... | 82 |
| 1.2 Stabilité des enzymes..... | 82 |
| 2. Détermination du pH optimal..... | 85 |
| 3. Détermination de la température optimale de l'activité enzymatique et de la stabilité thermique..... | 87 |
| 4. Effet du sulfate, du nitrate et du sulfite sur l'activité de déshalogénéation des fractions solubilisées..... | 92 |
| 5. Effet de l'air sur l'activité enzymatique des fractions solubilisées..... | 92 |
| 6. Effet des métaux sur l'activité enzymatique des fractions solubilisées..... | 96 |
| 7. Effet d'agents chélateurs et du Triton X-100 sur l'activité enzymatique des fractions solubilisées..... | 96 |
| 8. Spectre d'activité des fractions solubilisées des déshalogénases I et II..... | 100 |
| 8.1 Les chlorophénols et bromophénols..... | 100 |
| 8.2 Le tétrachloroéthylène (PCE)..... | 101 |
| 9. Essai d'inhibition de l'activité des déshalogénases par l'iodopropane..... | 104 |
| 10. Essai de purification de la déshalogénase II solubilisée..... | 106 |
| Discussion | 110 |

| | |
|---|------------|
| 1. Caractérisation des déshalogénases..... | 111 |
| 2. Essais de purification de la déshalogénase II..... | 118 |
| 3. Structure des déshalogénases et spécificité..... | 120 |
| Conclusion..... | 126 |
| Remerciements..... | 129 |
| Bibliographie..... | 131 |

LISTE DES TABLEAUX

| | Page |
|---|------|
| TABLEAU 1: Résumé des caractéristiques, des accepteurs d'électrons et du spectre d'activité de différentes bactéries utilisant la déshalogénéation réductrice | 32 |
| TABLEAU 2: Résumé des caractéristiques, structure et des substrats transformés par différentes déshalogénases bactériennes | 49 |
| TABLEAU 3: Effet de l'air sur l'activité de déshalogénéation de préparations de déshalogénases I et II solubilisées | 95 |
| TABLEAU 4: Effet des agents chélateurs et du Triton X-100 sur l'activité de déshalogénéation de préparations de déshalogénases I et II solubilisées | 99 |
| TABLEAU 5: Spectre d'activité de déshalogénéation envers les chlorophénols et les bromophénols pour une préparation de déshalogénase I solubilisée | 102 |
| TABLEAU 6: Spectre d'activité de déshalogénéation envers les chlorophénols et les bromophénols pour des préparations de déshalogénase II solubilisée | 103 |
| TABLEAU 7: Charte de purification partielle de la déshalogénase II | 107 |

LISTE DES FIGURES

| | Page |
|--|------|
| FIGURE 1: Mécanismes de déshalogénéation enzymatique | 11 |
| FIGURE 2: Modèle de la chaîne respiratoire chez <i>Dehalobacter restrictus</i> | 29 |
| FIGURE 3: Modèle chimiosmotique de déshalorespiration chez <i>Desulfomonile tiedjei</i> souche DCB-1 | 38 |
| FIGURE 4: Modèle détaillé de la déshalogénéation réductrice du tétrachloroéthylène, impliquant un flot réversible d'électrons chez <i>Dehalospirillum multivorans</i> | 43 |
| FIGURE 5: Formation de 2,4-DCP pour une préparation de déshalogénase I solubilisée en fonction du temps d'incubation et de la quantité de protéines présente lors du dosage enzymatique. | 83 |
| FIGURE 6: Cinétique enzymatique de la formation de 3-MCP en fonction du temps d'incubation pour une préparation de déshalogénase II solubilisée | 84 |
| FIGURE 7: Stabilité d'une préparation de déshalogénase II solubilisée à 4°C avec ajout de Na ₂ S ou de 3,5-DCP | 86 |
| FIGURE 8: Effet du pH sur l'activité de déshalogénéation du 2,4,6-TCP d'une préparation de déshalogénase I solubilisée | 88 |
| FIGURE 9: Effet du pH sur l'activité de déshalogénéation du 3,5-DCP d'une préparation de déshalogénase II solubilisée | 88 |
| FIGURE 10: Effet de la température sur l'activité de déshalogénéation du 2,4,6-TCP et stabilité thermique d'une préparation de fractions membranaires de déshalogénase I | 90 |

| | | |
|------------|--|-----|
| FIGURE 11: | Effet de la température sur l'activité de déshalogénéation du 2,4,6-TCP et stabilité thermique d'une préparation de déshalogénase I solubilisée | 90 |
| FIGURE 12: | Effet de la température sur l'activité de déshalogénéation du 3,5-DCP d'une préparation de fraction membranaire et d'une préparation de fraction solubilisée de déshalogénase II | 91 |
| FIGURE 13: | Effet du sulfate, du nitrate et du sulfite sur l'activité de déshalogénéation du 2,4,6-TCP d'une préparation de déshalogénase I solubilisée | 93 |
| FIGURE 14: | Effet du sulfate, du nitrate et du sulfite sur l'activité de déshalogénéation du 3,5-DCP d'une préparation de déshalogénase II solubilisée | 94 |
| FIGURE 15: | Effet des métaux (5mM) sur l'activité de déshalogénéation du 2,4,6-TCP d'une préparation de déshalogénase I solubilisée | 97 |
| FIGURE 16: | Effet des métaux (5mM) sur l'activité de déshalogénéation du 3,5-DCP d'une préparation de déshalogénase II solubilisée | 98 |
| FIGURE 17: | Inhibition réversible de l'activité de déshalogénéation par l'iodopropane de préparations de déshalogénases I et II solubilisées | 105 |
| FIGURE 18: | Gels de polyacrylamide colorés au bleu de Coomassie | 109 |
| FIGURE 19: | Mécanisme de réaction proposé pour la <i>ortho</i> -chlorophénol déshalogénase réductrice de <i>Desulfitobacterium dehalogenans</i> | 122 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Pour les substances chlorées:

PCP: pentachlorophénol

TeCP: tétrachlorophénol

TCP: trichlorophénol

DCP: dichlorophénol

MCP: monochlorophénol

CP: chlorophénol

TBP: tribromophénol

DBP : dibromophénol

MBP: monobromophénol

PCE: tétrachloroéthylène

TCE: trichloroéthylène

DCE: dichloroéthylène

3CB: 3-chloro-benzoate

CB: benzoate

HCB: hexachlorobenzène

Cl-HBA: chloro-hydroxybenzoate

BPC: biphényles polychlorés

Cl-OHBA: chloro-hydroxyphénylacétate

Pour les autres substances:

EDTA: acide éthylènediaminetétraacétique

SDS: lauryl sulfate de sodium

TFA: acide trifluoroacétique

Pour les techniques:

CLHP: chromatographie en phase liquide à haute performance

CG-DCE: chromatographie en phase gazeuse et détecteur à capture d'électrons

CIH: chromatographie à interactions hydrophobiques

RcPC: réaction compétitive de polymérisation en chaîne

Autres:

MLA: milieu liquide anaérobie

TAE: tampon d'activité enzymatique

SOMMAIRE

Desulfitobacterium frappieri, PCP-1 est un nouveau microorganisme anaérobie pouvant dégrader le pentachlorophénol, qui a été récemment isolé dans notre laboratoire à partir d'un consortium méthanique. C'est le seul microorganisme connu capable de déshalogéner des chlorophénols en position *ortho*, *meta* et *para*. Deux déshalogénases sont impliquées, soit la déshalogénase I induite par le 2,4,6-trichlorophénol et la déshalogénase II induite par le 3,5-dichlorophénol. Le but de ce travail de maîtrise était d'effectuer une caractérisation préliminaire de ces deux enzymes et d'initier la purification de la déshalogénase II.

Ces déshalogénases réductrices retrouvées dans la fraction membranaire de *D. frappieri* souche PCP-1 ont été solubilisées en présence de 0,1% de Triton X-100 et de 20% de glycérol. Ces dernières préparations ont été utilisées au cours de notre étude. La déshalogénase I catalyse la déshalogénéation réductrice du pentachlorophénol (PCP) et de différents chlorophénols principalement en position *ortho*, tandis que la déshalogénase II transforme principalement les chlorophénols en position *meta* et *para*. Lorsque le méthyl viologen et le citrate de titanium(III) sont utilisés comme agents réducteurs, les préparations enzymatiques de déshalogénase I transforment le pentachlorophénol à un taux de 40,9 nmoles min⁻¹ mg de protéines⁻¹, tandis qu'un taux de 0,161 nmoles min⁻¹ mg de protéines⁻¹ a été obtenu pour les préparations de déshalogénase II. Les conditions optimales de déshalogénéation ont été obtenues à un pH de 6,9 et à une température de 50°C pour la préparation enzymatique de la déshalogénase I et à un pH de 7,4 et à une température de 45°C pour la préparation enzymatique de la déshalogénase II. Le sulfite à une concentration de 1 mM inhibe l'activité de déshalogénéation des deux préparations de déshalogénases, tandis que le sulfate (100 mM) ne démontre aucun effet. Le nitrate (5 mM) diminue l'activité de déshalogénéation de la préparation enzymatique de la déshalogénase I de 50% tandis qu'il inhibe complètement l'activité de la préparation enzymatique de la déshalogénase II. L'inhibition réversible de la préparation enzymatique de la déshalogénase II par le 1-iodopropane (1 mM) et sa restauration par exposition à la lumière, suggère que cette enzyme contiendrait une cobalamine. Par contre, la

déshalogénase I est également inactivée par le 1-iodopropane, mais l'activité n'est pas restaurée après exposition à la lumière. Une purification partielle de la déshalogénase II a été obtenue par chromatographie à interaction hydrophobique sur t-butyl suivie d'une chromatographie d'affinité sur hydroxyapatite.

INTRODUCTION

Plusieurs substances xénobiotiques halogénées et toxiques sont retrouvées dans notre environnement et causent des problèmes de pollution. Les chlorophénols, les biphényles polychlorés, les chlorodioxines, les chlorofurannes et les solvants chlorés, en sont quelques exemples. Le pentachlorophénol (PCP) est l'un de ces produits, qui a été le plus utilisé grâce à sa versatilité et à son action biocide. Ce composé stable, peu réactif et récalcitrant a été introduit comme préservatif dans l'industrie des bois d'extérieurs. Par la suite, son utilisation a été élargie, puisqu'il possède un large spectre d'activité contre les bactéries, les champignons, les insectes, les plantes et les animaux. Le PCP a été reconnu comme étant très toxique pour les êtres vivants. Chez l'homme, le PCP pénètre par la peau et peut causer des problèmes de santé. À long terme, les effets du PCP ont été identifiés comme étant cancérigène, tératogène et hautement embryotoxique. Étant donné la grande variété de composés qui ont été créés par l'homme pour diverses applications et qui contaminent et polluent notre environnement, il est essentiel de trouver des méthodes afin d'éliminer les polluants ou encore d'abaisser leur niveau de contamination à un degré acceptable.

La biodégradation aérobie est un volet qui a été étudié et qui a permis de développer des traitements capables de dégrader efficacement le PCP. Cependant, les biotraitements anaérobies offrent des perspectives avantageuses grâce à leur moindre coût, à leur capacité de dégrader des substances fortement chlorées, difficilement dégradées par les bactéries aérobies et à leur potentiel d'application *in situ*. Effectivement, on retrouve dans la majorité des sols des conditions anaérobies à partir d'une certaine profondeur. Ces avantages et possibilités offrent pour la biodégradation anaérobie un potentiel d'application très intéressant.

Quelques équipes de recherche se sont intéressées à la biodégradation anaérobie du pentachlorophénol et plus particulièrement à la déshalogénéation. La déshalogénéation réductrice est le mécanisme le plus important impliqué dans la transformation anaérobie des xénobiotiques chlorés et récalcitrants. L'étude de la

déshalogénéation et par conséquent des déshalogénases microbiennes, permet d'acquérir des connaissances sur les mécanismes de dégradation utilisés par les microorganismes envers les substances xénobiotiques halogénées.

Jusqu'à ce jour, peu de bactéries anaérobies impliquées dans la déshalogénéation réductrice de composés chlorés aliphatiques et aromatiques ont été décrites dans la littérature. De plus, seulement quelques-uns des systèmes enzymatiques de déshalogénéation réductrice de ces bactéries ont été étudiés. Le premier microorganisme à avoir été isolé est *Desulfomonile tiedjei* (Shelton & Tiedje, 1984), il possède la capacité de déshalogéner le PCP et certains chlorophénols principalement en position *meta*. Par la suite, quelques espèces du genre *Desulfitobacterium*, capables de déshalogéner des substances chlorées, ont été isolées soit: *dehalogenans* (Utkin *et al.*, 1994), *hafniense* (Christiansen & Ahring, 1996), souche PCE-1 (Gerritse *et al.*, 1996), *chlororespirans* (Sanford *et al.*, 1996) et *frappieri*. Parmi ces souches seule *Desulfitobacterium frappieri* souche PCP-1 est capable de déshalogéner les substances aromatiques chlorées aux positions *ortho*, *meta* et *para*. La souche anaérobie stricte PCP-1 a été isolée à partir d'un consortium méthanogénique (Bouchard *et al.*, 1996). Elle dégrade le pentachlorophénol en 3-monochlorophénol et plusieurs autres chlorophénols aux trois positions. *D. frappieri* démontre un large spectre d'activité. En plus de déshalogéner le tétrachloroéthylène et le pentachloropyridine, *D. frappieri* peut déshalogéner une large variété de molécules aromatiques qui sont substituées avec un groupement hydroxyl ou amine (Dennie *et al.*, 1998). Deux enzymes inductibles, se retrouvant dans la fraction membranaire, sont impliquées; une première, la déshalogénase I agit en position *ortho* et la seconde, la déshalogénase II agit aux positions *meta* et *para*. Les résultats obtenus jusqu'à maintenant avec *D. frappieri*, suggèrent que ce microorganisme aurait un potentiel intéressant pour la biorémédiation des sites contaminés par le PCP ou par d'autres substances halogénées. Une meilleure connaissance de ce microorganisme et des enzymes impliquées dans la déshalogénéation réductrice, pourrait éventuellement permettre son utilisation optimale dans des procédés de bio-restauration. De plus,

l'acquisition de connaissances sur le système enzymatique pourrait permettre ultérieurement, d'établir le mécanisme moléculaire de la déshalogénéation réductrice chez la souche PCP-1.

Le but de ce projet de maîtrise était donc d'acquérir une meilleure connaissance des microorganismes anaérobies et des enzymes impliquées dans la déshalogénéation réductrice. Plus spécifiquement les objectifs étaient (1) d'effectuer une caractérisation préliminaire et de comparer les différentes propriétés des déshalogénases I et II produites par *Desulfitobacterium frappieri* souche PCP-1 et (2) d'effectuer des essais de purification de la déshalogénase II.

REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

1. PENTACHLOROPHÉNOL ET AUTRES POLLUANTS

Depuis son introduction dans les années 1930, le pentachlorophénol (PCP) est devenu l'un des produits chimiques les plus utilisés grâce à sa versatilité et à son action biocide. Le PCP a été premièrement introduit comme préservatif pour l'industrie des bois d'extérieurs. Cependant, au fil des années ce composé xénobiotique, stable, peu réactif, très toxique et récalcitrant a vu son utilisation s'élargir considérablement, notamment dans l'industrie et l'agriculture comme agent biocide. Ceci est dû à son large spectre d'activité contre les bactéries, les champignons, les insectes, les plantes inférieures et supérieures ainsi que contre les animaux (Orser & Lange, 1994). L'usage abusif du PCP a mené à la contamination de plusieurs sites environnementaux, incluant les sols, les environnements aquatiques (eaux de surface et sédiments), l'atmosphère ainsi que les eaux de pluies (Liu, 1989). La production annuelle de PCP a été estimée à 50 millions de kg en 1981 (Crosby, 1981). Le PCP a donc été reconnu comme un des polluants prioritaires et c'est pourquoi son utilisation a été fortement réglementée dans les années 1970 (McAllister *et al.*, 1996). Aujourd'hui il est principalement utilisé pour la préservation du bois destiné à un usage extérieur (Crosby, 1981).

En plus du PCP, d'autres produits xénobiotiques halogénés et toxiques se retrouvent dans notre environnement. Ces produits peuvent être classés selon trois classes, soit les pesticides organochlorés, les solvants alkyles et les aryles halogénés (Mohn & Tiedje, 1992). La première classe regroupe, entre autres, les produits suivants, qui ont été largement utilisés dans les années 60: le DDT (1,1,1-trichloro-2,2-bis(*p*-chlorophényl)éthane), le lindane (γ -1,2,3,4,5,6-hexachloro-cyclohexane), le mirex et le toxaphène. La deuxième classe regroupe des produits qui sont halogénés en C₁ et C₂ et qui ont été utilisés pour le nettoyage à sec, comme dégraissant, comme pesticides et à la fabrication de composantes électroniques. Ces produits sont les

suivants: le chlorométhane, le chloroforme, le tétrachloroéthylène (PCE) et le trichloroéthylène (TCE). La troisième classe, quant à elle, regroupe des produits halogénés tels que des anilines, des benzènes, des phénoxyacétates et des phénols. Le PCP et les biphényles polychlorés (BPC) se situent donc dans cette classe. Ces produits ont été utilisés comme: pesticides, solvants et agents de transfert de chaleur. De plus, ils ont été retrouvés dans les boues usées de plusieurs procédés industriels (Mohn & Tiedje, 1992).

Étant donné la grande variété de composés qui ont été créés par l'homme pour diverses applications et qui contaminent et polluent notre environnement, il est impératif de trouver des méthodes afin de réduire le problème soit en éliminant les polluants ou encore en abaissant leur niveau de contamination à un degré acceptable (Neilson, 1996). La biorémédiation *in situ* est une méthode intéressante de décontamination. Le principe de cette méthode est de favoriser les conditions de croissance des microorganismes afin d'augmenter le catabolisme et le cométabolisme des contaminants (Sylvestre *et al.*, 1991). En effet, les microorganismes possèdent des mécanismes physiologiques efficaces pour dégrader une large diversité de molécules aromatiques naturelles (Reineke & Knackmuss, 1988). Cependant, l'introduction des composés xénobiotiques d'une façon toujours croissante dans l'environnement, n'a pas toujours permis aux microorganismes de s'adapter et d'établir des mécanismes efficaces pour dégrader ces nouveaux composés (Chaudru & Chapalamadugu, 1991). Par contre, certains microorganismes possèdent un bon potentiel pour dégrader les polluants, mais souvent les conditions environnementales ne sont pas favorables ou adéquates pour permettre cette dégradation. C'est pourquoi la biorémédiation est une méthode prometteuse puisqu'elle permet d'optimiser, entre autres, les conditions physico-chimiques retrouvées *in situ*, favorisant ainsi la dégradation des contaminants par les microorganismes. La biorémédiation peut également s'effectuer par amendements des sols contaminés, en ajoutant des microorganismes déjà adaptés à un produit en particulier. Pour ce faire, il est essentiel de bien connaître la physiologie, le métabolisme ainsi que l'écologie des bactéries adaptées à la dégradation des

contaminants afin que le rendement de biorestauration soit optimal.

2. LA DÉSHALOGÉNATION

2.1 Généralités

L'étude de la déshalogénéation, et par conséquent des déshalogénases microbiennes, permet d'évaluer et de mieux comprendre le potentiel de dégradation des microorganismes envers les composés xénobiotiques dans leurs microcosmes naturels. Cela peut permettre de trouver de nouvelles solutions face aux problèmes environnementaux de pollution causés par ces composés xénobiotiques. L'amélioration des procédés existants de biorémédiation est une de ces solutions. Ceci peut être effectué en prenant en considération et en optimisant tous les paramètres qui influencent l'activité des déshalogénases lors de procédés de biorémédiation *in situ* (Fetzner et Lingens, 1994). De plus, une variété de mécanismes de déshalogénéation ont été démontrés en microcosmes, en cultures pures, ainsi que dans l'environnement. Donc une meilleure compréhension de ces mécanismes permettrait d'augmenter considérablement l'efficacité des stratégies de biorémédiation (Lee *et al.*, 1998). Par ailleurs, il existe plusieurs déshalogénases capables de catalyser le clivage de substituants halogénés tels que des composés haloaromatiques, haloalcanes, haloalcools et haloacides. La plupart des composés xénobiotiques qui doivent être traités dans l'environnement, se situe dans l'une de ces catégories.

2.2 Mécanismes

Sept mécanismes de déshalogénéation enzymatique qui permettent d'obtenir le

clivage du lien carbone-halogène d'un composé halogéné sont connus. Les mécanismes sont les suivants: La déshalogénéation réductrice (Figure 1a) consiste au remplacement du constituant halogéné par un hydrogène. La déshalogénéation oxygénolytique (Figure 1b) est catalysée par des monooxygénases ou des dioxygénases. Celles-ci incorporent un ou deux atomes d'oxygène dans le substrat. La déshalogénéation hydrolytique (Figure 1c) est catalysée par des halidohydrolases. Au cours de cette déshalogénéation, le substituant halogéné est remplacé dans une réaction de substitution nucléophile, par un groupement hydroxyle qui est dérivé de l'eau. La déshalogénéation thyolytique, quant à elle, (Figure 1d) survient chez des bactéries qui utilisent le dichlorométhane. Dans ce mécanisme, une enzyme glutathione *S*-transférase catalyse la formation d'un conjugué *S*-chlorométhyl glutathione et une déchloruration se produit simultanément lors de cette réaction. La substitution intramoléculaire (Figure 1e) est un mécanisme impliqué dans la déshalogénéation des alcools halogénés et mène à la formation de composés époxydes. La déshydrohalogénéation (Figure 1f) entraîne l'élimination de l'acide chlorhydrique de la molécule, ce qui mène à la formation d'une double liaison. Finalement, le dernier mécanisme est l'hydratation (Figure 1g). Dans ce dernier cas, une hydratase est responsable de l'addition d'une molécule d'eau à une liaison insaturée. Ceci mène à la déshalogénéation de composées vinyliques, comme l'acide 3-chloroacrylique, par une décomposition chimique de l'intermédiaire qui est instable (Fetzner et Lingens, 1994).

La déshalogénéation, qui permet de transformer les composés xénobiotiques retrouvés dans notre environnement, peut s'effectuer en conditions anaérobies ou aérobies. En conditions aérobies, les microorganismes impliqués utilisent différents mécanismes de dégradation dont la déshalogénéation oxygénolytique, la déshalogénéation hydrolytique et parfois la déshalogénéation réductrice. Pour plus d'informations sur les processus aérobies, il est suggéré de consulter les références suivantes: Chénier, 1997; Hardman, 1991 et Neilson, 1996.

2.3 La déshalogénéation réductrice

La déshalogénéation réductrice est le principal et souvent le seul mécanisme de biodégradation connu, capable de transformer les composés classés comme les plus toxiques et les plus persistants dans l'environnement (Mohn & Tiedje, 1992). Ces composés sont les suivants: les biphényles polychlorés (BPC) possédant un niveau élevé d'atome de chlore (plus que 7), l'hexachlorobenzène (HCB), le tétrachloroéthylène (PCE) et le pentachlorophénol (PCP). La déshalogénéation réductrice, qui a généralement lieu en conditions anaérobies, permet de diminuer la toxicité des composés et de les rendre plus facilement biodégradables pour d'autres microorganismes. Effectivement, les bactéries aérobies prennent souvent la relève, une fois que les micro-organismes anaérobies ont amorcé la biodégradation des composés récalcitrants. Ceci s'explique par le fait que les bactéries aérobies ont la capacité de déchlorer les molécules aromatiques faiblement substituées, tandis que les bactéries anaérobies sont reconnues pour leur capacité de déchlorer des composés aromatiques fortement substitués. En conditions anaérobies, les molécules fortement substituées sont transformées plus rapidement. Ceci est probablement dû à la génération d'ATP lors de la réaction de déshalogénéation (Neilson, 1994).

Plus précisément, la déshalogénéation réductrice consiste en l'enlèvement d'un substituant halogéné couplé à l'addition simultanée d'électrons à une molécule. Cette substitution peut s'effectuer selon deux processus. Le premier est l'hydrogénolyse, qui consiste au remplacement du substituant halogéné par un atome d'hydrogène. Le deuxième est la réduction vicinale, qui consiste en l'enlèvement de deux halogènes sur deux carbones adjacents, couplé à la formation d'une double liaison entre les atomes de carbone. La réduction vicinale peut s'effectuer seulement sur des molécules linéaires, tandis que l'hydrogénolyse peut survenir autant chez les alkyles que les aryles. Par ailleurs, les deux processus de substitution nécessitent un donneur

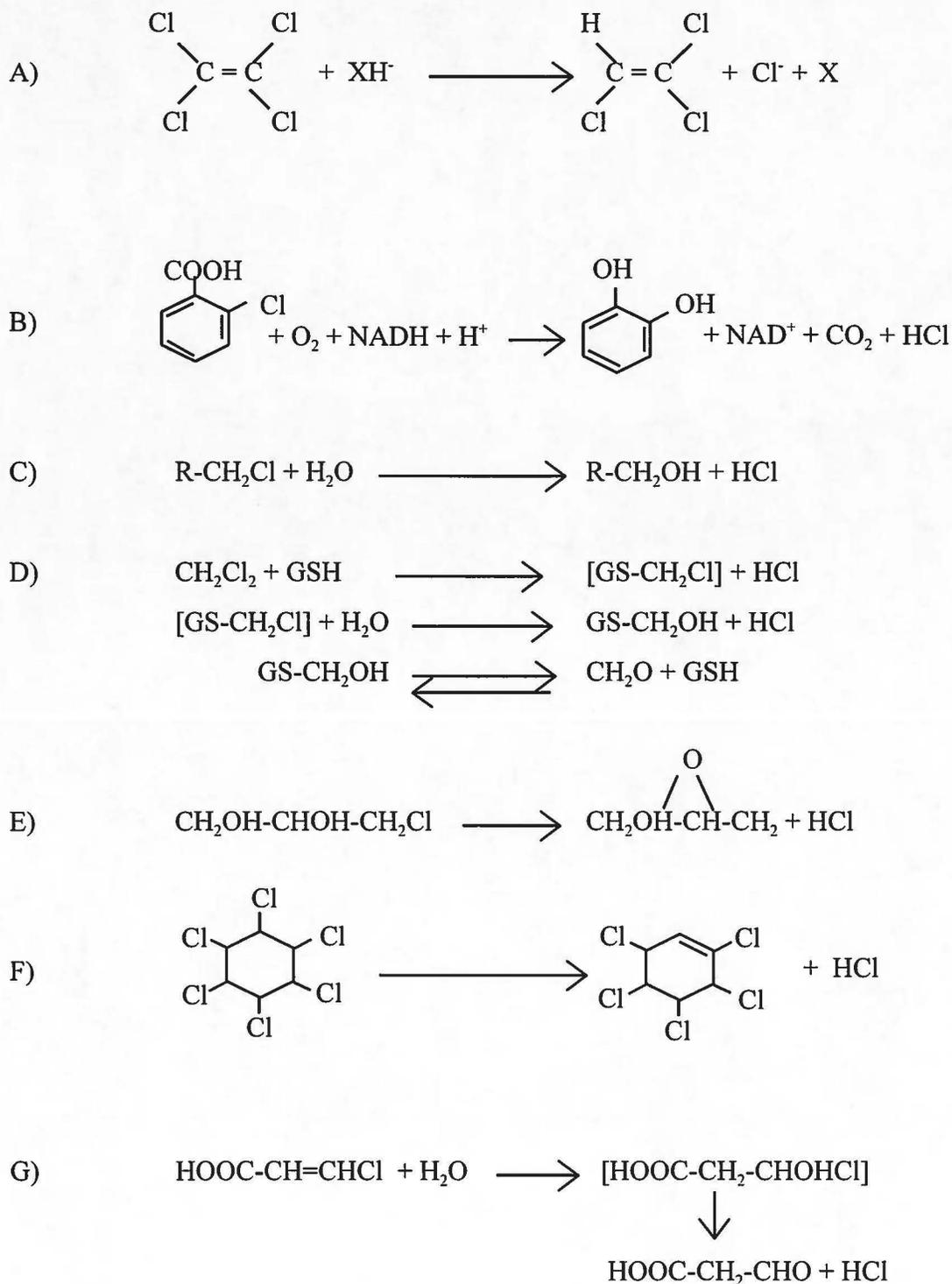


FIGURE 1: Mécanismes de déshalogénéation. (A) déshalogénéation réductrice; (B) déshalogénéation oxygénolytique; (C) déshalogénéation hydrolytique; (D) déshalogénéation thiolitique; (E) substitution intramoléculaire; (F) déshydrohalogénéation; (G) hydratation. Modifiée de Fetzner & Lingens (1994).

d'électrons (Mohn & Tiedje, 1992).

Cependant, en ce qui concerne le métabolisme microbien, les composés halogénés peuvent être transformés par les microorganismes en conditions anaérobies selon deux voies majeures. Tout d'abord, les composés halogénés sont de plus forts oxydants que le nitrate, donc ils peuvent servir d'accepteurs d'électrons dans un processus de respiration anaérobie qui respecte les règles thermodynamiques (Holliger *et al.* 1993). Ceci implique que la déshalogénéation réductrice est un mode de respiration cellulaire. Ce processus constitue la première voie et se nomme halorespiration. L'halorespiration se produit lorsque les composés halogénés sont utilisés comme accepteur d'électrons et que l'énergie nécessaire à la croissance des bactéries est générée par des réactions exergoniques de déshalogénéation (Holliger & Schraa, 1994). Contrairement à la première, la deuxième voie qui est le co-métabolisme, n'est pas avantageuse pour les microorganismes. Le co-métabolisme est une modification d'un composé xénobiotique qui a été produite par des enzymes ou des cofacteurs qui catalysent normalement d'autres réactions (Holliger & Schraa, 1994). La déshalogénéation de ces composés xénobiotiques est dite fortuite puisque cette transformation n'est pas avantageuse en terme énergétique pour les bactéries (Fantroussi *et al.*, 1998).

En résumé, la déshalogénéation réductrice est le principal mécanisme connu qui permet de biotransformer des composés toxiques et récalcitrants tels que les BPC, le HCB, le PCE et le PCP (Gerritse *et al.* 1996). Étant donné la pollution importante due à la présence de ces composés dans l'environnement, il est essentiel d'étudier et d'isoler des organismes capables d'effectuer cette réaction.

3. SOUCHES BACTÉRIENNES UTILISANT LA DÉSHALOGÉNATION RÉDUCTRICE

Quelques bactéries anaérobies utilisant la déshalogénéation réductrice ont été isolées dans les dernières années. Ces bactéries sont les suivantes: *Desulfomonile tiedjei*, *Desulfitobacterium dehalogenans*, *Desulfitobacterium hafniense*, *Desulfitobacterium* souche PCE-1, *Desulfitobacterium chlororespirans*, *Desulfitobacterium frappieri*, *Dehalospirillum multivorans*, *Dehalobacter restrictus*, *Dehalococcoides ethenogenes* souche 195, la souche TT4B et la souche 2CP-1. Elles seront décrites dans la présente section, ainsi que présentées sous forme de résumé dans le tableau 1 (voir page 32).

3.1 *Desulfomonile tiedjei* souche DCB-1

Le premier microorganisme, effectuant la déshalogénéation réductrice, à avoir été isolé est *Desulfomonile tiedjei* (Shelton & Tiedje, 1984). Cette bactérie a été isolée d'un consortium méthanogène qui a été enrichi à partir de boues anaérobies. C'est un bâtonnet, de coloration Gram négative, anaérobie stricte, non-mobile, non-sporulant et qui possède une structure inhabituelle en forme de collet qui entoure chaque cellule. Ce collet serait impliqué dans la division bactérienne. Son contenu en bases G+C a été établi à 49 % mol. (Stevens *et al.*, 1988). Cette bactérie peut croître sur une variété de composés comme le pyruvate, le formate, le vanillate et le H₂-CO₂ (Stevens *et al.*, 1988). De plus, *Desulfomonile tiedjei* est capable de soutirer de l'énergie pour son métabolisme, de la déchloruration du 3-chlorobenzoate (3CB) en benzoate, en utilisant le 3CB comme accepteur d'électrons. DCB-1 est donc capable d'effectuer la respiration anaérobie soit l'halorespiration. Ce processus dans le cas de DCB-1, consiste au couplage de l'oxydation d'une source de carbone: le formate, avec la déshalogénéation réductrice du 3CB (Mohn & Tiedje, 1992). La synthèse de l'ATP est donc directement supportée par l'activité de déshalogénéation. La déshalogénéation supporte la translocation des protons par la cellule, ce qui mène à la formation d'une

force motrice de protons. L'effet négatif des inhibiteurs du processus de respiration, sur l'efficacité de la synthèse d'ATP dépendante de la déshalogénéation, suggère que la force motrice de protons couple la déshalogénéation et la synthèse d'ATP via une ATPase qui permet l'entrée des protons dans la cellule (Mohn & Tiedje, 1992).

Par ailleurs, *D. tiedjei* est capable d'utiliser le sulfate, le sulfite et le thiosulfate comme accepteurs d'électrons. En l'absence de ces accepteurs d'électrons, la souche DCB-1 est capable de déshalogéner le 3CB, le tétrachloroéthylène, le pentachlorophénol et plusieurs autres chlorophénols, après avoir été induite par un benzoate substitué en position *meta*, par un benzyl alcool ou par un benzamide (Ni *et al.*, 1995). Les atomes de brome et d'iode peuvent être enlevés à toutes les positions, tandis que les atomes de chlore peuvent l'être seulement en position *meta* (Mohn & Kennedy, 1992). L'activité de déshalogénéation chez *D. tiedjei* peut être induite par plusieurs composés qui ne sont pas des substrats, donc des inducteurs gratuits. De plus, plusieurs substrats ne sont pas des inducteurs de l'activité de déshalogénéation. Les inducteurs doivent être substitués à la position *meta*, mais l'activité de déshalogénéation peut s'effectuer aux positions *ortho* et *para*. Certains substituants en position *meta* des inducteurs, ne peuvent pas être transformés tels que les groupements F, CH₃ et CF₃ (Mohn & Tiedje, 1992).

Le taux maximal de déchloruration du PCP qui a été observé chez la souche DCB-1 était de 54 $\mu\text{mol de Cl}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ g de protéines}^{-1}$ (Mohn & Kennedy, 1992). L'induction par le 3-chlorobenzoate est essentielle à la déshalogénéation du PCP. Cependant, le PCP et le 3-chlorophénol ne peuvent servir d'inducteurs pour cette réaction de déshalogénéation. Les monochlorophénols ne sont pas transformés par *D. tiedjei*, pas même le 3-chlorophénol. Ceci est surprenant étant donné que le microorganisme possède la capacité de déshalogéner le 3-chlorobenzoate. La déchloruration des chlorophénols s'effectue toujours en position *meta*, les substituants en positions *ortho* ou *para* ne sont jamais enlevés. La transformation complète d'un

substrat par la souche DCB-1 est observée seulement lorsque l'énergie libre de Gibbs, de la réaction de déshalogénéation, se situe en dessous de $-140 \text{ kJ réaction}^{-1}$ (Mohn & Kennedy, 1992). Ce niveau d'énergie correspond généralement aux composés fortement chlorés, comme le PCP et les TeCP. C'est pourquoi les substrats fortement chlorés sont transformés plus complètement par *D. tiedjei* pendant une incubation de 20 heures, que les composés possédant moins d'atomes de chlore (Mohn & Kennedy, 1992). L'incapacité des chlorophénols d'induire la déshalogénéation chez *D. tiedjei*, suggère une réaction de déchloruration fortuite. Cette réaction n'est donc pas un résultat de la sélection naturelle. Cependant, puisque la déshalogénéation du PCP est avantageuse pour la souche DCB-1, Mohn et Kennedy (1992) suggère qu'il serait possible qu'une sélection naturelle en présence de PCP puisse mener à une activité constitutive de déshalogénéation ou même à un mécanisme d'induction par le PCP.

En plus de dégrader des composés aromatiques halogénés, *D. tiedjei* possède l'habileté de déchlorer le tétrachloroéthylène (PCE) en trichloroéthylène (TCE). En culture pure, le microorganisme dégrade approximativement 180 nmol de PCE par 50 mL en 6 semaines (Fatherpure *et al.*, 1987). Par la suite, le TCE peut être transformé en *cis*-dichloroéthylène. Le 3-fluorobenzoate (un analogue du 3CB) peut servir d'inducteur à l'activité de déshalogénéation du PCE et du TCE. Cependant, le taux de transformation du PCE en TCE ($22 \mu\text{mol-g de protéines}^{-1}\text{-h}^{-1}$) est considérablement plus élevé que le taux de transformation du TCE en DCE ($5,5 \mu\text{mol-g de protéines}^{-1}\text{-h}^{-1}$) (Fantroussi *et al.*, 1998). Finalement, il a été démontré que l'activité de déchloruration du tétrachloroéthylène et du 3-chlorobenzoate était co-induite chez la souche DCB-1 (Cole *et al.*, 1995).

3.2 Desulfitobacterium dehalogenans

Isolée en 1994 et première de son genre, *Desulfitobacterium dehalogenans* JW/IU-DC1 a été enrichie à partir de sédiments méthaniques provenant d'un lac. Cette bactérie est un bâtonnet de 2,5 à 4 µm de longueur et de 0,5 à 0,7 µm de largeur, anaérobie, mobile, non-sporulante et de coloration Gram positive. Son contenu en bases G+C de l'ADN génomique est de 45 % mol. *D. dehalogenans* réduit le sulfite et le thiosulfate en sulfure, tandis qu'il réduit le nitrate en nitrite et le fumarate en succinate. Le sulfate, quant à lui, ne peut être réduit. La seule source de carbone capable de soutenir la croissance de *D. dehalogenans*, en présence de 0,1% d'extraits de levures, en conditions anaérobies est le pyruvate. Par ailleurs, ce microorganisme croît en présence de 0,1% d'extraits de levures, lorsque le pyruvate, le lactate, le formate ou le dihydrogène sont utilisés comme donneurs d'électrons pour la déshalogénéation réductrice du 3-chloro-4-hydroxyphénylacétate (3-Cl-4-OHPA), qui est alors utilisé comme accepteur d'électrons (Utkin *et al.*, 1994). La température optimale de croissance de *D. dehalogenans* est de 38°C et le pH optimal est de 7,5. Dans ces conditions, le temps de génération est approximativement de 3,5 heures (Utkin *et al.*, 1994).

En plus d'effectuer, la déshalogénéation du 3-Cl-4-OHPA, ce microorganisme est capable d'effectuer la déshalogénéation de plusieurs chlorophénols (Utkin *et al.*, 1995). Lorsque *D. dehalogenans* JW/IU-DC1 croît dans un milieu contenant du pyruvate et du 3-Cl-4-OHPA, qui agit comme accepteur d'électrons et d'inducteur à la déshalogénéation réductrice, les composés suivants peuvent être déchlorés en position *ortho*: le PCP, les TeCPs, le 2,3,4-TCP, le 2,3,6-TCP, le 2,4,6-TCP, le 2,3-DCP, le 2,4-DCP et le 2,6-DCP. En plus, de ces composés, ce microorganisme est capable, dans les mêmes conditions de déshalogéner le 2-bromophénol, le 2,6-dibromophénol, le 2-bromo-4-chlorophénol, le 2,6-dichloro-4-R-phénols, où R est un groupement -H, -F, -Cl, -NO₂, -CO₂⁻ ou COOCH₃, et le 2-chloro-4-R-phénols, où R est -H, -F, -Cl, -Br, -NO₂, -CO₂⁻, CH₂CO₂⁻ ou COOCH₃ (Utkin *et al.*, 1995).

Cependant, *D. dehalogenans* est incapable de déshalogéner les 3 et 4-monochlorophénols, le 2,5-DCP, le 3,4-DCP, le 3,5-DCP, le 2,3,5-TCP, le 2,4,5-TCP, le 3,4,5-TCP et l'analogue fluoré du 3-chloro-4-hydroxyphénylacétate: le 3-F-4-OHPA (Utkin *et al.*, 1995). Un substituant chloré en position *ortho* (6), *meta* (3) ou *para* (4), favorise la déchloruration à la position *ortho* (2), tandis qu'un chlore en position *meta* (5) a un effet négatif et peut même inhiber la déchloruration à la position *ortho* (2) (Utkin *et al.*, 1995). Généralement, les composés 2,6-dichloro-4-R-phénols sont déshalogénés plus rapidement que les composés correspondants 2-chloro-4-R-phénols ayant le même groupement R. De plus, les produits ayant la capacité d'induire la réaction de déshalogénation sont le 3-Cl-4-OHPA ainsi que la plupart des 2-chloro-4-R-phénols et leurs analogues bromés. Par contre, les produits 2,6-dichloro-4-R-phénols ne peuvent induire la réaction (Utkin *et al.*, 1995). Donc *D. dehalogenans* effectue la déshalogénation réductrice avec une très haute spécificité pour la position *ortho*.

Finalement, lorsque le formate est utilisé comme donneur d'électrons et que le 3-chloro-4-hydroxyphénylacétate est utilisé comme accepteur d'électrons, il a été démontré que les rendements de croissance obtenus confirment que *D. dehalogenans* produit et conserve de l'énergie. Cette énergie est obtenue du couplage de la déshalogénation réductrice du 3-Cl-4-OHPA et de l'oxydation du formate (Mackiewicz & Wiegel, 1998).

3.3 *Desulfitobacterium hafniense* souche DCB-2

Desulfitobacterium hafniense provient d'un consortium stable, capable de déchlorer certains trichlorophénols (TCP), retrouvé dans des boues municipales. Cette bactérie est un bâtonnet incurvé de 3,3 à 6 µm de longueur et de 0,6 à 0,7 µm de

largeur. Elle est mobile, sporulante, anaérobie stricte et les cellules en phase exponentielle ou stationnaire sont Gram négative (Christiansen & Ahring, 1996). Ce microorganisme ne peut croître en présence d'oxygène mais conserve tout de même sa mobilité. Après une exposition de 24 heures à l'oxygène, *D. hafniense* peut poursuivre sa croissance, si elle est remise à nouveau en conditions anaérobies (Madsen & Licht, 1992). La souche DCB-2 n'hydrolyse pas la gélatine et est indole positif et catalase négative. Sa température optimale de croissance est de 37°C et seulement le pyruvate et le tryptophane peuvent être utilisés comme substrats. Lorsque du sulfite ou du thiosulfate sont ajoutés comme accepteurs d'électrons au milieu contenant du pyruvate, la souche DCB-2 produit du sulfure. Par contre, le sulfate n'est pas transformé en sulfure en présence de pyruvate ou de d'autres sources de carbone communes aux bactéries réductrices de sulfate (Christiansen & Ahring, 1996). Par ailleurs, des cytochromes *c* ont été détectés chez cette souche et son contenu en bases G+C a été établi à 47 % mol. Son pourcentage d'homologie de séquence d'ARN 16S avec *D. dehalogenans* est de 97.4%.

D. hafniense est capable de déchlorer plusieurs chlorophénols (Madsen & Licht, 1992). En effet, en présence de pyruvate, le 2,4,6-trichlorophénol est transformé en acétate, en CO₂ et en 4-chlorophénol (Christiansen & Ahring, 1996). La souche DCB-2 est capable d'effectuer la déshalogénéation réductrice des substances suivantes: le PCP, le 2,4,5-TCP, le 2,4,6-TCP et le 2,4-DCP. Ces composés sont déchlorés en position *ortho*, quoique la déchloruration ne soit pas limitée à cette position, puisque le 3,5-DCP est transformé en 3-MCP (Fantroussi *et al.* 1998). Cependant, *D. hafniense* est incapable d'éliminer un substituant en position *para*, ainsi que de déchlorer les monochlorophénols. Le taux maximal de déchloruration du 2,4,6-TCP par la souche DCB-2 est de 1,8 mmol de Cl⁻ ·h⁻¹·g de protéines⁻¹. Tandis que le taux de déchloruration du PCP est seulement de 29 µmol de Cl⁻ ·h⁻¹·g de protéines⁻¹ (Madsen & Licht, 1992). Finalement, il a été démontré dernièrement que la souche DCB-2 était capable de produire de l'énergie de la déshalogénéation du 3-chloro-4-

hydroxyphénylacétate (Christiansen & Ahring, 1996).

3.4 *Desulfitobacterium* sp. souche PCE-1

Desulfitobacterium sp. souche PCE-1 a été isolée à partir d'enrichissements d'une culture qui dégradait le tétrachloroéthylène (PCE). Cette bactérie est un bâtonnet incurvé de 2 à 3 µm de longueur et de 0,6 à 0,8 µm de largeur, anaérobie, mobile, non-sporulante et de coloration Gram positive. Cette bactérie est mobile puisqu'elle possède quatre flagelles latéraux (Gerritse *et al.*, 1996). Elle possède également des cytochromes *c*. La souche PCE-1 peut croître en présence de L-lactate, pyruvate, butyrate, formate, succinate ou d'éthanol comme donneurs d'électrons. De plus, elle peut utiliser le sulfite, le thiosulfate, le fumarate, le PCE, le 2-monochlorophénol, le 2,4,6-trichlorophénol et le 3-chloro-4-hydroxyphénylacétate comme accepteurs d'électrons (Gerritse *et al.*, 1996). La croissance optimale de la souche PCE-1 s'effectue à une température de 34 à 38°C et à un pH de 7,2 à 7,8.

Cette bactérie transforme le PCE, par déshalogénéation réductrice, en trichloroéthylène (TCE) et en petites quantités de *cis*-1,2-dichloroéthylène et de *trans*-1,2-dichloroéthylène (Gerritse *et al.*, 1996). Elle est également capable de déshalogéner certains chlorophénols en position *ortho* tels que le 2,4,6-TCP jusqu'au 4-monochlorophénol et le 2-monochlorophénol en phénol. Tous les autres chlorophénols ne peuvent être déchlorés par cette bactérie. Cependant, le 3-Cl-4-OHPA est transformé en 4-hydroxyphénylacétate en présence de lactate, qui sert à supporter la croissance.

La déshalogénéation réductrice du PCE et du 3-Cl-4-OHPA permet à la souche

de croître en présence de formate, démontrant ainsi que l'utilisation de ces composés comme accepteurs d'électrons est couplée à la synthèse d'ATP. Donc cette souche est capable d'effectuer le processus d'halorespiration. De plus, la souche PCE-1 serait vraisemblablement la première bactérie capable de croître en utilisant la déshalogénéation réductrice tant des composés aromatiques que des composés aliphatiques (Gerritse *et al.*, 1996).

Par ailleurs, l'analyse de séquence de l'ARN 16S a révélé que *Desulfitobacterium* souche PCE-1, démontre 99,3% d'homologie avec la séquence de *Desulfitobacterium dehalogenans*. Ce très haut pourcentage suggère que la souche PCE-1 est une nouvelle souche de *D. dehalogenans* ou encore une espèce génomique très rapprochée (Fantroussi *et al.*, 1998).

3.5 *Desulfitobacterium chlororespirans* souche Co23

Desulfitobacterium chlororespirans, souche Co23, a été enrichie à partir de sols compostés, en utilisant son habileté à croître avec le 2,3-DCP comme accepteur d'électrons (Sanford *et al.*, 1996). Ce microorganisme est un bâtonnet incurvé de 3 à 5 µm de longueur et de 0,5 à 1 µm de largeur, anaérobie, sporulant, mobile et de coloration Gram négative. *D. chlororespirans* peut utiliser comme donneurs d'électrons, pour la déshalogénéation réductrice, le lactate, le pyruvate, le formate, le butyrate, le crotonate et le dihydrogène. Cette bactérie utilise également le sulfite, le thiosulfate et le soufre comme accepteurs d'électrons nécessaires lors de sa croissance, mais est incapable d'utiliser le sulfate, le fumarate ou le nitrate (Sanford *et al.*, 1996).

De plus, *D. chlororespirans* peut croître par halorespiration en couplant

l'oxydation du lactate et la déshalogénéation réductrice du 3-chloro-4-hydroxybenzoate (3Cl-4-HBA) en 4-hydroxybenzoate. La température optimale de croissance est de 37°C, mais l'activité de déchloruration est optimale à 45°C et celle-ci persiste à une température aussi élevée que 55°C (Sanford *et al.*, 1996). Le temps de génération de la souche Co23 est de 15,4 heures à 30°C, lorsqu'elle est dans un milieu contenant du pyruvate comme seule source de carbone et d'énergie.

Comme il a été mentionné auparavant, *D. chlororespirans* est capable de déshalogéner le 3Cl-4-HBA, qui s'avère être le meilleur accepteur d'électrons. Cependant, elle est également capable de déshalogéner en position *ortho* des composés phénoliques chlorés qui possèdent deux substituants halogénés ou plus, à l'exception du 2,4-DCP, du 2,5-DCP, du 2,3,5-TCP et du PCP. Elle ne démontre aucune activité de déshalogénéation envers les composés monohalogénés. Par contre, la souche Co23 transforme le 2,4,6-tribromophénol en 4-bromophénol. Les seuls composés monochlorés qui peuvent être utilisés comme accepteurs d'électrons, par ce microorganisme, sont le 3Cl-4-HBA et le 3-chloro-4-hydroxyphénylacétate (Sanford *et al.*, 1996). La séquence en ARN 16S de *D. chlororespirans* est similaire aux séquences de *D. dehalogenans*, *Desulfitobacterium* sp. souche PCE-1 et *D. hafniense*, respectivement à 97,2, 96,8, et 98,5% (Fantroussi *et al.* 1998).

3.6 *Desulfitobacterium frappieri* souche PCP-1, origine et travaux antérieurs

Un consortium anaérobie capable de dégrader le PCP par fermentation méthanique a été obtenu dans le laboratoire du Docteur Réjean Beaudet (Juteau *et al.*, 1995a). Ce consortium provient d'un enrichissement qui a été effectué à partir de sols contaminés au PCP et à partir de réacteurs anaérobies contenant des boues provenant d'une usine de traitement des eaux usées. La déchloruration du PCP était observée

lorsque du glucose, du formate, du lactate ou de l'extrait de levures était présent dans le milieu comme source secondaire de carbone. Par contre, l'acétate n'était pas un bon substrat pour supporter la déchloruration. Le consortium était capable de déshalogéner différents chlorophénols dans l'ordre d'efficacité suivante: *ortho*>*meta*>*para* (Juteau *et al.*, 1995a). Ce consortium s'est avéré très efficace à dégrader le PCP puisque le taux de déchloruration était de 96 µmol/(L·jour) à 37°C (Juteau *et al.* 1995a). L'analyse des intermédiaires de dégradation proposait que la voie principale de déchloruration du PCP était la suivante: PCP → 2,3,5,6-tétrachlorophénol (TeCP) → 2,3,5-trichlorophénol (TCP) → 3,5-dichlorophénol (DCP) → 3-monochlorophénol (MCP) → phénol (Juteau *et al.* 1995b). La transformation rapide du PCP en 3-MCP malgré un chauffage à 80°C pendant 1 heure, suggérait que les bactéries responsables de la dégradation étaient sporulantes. De plus, la déchloruration du 3-MCP était complètement inhibée par un traitement à la chaleur ou en présence d'acide 2-bromoéthanosulfonique (BESA), ce qui suggérait l'implication de microorganismes syntrophiques (Juteau *et al.*, 1995a).

Par la suite Bouchard *et al.* (1996), ont isolé la bactérie anaérobie, responsable de la déchloruration du PCP en 3-MCP, du consortium méthanogène. Cette bactérie, souche PCP-1 appartient au genre *Desulfitobacterium* et à une nouvelle espèce dite *frappieri*. *D. frappieri* est un bacille de 2,2 à 4,5 µm de longueur et de 0,7 µm de largeur. Cette bactérie est anaérobie stricte, non-flagellée et présente une endospore terminale et déformante.

La coloration de Gram s'est avérée négative, cependant l'étude de la bactérie par microscopie électronique a révélé que la paroi était de type Gram positif. De plus, le contenu en bases G+C de l'ADN génomique a été estimé à 46% mol. La séquence d'ARN 16S de *D. frappieri* démontre une homologie de 96,8% à celle de *Desulfitobacterium dehalogenans* (Bouchard *et al.*, 1996). *D. frappieri* est positive pour la formation d'indole, faiblement positive pour l'activité de la catalase et

négative pour l'hydrolyse de l'urée et de l'esculine. De plus, la bactérie est négative pour la fermentation du glucose, du mannitol, du lactose, du saccharose, du maltose, de la salicine, du xylose, de l'arabinose, du glycérol, de la cellobiose, du mannose, du melezitose, du raffinose, du sorbitol, du rhamnose et du tréhalose ainsi que pour la liquéfaction de la gélatine. Donc la souche PCP-1 est asaccharolytique. Contrairement au sulfate, le sulfite, le thiosulfate et le nitrate stimulent la croissance de la souche en présence de pyruvate et d'extraits de levures. La croissance optimale se situe à une température de 38°C et à un pH de 7,5. Le temps de génération dans le milieu de Boyd, contenant 20 mM de pyruvate, 0,02% d'extraits de levures, 5 mg/l de PCP, à température et pH optimum était d'environ 3 heures. *D. frappieri* est la seule bactérie capable de déchlorer différents chlorophénols aux positions *ortho*, *meta* et *para*. Cependant, certains chlorophénols ne sont pas déchlorés comme le 2,3-DCP, le 2,5-DCP, le 3,4-DCP ainsi que les monochlorophénols. La voie de déchloration empruntée par la souche PCP-1 a été établie comme étant la suivante: PCP → 2,3,4,5-TeCP → 3,4,5-TCP → 3,5-DCP → 3-MCP. Il semble que deux systèmes enzymatiques soient impliqués dans la déchloration du PCP par *D. frappieri*, puisque la cinétique de déchloration montre un temps de latence entre la déchloration du 3,4,5-TCP et l'apparition du 3,5-DCP (Bouchard, 1995). Un premier système serait responsable de la déchloration de la position *ortho* et le second inductible, serait responsable de la déchloration aux positions *meta* et *para* (Bouchard *et al.*, 1996).

De plus, Dennie *et al.* (1998) ont démontré que l'activité de déchloration aux positions *ortho* et *meta* de *D. frappieri* souche PCP-1 pouvait être induite par la présence de différents chlorophénols. Un taux de déshalogénération variant de 25 à 1,158 nmol/min/mg de protéines a été observé, selon le chlorophénol étudié et la position d'enlèvement du chlore sur la molécule. *D. frappieri* possède un spectre large de spécificité de substrats. En plus de déshalogéner le tétrachloroéthylène (PCE) et le pentachloropyridine, la souche PCP-1 est capable de déshalogéner aux positions *ortho*, *meta* et *para* plusieurs molécules aromatiques qui sont substituées par des

groupements hydroxyle ou amine. En voici la liste: 2,4,6-tribromophénol, tétrachlorocatéchol, tétrachloroguaiacol, tétrachlorovératrole, pentachloroanisole, pentachloroaniline, pentachloronitrobenzène, 3,5-dichloro-4-hydroxybiphényle, 2,3,5,6-tétrachloroaniline, et 3-chloro-4-hydroxyphénylacétate. Des réactions de O-déméthylation et la réduction, sur les molécules aromatiques, de groupements nitro en groupements amine ont également été observées.

Par ailleurs, des traitements en sol ont été effectués avec le consortium méthanogénique dégradant le PCP ainsi qu'avec la souche PCP-1. En effet, la biodégradation anaérobie du PCP, présent dans un sol pollué provenant d'une usine de traitement du bois, a été étudiée en microcosmes de type slurry (Beaudet *et al.*, 1998). Lorsque les microcosmes contenant 10%-40% (p/v) de sol étaient inoculés avec le consortium, plus de 90% du PCP était transformé en moins de 30 jours à 29°C. L'inoculation de ces microcosmes avec la souche PCP-1 permettait également d'observer une dégradation rapide du PCP en 3-chlorophénol. La concentration de PCP dans un sol pouvant être transformé par *D. frappieri*, était de plus de 200 mg PCP/ kg de sol. La souche PCP-1 a donc un bon potentiel pour le traitement anaérobie de sols pollués au PCP.

Une méthode a également été mise au point afin de suivre et de quantifier *D. frappieri* dans les sols (Lévesque *et al.*, 1998). Cette méthode utilise la réaction compétitive de polymérisation en chaîne (RcPC) qui permet de quantifier la souche PCP-1 dans une population bactérienne mixte. La RcPC a été effectuée avec des amorces spécifiques au gène d'ARNm 16S de la souche PCP-1.

3.7 Dehalospirillum multivorans

Dehalospirillum multivorans est une bactérie anaérobie stricte, qui a été isolée de boues activées n'ayant jamais été exposées aux chloroéthylènes, dans un milieu défini contenant du pyruvate (20 mM) et du PCE (0.2 mM), comme seule source de carbone (Scholz-Muramatsu *et al.*, 1995). Selon l'analyse de séquence de l'ARN 16S, *D. multivorans* appartiendrait à un nouveau genre et à une nouvelle espèce bactérienne. Cette bactérie est un spirillum, non-sporulant, de coloration Gram négative et qui possède des quinones, des corrinoïdes et des cytochromes *b* et *c*. Son contenu en bases G+C a été établi à 41,5 % mol. *D. multivorans* déshalogène le PCE via le trichloroéthylène, jusqu'au *cis*-1,2-dichloroéthylène (DCE) (Scholz-Muramatsu *et al.*, 1995).

D. multivorans croît dans un milieu défini en se servant du PCE et du dihydrogène comme sources d'énergie et de l'acétate comme source de carbone. Le PCE peut être remplacé par le fumarate ou le nitrate qui servent en fait d'accepteurs d'électrons, mais pas par le sulfate. En plus du dihydrogène, le pyruvate, le lactate, l'éthanol, le formate et le glycérol peuvent servir de donneurs d'électrons (Fantroussi *et al.*, 1998). Dans des conditions optimales, c'est-à-dire à un pH de 7,3 à 7,6, à une température de 30°C et en présence de pyruvate (20 mM) et de PCE (180 µM) le taux maximal de déchloruration observé est de 50 nmol min⁻¹ (mg de protéines)⁻¹ et le temps de génération est de 2,5 heures (Scholz-Muramatsu *et al.*, 1995). L'habileté de *D. multivorans* de réduire le PCE en DCE semble constitutive, puisque les cultures bactériennes qui ont subi plusieurs passages en absence de PCE commencent à déshalogéner ce composé dès qu'elles sont mises en sa présence. Cette bactérie est également capable de coupler le transfert d'électrons provenant du dihydrogène ou du formate au PCE avec la conservation de l'énergie (Scholz-Muramatsu *et al.*, 1995). Donc elle peut tirer de l'énergie de la déshalogénéation par halorespiration.

3.8 *Dehalobacter restrictus* souche PER-K23

Dehalobacter restrictus PER-K23 a été isolée d'une culture enrichie au PCE, provenant d'un réacteur contenant des sédiments anaérobies du Rhin (Pays-Bas) et des boues granulaires anaérobies provenant d'une raffinerie de sucre. Cette culture est capable de transformer le PCE en éthane, via le trichloroéthylène, le *cis*-1,2-dichloroéthylène (*cis*-1,2-DCE), le chloroéthylène et l'éthylène. La souche PER-K23, isolée de cette culture, est un bâtonnet anaérobie Gram négatif (Holliger *et al.*, 1993).

D. restrictus utilise l'halorespiration, puisse qu'elle catalyse la déchloruration du PCE (via le TCE) en *cis*-1,2-DCE et qu'elle couple cette déshalogénéation réductrice avec sa capacité de croissance. La déchloruration est optimale à un pH de 6,8 à 7,6 et à une température de 25 à 35°C. Le dihydrogène et le formate sont les seuls donneurs d'électrons qui peuvent supporter la croissance de ce microorganisme, en présence de PCE ou de TCE comme accepteurs d'électrons (Holliger *et al.*, 1993). Les autres donneurs d'électrons ou source de carbone qui ont été étudiés et qui ne peuvent être utilisés par la bactérie sont: le lactate, le pyruvate, le propionate, le butyrate, l'acétate, le succinate, le glucose, le fructose, l'éthanol, l'aspartate, etc. De plus, *D. restrictus* est incapable de croître en absence de PCE et de TCE. En effet, aucun des accepteurs d'électrons utilisés normalement par les bactéries anaérobies: oxygène, nitrate, nitrite, sulfate, sulfite, thiosulfate, soufre, CO₂, n'a pu remplacer le PCE ou le TCE lorsque le dihydrogène était utilisé comme donneur d'électrons. Plusieurs accepteurs d'électrons organiques ont été également essayés, entre autres, le fumarate, la glycine, les DCEs et les chloroéthylènes et aucun d'eux n'est utilisé par la bactérie. *D. restrictus* possède donc un spectre d'activité très étroit. Ceci est intéressant puisque cette caractéristique est habituellement réservée aux bactéries méthanogènes (Holliger *et al.*, 1993). Par ailleurs, la souche PER-K23 est la première bactérie décrite qui dépend entièrement d'un hydrocarbure chloré comme accepteur

d'électrons, soit le PCE ou le TCE. Cette particularité est étonnante puisque les éthylènes chlorés ne sont pas d'origine naturelle. Ils n'ont pas été présents dans l'environnement avant le début de leur utilisation industrielle, c'est-à-dire il y a une cinquantaine d'années (Holliger *et al.*, 1993).

Comme il a été mentionné dans le paragraphe précédent, *D. restrictus* utilise l'halorespiration. Des études effectuées plus en profondeur ont permis de construire un modèle de la chaîne respiratoire chez cette bactérie (voir figure 2) (Schumacher & Holliger, 1996). Les auteurs ont démontré que *D. restrictus* possédait une menaquinone liée à la membrane, une molécule jouant possiblement le rôle de médiateur entre l'hydrogénase et la tétrachloroéthylène réductase, deux enzymes qui avaient été préalablement identifiées. De plus, des cytochromes de type *b*, dans la membrane cytoplasmique de cette bactérie ont été identifiés, mais leur rôle dans le transfert des électrons du H₂ au PCE n'a pas été prouvé. Le modèle de la figure 2 illustre la direction de l'échange protonique qui est associée avec les réactions redox effectuées par la menaquinone, pendant le transfert des électrons du H₂ au tétrachloroéthylène. Tout d'abord, l'oxydation du H₂ est catalysée par la déshydrogénase dans l'espace périplasmique. Ceci résulte en un relâchement de deux protons dans le périplasme simultanément au transport transmembranaire des électrons jusqu'à la PCE réductase située dans le cytoplasme. Finalement, la réduction du PCE en *cis*-1,2-dichloroéthylène mène à la consommation de 1 proton par atome de chlore (Cl⁻) relâché (Schumacher & Holliger, 1996).

La tétrachloroéthylène réductase, qui possède une masse moléculaire de 60 kDa, a récemment été purifiée (Schumacher *et al.*, 1997). De plus, certains groupes prothétiques de l'enzyme ont été étudiés. Cette étude a révélée que l'enzyme possédait une cobalamine et deux groupements Fe₄S₄ qui seraient impliqués dans le transfert des électrons.

3.9 *Dehalococcoides ethenogenes* souche 195

Dehalococcoides ethenogenes a été isolé d'un enrichissement de culture qui transformait le PCE en éthylène. Cette bactérie peut utiliser le méthanol, le dihydrogène ou le butyrate comme donneurs d'électrons. *D. ethenogenes* souche 195 est la seule bactérie anaérobie isolée capable de déshalogéner le PCE jusqu'à l'éthylène (Maymo-Gatell *et al.*, 1997). Les caractéristiques physiologiques de la souche révèlent que celle-ci nécessite du dihydrogène afin de réduire le PCE et que la condition pour sa croissance est que le dihydrogène et le PCE, soit tous deux présents, comme donneur et accepteur d'électrons (Fantroussi *et al.*, 1998). De plus, la souche 195 a besoin pour croître, d'extraits de la culture bactérienne mixte d'où elle a été isolée. Par ailleurs, les cultures microbiennes de *D. ethenogenes* transforment plus de 90% du PCE, en chlorure de vinyle et en éthylène. Le PCE est métabolisé en chlorure de vinyle à un taux de 40 $\mu\text{mol}/\text{heure}/\text{litre}$ de milieu de culture (Fantroussi *et al.*, 1998).

3.10 La souche TT4B

La souche TT4B a été isolée de sédiments anaérobies qui avaient été contaminés avec une variété de solvants organiques. Cette bactérie est un bâtonnet de 1 à 1,7 μm de longueur et de 0,6 μm de largeur, non-sporulante, Gram négative qui déshalogène le PCE en *cis*-dichloroéthylène (Krumholz *et al.*, 1996). La souche TT4B est incapable de croître par fermentation. Cependant, elle croît dans un milieu minéral contenant de l'acétate comme donneur d'électrons et du tétrachloroéthylène (PCE) comme accepteur d'électrons. L'acétate et le pyruvate sont les seuls produits qui peuvent servir comme donneurs d'électrons, pour la déshalogénéation réductrice du

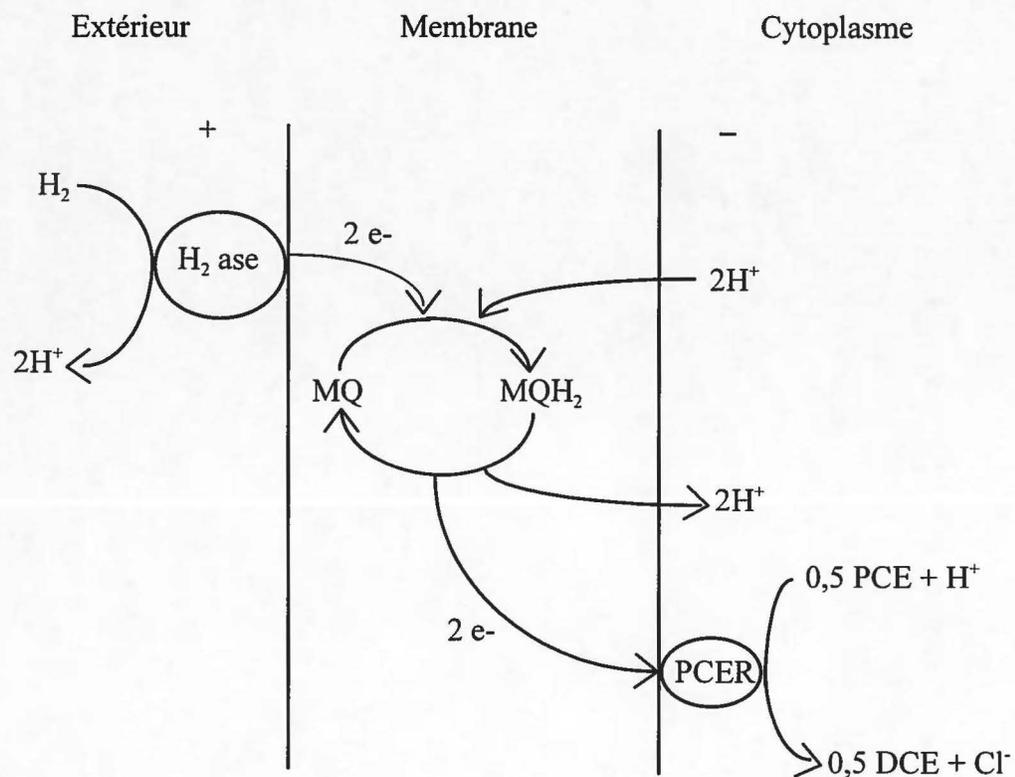


FIGURE 2: Modèle de la chaîne respiratoire chez *Dehalobacter restrictus*. H_2 ase: hydrogénase, MQ: menaquinone, PCER: tétrachloroéthylène réductase, PCE: tétrachloroéthylène, DCE: *cis*-1,2-dichloroéthylène. Modifiée de Fantroussi *et al.* (1998).

PCE. Comme accepteurs d'électrons la souche TT4B est capable d'utiliser le PCE, le trichloroéthylène, le nitrilacétate ferrique et le fumarate (Krumholz *et al.*, 1996). Toutefois, l'azote et les oxyanions soufrés ne peuvent jouer ce rôle.

La croissance de la souche TT4B a été observée dans un système biphasique, où la phase organique était constituée de 1 mL d'hexadécane contenant 50 à 200 mM de PCE et où la phase aqueuse était constituée d'un milieu minéral anaérobie, contenant du Na₂S comme agent réducteur (Krumholz *et al.*, 1996). Cependant, la concentration de PCE, qui se retrouvait dans la phase aqueuse, variait de 25 à 100 µM dans ce système. Au-delà de 100 µM de PCE se retrouvant dans la phase aqueuse, la croissance de la souche était complètement inhibée.

Par ailleurs, la souche TT4B était incapable de déchlorer les produits suivants en présence d'acétate: le 1,1,2,2-tétrachloroéthane, 1,1,1,2-tétrachloroéthane, le 1,4-dichlorobenzène, le tétrachlorure de carbone et le chloroforme (Krumholz *et al.*, 1996). Finalement, la souche TT4B a été identifiée comme étant une proche parente du genre *Desulfuromonas* et *Geobacter* à cause de son habileté à oxyder l'acétate (Fantroussi *et al.*, 1998). L'analyse de séquence de l'ARN 16S a révélé que la souche TT4B démontrait 96,6% d'homologie avec *Desulfuromonas acetexigens*. Cependant, elle diffère de *Desulfuromonas* sp., puisqu'elle est incapable d'utiliser le soufre comme accepteur d'électrons. TT4B est donc une nouvelle espèce du genre *Desulfuromonas* (Fantroussi *et al.*, 1998).

3.11 La souche 2CP-1

La souche 2CP-1, qui est capable de déshalogéner le 2-chlorophénol (2-CP), a

été isolée de sédiments provenant d'un ruisseau du Michigan. Cette bactérie est un bâtonnet de 3 μm de longueur par 0,5 μm de largeur, anaérobie facultative, catalase négative, oxydase négative et de type Gram négatif, qui forme des petites colonies rouges sur un milieu anaérobie (Cole *et al.*, 1994). Cependant elle peut croître en présence d'oxygène ou non. Plus précisément, ce microorganisme croît dans un milieu minimal réduit, en présence de 2-CP, d'acétate et de vitamines. Le produit qui est formé est le phénol. La souche 2CP-1 peut également utiliser le fumarate comme accepteur d'électrons. Cependant, sans la présence du 2-CP ou de l'acétate aucune croissance n'est observée.

Par ailleurs, le rendement de croissance est approximativement de 3 g de protéines par mole de 2-chlorophénol déshalogéné. Le temps de génération est de 3,7 jours en présence de 2-CP et d'acétate et de 2,5 jours en présence de fumarate et d'acétate (Cole *et al.*, 1994). La souche 2CP-1 est capable de déshalogéner seulement en position *ortho* et la présence d'atomes de chlore à d'autres positions inhibe et bloque la déshalogénéation. De plus, l'activité de déchloruration nécessite une induction. Le seul inducteur connu est le 2-CP. En plus du 2-CP, la souche 2CP-1 est capable de déshalogéner le 2,5-DCP en 3-monochlorophénol et le 2,6-DCP en 2-CP et en phénol. Par contre, la souche ne démontre aucune activité envers les composés suivants: le 3-CP, le 4-CP; les 2-, 3- et 4-monobromophénols; les 2-, 3- et 4-monofluorophénols; les 2-, 3- et 4-monoiodophénols; le 2,5-DCP; l'acide 2-chlorophénoxyacétique, l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique et le PCP (Cole *et al.*, 1994).

En outre, aucune évidence directe ne prouve que la souche 2CP-1 obtient de l'énergie de la déshalogénéation du 2-chlorophénol, mais les auteurs croient que comme *D. tiedjei*, la souche 2CP-1 est capable d'effectuer l'halorespiration (Cole *et al.*, 1994). Finalement, l'analyse de la séquence de l'ARN 16S a révélé que la souche 2CP-1 appartenait au groupe Delta de la classe des protéobactéries et qu'elle était plus

TABLEAU 1: Résumé des caractéristiques, des accepteurs d'électrons et du spectre d'activité de différentes bactéries utilisant la déshalogénéation réductrice.

| Bactéries | Caractéristiques | Accepteurs d'électrons | spectre d'activité |
|--|---|---|---|
| <i>D. tiedjei</i> souche DCB-1 | bâtonnet, Gram- non-mobile, non-sporulant anaérobie stricte | sulfate sulfite thiosulfate | 3CB, PCE, CPs en position <i>meta</i> |
| <i>D. dehalogenans</i> | bâtonnet, Gram+ mobile, non-sporulant anaérobie | sulfite nitrate thiosulfate fumarate | 3-Cl-4-OHPA 2-MBP, 2,6-DBP et CPs en position <i>ortho</i> |
| <i>D. hafniense</i> souche DCB-2 | bâtonnet, Gram-, mobile sporulant, anaérobie stricte | sulfite thiosulfate | CPs en position <i>ortho</i> et <i>meta</i> (3,5-DCP) |
| <i>D.</i> souche PCE-1 | bâtonnet, Gram+ mobile, non-sporulant anaérobie | sulfite thiosulfate fumarate | CPs en position <i>ortho</i> |
| <i>D. chlororespirans</i> souche Co23 | bâtonnet, Gram- mobile, sporulant anaérobie | sulfite thiosulfate soufre | 3-Cl-4-HBA 2,4,6-TBP et CPs en position <i>ortho</i> |
| <i>D. frappieri</i> souche PCP-1 | bâtonnet, Gram+ non-mobile, sporulant anaérobie stricte | sulfite thiosulfate nitrate | CPs en position <i>ortho, meta</i> et <i>para</i> , PCE et plusieurs molécules aromatiques |
| <i>D. multivorans</i> | Spirillum, Gram- non-sporulant, anaérobie stricte | nitrate fumarate | PCE, TCE |
| <i>D. restrictus</i> souche PER- K23 | bâtonnet, Gram- anaérobie | PCE DCE | PCE, TCE, DCE chloroéthylène |
| <i>D. ethenogenes</i> souche 195 | anaérobie | di- hydrogène | PCE, TCE, DCE chloroéthylène |
| Souche TT4B | bâtonnet, Gram- non-sporulant, anaérobie | TCE fumarate | PCE |
| Souche 2-CP1 | bâtonnet, Gram- anaérobie facultative | fumarate | CPs en position <i>ortho</i> |

près des myxobactéries que des bactéries sulfidogéniques (Fantroussi *et al.*, 1998).

4. LES DÉSHALOGÉNASES

La section précédente a permis de présenter les bactéries anaérobies qui effectuaient la déshalogénéation réductrice, quelques-unes de ces bactéries ont été caractérisées plus en profondeur. Effectivement, plusieurs déshalogénases provenant de ces bactéries ont été caractérisées et purifiées. L'importance d'une étude approfondie de ces enzymes consiste en une meilleure compréhension des déshalogénases et de leur mécanisme, afin d'appliquer ces connaissances à l'amélioration des procédés de biorémédiation des xénobiotiques halogénés, toxiques et récalcitrants, que l'on retrouve dans l'environnement. Quelques déshalogénases microbiennes seront donc décrites dans cette section et présentées sous forme de résumé dans le tableau 2 (voir page 49).

4.1 La 3-chlorobenzoate déshalogénase réductrice de *Desulfomonile tiedjei* souche DCB-1

La première enzyme effectuant la déshalogénéation aryl-réductrice à avoir été purifiée est la 3-chloro-benzoate déshalogénase réductrice de *Desulfomonile tiedjei* DCB-1 (Ni *et al.*, 1995). Cette enzyme membranaire inductible, transforme le 3-chlorobenzoate (3CB) en benzoate (CB). Le méthyl viologen et du dihydrogène sont essentiels afin d'observer une activité de déchloruration lors de l'essai enzymatique. Cette déshalogénase a été purifiée par un facteur de 120 et elle est constituée de deux sous-unités de masse moléculaire de 67 et de 37 kDa. De plus, une fois purifiée, l'activité maximale de déshalogénéation a été observée à une température de 38°C, à un

pH se situant entre 7,2 et 7,5 et à une force ionique équivalente à 10 mM de tampon potassium phosphate. Cependant, l'activité enzymatique a été observée entre 20°C et 55°C, à un intervalle de pH de 5,5 à 8,7 et à une concentration de tampon potassium phosphate variant de 10 mM à 300 mM. Par contre, la déshalogénase était complètement inactivée à une température de 60°C, à un pH de 9 et à une concentration de 400 mM de potassium phosphate (Ni *et al.*, 1995). Par ailleurs, les auteurs ont démontré que cette déshalogénase possédait un hème ainsi que du fer.

D'autres caractéristiques de l'enzyme ont été étudiés, dont l'influence des oxyanions soufrés sur l'activité enzymatique (Townsend & Suflita, 1997). Lorsque la souche DCB-1 était cultivée en présence de 3-CB (qui sert de substrat ou d'inducteur à l'activité de déshalogénéation) et de sulfite, de sulfate ou de thiosulfate, il a été démontré que l'activité enzymatique présente dans les extraits cellulaires était considérablement diminuée. Ceci suggèrerait que dans les conditions de culture, les oxyanions soufrés provenant du sulfate, du sulfite et du thiosulfate, servaient d'accepteurs d'électrons préférentiels à la place du 3-CB. Donc, cela agissait négativement sur l'activité enzymatique en diminuant soit la quantité de déshalogénase active présente dans les cellules, soit son expression. Par ailleurs, le sulfite et le thiosulfate inhibent l'activité de la déshalogénase de *D. tiedjei*, présente dans les fractions membranaires, lorsque celles-ci proviennent de bactéries qui ont été cultivées en présence de 3-CB. Le sulfate, quant à lui, ne démontre aucun effet. Selon Townsend & Suflita (1997), cette inhibition est due à l'interactions des oxyanions soufrés directement avec les enzymes membranaires responsables de la déshalogénéation. Cependant, ils ne peuvent exclure la possibilité que ces oxyanions puissent se lier à d'autres composés responsables de la respiration anaérobie, ce qui pourrait également avoir pour conséquence d'inhiber l'activité enzymatique.

Par ailleurs, une autre particularité de cette enzyme a été étudiée, mais cette fois-ci concernant le spectre d'activité. Il a été mentionné dans la section 3.2, que la

souche DCB-1 était capable de déshalogéner le tétrachloroéthylène et le trichloroéthylène, en plus du 3-chlorobenzoate. Il a été démontré que le co-métabolisme était responsable de cette transformation. En effet, la 3-chlorobenzoate déshalogénase réductrice catalyse la déshalogénéation du PCE et du TCE chez *D. tiedjei* (Townsend & Suflita, 1997).

Finalement, il a été montré que *D. tiedjei* souche DCB-1 effectuait l'halorespiration, c'est-à-dire qu'il conservait l'énergie nécessaire à sa croissance de la déshalogénéation du 3-chlorobenzoate par un procédé chimiosmotique (Louie & Mohn, 1999). Un procédé chimiosmotique est un procédé dans lequel un gradient de concentration de protons entraîne la formation d'ATP servant de réserve d'énergie (Horton *et al.*, 1994). Des études plus détaillées ont été effectuées sur ce modèle chimiosmotique d'halorespiration. Premièrement, les transporteurs d'électrons impliqués dans le processus de respiration et se situant dans différents compartiments cellulaires ont été examinés. Un cytochrome *c* de 50 kDa, co-induit avec l'activité de déshalogénéation, a été isolé des fractions membranaires (Louie *et al.*, 1997). La séquence de ce cytochrome a été déterminée et aucune similitude n'a été observée avec les séquences se retrouvant dans la banque de données (GenBank). Il a été conclu que ce cytochrome de type *c* était différent de tous les autres cytochromes de ce même type caractérisés jusqu'à aujourd'hui (Louie *et al.*, 1997).

Par la suite, il a été démontré que l'activité de déshalogénéation était inhibée par le 2-heptyl-4-hydroxyquinoline *N*-oxide, ce qui suggérait qu'une quinone était impliquée dans la chaîne du transport d'électrons couplée à la déshalogénéation réductrice (Louie & Mohn, 1999). Cependant, aucune ubiquinone ou menaquinone n'a pu être isolée de *D. tiedjei*. De plus, trois enzymes constitutivement exprimées dans le cytoplasme ont été identifiées soient: une ATP sulfurylase, une adénosine phosphosulfate réductase et une désulfovirdine sulfite réductase. Il est important de noter que la caractérisation des composantes du transport d'électrons a été faite avec

des cellules de *D. tiedjei* qui avaient été cultivées dans des conditions leur permettant soit d'effectuer la déshalogénéation réductrice, la fermentation du pyruvate ou la réduction du sulfate. Par ailleurs une déshydrogénase, se situant dans l'espace périplasmique, a été détectée lorsque les cellules étaient cultivées en conditions de déshalogénéation réductrice ou de fermentation du pyruvate, tandis qu'une formate déshydrogénase liée à la membrane a été détectée, lorsque les cellules étaient cultivées en présence de formate comme donneur d'électrons. D'autres expériences ont permis à Louie & Mohn (1999) d'affirmer que la déshalogénase réductrice était liée à la membrane avec une orientation cytoplasmique. Finalement, toutes ces données ont permis aux auteurs de construire un modèle chimiosmotique de déshalorespiration (voir figure 3) qui démontre qu'une force motrice de protons peut être générée par un mécanisme, qui implique l'oxydation du dihydrogène ou du formate dans le périplasmique et le transfert d'électrons à travers la membrane cytoplasmique jusqu'à la déshalogénase réductrice qui transforme ainsi le 3-chlorobenzoate en benzoate.

4.2 La 3-chloro-4-hydroxy-phénylacétate (Cl-OHPA) déshalogénase réductrice de *Desulfitobacterium hafniense* souche DCB-2

Cette déshalogénase est une enzyme liée à la membrane et qui possède la capacité de déchlorer le 3-chloro-4-hydroxy-phénylacétate en 4-hydroxyphénylacétate. Cette déshalogénase réductrice est induite par la présence de Cl-OHPA. Lorsque ce substrat est absent aucune activité de déshalogénéation ne peut être observée (Christiansen *et al.*, 1998). Cette déshalogénase a été purifiée, par un facteur de 11,3 fois en présence de détergent CHAPS, à partir de cellules qui ont été cultivées dans un milieu contenant du Cl-OHPA et du pyruvate. L'ajout de 4,3 mM d'ammonium sulfate à l'essai enzymatique, a stimulé l'activité de déchloruration de 40% (Christiansen *et al.*, 1998). Par ailleurs, cette enzyme a été incapable de déshalogéner le tétrachloroéthylène.

La déshalogénase est composée d'une seule sous-unité (Christiansen *et al.*, 1998) et la masse moléculaire ainsi que le point isoélectrique de cette sous-unité ont été établis respectivement à 46,5 kDa et à moins de 4,45. Cette enzyme contient $0,68 \pm 0,2$ mole de facteur corrinoïde, $12,0 \pm 0,7$ moles de fer et $13,0 \pm 0,7$ moles de soufre par mole de sous-unité. Étrangement, aucune inhibition de l'enzyme a été observée en présence de 1-iodopropane, un composé qui inactive généralement les enzymes qui contiennent des facteurs corrinoïdes. Cette inactivation est habituellement réversible par exposition de la lumière. Par ailleurs, la séquence N-terminale en acides aminés de l'enzyme purifiée a été déterminée et aucune similitude n'a été observée avec les autres protéines contenues dans les banques de données.

4.3 La déshalogénase aryle-réductrice de *Desulfitobacterium chlororespirans* Co23

Cette déshalogénase, qui est une enzyme de membrane, a été partiellement caractérisée. Les fractions membranaires obtenues des cellules bactériennes, qui croissent en présence de pyruvate et de 3-chloro-4-hydroxybenzoate (3-Cl-4-HBA), sont capables de déshalogéner ce composé en 4-hydroxybenzoate (4-HBA), à un taux de $3,9 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg de protéines}^{-1}$. Lorsque le méthyl viologen était utilisé comme donneur d'électrons, dans l'essai enzymatique standard, le taux de déchloruration observé était cinq fois plus élevé que le taux mentionné précédemment (Löffler *et al.*, 1996). Cependant, le NADH, le NADPH, la flavine adénine dinucléotide réduite (FAD), la flavine mononucléotide réduite (FMN), le bleu de méthylène ainsi que le benzyl viologen, ne pouvaient remplacer le méthyl viologen à l'intérieur du système de déshalogénation de l'enzyme. Le citrate de titanium (III) était utilisé dans l'essai enzymatique afin de réduire le méthyl viologen en un radical monocationique.

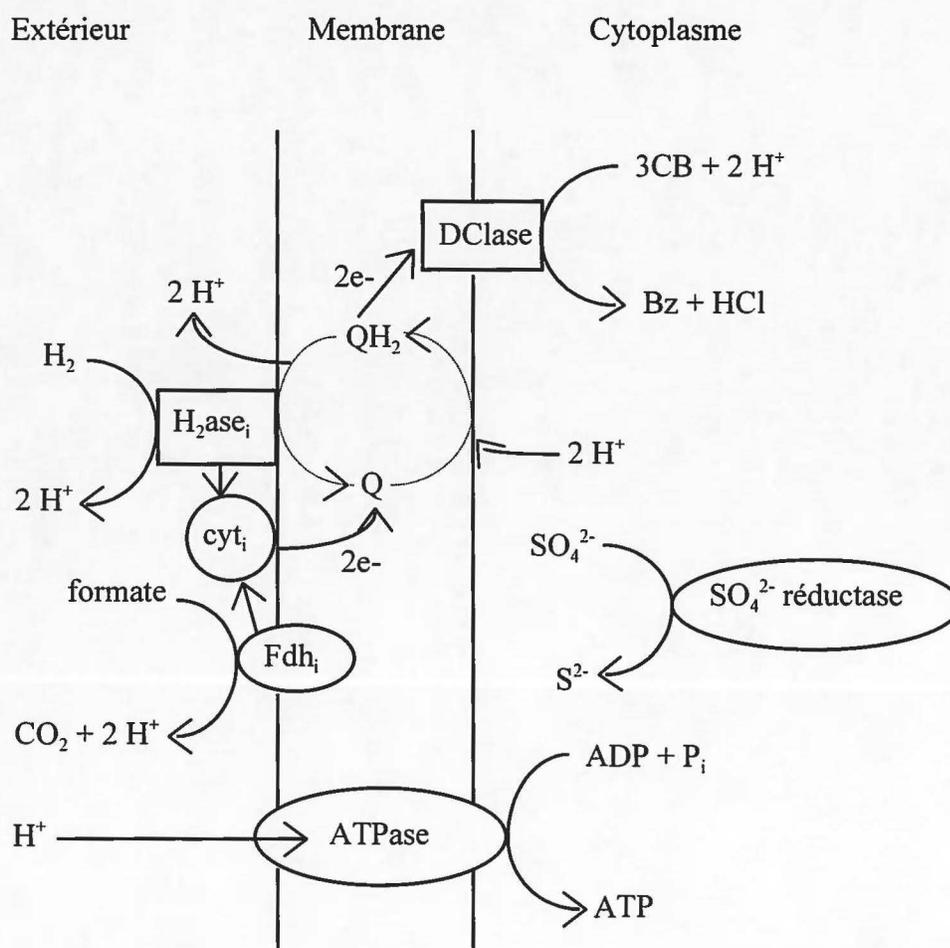


FIGURE 3: Modèle chimiosmotique de la déshalorespiration chez *Desulfomonile tiedjei* souche DCB-1. H_2ase_i : hydrogénase inductible, Fdh_i : formate déshydrogénase inductible, cyt_i : cytochrome *c* inductible de 50 kDa, Q : quinoïde, $DClase_i$: 3CB-déshalogénase réductrice, 3CB: 3-chlorobenzoate, Bz: benzoate. Modifiée de Louie & Mohn (1999).

Cette déshalogénase de *D. chlororespirans* Co23, n'est pas sensible à l'oxygène, puisque la même activité est retrouvée lorsque les fractions membranaires sont préparées en absence ou en présence d'air. Cependant, étant donné que le donneur d'électrons est rapidement oxydé lorsqu'il y a présence d'air, l'oxygène doit être supprimée du système avant qu'il ne soit possible de mesurer une activité de déchloruration (Löffler *et al.*,1996). L'activité maximale a été obtenue à une température de 60°C et à un pH de 6,5. De plus, l'enzyme est stable pendant au moins deux heures à une température de 57°C. Cependant, l'incubation de l'enzyme à de fortes températures amène une perte très rapide de l'activité. Plusieurs substances engendrent des effets sur l'activité de l'enzyme, lorsqu'elles sont ajoutées à l'essai enzymatique. Par exemple, le sulfite (1,75 mM) et le dithionite (4mM) inhibe totalement l'enzyme, tandis que le sulfate ne démontre aucun effet à des concentrations pouvant aller jusqu'à 100 mM. L'addition de: $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$, MnCl_2 , MgCl_2 , ZnCl_2 , NiSO_4 , CoCl_2 , Na_2SeO_4 , NaN_3 , NaCl , KCl , de dithiothréitol (tous à une concentration de 1 mM), de CHAPS à 20 mM, de Triton X-100 à plus de 0,5% p/v, d'EDTA à 200 mM et de citrate de sodium (200 mM) ne démontre également aucun effet sur l'activité enzymatique. Par contre, 1 mM de dodecyl sulfate de sodium (SDS) inhibe l'activité de 75% (Löffler *et al.*,1996). Cette déshalogénase est capable de déchlorer plusieurs substrats, mais en position *ortho* seulement. En plus de déchlorer le 3-Cl-4-HBA, cette enzyme est capable de déshalogéner le 3,5-dichloro-4-hydroxybenzoate, le 3-chloro-4-hydroxyphénylacétate, le 2,3-DCP, le 2,4-DCP, le 2,6-DCP, le 2,3,4-TCP, le 2,3,5-TCP, le 2,4,6-TCP, le 2,3,4,5-TeCP, le 2,3,4,6-TeCP, le 2,3,5,6-TeCP et le PCP.

4.4 La tétrachloroéthylène-déshalogénase réductrice de *Dehalospirillum multivorans*

Cette déshalogénase a été isolée d'extraits cellulaires de la bactérie anaérobie

Dehalospirillum multivorans qui a été cultivée en présence de pyruvate et de fumarate (Neumann *et al.*, 1995). Cette enzyme catalyse la déshalogénéation du PCE en TCE et du TCE en *cis*-1,2-dichloroéthylène et utilise « in vitro » le méthyl viologen réduit comme donneur d'électrons. L'expression de cette enzyme est constitutive et l'activité spécifique de cette réaction est de 2,6 microkatal/mg de protéines (microkatal étant défini comme une micromole de chlore relâchée par seconde à 25°C) (Neumann *et al.*, 1996). Plusieurs donneurs d'électrons artificiels ou physiologiques ont été étudiés, mais seul le méthyl viologen était efficace afin d'observer une activité de déshalogénéation. Par ailleurs, certaines caractéristiques de l'enzyme ont été déterminées, tel son inactivation par le 1-iodopropane, après l'ajout de citrate de titanium(III). Cette inactivation qui était réversible après une exposition à la lumière suggérait qu'une cob(I)alamine était impliquée dans la déshalogénéation réductrice du TCE (Neumann *et al.*, 1995). De plus, d'autres composés dont l'EDTA, le cyanure, le N₂O et le nitrite inhibaient l'activité enzymatique. L'inhibition par le cyanure suggérait l'implication d'une cob(III)alamine (Fantroussi *et al.*, 1998). Cependant, l'azoture de sodium ainsi que le monoxyde de carbone ne démontraient aucun effet. Ces résultats suggéraient donc l'implication d'une cob(I)alamine et possiblement de d'autres métaux dans la déshalogénéation du PCE et du TCE. De plus, le *trans*-1,2-dichloroéthylène et le 1,1-dichloroéthylène, qui étaient deux isomères du produit de la déshalogénéation (le *cis*-1,2-dichloroéthylène), n'inactivaient pas et/ou n'inhibaient pas l'activité enzymatique.

La masse moléculaire de l'enzyme native a été établie par filtration sur gel à 58 kDa, et par gel SDS-PAGE une seule bande a été observée à 57 kDa (Neumann *et al.*, 1996). Cette déshalogénase contenait 1,0 mole de facteur corrinoïde, 9,8 moles de fer et 8,0 moles de soufre par mole de sous-unité. Le pH optimal de l'activité enzymatique était de 8,0, tandis que la température optimale était de 42°C. De plus, la déshalogénase était légèrement sensible à l'oxygène et les valeurs de K_m respectives pour le TCE et le PCE étaient de 0,24 et 0,20 mM. Finalement l'activité de déshalogénéation du TCE était stimulée par les ions ammonium, tandis qu'elle était

sévèrement inhibée par les méthanes chlorés (exemples: CH_3Cl et CH_2Cl_2) (Neumann *et al.*, 1996).

Comme il a été mentionné auparavant, les auteurs croient que des cob(I-III)alamines seraient impliquées dans la déshalogénéation du PCE chez *D. multivorans*. Ceux-ci ont donc proposé un modèle de déshalogénéation réductrice du PCE, dans lequel le corrinoïde est réduit en cob(I)alamine avant que le PCE ne soit déchloré (Miller *et al.*, 1997b). La figure 4 illustre bien ce mécanisme, qui implique un flot réversible d'électrons. Ce concept de flot réversible d'électrons, consiste à la translocation des électrons en même temps que celle d'un proton. Le dihydrogène est d'abord oxydé à l'extérieur de la cellule, ce qui permet de relâcher deux protons. Ensuite, les électrons sont transférés à la PCE-déshalogénase, qui se situe à l'intérieur de la cellule. Par ce flot, deux électrons ($2 e^-$, sur la figure 4) sont transférés à un accepteur d'électrons primaire. Par la suite, un des électrons est transféré, dans une réaction non-endergonique, à un accepteur secondaire (Y) qui possède un potentiel positif, tandis que l'autre est transféré à un accepteur secondaire (X) qui possède un potentiel redox négatif. Le transfert d'électrons qui suit est endergonique et peut être effectué à l'aide d'un potentiel électrochimique de protons. Étant donné qu'un flot réversible d'électrons est impliqué dans la respiration du TCE de *D. multivorans*, il est indispensable qu'un seul proton soit transféré pour deux électrons lors de la translocation, sans quoi aucun potentiel électrochimique de protons ne pourrait être créé. Si cela était le cas, la bactérie ne pourrait coupler la synthèse d'ATP avec la déshalogénéation réductrice (Miller *et al.*, 1997b). Ceci implique que l'un des électrons traverse la membrane avec un proton, tandis que l'autre la traverse grâce à la différence de potentiel entre le donneur d'électrons extérieur (H_2) et l'accepteur d'électrons intérieur (Y). Par conséquent, deux étapes dans la réduction du PCE doivent être prises en considération soit: la réduction de la cob(II)alamine en cob(I)alamine qui requiert un donneur d'électrons avec un faible potentiel et la réduction de l'alkyle-cob(III)alamine en cob(II)alamine et en produit déchloré. Pour la deuxième étape, un donneur d'électron avec un potentiel plus positif est suffisant.

Enfin, ces deux étapes permettent de déshalogéner soit le TCE ou le PCE (R-Cl).

Finalement, les gènes codant pour la TCE-déshalogénase ont été clonés et séquencés (Neumann *et al.*, 1998). Deux gènes ont été identifiés soient *pceA* et *pceB*. Ces gènes, qui sont cotranscrits, codent pour des protéines contenant 501 (*pceA*) et 74 (*pceB*) acides aminés, de masse moléculaire respective de 55,887 et de 8,354 Da. De plus, il a été établi que le gène *pceA* contenait une séquence nucléotidique extrêmement semblable aux motifs de liaison de deux groupements Fe_4S_4 ou d'un groupement Fe_4S_4 et d'un groupement Fe_3S_4 . Ceci permettrait de mieux comprendre le fonctionnement et la structure de la TCE-déshalogénase de *D. multivorans* et pourrait éventuellement permettre d'améliorer le modèle de déshalogénation qui a été présenté ci-haut. Finalement, aucune similitude relative à la séquence n'a été découverte avec les autres gènes décrits dans les banques de données.

4.5 Les déshalogénases réductrices de *Dehalococcoides ethenogenes* souche 195

Deux déshalogénases membranaires, qui constituent une nouvelle voie complète de déchloruration du tétrachloroéthylène en éthène, ont été partiellement purifiées d'un enrichissement d'une culture anaérobie qui contenait la souche *Dehalococcoides ethenogenes* (Magnuson *et al.*, 1998). La première déshalogénase a été nommée PCE-déshalogénase réductrice (PCE-Dase) et celle-ci peut déchlorer le tétrachloroéthylène (PCE) en trichloroéthylène (TCE) à un taux de 20 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines. La deuxième est la TCE-déshalogénase réductrice (TCE-Dase) et elle est capable de déchlorer le trichloroéthylène en éthylène. Pour ces deux enzymes, les essais enzymatiques ont été effectués dans un tampon composé de 150 mM de NaCl, de 25 mM de 1,3-bis(tris[hydroxyméthyl]méthylamino)propane à pH 7 et impliquaient

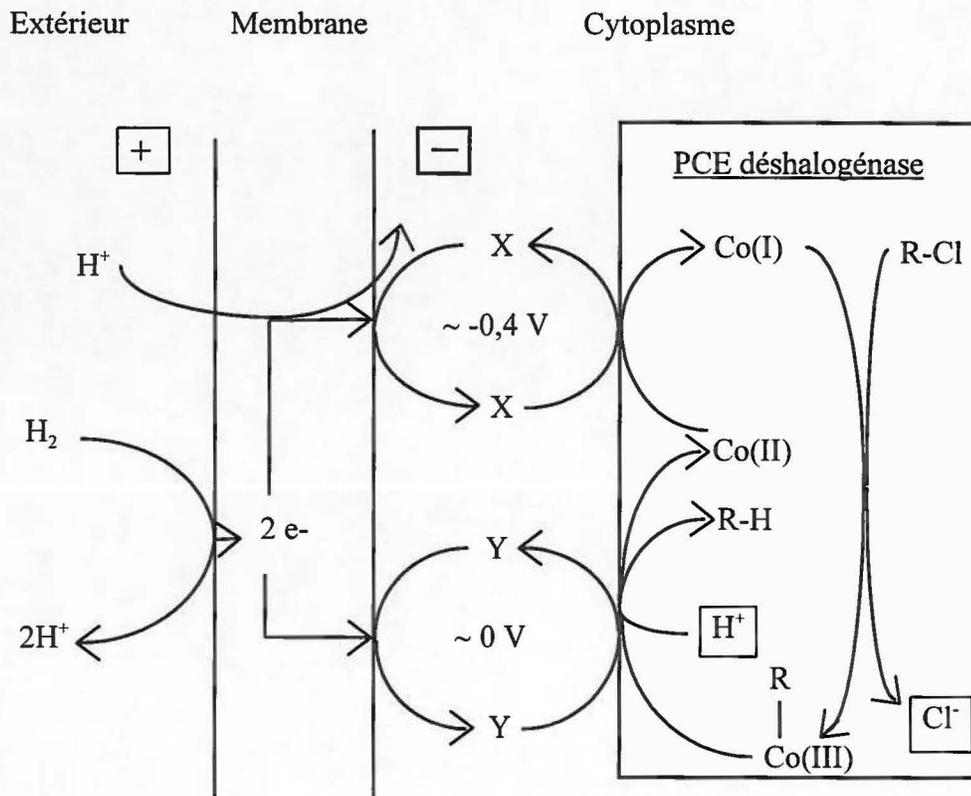


FIGURE 4: Modèle détaillé de la déshalogénation réductrice du tétrachloroéthylène, impliquant un flot réversible d'électrons chez *Dehalospirillum multivorans*. Modifiée de Miller *et al.* (1997b).

la présence du méthyl viologen comme donneurs d'électrons et du citrate de titanium(III) comme agent réducteur.

La PCE-déshalogénase est une enzyme membranaire qui a été solubilisée en présence de 0,1% de Triton X-100. Cette enzyme a été purifiée par un facteur de 75 fois, par chromatographie à interactions hydrophobiques et son poids moléculaire a été évalué à 51 kDa par SDS-Page. Par ailleurs, la PCE-déshalogénase est parfaitement spécifique, puisqu'elle était incapable de transformer le TCE, les isomères de dichloroéthylènes et le chlorure de vinyle (Magnuson *et al.*, 1998).

La deuxième enzyme, la TCE-déshalogénase a été, quant à elle, partiellement purifiée par chromatographie à interactions hydrophobiques. Après l'identification de la bande active à l'aide d'un gel de polyacrylamide en conditions non-dénaturante et son élution, celle-ci a été transférée sur un gel SDS-PAGE. Deux bandes ont été observées soit une dominante de 61 kDa et une plus faible de 110 kDa. Cette déshalogénase semblait être moins spécifique que la PCE-Dase, puisqu'elle était capable de déchlorer le TCE, le *cis*-1,2-dichloroéthylène (DCE), le 1,1-DCE, le *trans*-DCE et le chlorure de vinyle. Les trois premiers composés étaient déshalogénés à un taux variant de 8 à 12 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines, tandis que les deux derniers l'étaient à un taux deux fois moins élevé (Magnuson *et al.*, 1998).

Par ailleurs, les résultats obtenus suggèrent que les deux enzymes contiendraient des facteurs corrinoïdes, puisque les deux étaient inactivées en présence d'iodoalcanes. Effectivement, la TCE-Dase perdait 93% de son activité lorsqu'elle était incubée à la noirceur en présence de 1-iodopropane et de citrate de titanium(III). Une exposition à la lumière restaurait 80% de son activité initiale. La PCE-Dase, quant

à elle, perdait 85% de son activité lors d'une incubation en présence d'iodoéthane. Elle retrouvait 83% de son activité initiale après une exposition à la lumière. Selon les auteurs, ces observations étaient compatibles avec celles effectuées auparavant, portant sur une haute augmentation de l'activité de déshalogénéation lorsque de la vitamine B₁₂ était ajoutée aux cultures bactériennes. Cependant, selon eux, il était plus raisonnable de penser que ces résultats suggéraient que les facteurs corrinoïdes servaient de cofacteurs aux déshalogénases.

Finalement, d'autres inhibiteurs des déshalogénases ont été étudiés. Ainsi, la TCE-Dase était inhibée de 50%, par 2,5 mM de cyanure de sodium ou par 7 mM d'azoture de sodium, tandis que la PCE-Dase était inhibée de 20% par 20 mM de cyanure de sodium. Par ailleurs, les deux enzymes démontraient une inhibition complète en présence de 2 mM de sulfite de sodium ou par la même concentration de dithionite de sodium. De plus, l'activité enzymatique de la TCE-Dase était complètement inhibée par 1 mM de chlorure cuprique, tandis que la PCE-Dase n'était que légèrement inhibée. Le chlorure de zinc démontrait également le même profil. Cependant, les deux enzymes n'étaient pas inhibées par 2 mM de sulfate de sodium, de sélénate de sodium, de sulfure de sodium, de monoxyde de carbone, d'EDTA, de disulfonate de bathophénanthroline et de 2,2-dipyridyl. L'étude de ces différents inhibiteurs a permis aux auteurs de tirer certaines conclusions. La première est que l'inhibition par le cyanure et l'absence d'inhibition par le monoxyde de carbone supporte l'hypothèse de la présence de la vitamine B₁₂ comme cofacteur. La deuxième est que le profil d'inhibition par le zinc et le cuivre, peut indiquer la présence d'un ou de plusieurs centres métalliques, en plus de la présence de la vitamine B₁₂. Ces centres seraient fortement liés aux enzymes et/ou inaccessibles aux agents chélateurs de grandes dimensions (Magnuson *et al.*, 1998).

4.6 La déshalogénase réductrice de *Desulfitobacterium* sp. souche PCE-S

Cette déshalogénase, comme la plupart de celles décrites auparavant se retrouve également dans les membranes. Elle provient d'extraits cellulaires de *Desulfitobacterium* sp. souche PCE-S, qui a été cultivée en présence de fumarate, de pyruvate et d'extraits de levures. Le tétrachloroéthylène n'est pas nécessaire à la production de l'activité de déshalogénéation. Ceci suggère que l'expression de cette enzyme est constitutive (Miller *et al.*, 1998). Cette enzyme catalyse la déshalogénéation réductrice du tétrachloroéthylène (PCE) en trichloroéthylène (TCE) et du trichloroéthylène en *cis*-1,2-dichloroéthylène. Les fractions membranaires possédaient une activité spécifique de 650 nkat/mg de protéines, lorsque le méthyl viologen était utilisé comme donneur d'électrons lors de l'essai enzymatique (Miller *et al.*, 1998).

Cette déshalogénase reliée aux fractions membranaires démontre plusieurs caractéristiques. En effet, elle possède une activité optimale à un pH de 7,5 à 7,8. De plus, son activité demeure stable pour 10 minutes à une température de 50°C (Miller *et al.*, 1997a). Cette enzyme est peu sensible à l'oxygène, puisque qu'après une incubation de 90 minutes en présence d'oxygène, 50% de l'activité initiale était toujours retrouvée. Par ailleurs, la déshalogénase de la souche PCE-S était incapable de déchlorer les composés aliphatiques ou aromatiques autres que le TCE et le PCE, suggérant que son spectre d'activité était relativement étroit (Miller *et al.*, 1997a).

Par ailleurs, l'activité de la déshalogénase était inhibée lorsqu'elle était incubée à la noirceur en présence de 1-iodopropane et cette activité était restaurée lors d'une exposition à la lumière (Miller *et al.*, 1997a). Ces résultats suggéraient donc l'implication d'une cob(I)alamine. Les auteurs ont également voulu démontrer si des métaux, autre que le cobalt, étaient impliqués dans la réaction de déshalogénéation.

Pour ce faire, ils ont étudié l'effet de d'autres inhibiteurs des déshalogénases. Les composés suivants ont tous inhibé partiellement ou totalement l'activité enzymatique: le disulfonate de bathophénanthroline (10 mM), l'EDTA (2 mM), le cyanure de potassium (2 mM), l'azoture de sodium (20 mM) et le sulfite (1mM). L'inhibition par l'EDTA suggèrait l'implication de d'autres métaux dans la structure de l'enzyme. Cependant, le sulfate et le monoxyde de carbone ne démontraient aucune inhibition de l'activité (Miller *et al.*, 1997a).

Par ailleurs, l'identification de certaines enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique de *Desulfitobacterium* sp. souche PCE-S a été effectuée. Ces enzymes sont les suivantes: une hydrogénase, une formate déshydrogénase, une pyruvate-ferredoxine oxydoréductase, la tétrachloroéthylène déshalogénase et finalement une fumarate réductase (Miller *et al.*, 1997a). La déshalogénase de la souche PCE-S a été purifiée et son poids moléculaire a été évalué à 65 kDa par SDS-PAGE, alors que la masse moléculaire de l'enzyme native a été évaluée à 200 kDa (Miller *et al.*, 1998). La déshalogénase purifiée contenait $0,7 \pm 0,3$ mole de facteur corrinoïde, $1,0 \pm 0,3$ mole de cobalt, $7,8 \pm 0,5$ moles de fer et $10,3 \pm 2,0$ moles de soufre par mole de sous-unité. Les paramètres optimaux de l'activité enzymatique, tels le pH et la température étaient légèrement différents des valeurs obtenues avec les fractions membranaires. Effectivement, le pH optimal était de 7,2 et la température optimale de 50°C. De plus, l'enzyme purifiée était plus sensible à l'oxygène et son temps de demi-vie a été établi à 50 minutes. Finalement, la séquence N-terminale en acides aminés de l'enzyme a été déterminée et aucune similitude n'a été observée avec la séquence de la TCE-déshalogénase réductrice de *Dehalospirillum multivorans*.

Les connaissances acquises jusqu'à ce jour concernant les microorganismes anaérobies, la déshalogénéation ainsi que les déshalogénases microbiennes anaérobies sont sensiblement limitées. Cependant, le bon potentiel de biodégradation de ces microorganismes envers les composés récalcitrants qui contaminent l'environnement, dont le PCP, nous a donc amené à pousser plus loin l'étude. Le but de ces travaux était donc d'acquérir une meilleure connaissance des microorganismes anaérobies ainsi que des enzymes impliquées dans la déshalogénéation réductrice. Plus spécifiquement, l'étude visait à effectuer une caractérisation préliminaire et à comparer les différentes propriétés des déshalogénases I et II produites par *Desulfitobacterium frappieri* souche PCP-1, ainsi que d'effectuer des essais de purification de la déshalogénase II. Dans le futur, ces nouvelles connaissances pourront éventuellement permettre d'améliorer les biotraitements déjà existants afin d'augmenter leur efficacité.

TABLEAU 2: Résumé des caractéristiques, structure et des substrats transformés par différentes déshalogénases produites par des microorganismes anaérobies.

| Déshalogénases réductrices | Souches | Caractéristiques et structure | Substrats transformés |
|--|---|--|--|
| 3-chloro benzoate déshalogénase | <i>D. tiedjei</i> souche DCB-1 | membranaire, inductible 2 sous-unités: 67 et 37 kDa cofacteur : hème | 3CB PCE TCE |
| 3-chloro-4-hydroxy-phénylacétate déshalogénase | <i>D. hafniense</i> souche DCB-2 | membranaire, inductible 1 sous-unité: 46,5 kDa cofacteurs: corrinoïde et centres Fe/S | 3-Cl-4-OHPA |
| déshalogénase aryle réductrice | <i>D. chlororespirans</i> souche Co23 | membranaire | 3-Cl-4-HBA 3,5-Cl-4-HBA 3-Cl-4-OHPA certains DCPs, TCPs, TeCPs et PCP |
| tétrachloro-éthylène déshalogénase | <i>D. multivorans</i> | expression constitutive 2 sous-unités: 56 et 8 kDa cofacteurs: corrinoïde et 2 centres Fe/S | PCE TCE |
| PCE-déshalogénase | <i>D. ethenogenes</i> souche 195 | membranaire 1 sous-unité: 51 kDa cofacteurs: corrinoïde et centres Fe/S | PCE |
| TCE-déshalogénase | <i>D. ethenogenes</i> souche 195 | membranaire 2 sous-unités: 61 et 110 kDa cofacteurs: corrinoïde et centres Fe/S | TCE 1,1-DCE <i>cis</i> -1,2-DCE <i>trans</i> -DCE chlorure de vinyle |
| déshalogénase de la souche PCE-S | <i>Desulfotobacterium</i> souche PCE-S | membranaire, constitutive 1 sous-unité: 65 kDa cofacteurs: corrinoïde et centres Fe/S | PCE TCE |

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. PROVENANCE DE *DESULFITOBACTERIUM FRAPPIERI* SOUCHE PCP-1

La souche bactérienne *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 (ATCC 700357) a été isolée (Bouchard, 1995) d'un consortium bactérien anaérobie pouvant effectuer la dégradation du PCP par fermentation méthanique (Bouchard *et al.*, 1996) (Juteau *et al.*, 1995a, 1995b). Cette souche est productrice des déshalogénases qui ont été étudiées dans ce projet de recherche. *D. frappieri* a été conservée sous forme lyophilisée. Également, la souche PCP-1 a été maintenue par repiquage périodique dans un milieu liquide anaérobie dans des bouteilles de sérum.

2. MILIEU ET CULTURE DE LA SOUCHE PCP-1

Le milieu liquide anaérobie (MLA) qui a été utilisé pour la culture de la souche PCP-1 est une modification de celui de Boyd *et al.* (1983). Il contient les composés suivants par litre: 0,27 g de KH_2PO_4 ; 0,35 g de K_2HPO_4 ; 0,53 g de NH_4Cl (J.T. Baker, Phillipsburg, N.J.) ; 0,10 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Mallinckrodt, Paris, KY) ; 0,073 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Fisher, Fair Lane, N.J.); 0,002 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Montréal, Qc.); 0,1% d'extrait de levures (Difco, Détroit, MI); 55 mM de pyruvate (Sigma, St-Louis, MO); 0,01 g de 2,4,6-TCP (Aldrich, Milwaukee, WIS); 0,05 g de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (Mallinckrodt, Paris, KY) et 0,001 g de résazurine (Sigma, St-Louis, MO) qui est utilisée comme indicateur de potentiel rédox. Un volume de 10 mL d'une solution de minéraux est également ajouté. Cette solution stock contenait 0,1 g de chacun des minéraux suivants : $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; ZnCl_2 ; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; H_3BO_3 (J.T. Baker, Phillipsburg, N.J.); $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Anachemia, Montréal, Qc). Le milieu a été ajusté à un pH de 7,5 avec du K_2HPO_4 . Afin d'en chasser l'oxygène, le milieu a été bouilli pendant 1 heure dans une colonne réfrigérante et barboté 5 minutes avec un

mélange gazeux contenant 10% de H₂, 10% de CO₂ et 80% de N₂ (Médigas, St-Laurent, Qc). Par la suite, le milieu a été stérilisé par autoclavage. Les composés tels que l'extrait de levures, le pyruvate, le Na₂S et le 2,4,6-TCP ont été ajoutés au milieu sous forme de solution après que celui-ci ait été autoclavé. Ces solutions stérilisées par filtration (0,2 µm) ont été effectuées en solubilisant les produits dans de l'eau bouillie déionisée. Le Na₂S, qui a servi d'agent réducteur, avait pour rôle de maintenir les conditions anaérobies tandis que le pyruvate de sodium et l'extrait de levure servaient de source de carbone et d'énergie. Le 2,4,6-TCP a servi comme inducteur de la déshalogénase I. Cependant, lors des études portant sur la déshalogénase II, le 2,4,6-TCP a été remplacé par le 3,5-DCP (Aldrich, Milwaukee, WIS) qui agissait comme inducteur de la déshalogénase II.

La culture de la souche PCP-1 a été effectuée dans des bouteilles de trois volumes différents. La souche PCP-1 a généralement été cultivée dans des vials sérologiques de 70 mL contenant 35 mL de milieu MLA. Lors de la production d'une biomasse pour la production des extraits cellulaires, des bouteilles Schott de 1 litre contenant 502 mL de milieu et des bouteilles de 14 litres en verre contenant 8,91 litres de milieu ont été utilisées. Les vials sérologiques ont été fermés avec des bouchons de butyle (Geo-Microbial Technologies, Ochelata, N.J.). La préparation du milieu dans les bouteilles de 1 et de 14 litres a varié légèrement de la méthode décrite ci-haut. La différence étant que le milieu n'a pas été bouilli mais plutôt stérilisé par autoclavage pendant 2 heures et barbotté ensuite avec le mélange de gaz (H₂:CO₂:N₂) pendant 1 heure. De plus, une solution stérile de NaHCO₃ saturée a été ajoutée après autoclavage afin d'ajuster le pH. Les volumes ajoutés au MLA étaient les suivants: soit 29,33 mL/litre pour les bouteilles Schott et 18,28 mL/litre pour les bouteilles de 14 litres. Par ailleurs, la concentration de Na₂S•9H₂O présente dans le MLA de la bouteille de 14 litres était de 0,075 g/l.

Finalement, tous les milieux ont étéensemencés avec une préculture en phase

exponentielle de croissance de la souche PCP-1 dans un rapport de 5% v/v. Dans tous les cas, les cultures ont été incubées à 37°C.

3. MANIPULATIONS EFFECTUÉES EN CONDITIONS ANAÉROBIES

Les travaux nécessitant des manipulations en conditions anaérobies, notamment lors de la préparation des extraits cellulaires, de la caractérisation et de la purification, ont été effectués dans une chambre anaérobie (Shel Lab, Sheldon Manufacturing Inc., modèle BAC II: Bactron Anaerobic/Environmental Chamber, Orégon, États-Unis). Le mélange gazeux présent dans cette chambre est constitué de 10% de H₂, 10% de CO₂ et de 80% de N₂. Cette enceinte permet le travail à main nue (sans gants), ce qui permet d'effectuer des manipulations de plus grande précision requises pour ce travail.

3.1 Préparation de solutions anaérobies

La procédure qui a été utilisée afin de rendre une solution anaérobie était la suivante. La solution a été placée dans un bécher en verre contenant un barreau magnétique, puis ce bécher a été mis dans une jarre anaérobie, munie d'un système de sortie (pour le vide) et d'entrée de gaz (Quelab, Montréal, Qc). La jarre a été déposée sur une plaque agitatrice (Corning Hot Plate Stirrer modèle PC351) et reliée à un système de vide et à une bonbonne de gaz. Des lavages avec le mélange gazeux H₂CO₂N₂ (10%:10%:80%) de la solution agitée ont donc été effectués en alternant la création du vide et l'entrée du mélange gazeux à l'intérieur de la jarre. Ensuite, la jarre a été transférée dans l'enceinte anaérobie et la solution a été transvidée dans des bouteilles sérologiques de 70 mL (Canlab, Pointe-Claire, Qc), fermés avec des

bouchons de butyle (Geo-Microbial Technologies, Ochelata, N.J.). Par la suite, ces vials ont été retirés de l'enceinte anaérobie et la solution était prélevée avec des seringues. Cette procédure a toujours été employée pour rendre les solutions anaérobies, qui ont été nécessaires à la majorité des expériences effectuées et qui sont décrites dans ce mémoire.

4. PRODUCTION DES DÉSHALOGÉNASES

4.1 Production d'une biomasse

La méthodologie qui a été employée afin d'effectuer la production d'enzymes était une modification de la méthode utilisée par Ni *et al.* (1995). Une culture de la souche PCP-1 a été premièrement effectuée dans des vials sérologiques de 70 mL. Après une incubation de 20 heures à 37°C, 25 mL de cette culture en vial ont servi d'inoculum pour ensemer 502 mL de milieu contenu dans une bouteille Schott de 1 litre. Après une incubation de 22 heures à 37°C, le volume total (527 mL) de cette culture en bouteille Schott a été utilisé comme inoculum pour une culture de plus grand volume effectuée dans des bouteilles en verre de 14 litres, qui contenait 8,91 litres de milieu (MLA). Entre chaque passage les paramètres suivants ont été déterminés : la densité optique de la culture à une longueur d'onde de 600 nm, le pH, le niveau de déchloration de l'inducteur et le degré de pureté de la culture par microscopie photonique après une coloration de Gram (Difco, Détroit, MI).

Les mesures de la densité optique des cultures ont été effectuées à partir de deux échantillons de 1,5 mL prélevés à l'aide de seringues de 3 mL et d'aiguilles stériles. Le premier échantillon a été déposé dans un tube Eppendorf, puis centrifugé pendant 5 minutes à 15 000 g (Canlab, Pointe-Claire, Qc, modèle Biofuge A). Cet

échantillon a servi de blanc, pour la lecture de la densité optique au spectrophotomètre (Canlab SP6-550 UV/VIS) à 600 nm.

Le suivi du pH de la culture a été fait en prélevant un échantillon de celle-ci stérilement, puis le pH a été mesuré à l'aide d'un pHmètre de marque Corning pHmeter 125. Dans le cas où le pH s'éloignait trop de 7,5 celui-ci était ajusté avec une solution de NaHCO₃ saturée stérile et anaérobie.

Le suivi de la déchloration des inducteurs dans les cultures, soit le 2,4,6-TCP lors de la production de déshalogénase I ou le 3,5-DCP lors de la production de déshalogénase II, a été effectué à partir d'un échantillon de 1 mL de culture prélevé stérilement. Ce volume a été transféré dans un tube Eppendorf et 0,5 mL d'une solution d'acétonitrile (qualité HPLC, Anachemia, Montréal, Qc) contenant 0,33% v/v d'acide acétique (Baxter, Toronto, Ont.) lui a été ajouté. Par la suite, le tube a été agité manuellement, puis centrifugé 5 minutes à 15 000 g (Canlab, Pointe-Claire, Qc, modèle Biofuge A). Les inducteurs et les produits de déchloration ont été analysés par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) (voir section 8).

4.2 Collecte et fractionnement cellulaire

4.2.1 Pour la déshalogénase I

Lorsque la culture a atteint une densité optique voisine de 0,6 soit généralement après une incubation de 20 heures à 37°C, la biomasse a été récoltée par centrifugation. Les 9,43 litres de culture ont été centrifugés dans des bouteilles de polycarbonates de 500 mL, à 9 000 g, à 4°C pendant 20 minutes (modèle Beckman

Avanti J-25 Centrifuge). Les culots ont été repris dans 300 mL de tampon potassium phosphate anaérobie 0,05 M, pH 7,5 contenant 1 mM dithiothréitol (Bio-Rad Laboratories, CA, États-Unis). Ces manipulations ont été faites à l'air libre mais en essayant de minimiser les entrées d'oxygène.

Les bactéries se retrouvant dans le culot ont été resuspendues dans le même tampon et centrifugées à 9 000 g, à 4°C pendant 15 minutes (modèle Beckman Avanti J-25 Centrifuge). Le culot a été ensuite repris dans 100 mL de tampon potassium phosphate (0,05 M, pH 7,5) contenant 1 mM de dithiothréitol, auquel avait été ajouté 1,25 mL d'une solution contenant : 5 mg de phénylméthylsulfonylfluoride (PMSF) (Sigma, St-Louis, MO) dissout dans 4,5 mL d'éthanol 100% et 0,5 mL d'eau déionisée. La concentration finale de PMSF se retrouvant dans la solution de resuspension était de 1 mg pour 100 mL. Ensuite, la suspension a été bien homogénéisée à l'aide d'une pipette de 10 mL en verre borosilicate.

Les bactéries ont été brisées par deux passages de la suspension à la presse de French (Aminco, Silver Spring, MA, modèle 5-598A) à une pression de 1800 psi. Afin de minimiser l'entrée d'oxygène dans la suspension, celle-ci a été placée dans un flacon Erlenmeyer de 125 mL relié premièrement au piston de la presse en circuit fermé et deuxièmement à un ballon contenant un mélange gazeux de H₂:CO₂:N₂ (10%:10%:80%). Un deuxième flacon Erlenmeyer, relié au premier recueillait les cellules brisées à la sortie du piston. Par la suite, la suspension a été simplement transvidée dans le premier flacon Erlenmeyer toujours à l'abri de l'oxygène, ce qui permettait d'effectuer le deuxième passage. Après cette dernière étape, la suspension a été transférée dans des tubes de 40 mL en plastique, puis centrifugée à 17 000 g, à 4°C, pendant 30 minutes (modèle Beckman Avanti J-25 Centrifuge).

Le surnageant a été recueilli et centrifugé dans des tubes de 40 mL à 161 000

g, à 4°C, pendant 90 minutes. Les culots ont été repris avec 10 mL de tampon potassium phosphate anaérobie (0,05 M, pH 7,5) contenant 1 mM de dithiotréitol et 20% v/v de glycérol (EM Science, Gibbstown, N.J.). La suspension a été ensuite distribuée en aliquots de 1 mL dans des bouteilles sérologiques de 12 mL en borosilicate (Canlab, Pointe-Claire, Qc), fermés hermétiquement avec des bouchons de butyle (Geo-Microbial Technologies, Ochelata, N.J.). Ces aliquots ont été conservés à une température de -80°C et constituaient les fractions membranaires. Le surnageant qui constituait la fraction cytoplasmique a été conservé par aliquots à -80°C.

4.2.2 Pour la déshalogénase II

La méthode employée, pour la collecte de la biomasse et le fractionnement cellulaire lors de la production de la préparation enzymatique de la déshalogénase II, était semblable à celle utilisée pour la déshalogénase I. La différence majeure était que toutes les manipulations ont été effectuées à l'abri de l'oxygène, dans l'enceinte anaérobie.

5. SUSPENSION DE FRACTIONS MEMBRANAIRES

Les propriétés des enzymes liées à la membrane ont été étudiées avec des fractions membranaires resuspendues dans un tampon anaérobie potassium phosphate 0,05 M, pH 7 contenant 1mM de dithiothréitol. La procédure était la suivante : un aliquot de 1 mL de fraction membranaire a été décongelé et repris avec 10 mL de tampon de dilution, dans l'enceinte anaérobie. Par la suite, les suspensions membranaires ont été distribuées en aliquot de différents volumes dans des vials de 12 mL en borosilicate. Ces vials ont été fermés avec des bouchons de butyle et conservés

à -80°C .

6. SOLUBILISATION DES DÉSHALOGÉNASES

Afin de solubiliser les enzymes, un aliquot de 1 mL de fraction membranaire a été décongelé, repris dans 10 mL de tampon de solubilisation anaérobie et agité sur glace pendant 45 minutes. Ce tampon était constitué de: 0,05 M de potassium phosphate (pH 7), 20% v/v de glycérol; 0.1% v/v de Triton X-100 (Bio-Rad Laboratories, CA, États-Unis) et 1 mM de dithiothréitol. Ensuite, le tout a été centrifugé dans des tubes de plastiques de 12 mL, à une force de 145 000 g, à 4°C , pendant 90 minutes (Beckman modèle L5-50 Ultracentrifuge). Après centrifugation, le surnageant contenant les protéines solubilisées a été distribué en aliquots de différents volumes dans des bouteilles sérologiques en borosilicate de 12 mL, dans l'enceinte anaérobie. Ces aliquots ont été conservés à -80°C . Ces préparations brutes ont été utilisées pour toutes les expériences effectuées au cours de ces travaux.

7. ESSAI STANDARD POUR LE DOSAGE DE L'ACTIVITÉ DE DÉSHALOGÉNATION

7.1 Pour la déshalogénase I

Le dosage de l'activité enzymatique a été effectué dans un tampon d'activité enzymatique (TAE) anaérobie composé de : tampon 0,1 M potassium phosphate, pH 7, 20% v/v de glycérol; 2 mM de méthyl viologen (Sigma, St-Louis, MO); 2 mM de citrate de titanium(III) et de 1 mM du substrat halogéné testé qui était généralement le 2,4,6-TCP (modifié de Ni *et al.*, 1995). La solution de citrate de titanium(III) a été préparée totalement dans l'enceinte anaérobie. Tout d'abord, une solution de 15% p/v de chlorure de titanium(III) (Aldrich, Milwaukee, WIS) a été préparée dans l'eau

déionisée anaérobie. À 5 mL de cette solution a été ajouté 45 mL d'une solution 0,2 M de citrate de sodium (Baker, Phillipsburg, N.J.). Finalement, le pH du mélange a été ajusté à 7 avec une solution saturée de carbonate de sodium (Fisher Scientific, Fair Lawn, N.J.). La solution de citrate de titanium a été conservée à l'obscurité, à 4°C dans une bouteille sérologique en borosilicate.

L'essai enzymatique standard a été effectué comme suit : dans l'enceinte anaérobie, 50 µl de l'enzyme solubilisée (ou de suspension membranaire) ont été ajoutés à 1,95 mL de TAE dans des vials en borosilicate de 12 mL fermés hermétiquement avec des bouchons de butyle. Les vials ont été incubés dans un bain-marie à 37°C pendant 2 heures. Après ce temps, la réaction a été arrêtée par l'addition de 1 mL d'une solution d'acétonitrile (Anachemia, Montréal, Qc) contenant 0.33% v/v d'acide acétique (Mallinckrodt, Pointe-Claire, Qc). Par la suite, les préparations ont été transférées à l'aide de pipettes Pasteur dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL et centrifugés 5 min à 15 000 g (Canlab, Pointe-Claire, Qc, modèle Biofuge A). Le surnageant a été recueilli et les chlorophénols ont été analysés par CLHP (voir section 8). Au cours de cet essai enzymatique, le 2,4,6-TCP était transformé en 2,4-DCP. De plus, tous les essais enzymatiques ont été effectués en duplicata ou triplicata.

7.2 Pour la déshalogénase II

Le dosage enzymatique a été effectué dans le tampon d'activité enzymatique (TAE) pour la préparation de déshalogénase I à pH 8,5, où le substrat généralement utilisé était le 3,5-DCP (1 mM). L'essai enzymatique standard a été effectué comme suit : dans l'enceinte anaérobie 125 µl de l'enzyme solubilisée (ou de la suspension membranaire) ont été ajoutés à 375 µl de TAE. Les vials contenant les essais ont été incubés à 45°C pendant 18 heures. Après l'incubation, la réaction a été arrêtée par

l'addition de 250 μ l d'une solution d'acétonitrile contenant 0.33% v/v d'acide acétique. Le produit de la déshalogénéation du 3,5-DCP était le 3-MCP et il a été quantifié par CLHP.

D'autres donneurs d'électrons ont été étudiés en remplacement du méthyl viologen pour le dosage de l'activité enzymatique pour la préparation de la déshalogénase II soit: le dichlorure de benzyl viologen (Aldrich, Milwaukee, WIS) à une concentration de 2 mM et l'éthyle viologen (Aldrich, Milwaukee, WIS) à la même concentration.

8. ANALYSE DES CHLOROPHÉNOLS PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE (CLHP)

L'appareil CLHP qui a été utilisé était de marque Waters (Mississauga, Ont.) (modèle 600), un spectrophotomètre (modèle 486) et un injecteur automatique (Waters, modèle 717 Plus). Le système était contrôlé par un ordinateur Digital Celebris (modèle 590) et régit par le logiciel Millenium Software Chromatography Manager, version 2.15.01. La colonne hydrophobe utilisée était une NovaPak C₁₈ (3,9 x 150 mm). Le programme utilisé avait recours à deux phases mobiles. La phase mobile A était composée d'eau déionisée et d'acide acétique à 0.1% v/v et la phase mobile B était composée d'acétonitrile et d'acide acétique à 0,1% v/v. Les deux phases étaient préparées séparément et étaient par la suite barbotées avec de l'hélium (Médigas, St-Laurent, Qc) pendant 15 minutes.

La séparation et la quantification des chlorophénols ont été effectuées comme suit : la colonne était équilibrée avec un mélange de 70 % de la phase mobile A et de 30 % de la phase mobile B, à un débit de 2 mL par minute (1004,5 cm/heure). Ce

débit était gardé constant au cours de tout le programme d'une durée de 13 minutes. Par la suite, au cours des 4 premières minutes, la concentration de la phase mobile B était augmentée de manière linéaire jusqu'à 55 % tandis que le pourcentage de la phase mobile A diminuait à 45 %. Ces conditions étaient maintenues jusqu'à la dixième minute pour être, à la fin du programme, ramenées par un gradient concave aux conditions de départ, ce qui permettait de rééquilibrer la colonne. L'analyse des chlorophénols a été effectuée à une longueur d'onde de 220 nm. Le temps de rétention des différents chlorophénols ainsi que la courbe de calibration étaient vérifiés régulièrement.

9. DOSAGE DES PROTÉINES

Les dosages des protéines présentent dans les préparations membranaires et les préparations solubilisées ont été effectués par la méthode de Dudley & Grieve (1975). Cette méthode, qui élimine l'interférence des détergents, est une modification de la méthode de Lowry *et al.* (1951) et consistait en l'ajout de 0,5% p/v de lauryl de sulfate de sodium (SDS) (Sigma, St-Louis, MO) à la solution réactive. Une courbe standard entre 50 et 200 mg/l a été établie avec de l'albumine sérine bovine (Sigma, St-Louis, MO).

Lors des expériences portant sur la purification de la déshalogénase II (voir section 19), le dosage des protéines a été effectué avec le kit «Bio-Rad Protein Assay» (Bio-Rad Laboratories, CA, États-Unis); ce test est basé sur la méthode de Bradford (1976).

10. CINÉTIQUE ENZYMATIQUE ET DÉTERMINATION DE LA STABILITÉ DES ENZYMES

10.1 Cinétique enzymatique

La présence d'une relation linéaire existant entre la quantité de produit formé par l'enzyme et le temps d'incubation a été déterminée. Pour les préparations enzymatique des déshalogénases I et II des essais enzymatiques standard ont été effectués avec respectivement 73 et 273,7 μg d'enzymes solubilisées. Les essais ont été effectués à 37°C et les réactions ont été arrêtées après 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 et 6 heures d'incubation dans le cas de la préparation enzymatique de la déshalogénase I et après 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 et 20 heures d'incubation pour la préparation enzymatique de la déshalogénase II. Pour la préparation de la déshalogénase II, la cinétique de déshalogénation du 3,5-DCP a été déterminée à différentes températures d'incubation soit: 37°, 41° et 45°C.

Pour la préparation de la déshalogénase I, la relation existant entre la formation de 2,4-DCP et la quantité d'enzyme présente dans les conditions utilisées pour le dosage de l'activité enzymatique a été déterminée. Cette expérience a été effectuée en variant la quantité d'enzyme solubilisée présente lors du dosage de l'activité enzymatique. Les quantités d'enzyme étudiées (en duplicata) étaient les suivantes: 0, 73, 109, 146, 219, 292 et 365 μg . Le volume de TAE présent dans chacun des vials, a été ajusté de façon à ce que le volume total de l'essai enzymatique standard soit toujours de 2 mL. Par la suite, les vials ont été incubés 1 heure à 37 °C, puis l'arrêt des réactions et l'analyse ont été effectués selon la méthode habituelle.

10.2 Stabilité

Pour la préparation de la déshalogénase I, plusieurs aliquots de 175 μ l d'enzyme solubilisée et de fractions membranaires diluées ont été incubés à différentes températures soit : 4°, 37°, -20° et -80°C. À différents temps et à chaque température, trois aliquots de 50 μ l (équivalent à 78,5 μ g de protéines pour l'enzyme solubilisée et à 145,5 μ g pour la fraction membranaire) ont été prélevés et leur activité enzymatique a été déterminée par l'essai standard (voir section 7.1).

Dans le cas de la préparation de la déshalogénase II, des aliquots de 1250 μ l de l'enzyme solubilisée ont été incubés à 4°C et leur activité enzymatique a été déterminée après différents intervalles de temps. La stabilité enzymatique a également été étudiée en ajoutant 1 et 4 mM de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ou 0.1 mg/l de 3,5-DCP à l'enzyme solubilisée. Ces produits ont été additionnés, par l'ajout respectif d'un volume de 50 μ l, provenant de solutions stock, à trois aliquots de 1250 μ l d'enzyme solubilisée. Un aliquot témoin a également été effectué et contenait 1250 μ l d'enzyme et 50 μ l d'eau déionisée. Par la suite, après différents intervalles de temps, le dosage de l'activité enzymatique a été effectué, en duplicata, selon la méthode habituelle (voir section 7.2). Chaque essai contenait 273,7 μ g de protéines.

11. DÉTERMINATION DU pH OPTIMAL

11.1 Pour la déshalogénase I

Le pH optimal de l'activité enzymatique pour la préparation de la déshalogénase I solubilisée a été déterminé à différentes valeurs de pH qui se situaient dans un intervalle de 5,55 à 8,30. Le pH a été ajusté en mélangeant la partie acide et la partie basique du tampon potassium phosphate 0,1 M qui était une composante du tampon d'activité enzymatique (TAE). Par la suite, les solutions de TAE ont été

incubés à 37°C pendant 4 heures afin de stabiliser leur pH. Après l'incubation si des variations avait eu lieu, le pH des TAE était réajusté à leur valeur initiale avec une solution anaérobie d'hydroxyde de sodium à 0.05 M (Baker, Phillipsburg, N.J.). Toutes ces manipulations ont été effectuées dans l'enceinte anaérobie. Finalement, les essais enzymatiques standards (exception : incubation de 3 heures) contenant chacun 71,5 µg de protéines, ont été effectués en triplicata, avec chacun des TAE possédant un pH différent. Par la suite, la valeur du pH a été mesurée pour chaque essai juste avant l'arrêt de la réaction par l'addition d'acétonitrile, avant d'effectuer les analyses par CLHP. Cette dernière valeur a été utilisée comme étant le pH de l'essai enzymatique.

11.2 Pour la déshalogénase II

Le pH optimal de l'activité enzymatique pour la préparation brute de la déshalogénase II a été déterminé dans trois tampons différents. Le premier était le TAE décrit à la section 7.2 et l'expérience a été effectuée de la même façon que pour la préparation de la déshalogénase I (voir section 11.1), sauf en ce qui concerne l'essai standard (voir section 7.2). Le deuxième tampon utilisé était le tampon Tris-HCl composé de: 0,1 M de Trizma Base (Sigma, St-Louis, MO); 20% v/v de glycérol; 1 mM de 3,5-DCP; 2 mM de méthyl viologen de 2 mM de citrate de titanium(III). Le pH de ce tampon a été ajusté à différentes valeurs dans un intervalle de 6,00 à 9,00 dans l'enceinte anaérobie, avec une solution 2 M d'acide chlorhydrique (BDH, Toronto, Ont.). Par la suite, les vials contenant les tampons ont été incubés à 37°C pendant 4 heures et leur pH a été réajusté au besoin avec une solution 0,5 M d'hydroxyde de sodium. Les essais enzymatiques standards, contenant chacun 170 µg de protéines, ont été par la suite effectués selon la procédure habituelle. Le troisième tampon utilisé avait la même composition que celui décrit précédemment sauf que la concentration de Tris était de 0,2 M et que l'intervalle de pH couvert était de 6,20 à 9,75. La procédure était également identique.

12. DÉTERMINATION DE LA TEMPÉRATURE OPTIMALE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE ET STABILITÉ THERMIQUE

Pour la préparation de la déshalogénase I, la détermination de la température optimale de l'activité enzymatique a été effectuée d'une part avec l'enzyme solubilisée et d'autre part, avec les fractions membranaires diluées. Les essais enzymatiques standard ont été effectués selon la méthode habituelle, à l'exception que les vials ont été incubés à différentes températures (trois vials par température). Les températures d'incubation étaient les suivantes pour les enzymes solubilisées: 5°, 24°, 30°, 37°, 45°, 50°, 60°, 65°, 75°C et de 5°, 24°, 30°, 37°, 50°, 60°, 65°, 75° et 80°C pour les fractions membranaires diluées. La stabilité de la préparation de la déshalogénase I solubilisée et des fractions membranaires diluées, aux différentes températures d'incubation, a été évaluée selon le protocole suivant: des vials contenant 950 µl de TAE sans 2,4,6-TCP et 50 µl d'enzyme solubilisée (70,5 µg de protéines) ou de fractions membranaires diluées (131,5 µg de protéines) ont été incubés pendant deux heures à différentes températures soit: 5°, 24°, 30°, 37°, 45°, 50°, 60°, 65° et 75°C. Après cette incubation, les vials (trois par température) ont reçu 1 mL de TAE contenant 2 mM de 2,4,6-TCP et afin de doser l'activité enzymatique, les vials ont été incubés à 37°C pendant deux heures. Finalement, les réactions ont été arrêtées selon la procédure habituelle.

Pour la préparation de la déshalogénase II, la température optimale de l'activité a été effectuée avec les enzymes solubilisées seulement et les températures d'incubation étaient les suivantes: 5°, 21°, 28°, 37°, 45°, 50°, 60°, 65° et 75°C. Les essais enzymatiques, contenant chacun 182,5 µg de protéines, ont été effectués tel que décrit à la section 7.2.

13. EFFET DU SULFATE, DU SULFITE ET DU NITRATE SUR L'ACTIVITÉ DE L'ENZYME SOLUBILISÉE

13.1 Pour la déshalogénase I

Des solutions anaérobies de 0,1 M Na_2SO_4 (BDH, Toronto, Ont.), de 0,01 M Na_2SO_3 (Baker, Phillipsburg, N.J.) et de 0,1 M NaNO_3 (BDH, Toronto, Ont.) ont été préparées dans de l'eau déionisée. L'effet du sulfate et du nitrate sur l'activité de déshalogénéation a été étudié aux concentrations finales suivantes: 0 (témoin), 5, 10, 15, 20, 30, 50, 75 et 100 mM. Le volume de solution qui a été ajouté à l'essai enzymatique standard a varié de 0 à 100 μl (équivalent à 100 mM) et le volume de TAE a été ajusté de façon à ce que le volume total de l'essai enzymatique standard soit toujours de 2 mL. Le sulfite, quant à lui, a été étudié aux concentrations finales suivantes: 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 1,75; 2; 2,5; 5 et 10 mM. Le volume maximal de la solution de Na_2SO_3 qui a été ajouté à l'essai enzymatique était également de 100 μl (équivalent à 10 mM). Une fois les solutions et le TAE distribués dans les vials, 50 μl d'enzyme solubilisée (66 μg de protéines) ont été ajoutés et le dosage de l'activité enzymatique a été effectué en duplicata pour chacune des concentrations.

13.2 Pour la déshalogénase II

Les solutions suivantes ont été utilisées: 0,1 M Na_2SO_4 , 0,01 M Na_2SO_3 et 0,01 M NaNO_3 . Pour le sulfate, l'effet a été déterminé aux mêmes concentrations que pour la déshalogénase I. Le volume de solution qui a été ajouté à l'essai enzymatique standard a varié de 0 à 25 μl (équivalent à 100 mM) et le volume de TAE a été ajusté de façon à ce que le volume total de l'essai enzymatique standard soit toujours de 500

μl . Le sulfite et le nitrate quant à eux, ont été étudiés aux concentrations finales suivantes: 0 (témoin); 0,75; 1; 1,25; 1,5; 1,75; 2; 2,5; 5 et 10 mM. Le volume maximal de la solution de Na_2SO_3 ou de NaNO_3 qui a été ajouté à l'essai enzymatique était également de 100 μl (équivalent à 10 mM). Une fois les solutions et le TAE distribués dans les vials, 125 μl d'enzyme solubilisée ont été ajoutés (163,7 μg de protéines dans chacun des essais dans le cas du sulfate et du sulfite et 113,7 μg dans les essais pour le nitrate) et le dosage de l'activité enzymatique a été effectué en duplicata pour chacune des concentrations.

14. EFFET DE L'AIR SUR L'ACTIVITÉ DE L'ENZYME SOLUBILISÉE

L'effet de l'air a été déterminé, pour les préparations brutes des déshalogénases I et II, en incubant 1 mL d'enzyme solubilisée en présence de 0% (témoin), 10% et 50% d'air ambiant, pendant une heure, à 4°C avec agitation. La procédure était la suivante, le volume de la phase gazeuse du vial, dans lequel se trouvait la préparation enzymatique, a été premièrement mesuré (6,2 mL). Par la suite, à l'aide d'une seringue, un volume déterminé de gaz a été enlevé du vial et le même volume d'air ambiant a été ajouté. Par exemple, pour 10% d'air ambiant (volume d'air ambiant/volume de la phase gazeuse) un volume de 0,62 mL a été enlevé, puis ajouté. Après l'incubation, des aliquots ont été prélevés (en triplicata) et le dosage de l'activité enzymatique, de chacun d'eux, a été effectué selon la procédure standard habituelle. A l'exception que pour les essais avec la déshalogénase I, 100 μl de préparation enzymatique ont été ajoutés au lieu de 50 μl . Chaque essai contenait 145 et 113,7 μg de protéines pour les déshalogénases I et II respectivement.

15. EFFET DES MÉTAUX SUR L'ACTIVITÉ DE L'ENZYME SOLUBILISÉE

Les métaux suivants ont été ajoutés à une concentration finale de 5 mM à l'essai enzymatique standard: $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Mallinkrodt, Pointe-Claire, Qc); KCl (Baker, Phillipsburg, N.J.); $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Baker, Phillipsburg, N.J.); ZnCl_2 (Baker, Phillipsburg, N.J.); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Baker, Phillipsburg, N.J.); NaCl (Baker, Phillipsburg, N.J.); $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Baker, Phillipsburg, N.J.) et NaN_3 (Fisher, Fair Lawn, N.J.). Plus précisément, les métaux ont été ajoutés à l'essai enzymatique standard à partir de solutions stock anaérobies. Ces solutions ont été préparées dans de l'eau déionisée. L'essai enzymatique standard composé de 100 μl de solution stock, 1850 μl de TAE et 50 μl d'enzyme solubilisée (74,5 μg de protéines), a été effectué selon la procédure habituelle pour la préparation de la déshalogénase I, en triplicata pour chacun des métaux. Trois essais enzymatiques témoins ont également été effectués, en remplaçant le volume de la solution stock par 100 μl d'eau déionisée anaérobie. Dans le cas de la préparation de la déshalogénase II, l'essai enzymatique composé de 25 μl de solution stock, 350 μl de TAE et 125 μl d'enzyme solubilisée (167,5 μg de protéines) a été effectué selon la procédure habituelle, en triplicata.

16. EFFET D'AGENTS CHÉLATEURS ET DU TRITON X-100 SUR L'ACTIVITÉ DE DÉSHALOGÉNIATION DE L'ENZYME SOLUBILISÉE

16.1 Pour la déshalogénase I

L'effet du citrate de sodium (Baker, Phillipsburg, N.J.) sur l'activité de déshalogénation a été déterminé. Le citrate de sodium a été ajouté à l'essai enzymatique standard à des concentrations finales de 0 (témoin), 100 et 200 mM. Les essais contenant chacun 74,5 μg de protéines ont été effectués, en triplicata pour

chacune des concentrations, selon la méthode habituelle.

L'effet du Triton X-100 sur l'activité de déshalogénation a également été déterminé. Le Triton X-100 provenant d'une solution stock anaérobie a été ajouté à l'essai enzymatique standard à des concentrations finales de 0 (témoin), 0,5 et 1% v/v. La quantité maximale de solution stock qui a été ajoutée à l'essai enzymatique standard, contenant 1850 µl de TAE et 50 µl d'enzyme solubilisée, était de 100 µl. De l'eau anaérobie a été ajoutée à l'essai afin de compléter son volume à 2 mL. Les essais enzymatiques ont été effectués en triplicata.

L'effet de l'EDTA (Baker, Phillipsburg, N.J.) a été également étudié. Dans ce cas, 200 µl de l'enzyme solubilisée ont été préalablement incubés 1 heure, en présence d'une concentration finale de 10 mM d'EDTA, à 4°C et avec agitation. Par la suite, l'activité de l'enzyme a été déterminée, en triplicata, selon la procédure habituelle et comparée à une préparation d'enzyme incubée sans EDTA.

16.2 Pour la déshalogénase II

Pour la préparation enzymatique de la déshalogénase II, l'effet du citrate de sodium sur l'activité enzymatique a été déterminé de la même façon que pour la préparation de la déshalogénase I. Les essais enzymatiques standard contenant chacun 143,7 µg de protéines, ont été effectués en triplicata selon la procédure habituelle. L'effet du Triton X-100 a également été déterminé selon la même procédure que pour la préparation de la déshalogénase I solubilisée. Cependant, la quantité maximale de solution stock de Triton X-100 qui a été ajoutée à l'essai enzymatique standard était de 25 µl. Pour l'étude de l'effet de l'EDTA, la même procédure a été utilisée.

17. SPECTRE D'ACTIVITÉ DES PRÉPARATIONS D'ENZYMES SOLUBILISÉES

17.1 Les chlorophénols et bromophénols

L'activité de la préparation de la déshalogénase I solubilisée envers plusieurs chlorophénols a été étudiée selon la procédure suivante. Chacun des chlorophénols ou bromophénols suivants a été ajouté à une concentration de 1 mM en remplacement du 2,4,6-TCP à l'essai enzymatique standard: 2-MBP, 3-MBP, 4-MBP, 2-MCP, 3-MCP, 4-MCP, 2,3-DCP, 2,4-DCP, 2,5-DCP, 2,6-DCP, 3,4-DCP, 3,5-DCP, 2,3,4-TCP, 2,3,5-TCP, 2,3,6-TCP, 2,4,5-TCP, 2,4,6-TCP, 3,4,5-TCP (Ultra Scientific, North Kingstown, RI) et le PCP. Les essais contenant chacun 73,7 µg de protéines ont été effectués en triplicata pour chacun des substrats étudiés. Tous les chlorophénols ou bromophénols qui ont été utilisés, à moins d'avis contraire, provenaient de la compagnie Aldrich (Milwaukee, WIS).

Pour la préparation de la déshalogénase II, la même procédure a été employée et l'essai enzymatique standard (contenant soit 135 ou 197 µg de protéines) a été effectué selon la méthode habituelle, à l'exception que le pH du TAE était de 7.

Les essais effectués avec les monochlorophénols et les monobromophénols ont été analysés par CLHP mais par une méthode différente de celle décrite à la section 7, étant donné que le phénol ne pouvait être quantifié par cette méthode. La méthode utilisée était la suivante: la colonne était équilibrée avec un mélange de 80 % de la phase mobile A et de 20 % de la phase mobile B, à un débit de 2 mL par minute (1004,5 cm/heure). Ce débit était gardé constant au cours de tout le programme d'une

durée de 10 minutes. Par la suite, au cours des 5 premières minutes, la concentration de la phase mobile B était augmentée de manière linéaire jusqu'à 100 % tandis que le pourcentage de la phase mobile A diminuait à 0 %. Ces conditions étaient maintenues jusqu'à la sixième minute pour être, à la fin du programme, ramenées par un gradient concave aux conditions de départ, ce qui permettait de rééquilibrer la colonne. La concentration du phénol, des monochlorophénols et des monobromophénols a été déterminée à une longueur d'onde de 260 nm. Le temps de rétention des différents chlorophénols, monobromophénols et du phénol, ainsi que la courbe de calibration étaient vérifiés régulièrement.

La quantification des tétrachlorophénols (TeCP) a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplé à un détecteur à capture d'électrons (CG-DCE). Avant de procéder à l'analyse, une extraction à l'acétate d'éthyle a été effectuée à partir d'échantillons provenant de l'essai enzymatique standard. Un volume de 1 mL d'acétate d'éthyle (Anachemia, Montréal, Qc), 1 goutte d'acide chlorhydrique concentré (BDH inc, Toronto, Ont.) et 20 µl d'une solution de 7,5 g/l de para-crésol (standard interne) (Baker, Phillipsburg, N.J.) effectuée dans de l'eau déionisée, ont été ajoutés à un échantillon de 500 µl provenant de l'essai enzymatique, dans une bouteille de 5 mL fermée avec un bouchon de téflon. Le tout a été agité manuellement pendant une minute et par la suite, la phase supérieure a été prélevée et mise en présence de sulfate de sodium anhydre (Anachemia, Montréal, Qc) pendant 10 minutes. Finalement, à 100 µl de cette phase a été ajouté 30 µl de BSTFA (N-O-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide) (Pierce, Rockford, Illinois) dans des bouteilles coniques à GC et le tout a été incubé à 70°C pendant 30 minutes. L'échantillon était ainsi prêt à être injecté.

Le chromatographe utilisé était de marque Hewlett-Packard, modèle 5890, muni d'une colonne de type phényl-méthyl-silicone DB5 de 25 m de longueur et de 0,2 mm de diamètre interne. Le gaz porteur était de l'hélium (Médigas, St-Laurent,

Qc) et l'appareil était réglé à une pression de tête constante de 10 psi. Le four a été programmé de la façon suivante : la température initiale était de 70°C, puis augmentait à un taux de 15°C/min jusqu'à 100°C. Par la suite, la température augmentait à un taux de 5°C/min jusqu'à 180°C et était maintenue pendant 2 minutes. Finalement, elle augmentait de 30°C/min jusqu'à 310°C. Le temps total du programme était de 26,33 minutes. La température de l'injecteur était de 250°C tandis que celle du détecteur était de 320°C. Les temps de rétention du para-crésol, du 2,3,5,6-TeCP, du 2,3,4,5-TeCP et du 2,3,4,6-TeCP ont été vérifiés avant chaque série d'injections. Les tétrachlorophénols utilisés provenaient de la compagnie Ultra Scientific (North Kingstown, RI).

17.2 Le tétrachloroéthylène (PCE)

La capacité des préparations des déshalogénases à déchlorer le tétrachloroéthylène a été étudiée. Pour la préparation de la déshalogénase I, la procédure utilisée était la suivante. Une solution stock de PCE à une concentration de 5,25% (Aldrich, Milwaukee, WIS) a été préparée dans le pentane (Anachemia, Montréal, Qc), dans l'enceinte anaérobie. Par la suite, cinq essais ont été effectués dans les vials habituels, mais cette fois-ci fermés avec des bouchons de téflon (Wheaton, Milville, N.J.). Les deux premiers essais étaient des témoins et contenaient: 10 µl de la solution stock de PCE (pour une concentration finale de 1 mM), 50 µl d'eau déionisée et 1,94 mL de TAE. Les deux autres essais étaient composés de: 10 µl de la solution stock, 50 µl d'enzyme solubilisée (91,5 µg de protéines) et de 1,94 mL de TAE. Le dernier essai, quant à lui, contenait 50 µl d'enzyme solubilisée (91,5 µg de protéines) et 1,95 mL de TAE contenant 1 mM de 2,4,6-TCP. Ce dernier essai a servi à confirmer l'activité de l'enzyme. Les vials ont été incubés à 37 °C pendant 3 heures. Après l'incubation, la réaction du dernier essai contenant le 2,4,6-TCP a été arrêtée et son analyse a été effectuée par CLHP selon la procédure habituelle. Des

extractions ont été effectuées sur les quatre autres essais afin que les produits de dégradation puissent être analysés par CG-DCE.

La méthode d'extraction qui a été utilisée était la suivante. Un mL d'une solution de *para*-dichlorobenzène (standard interne) a été ajouté à chacun des essais. Le *para*-dichlorobenzène (Aldrich, Milwaukee, WIS) a été préparé dans du cyclohexane (Anachemia, Montréal, Qc) à une concentration de 3,6 g/l. Le contenu des vials a été transféré dans des tubes en borosilicate de 16 mL, fermés avec des bouchons ayant une membrane de téflon. Le lavage des vials a été effectué avec 2 mL d'eau déionisée. Ensuite, 3 mL de pentane ont été ajoutés à chaque tube et après une agitation manuelle d'une minute, la phase supérieure a été prélevée avec une seringue. Un aliquot de 50 µl de la phase supérieure a été ajouté à 1,45 mL de pentane, puis 2 µl de cette solution a été injecté, puis analysé par CG-DCE.

Le chromatographe qui a été utilisé était le même que pour l'analyse des tétrachlorophénols. Cependant, le four a été programmé de la façon suivante : la température initiale était de 35°C pendant 5 minutes, puis augmentait à un taux de 10°C/min jusqu'à 50°C. Cette température était maintenue pendant 3 minutes. Par la suite, la température augmentait à un taux de 10°C/min jusqu'à 90°C et finalement de 35°C/min jusqu'à 310°C. La température de l'injecteur était de 250°C tandis que celle du détecteur était de 320°C. Les temps de rétention du PCE, du trichloroéthylène (TCE) et du *para*-dichlorobenzène ont été vérifiés avant chaque série d'injections.

Dans le cas de la préparation de la déshalogénase II, sept essais ont été effectués. Le premier contenait 375 µl de TAE contenant 1 mM de 3,5-DCP et 125 µl de la préparation d'enzyme solubilisée (243,7 µg de protéines). Le deuxième contenait 375 µl de TAE sans 3,5-DCP et 125 µl d'enzyme (243,7 µg de protéines). Cet essai a servi à démontrer que rien dans le contenu de l'enzyme ou du TAE n'interférait avec

le temps de rétention des produits d'intérêt. Le troisième était composé de: 365 μ l de TAE, 10 μ l d'une solution stock contenant du PCE et du TCE (pour une concentration finale de 1 mM pour chacun des produits) et de 125 μ l d'enzyme (243,7 μ g de protéines). Cet essai a servi à confirmer les temps de rétention des produits recherchés. Le quatrième et le cinquième étaient des essais témoins et contenaient: 365 μ l de TAE, 10 μ l d'une solution stock de PCE (pour une concentration finale de 1 mM) et 125 μ l d'eau déionisée. Les deux derniers essais avaient la même composition que le quatrième et le cinquième sauf que l'eau a été remplacée par l'enzyme solubilisée. Par la suite, les vials ont été incubés à 45 °C pendant 18 heures. Après l'incubation, l'arrêt de la réaction et l'analyse des chlorophénols du premier essai ont été effectués selon la procédure habituelle. Le contenu des autres essais a été extrait selon la méthode d'extraction utilisée pour la préparation de la déshalogénase I à l'exception des volumes utilisés. En effet, 200 μ l du standard interne ont été ajoutés aux vials et 3,8 mL de pentane ont été ajoutés aux tubes au lieu de 3 mL. Finalement, 200 μ l de la phase supérieure ont été ajoutés à 800 μ l de pentane avant d'être analysé. Les échantillons ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse selon la méthode décrite auparavant.

18. ESSAIS D'INHIBITION DE L'ACTIVITÉ DES DÉSHALOGÉNASES PAR L'IODOPROPANE

Les essais d'inhibition par l'iodopropane ont été effectués selon une modification de la méthode de Brot et Weissbach (1965). La préparation de déshalogénase II a été incubée avec 1 mM de 1-iodopropane (Aldrich, Milwaukee, WIS) et avec 2 mM de citrate de titaniu(m) III, pendant 30 minutes à 37 °C, dans des vials clairs en borosilicate entourés de papier d'aluminium. Un vial témoin a également été effectué dans lequel le 1-iodopropane a été remplacée par de l'eau déionisée. Après l'incubation, 125 μ l d'échantillon (312,5 μ g de protéines) ont été prélevés dans chacun des vials (en triplicata) et le dosage de l'activité enzymatique a

été effectué selon la méthode habituelle. Par la suite, le papier d'aluminium a été enlevé et le vial contenant l'enzyme traitée au 1-iodopropane ainsi que le vial témoin ont été placés sur glace et exposés à la lumière pendant 6 minutes. La lampe utilisée était une lampe halogène de projecteur (300W, 82V) de marque Sylvania. Après ce traitement à la lumière, un deuxième échantillon a été prélevé, en triplicata dans chacun des vials, pour effectuer les essais standard afin de doser l'activité de déshalogénéation.

Pour la préparation de la déshalogénase I, la méthode qui a été employée était la même que pour la préparation de la déshalogénase II, à l'exception que le volume de l'échantillon prélevé a été de 50 μ l (91,5 μ g de protéines) et que deux doses de 1-iodopropane ont été étudiées soit: 0,05 mM et 0,1 mM. De plus, le temps d'exposition à la lumière a été de 10 minutes et le dosage de l'activité enzymatique a été effectué selon la méthode habituelle.

19. ESSAIS DE PURIFICATION DE LA DÉSHALOGÉNASE II SOLUBILISÉE

Plusieurs essais de purification ont été effectués pour la déshalogénase II. Dans tous les cas, les solutions qui ont été utilisées pour la purification de la déshalogénase II étaient anaérobies et les manipulations ont toujours été effectuées en conditions anaérobies ou de façon à minimiser l'effet de l'oxygène. Afin de procéder aux essais, les préparations membranaires ont été premièrement solubilisées selon la méthode décrite à la section 6. Cependant, lorsque les chromatographies étaient effectuées à pH 8,5, le pH du tampon de solubilisation était ajusté à 8,5. Différents types de colonnes ont été essayés tels: des colonnes échangeuses ioniques, une filtration sur gel, une colonne hydrophobique et une colonne d'affinité. Deux essais sur Sep-Pak QMA light (résine charge positive) (Waters, Mississauga, Ont.) ont été effectués. Pour le premier,

le Sep-Pak a été équilibré avec un tampon potassium phosphate 0,05 M à pH 7 contenant 0,1% de Triton X-100, 20% de glycérol et 1 mM de dithiothréitol. Un volume de 1 mL d'une préparation de déshalogénases II (1,95 mg de protéines/mL) solubilisées dans ce tampon a été utilisée. L'élution a été effectuée avec le même tampon contenant 0,2, 0,4, 0,6 et 1 M de NaCl. Un dosage de l'activité de déshalogénéation a été effectué pour chacune des fractions récoltées. Lors du deuxième essai le pH du tampon était de 8,5. Un Sep-Pak CM light (charge négative) (Waters, Mississauga, Ont.) a également été utilisé dans les mêmes conditions que pour le premier essai.

Une première chromatographie a été effectuée avec une colonne hydrophobique t-butyl effectuée dans une seringue de 10 mL contenant 6 mL de gel (15 x 60 mm): Macro-Prep t-butyl CIH support (CIH: chromatographie à interactions hydrophobiques) (Bio-Rad, CA, États-Unis). La colonne hydrophobique a été équilibrée avec 20 mL de tampon potassium phosphate 0,05 M à pH 7, contenant 5 % v/v de glycérol, 0,1 % de Triton X-100, 1 mM de dithiothréitol et 0,5 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (BDH, Toronto, Ont.), à un débit de 1 mL/min (33,9 cm/heure) contrôlé par une pompe péristaltique (LKB Bromma Microperpex, Ontario, Canada). Un volume de 4 mL de préparation enzymatique de la déshalogénase solubilisée (0,93 mg de protéines/mL) contenant 0,5 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a été introduit dans la colonne. L'élution a été effectuée (débit de 1 mL/min) avec 10 mL de tampon potassium phosphate 0,05 M à pH 7, contenant 5 % v/v de glycérol, 0,1 % de Triton X-100, 1 mM de dithiothréitol et 0,5 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et par la suite avec 10 mL de ce même tampon ne contenant pas de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Les fractions, dont le volume était de 2 mL, ont été recueillies dans des vials. Le dosage de l'activité de déshalogénéation de ces fractions a été effectué selon la méthode habituelle (section 7.2).

Par la suite, un volume de 500 μl de la fraction active, obtenue de la chromatographie sur colonne hydrophobique t-butyl, a été utilisée pour une filtration

sur gel avec une colonne Sephacryl SW-300 (8 x 300 mm) (Waters, Mississauga, Ont.), préalablement équilibrée à un débit de 0,8 mL/min (95,5 cm/heure) avec un tampon potassium phosphate 0,05 M à pH 7, contenant 5 % v/v de glycérol, 0,01 % de Triton X-100 et 1 mM de dithiothréitol. La filtration sur gel a été effectuée une seconde fois, dans les mêmes conditions, à l'exception que l'échantillon protéique provenant de la colonne t-butyl avait subi un traitement avec 0,05% de TFA pendant 30 minutes à 37°C avant d'être introduit sur la colonne. Dans un autre essai, la colonne t-butyl a été équilibrée avec le même tampon sauf que le pH était de 8,5 et la filtration sur gel a été effectuée avec un tampon potassium phosphate 0,05 M à pH 8,5 contenant 5 % v/v de glycérol, 0,05% de Triton X-100 et 1 mM de dithiothréitol. De plus, une chromatographie sur colonne t-butyl-CIH a été effectuée avec le tampon à pH 8,5 où le Triton X-100 avait été remplacé par 6 mM de CHAPS (3-[3-(cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate) (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suède).

Un autre essai a été effectué avec une colonne échangeuse-ionique DEAE (diéthylaminoéthyl)-5PW (8,0 x 75 mm) (Waters, Mississauga, Ont.) préalablement équilibrée dans un tampon contenant 0,05 M de potassium phosphate à pH 8,5, 5 % v/v de glycérol, 0,025% de Triton X-100 et 1 mM de dithiothréitol. L'échantillon provenait d'une fraction active, obtenue dans les mêmes conditions de tampon, de la chromatographie sur t-butyl-CIH. L'élution a été effectuée à un débit de 1mL/min (119,4 cm/heure), avec un gradient passant de 0 à 0,6 M de NaCl en 45 minutes et de 0,6 à 1 M en 10 minutes, pour rester à 1 M pendant 10 minutes. Les essais de purification avec les colonnes DEAE-5PW et Sephacryl SW-300 ont été effectués avec le système Waters 650 Advanced Purification System (Millipore-Waters, Mississauga, Ont.), qui était relié à un spectrophotomètre (LC spectrophotometer modèle 481 de marque Millipore-Waters) et à un module de données (modèle 740, Waters-Millipore).

Finalement, un essai a été effectué utilisant comme première étape, la chromatographie sur colonne t-butyl-CIH dans un tampon à pH 8,5 avec Triton X-100 et comme deuxième étape, une chromatographie sur colonne hydroxyapatite. La colonne hydroxyapatite a été effectuée dans une seringue de 10 mL (15 x 60 mm) (Becton Dickinson, Franklin Lakes, N.J.) remplie avec 6 mL d'hydroxyapatite Bio-Gel HT Support (Bio-Rad, CA, États-Unis). dans laquelle une petite quantité de laine de verre avait été préalablement placée au fond afin de retenir le gel. Cette colonne a été équilibrée (débit 1 mL/min ou 33,9 cm/heure) avec un tampon potassium phosphate 0,05 M à pH 8,5 contenant 5 % v/v glycérol, 0,1% de Triton X-100 et 1 mM de dithiothréitol. Les fractions actives provenant de la colonne t-butyl, c'est-à-dire, dans lesquelles une activité de déshalogénéation était mesurée, ont été ensuite regroupées et introduites dans la colonne hydroxyapatite. L'élution a été effectuée (débit 1 mL/min) avec 10 mL de tampon potassium phosphate 0,05 M à pH 8,5 contenant 5 % v/v glycérol, 0,1% de Triton X-100 et 1 mM de dithiothréitol et par la suite avec 10 mL de tampon potassium phosphate 0,4 M, ayant la même composition. Les fractions, dont le volume était de 2 mL, ont été recueillies dans des vials et les dosages de l'activité de déshalogénéation ont été effectués selon la méthode habituelle.

20. ÉLECTROPHORÈSE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

Des électrophorèses en gel de polyacrylamide 10% contenant 0,1 % de lauryl sulfate de sodium (SDS) et 0.375 M de Tris à pH 8,8 ont été effectués selon la méthode de Bio-Rad: Reagent and gel preparation for Laemmli SDS polyacrylamide gel electrophoresis (Bio-Rad Laboratories, CA, États-Unis; Laemmli, 1970). Des échantillons de 50 µl, provenant des préparations obtenue lors des essais de purification, ont reçus 12 µl de tampon (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 20% glycérol, 2% SDS et 5% β-mercaptoéthanol) et ont été incubés pendant 5 minutes dans un bain d'eau en ébullition. Par la suite, le gel a été chargé et la migration a été effectuée

pendant 45 minutes à 200 volts (0,03 Amp), dans un tampon de migration Tris 25 mM, pH 8,3 contenant: 192 mM de glycine et 0,1% de SDS. Des standards protéiques de faible poids moléculaire (Bio-Rad, CA, États-Unis) ont été utilisés.

Des électrophorèses en gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes ont également été effectuées et ceux-ci étaient composés d'un gel de concentration et d'un gel de séparation. La composition du gel de concentration était la suivante: 4% de polyacrylamide; 0,375 M Tris-HCl à pH 6,8; 0,05 % Triton X-100; 0,05% d'ammonium persulfate (Bio-Rad, CA, États-Unis) et 0,05% de Temed (Bio-Rad, CA, États-Unis), tandis que celle du gel de séparation était: 6% de polyacrylamide; 0,375 M Tris à pH 8,8; 0,05 % Triton X-100; 0,15% d'ammonium persulfate et 0,04% de Temed. Des échantillons de 50 µl des fractions étudiées ont reçus: 5 µl de Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8; 50 µl d'une solution de bleu de bromophénol 0,1% (J.T. Baker, Phillipsburg, N.J.) et quelques cristaux de sucrose (J.T. Baker, Phillipsburg, N.J.). Par la suite, le gel a été chargé et la migration a été effectuée pendant 3 heures à 200 volts, dans deux tampons de migration. Le premier qui était le tampon du haut contenait: 0,05 M Tris-HCl à pH 8,8; 0,01 M de glycine et 0,05% Triton X-100 tandis que le deuxième, celui du bas, était un tampon Tris-HCl 0,1 M à pH 8,1. L'albumine sérine bovine (BSA) a été utilisée comme standard. Une solution de BSA à une concentration de 200 µg/mL a été diluée de moitié avec une solution de sucrose à 40%. Un volume de 50 µl de cette préparation a été ajouté à 5 µl de Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 et à 50 µl d'une solution de bleu de bromophénol 0,1%, une fois mélangé, ceci a servi à charger le gel.

Les protéines ont été révélées par deux méthodes différentes soit la coloration au bleu de Coomassie et la coloration à l'argent. La coloration au bleu de Coomassie a été effectuée en immergeant le gel pendant 30 minutes dans une solution colorante contenant: 40% de méthanol, 10% d'acide acétique et 0,1% de bleu de Coomassie R-250 (Bio-Rad, CA, États-Unis). La décoloration a été effectuée, pendant 30 minutes,

en utilisant un décolorant contenant 40% de méthanol et 10% d'acide acétique. La coloration à l'argent a été effectuée en utilisant les produits et la méthode Silver Stain Plus de Bio-Rad (numéro de référence 161-0449).

RÉSULTATS

1. CINÉTIQUE ENZYMATIQUE ET DÉTERMINATION DE LA STABILITÉ DES ENZYMES

1.1 Cinétique enzymatique

La relation entre la quantité de produit formé par l'enzyme et le temps d'incubation a été étudiée pour les deux enzymes et celles-ci sont présentées aux figures 5A et 6. Pour la préparation enzymatique de la déshalogénase I solubilisée une relation linéaire a été obtenue à une température d'incubation de 37°C, entre la quantité de 2,4-DCP formé par l'enzyme et le temps d'incubation, pour une période excédant 6 heures. La quantité de protéines utilisée pour chacun des essais de l'expérience décrite ci-dessus était de 73 µg. Par ailleurs, la relation existant entre l'activité de déshalogénéation et la quantité d'enzyme utilisée pour le dosage de l'activité enzymatique est présentée à la figure 5B. Une relation linéaire est observée jusqu'à une quantité de protéines utilisée dans l'essai enzymatique standard de 0,15 mg. Il est à noter que deux lots différents de préparations enzymatiques ont été utilisés pour ces expériences.

Pour la préparation enzymatique de la déshalogénase II solubilisée, une relation linéaire a été également observée à une température d'incubation de 45°C, entre la quantité de 3-MCP formé et le temps d'incubation, pour une période excédant 18 heures. Par ailleurs, l'effet de différents donneurs d'électrons sur l'activité de déshalogénéation a été étudié. L'éthyl viologène a diminué l'activité initiale de la préparation de la déshalogénase II solubilisée de 37,7%, par rapport au méthyl viologène, tandis qu'aucune activité n'a été observée avec le benzyl viologène.

1.2 Stabilité des enzymes

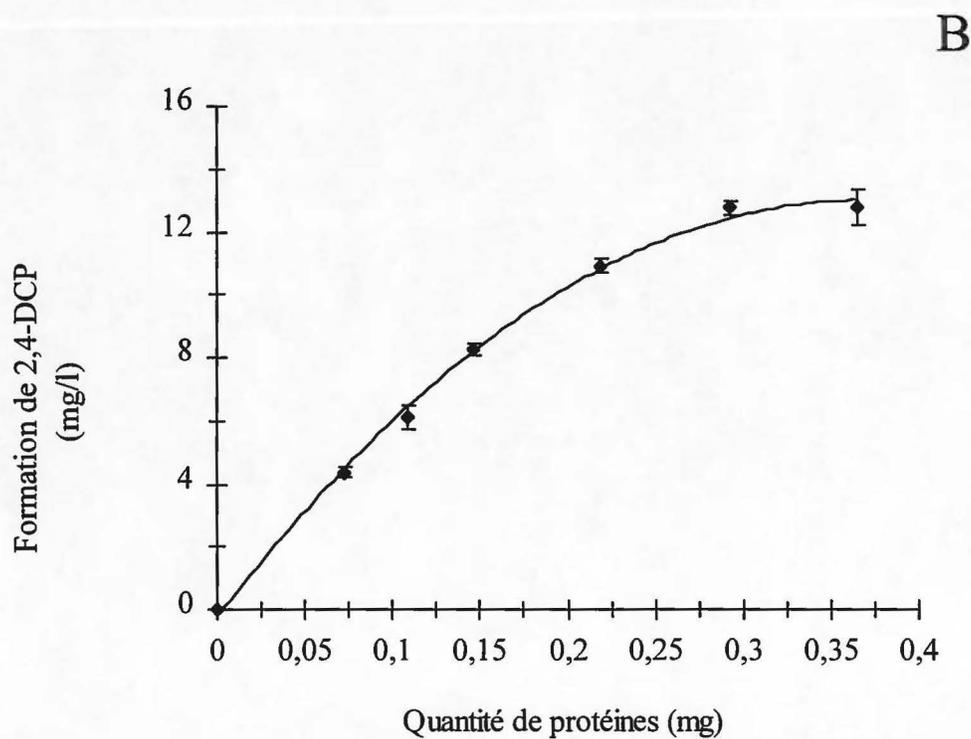
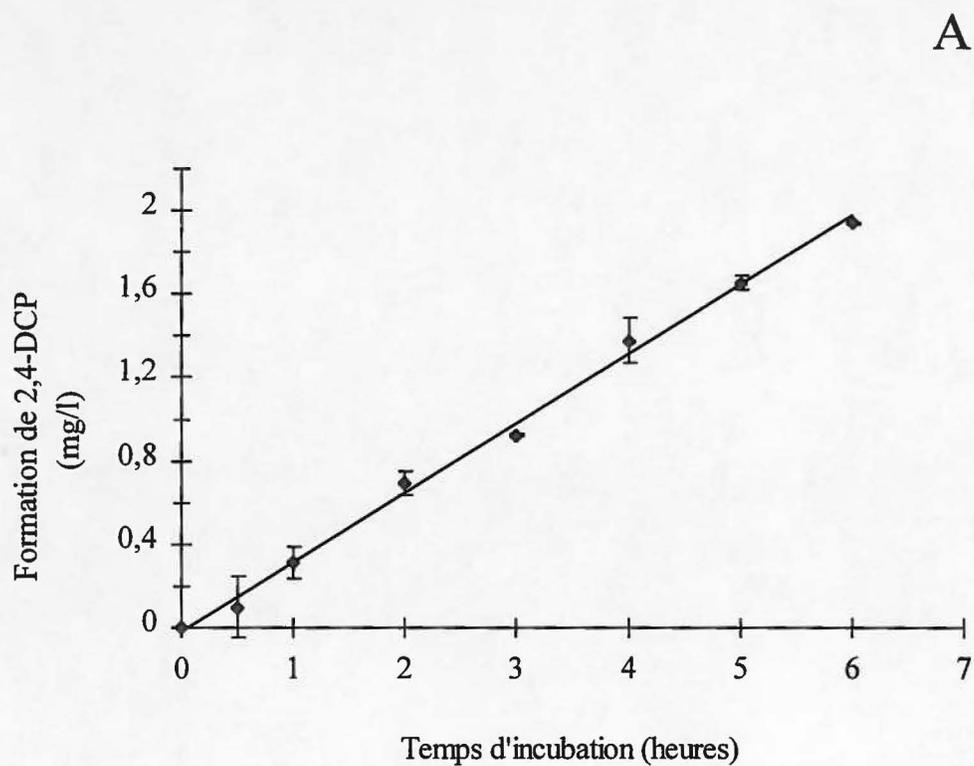


FIGURE 5: Formation de 2,4-DCP pour une préparation de déshalogénase I solubilisée en fonction (A) du temps d'incubation et (B) de la quantité de protéines présente lors du dosage enzymatique.

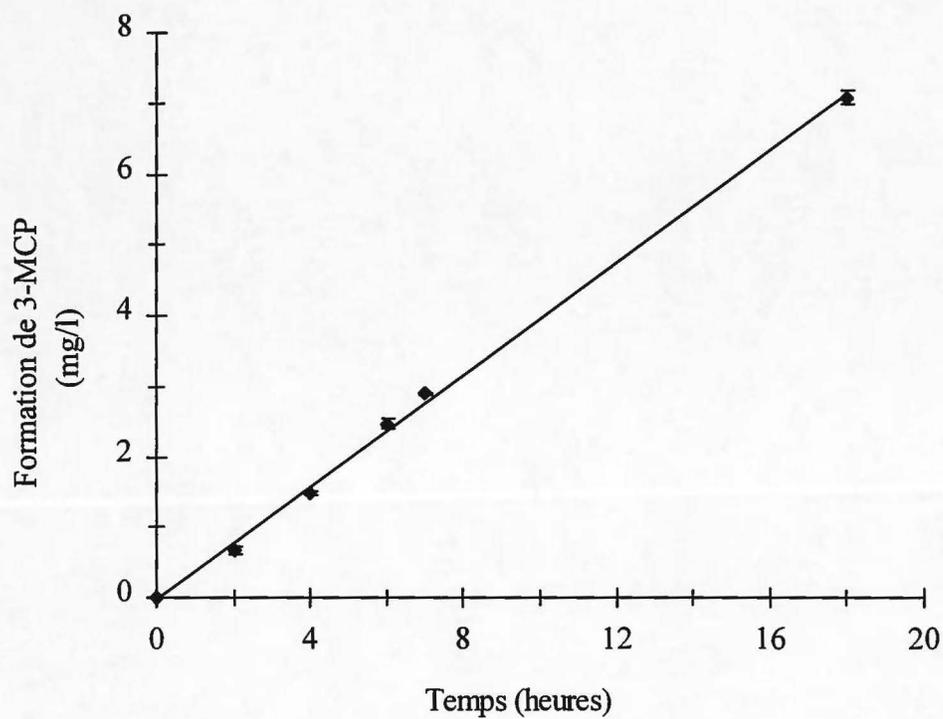


FIGURE 6: Cinétique enzymatique de la formation de 3-MCP en fonction du temps d'incubation pour une préparation de déshalogénase II solubilisée (274 μg de protéines).

La stabilité de la préparation de la déshalogénase I solubilisée a été étudiée ainsi que celles des fractions membranaires diluées. Pour les fractions membranaires et les préparations solubilisées de la déshalogénase I, l'activité a été relativement stable pendant plusieurs mois de conservation à -20 et -80°C . Cependant, l'activité spécifique des enzymes solubilisées et des fractions membranaires diluées de la déshalogénase I, qui ont été conservées à 37°C , a diminué respectivement de 96,1% et de 86,2% après 48 heures d'incubation, pour être par la suite complètement perdue après 72 heures. L'activité initiale des préparations solubilisées et des fractions membranaires diluées étaient respectivement de 7,179 et 4,992 nmoles 2,4-DCP min^{-1} mg de protéines⁻¹.

Dans le cas, de la préparation de la déshalogénase II solubilisée, la stabilité a été étudiée à 4°C et les résultats sont présentés à la figure 7. L'activité de déshalogénéation à 4°C est relativement stable puisque l'on observe dans tous les cas une perte de 25% de l'activité après 72 heures d'incubation. L'addition de Na_2S comme agent réducteur ou de 3,5-DCP n'a pas modifié la stabilité de l'enzyme, puisque le profil de chacune des courbes des préparations enzymatiques est identique à la préparation d'enzyme sans additif. De plus, l'activité de la préparation de la déshalogénase II solubilisée à -80°C était très stable pendant plusieurs mois.

2. DÉTERMINATION DU pH OPTIMAL

L'effet du pH sur la déshalogénéation du 2,4,6-TCP par la préparation enzymatique de la déshalogénase I solubilisée a été étudiée et est présenté à la figure 8. Cet essai a été effectué dans un tampon d'activité enzymatique (TAE) constitué de 0,1 M de potassium phosphate, dont l'intervalle de pH étudié a varié de 5,7 à 7,7. L'activité de déshalogénéation qui a été observée a augmenté graduellement pour atteindre sa valeur optimale de 6,79 nmoles/min/mg de protéines à pH 6,9, pour par la

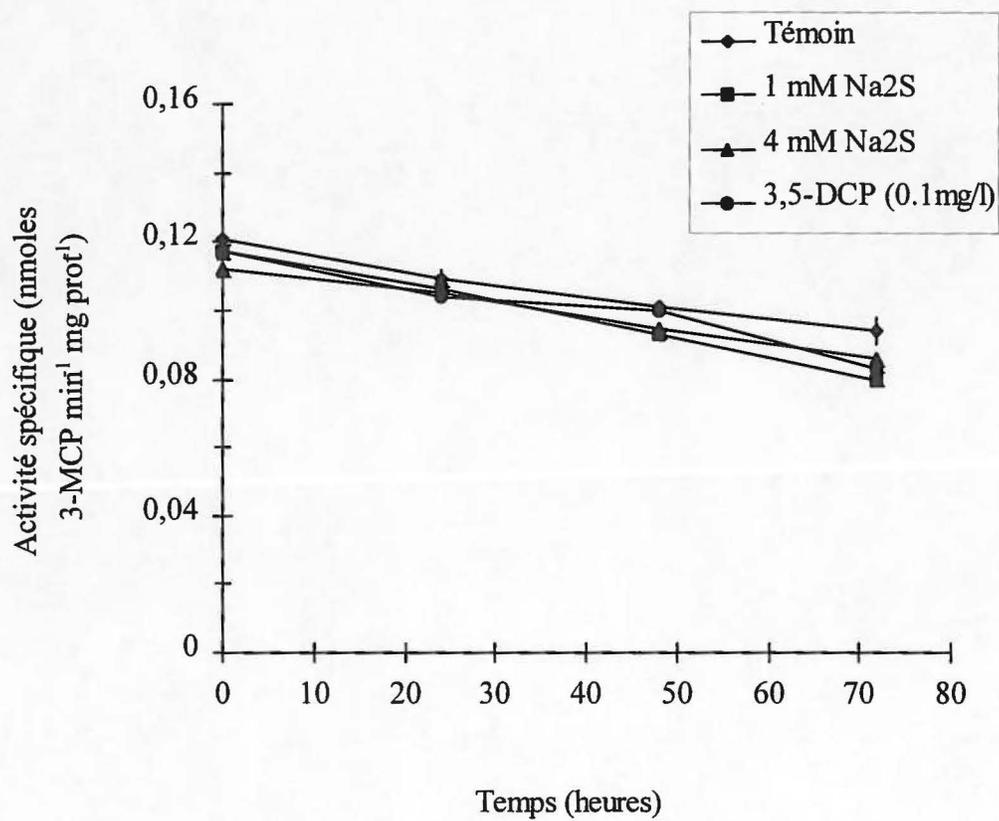


FIGURE 7: Stabilité d'une préparation de déshalogénase II solubilisée à 4°C, avec ajout de Na₂S ou de 3,5-DCP.

suite redescendre graduellement.

Dans le cas de la préparation enzymatique de la déshalogénase II solubilisée, l'effet du pH sur la déshalogénéation du 3,5-DCP a été étudiée dans trois tampons de composition différente (figure 9). Le premier tampon était le potassium phosphate à 0,1 M dont l'intervalle de pH étudié a varié de 6,2 à 7,4. L'activité de déshalogénéation qui a été observée a augmenté graduellement pour atteindre sa valeur optimale à un pH de 7,4.

Le deuxième tampon utilisé a été le Tris-HCl 0,1 M, dont l'intervalle de pH a varié de 6,7 à 8,2. L'activité de déshalogénéation s'accroissait avec l'augmentation du pH, pour atteindre son maximum à un pH de 8,2. Cependant l'activité de déshalogénéation observée dans le tampon Tris-HCl 0,1 M était plus faible que les valeurs observées dans le tampon potassium phosphate 0,1 M.

Dans le tampon Tris-HCl 0,2 M, l'activité de déshalogénéation a été étudiée dans un intervalle de pH variant de 6,6 à 8,5. La tendance observée a été la même que pour le tampon Tris-HCl 0,1 M et le maximum d'activité a été observé à pH 8,5. Cependant, l'activité de déshalogénéation mesurée dans le tampon Tris-HCl 0,2 M était plus faible que celle observée dans les deux autres.

3. DÉTERMINATION DE LA TEMPÉRATURE OPTIMALE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE ET DE LA STABILITÉ THERMIQUE

La détermination de la température optimale de l'activité de déshalogénéation ainsi que la stabilité thermique ont été étudiés d'une part avec les fractions

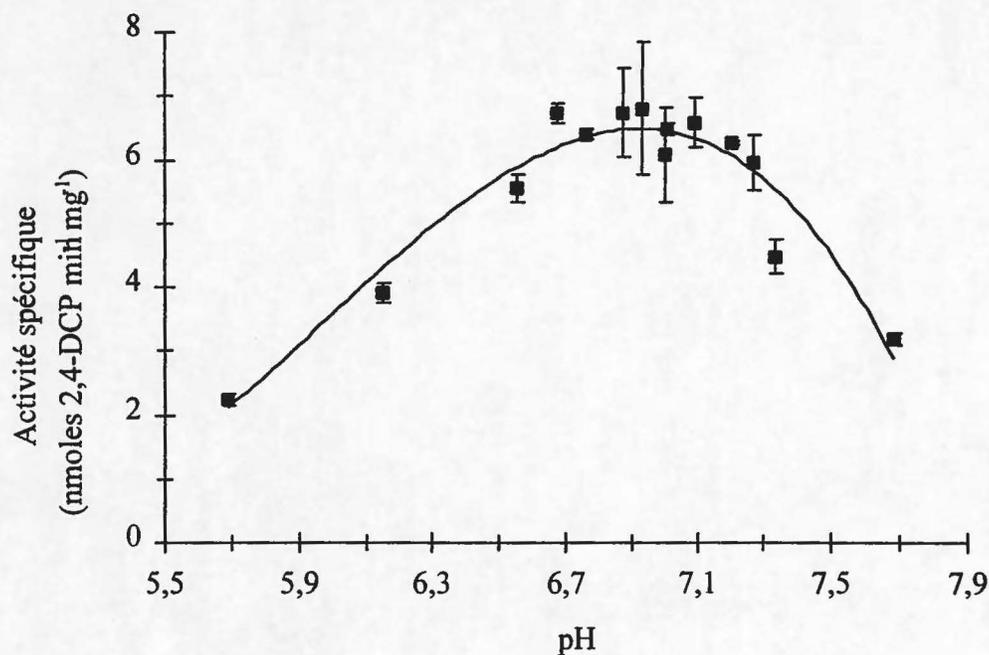


FIGURE 8: Effet du pH sur l'activité de déshalogénéation du 2,4,6-TCP d'une préparation de déshalogénase I solubilisée. Les essais ont été effectués avec un tampon potassium phosphate 0,1 M.

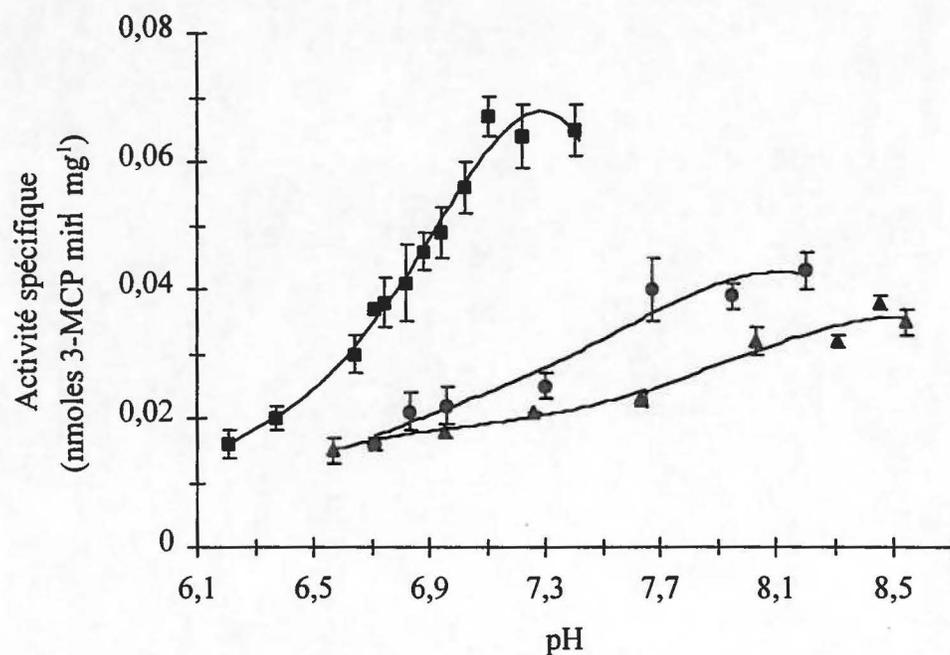


FIGURE 9: Effet du pH sur l'activité de déshalogénéation du 3,5-DCP d'une préparation de déshalogénase II solubilisée. Les essais ont été effectués avec un tampon potassium phosphate 0,1 M (■), Tris-HCl 0,1 M (●) et Tris-HCl 0,2 M (▲).

membranaires et d'autre part avec les préparations de la déshalogénase I solubilisée. Les résultats obtenus pour les fractions membranaires de la déshalogénase I sont présentés à la figure 10. Une activité de déshalogénéation a été observée entre 5°C et 75°C. La température optimale a été obtenue aux environs de 55°C. À des températures supérieures à 60°C, une baisse rapide de l'activité a été observée. Lorsque les fractions membranaires étaient incubées 2 heures à des températures entre 5°C et 50°C, préalablement au dosage de l'activité enzymatique (stabilité thermique), l'activité de déshalogénéation était relativement stable. Cependant, à partir de 60°C l'activité chutait, pour être par la suite complètement inhibée à une température de 65°C et plus.

Les résultats obtenus pour la préparation de la déshalogénase I solubilisée sont présentés à la figure 11. Le comportement de l'activité de déshalogénéation qui a été observé pour la préparation de la déshalogénase I solubilisée était le même que pour les fractions membranaires. Une activité de déshalogénéation a été observée entre 5°C et 65°C. L'activité maximale a été obtenue près de 50°C. A partir de 60°C l'activité a chuté très rapidement pour être complètement inhibée à 75°C. Lorsque les enzymes solubilisées étaient incubées 2 heures à des températures entre 5°C et 45°C, préalablement au dosage de l'activité enzymatique, l'activité de déshalogénéation était stable. Cependant, celle-ci chutait à 50°C pour être complètement inhibée à 57°C.

Pour la préparation de la déshalogénase II, l'effet de la température d'incubation a été étudiée avec les fractions membranaires et la fraction solubilisée (figure 12). Dans les deux cas, l'activité de déshalogénéation augmentait graduellement avec l'accroissement de la température, pour atteindre son maximum à 45°C et pour diminuer rapidement lorsque la température était supérieure à 45°C. Dans les deux cas, l'activité était complètement inhibée à 60°C.

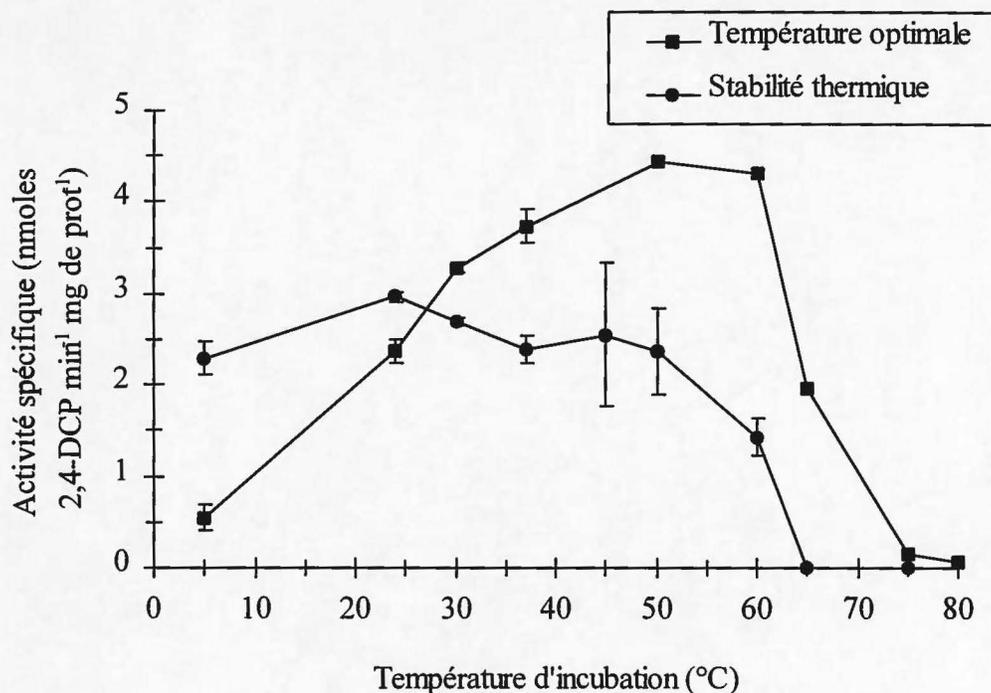


FIGURE 10: Effet de la température sur l'activité de déshalogénéation du 2,4,6-TCP et stabilité thermique d'une préparation de fractions membranaires de déshalogénase I (après 2 heures d'incubation aux températures indiquées).

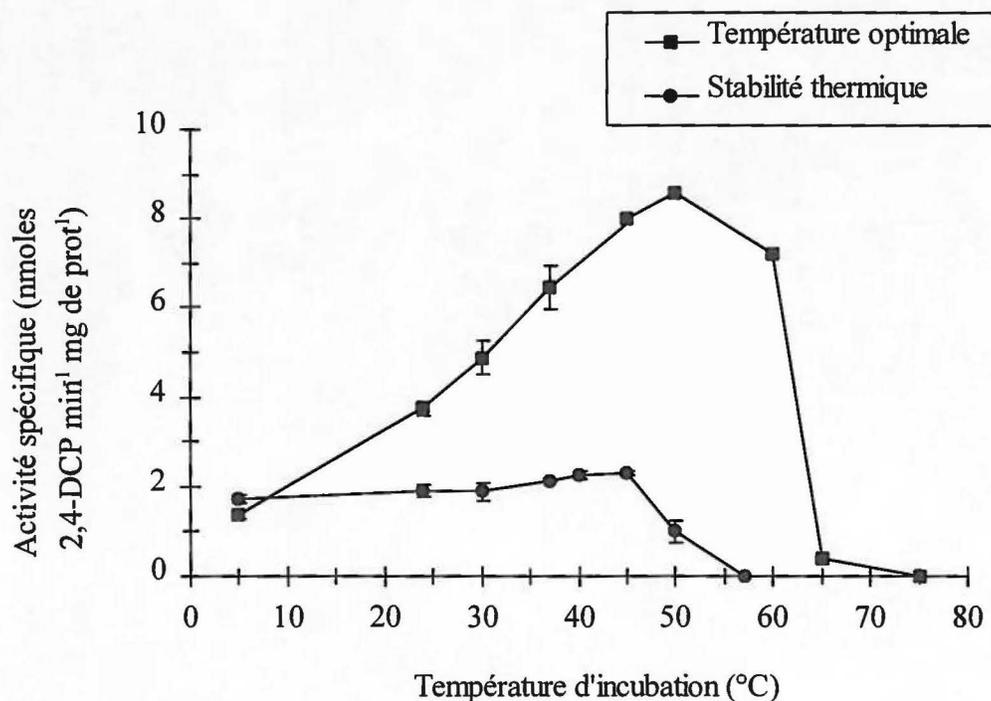


FIGURE 11: Effet de la température sur l'activité de déshalogénéation du 2,4,6-TCP et stabilité thermique d'une préparation de déshalogénase I solubilisée (après 2 heures d'incubation aux températures indiquées).

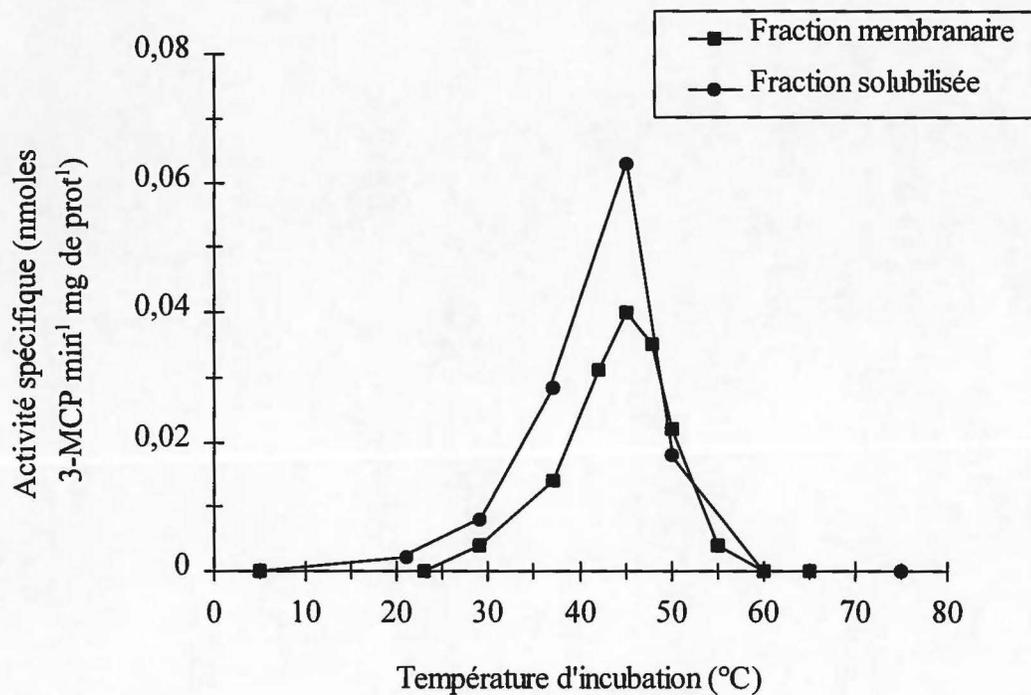


FIGURE 12: Effet de la température sur l'activité de déshalogénéation du 3,5-DCP d'une préparation de fraction membranaire et d'une préparation de fraction solubilisée de déshalogénase II. Les écart-type sont tous \leq à 0,004.

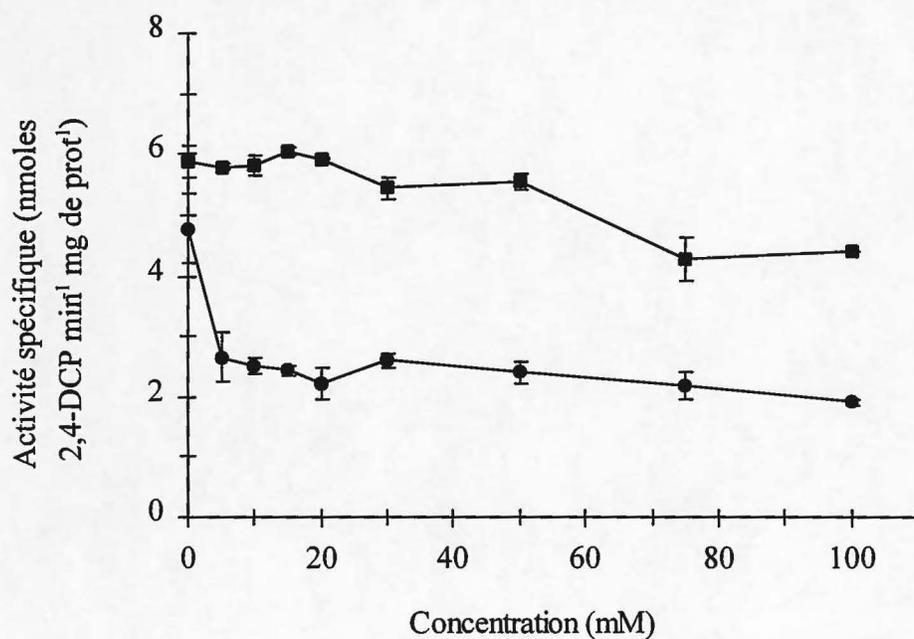
4. EFFET DU SULFATE, DU SULFITE ET DU NITRATE SUR L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DES FRACTIONS SOLUBILISÉES

Les effets du sulfate, du sulfite et du nitrate sur l'activité de déshalogénéation ont été étudiés pour les préparations enzymatiques des déshalogénases I et II solubilisées et les résultats sont présentés aux figures 13 et 14. Le sulfate n'a démontré aucun effet significatif sur l'activité de déshalogénéation de la préparation de la déshalogénase I solubilisée à des concentrations variant de 0 à 100 mM de sulfate, puisque l'activité était maintenue à environ 5 nmoles de 2,4-DCP/min/mg de protéines (figure 13). Cependant le sulfite inhibait totalement l'activité de déshalogénéation à une concentration aussi faible que 1 mM, tandis que le nitrate diminuait l'activité d'environ 50% à une concentration de 5 mM. Par la suite, l'activité était maintenue constante pour des concentrations de nitrate allant jusqu'à 100 mM. Dans le cas de la préparation de la déshalogénase II solubilisée (figure 14), le sulfate n'a démontré aucun effet sur l'activité de déshalogénéation, puisque celle-ci s'est maintenue pour des concentrations aussi grandes que 100 mM. Cependant pour le sulfite et le nitrate, des baisses respectives de 84% et de 97% de l'activité de déshalogénéation étaient observées à une concentration de 0,75 mM.

5. EFFET DE L'AIR SUR L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DES FRACTIONS SOLUBILISÉES

L'effet de l'air a été étudié pour les préparations enzymatiques des déshalogénases I et II solubilisées et les résultats sont présentés au tableau 3. La préparation de la déshalogénase I solubilisée était très sensible à l'oxygène, puisqu'une incubation d'une heure en présence de 10% d'air, diminuait l'activité de déshalogénéation à 29,5% de l'activité initiale, tandis qu'une incubation avec 50% d'air diminuait l'activité à 8,6%. La préparation de la déshalogénase II solubilisée

A



B

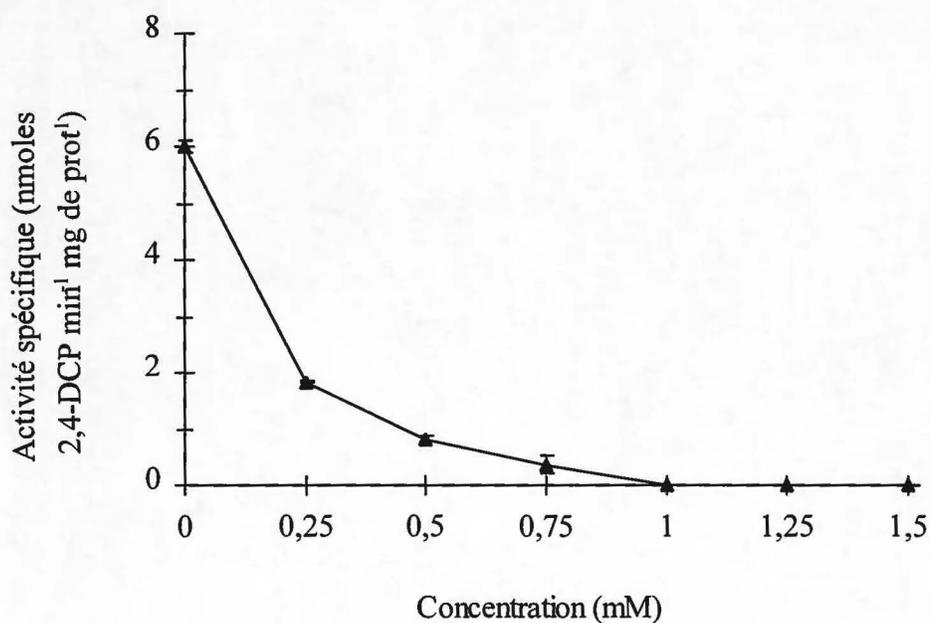


FIGURE 13: Effet (A) du sulfate (■), du nitrate (●) et (B) du sulfite (▲) sur l'activité de déshalogénation du 2,4,6-TCP d'une préparation de déshalogénase I solubilisée.

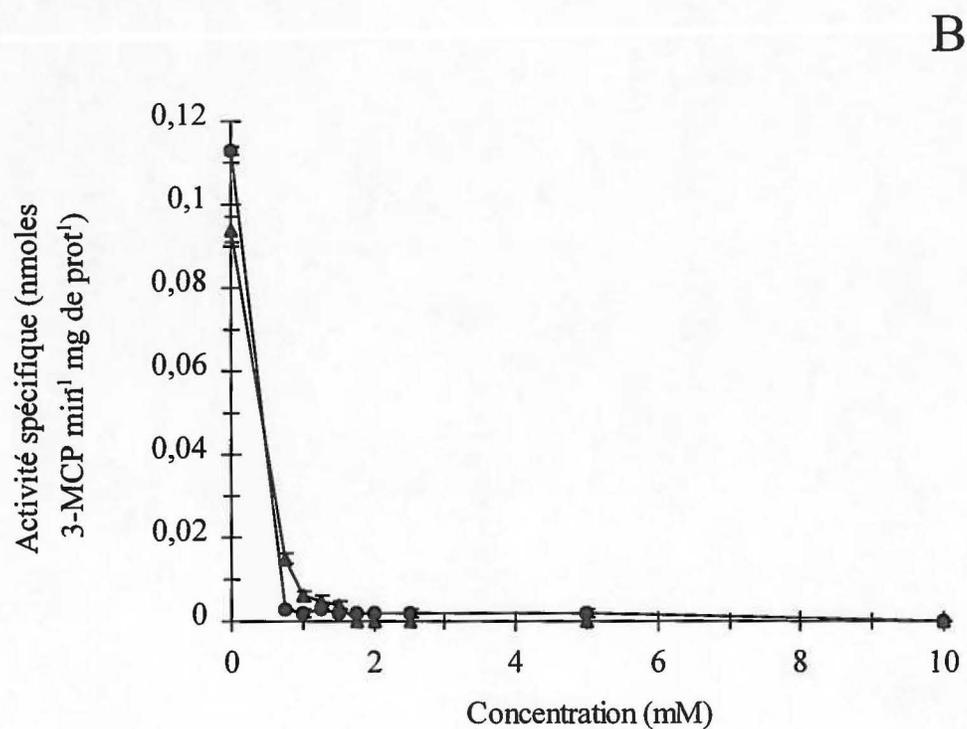
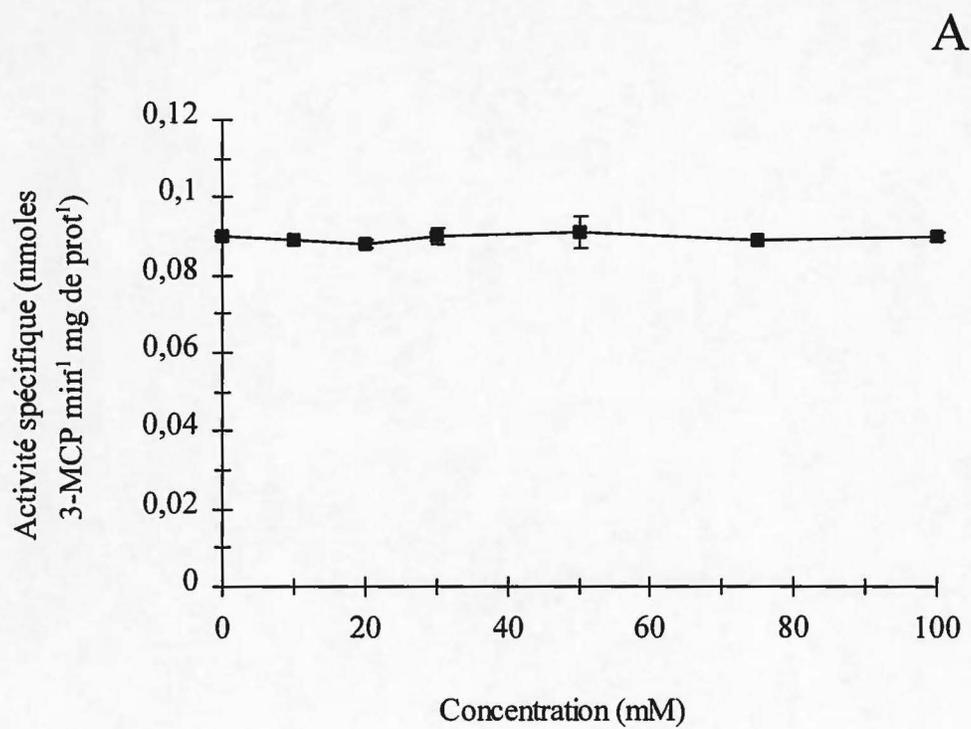


FIGURE 14: Effet (A) du sulfate (■) et (B) du nitrate (●) et du sulfite (▲) sur l'activité de déshalogénéation du 3,5-DCP d'une préparation de déshalogénase II solubilisée.

TABLEAU 3: Effet de l'air sur l'activité de déshalogénéation de préparations de déshalogénases I et II solubilisées.

| Pourcentage d'air | Activité de déshalogénéation (%) | |
|-------------------|----------------------------------|-------------------------|
| | <u>Déshalogénase I</u> | <u>Déshalogénase II</u> |
| Témoin (0) | 100 | 100 |
| 10 | 29,5 | 77,3 |
| 50 | 8,6 | 43,4 |

Note : L'activité spécifique du témoin était de 5,120 nmoles de 2,4-DCP min⁻¹ mg de protéines⁻¹ pour la préparation de la déshalogénase I et de 0,077 nmoles de 3-MCP min⁻¹ mg de protéines⁻¹ pour la préparation de la déshalogénase II.

était, quant à elle, moins sensible à l'oxygène que la préparation de la déshalogénase I puisque qu'une incubation en présence de 10% et de 50% d'air diminuait respectivement l'activité de déshalogénéation à 77,3 et 43,4 % de l'activité initiale.

6. EFFET DES MÉTAUX SUR L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DES FRACTIONS SOLUBILISÉES

L'effet des métaux a été étudié sur l'activité de déshalogénéation des préparations enzymatiques des déshalogénases I et II solubilisées et les résultats sont présentés respectivement aux figures 15 et 16. Dans le cas de la préparation de la déshalogénase I, la plupart des métaux ajoutés à l'essai enzymatique standard (5 mM) ont eu peu d'effet sur l'activité de déshalogénéation. En effet le $MgCl_2$, le KCl , le $ZnCl_2$, le $MnCl_2$, le $NaCl$ et le $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ n'ont démontrés aucun effet par rapport au témoin. Cependant, le $CoCl_2$ et le NaN_3 ont diminué l'activité de 18% et 55 % respectivement. Pour la préparation de la déshalogénase II solubilisée les résultats étaient similaires puisque seul le NaN_3 a diminué l'activité de déshalogénéation initiale de 86%.

7. EFFET D'AGENTS CHÉLATEURS ET DU TRITON X-100 SUR L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DES FRACTIONS SOLUBILISÉES

Les effets du citrate de sodium, de l'EDTA et du Triton X-100 ont été étudiés et les résultats sont présentés au tableau 4. Le citrate de sodium, à des concentrations de 100 et 200 mM, a diminué l'activité de déshalogénéation de la préparation de la déshalogénase I solubilisée de 40,1 et 58,4% respectivement. Cependant, l'EDTA n'a pas démontré d'effet. Le Triton X-100 à des concentrations de 0,5% et 1% a

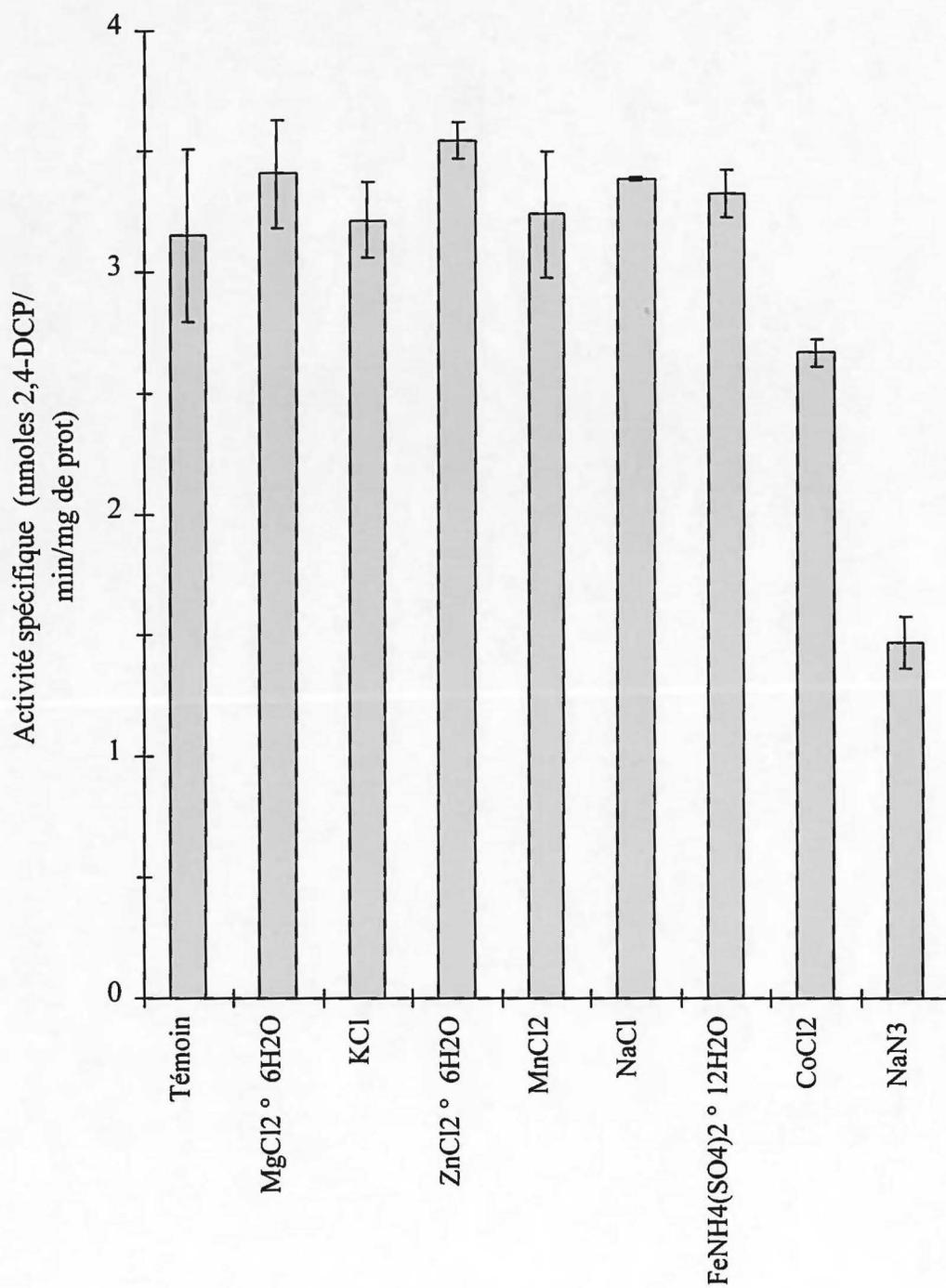


FIGURE 15: Effet des métaux (5 mM) sur l'activité de déshalogénation du 2,4,6-TCP d'une préparation de déshalogénase I solubilisée.

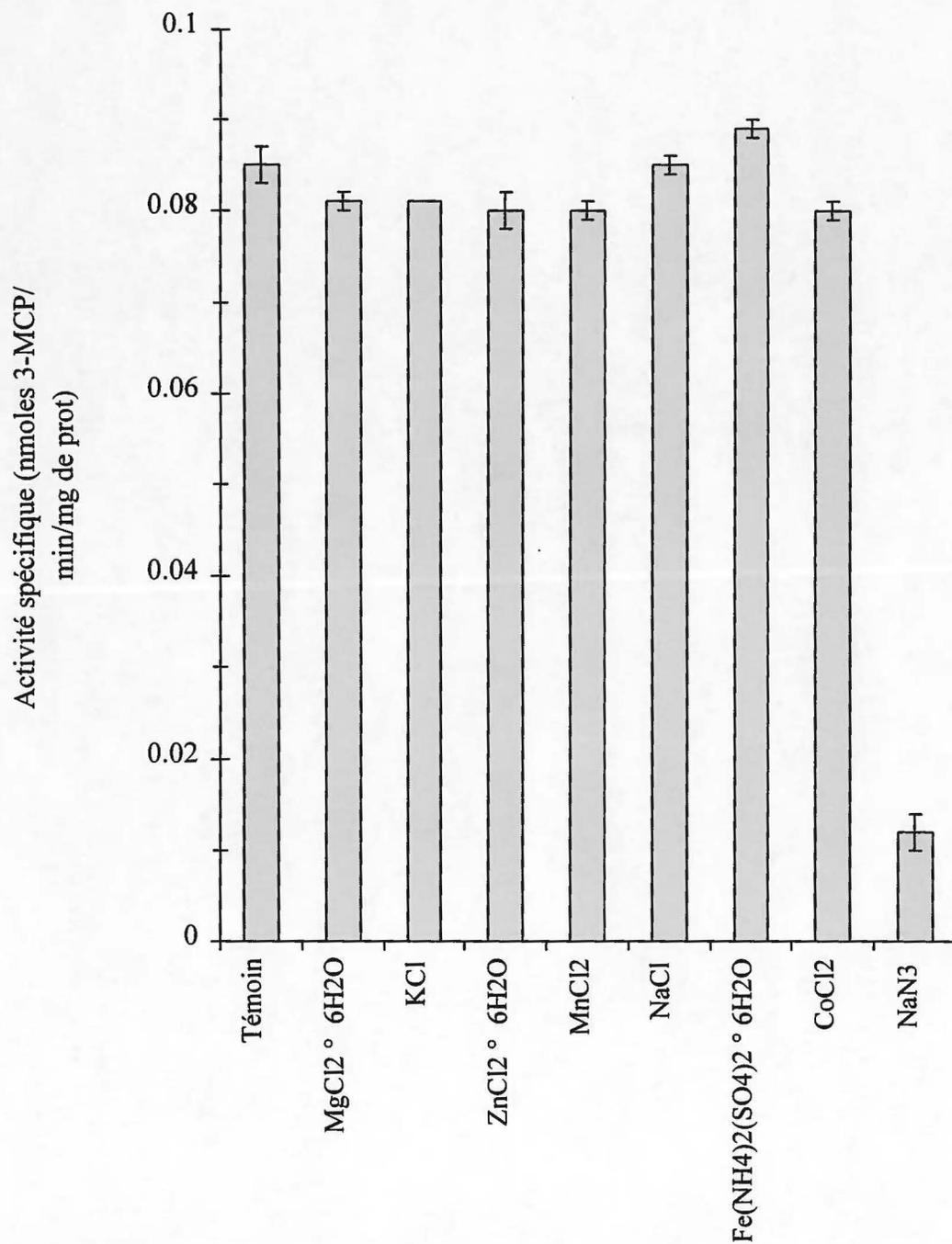


FIGURE 16: Effet des métaux (5 mM) sur l'activité de déshalogénéation du 3,5-DCP d'une préparation de déshalogénase II solubilisée.

TABLEAU 4: Effet des agents chélateurs et du Triton X-100 sur l'activité de déshalogénéation de préparations de déshalogénases I et II solubilisées.

| | Perte de l'activité de déshalogénéation (%) | |
|----------------------------|---|------------------|
| | Déshalogénase I | Déshalogénase II |
| <u>Agents chélateurs:</u> | | |
| Citrate de sodium (100 mM) | 40,1 | 31,1 |
| Citrate de sodium (200 mM) | 58,4 | 49,1 |
| EDTA (10 mM) | 0 | 0 |
| <u>Détergents:</u> | | |
| Triton X-100 (0,5 %) | 14,7 | 22,3 |
| Triton X-100 (1%) | 39,5 | 30,3 |

également diminué l'activité de 14,7 et 39,5% respectivement.

L'activité de la préparation de la déshalogénase II solubilisée a également été inhibée partiellement par le citrate de sodium et par le Triton X-100. En effet, une concentration de 100 et de 200 mM de citrate de sodium diminuait l'activité de 31,1 et de 49,1%, tandis que 0,05% et 1% de Triton X-100 diminuait celle-ci de 22,3 et 30,3% respectivement. Cependant, une incubation de la préparation solubilisée de la déshalogénase II en présence d'EDTA n'a démontré aucun effet sur l'activité de déshalogénéation.

8. SPECTRE D'ACTIVITÉ DES FRACTIONS SOLUBILISÉES DES DÉSHALOGÉNASES I ET II

8.1 Les chlorophénols et bromophénols

Le spectre d'activité de la préparation enzymatique de la déshalogénase I solubilisée a été effectué avec différents chlorophénols et bromophénols et les résultats sont présentés au tableau 5. La préparation de la déshalogénase I a été capable de déshalogéner le PCP, le 2,4,6-TCP, le 3,4,5-TCP, le 2,3,5-TCP, le 2,3,4-TCP, le 2,3,6-TCP, le 2,4,5-TCP, le 2,3-DCP et le 2,4-DCP. L'activité de déshalogénéation la plus importante a été observée pour la transformation du PCP en 2,3,4,5-TeCP et la valeur était de 40,93 nmoles/min/mg de protéines. La position de déshalogénéation qui a été observée était principalement la position *ortho*, quoique qu'une faible activité, de 0,931 nmole/min/mg de protéines, en position *para* ait été observé pour le 3,4,5-TCP. Les chlorophénols suivants n'ont pas été déchlorés par la préparation de la déshalogénase I: le 2,5-DCP, le 2,6-DCP, le 3,4-DCP, le 3,5-DCP et les monochlorophénols. Par ailleurs, la préparation de la déshalogénase I solubilisée a été capable de transformer le 2,4,6-TBrP en un dibromophénol (non identifié), mais

incapable de déshalogéner les monobromophénols.

Le spectre de déshalogénéation de la préparation de la déshalogénase II solubilisée est présenté au tableau 6. Celle-ci a été capable de déshalogéner: le PCP, le 3,4,5-TCP, le 2,3,4-TCP, le 2,3,6-TCP, le 2,4,5-TCP, le 2,3,5-TCP, le 2,4,6-TCP, le 3,5-DCP, le 2,3-DCP et le 2,4-DCP. La préparation de la déshalogénase II a enlevé des atomes de chlore lors de la déshalogénéation des chlorophénols dans les trois positions soit: *ortho*, *meta* et *para*. L'activité la plus élevée qui a été observée était encore une fois pour le PCP et sa valeur était de 0,161 nmoles/min/mg de protéines. Le PCP a été transformé en 2,3,5,6-TeCP (*para*) et en 2,3,4,6-TeCP (*meta*) dans des proportions de 80 et 20% respectivement. Les chlorophénols qui n'ont pas été déshalogénés sont les suivants: 2,5-DCP, 2,6-DCP, 3,4-DCP et les monochlorophénols. Par ailleurs, la préparation de la déshalogénase II solubilisée a été capable de transformer le 2,4,6-TBrP en un dibromophénol (non identifié), mais incapable de déshalogéner les monobromophénols.

8.2 Le tétrachloroéthylène (PCE)

La capacité de déshalogénéation des préparations des déshalogénases solubilisées I et II a été étudiée sur le tétrachloroéthylène. Les deux enzymes sont capables de transformer le PCE en trichloroéthylène, puisque en chromatographie en phase gazeuse (GC-ECD) le pic représentant le PCE a diminué et il y a eu apparition d'un nouveau pic représentant le trichloroéthylène. Cependant, une quantification exacte des produits a été impossible à effectuer, dû aux variations provenant de la difficulté des extractions et de la volatilité des produits.

TABLEAU 5: Spectre d'activité de déshalogénéation envers les chlorophénols et les bromophénols pour une préparation de déshalogénase I solubilisée.

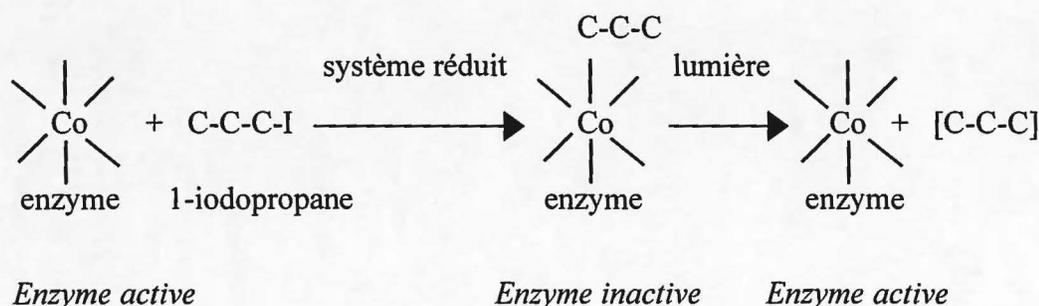
| Substrat | Produit(s) | Position de déshalogénéation | Activité spécifique (nmoles min ⁻¹ mg ⁻¹) |
|-------------|---------------|------------------------------|--|
| PCP | 2,3,4,5-TeCP | ortho | 40.933 ± 0.096 |
| 2,4,6-TCP | 2,4-DCP | ortho | 8.801 ± 0.281 |
| 3,4,5-TCP | 3,5-DCP | para | 0.931 ± 0.052 |
| 2,3,5-TCP | 3,5-DCP | ortho | 16.524 ± 0.801 |
| 2,3,4-TCP | 3,4-DCP | ortho | 23.582 ± 0.219 |
| 2,3,6-TCP | 2,5-DCP | ortho | 8.112 ± 0.276 |
| 2,4,5-TCP | 3,4-DCP | ortho | Traces |
| 2,3-DCP | 3-MCP | ortho | 3.734 ± 0.110 |
| 2,4-DCP | 4-MCP | ortho | 0.045 ± 0.006 |
| Autres DCPs | Aucun | | |
| MCPs | Aucun | | |
| 2,4,6-TBrP | Dibromophénol | Indéterminé | Indéterminé |
| MBrPs | Aucun | | |

TABLEAU 6: Spectre d'activité de déshalogénéation envers les chlorophénols et les bromophénols pour des préparations de déshalogénase II solubilisée.

| Substrat | Produit(s) | Position de déshalogénéation | Activité spécifique (nmoles min ⁻¹ mg ⁻¹) |
|-------------|--|------------------------------|--|
| PCP | 2,3,5,6-TeCP (80%) 2,3,4,6-TeCP (20%) | para meta | 0.161 ± 0.035 |
| 2,4,6-TCP | 2,4-DCP | ortho | 0.027 ± 0.001 |
| 3,4,5-TCP | 3,5-DCP | para | 0.058 ± 0.010 |
| 2,3,5-TCP | 2,5-DCP 3,5-DCP | meta ortho | 0.059 ± 0.002 0.032 ± 0.014 |
| 2,3,4-TCP | 2,4-DCP 3,4-DCP | meta ortho | 0.023 0.008 ± 0.003 |
| 2,3,6-TCP | 2,6-DCP | meta | 0.018 ± 0.001 |
| 2,4,5-TCP | 2,4-DCP 4-MCP | meta meta-ortho | 0.034 ± 0.014 0.013 |
| 3,5-DCP | 3-MCP | meta | 0,069 ± 0,003 |
| 2,3-DCP | 3-MCP | ortho | 0.007 ± 0.001 |
| 2,4-DCP | 4-MCP | ortho | 0.059 ± 0.006 |
| Autres DCPs | Aucun | | |
| MCPs | Aucun | | |
| 2,4,6-TBrP | Dibromophénol | Indéterminé | Indéterminé |
| MBrPs | Aucun | | |

9. ESSAI D'INHIBITION DE L'ACTIVITÉ DES DÉSHALOGÉNASES PAR L'IODOPROPANE

Un essai d'inhibition de l'activité de déshalogénéation par l'iodopropane a été effectué pour les préparations des déshalogénases I et II solubilisées et les résultats sont présentés à la figure 17. Le principe de cet essai est le suivant (Brot & Weissbach, 1965):



Une enzyme, dont l'activité dépend de la présence d'une cobalamine, est inactivée lorsqu'elle est mise en présence de 1-iodopropane, en conditions réduites, dû à la formation d'un lien *Enzyme-Co-C-C-C*. En présence de lumière, on observe la rupture du lien (*Enzyme-Co + C-C-C*) et la restauration de l'activité enzymatique. Dans le cas de la préparation de la déshalogénase II solubilisée, l'activité de déshalogénéation a chuté à 12,4% de l'activité initiale, après une incubation avec 1 mM d'iodopropane, pour être ensuite restaurée à 62,3% après une exposition à la lumière.

Dans le cas de la préparation de la déshalogénase I solubilisée l'activité a chuté à 11,4% de l'activité initiale, après une incubation avec 0,1 mM d'iodopropane. Toutefois, après exposition à la lumière, aucune restauration n'a eu lieu et une activité de déshalogénéation de 10,9% de l'activité initiale a été mesurée. Le même profil de résultats a été obtenu avec la dose de 0,05 mM d'iodopropane, c'est-à-dire qu'il y a eu une perte de 50% de l'activité de déshalogénéation, mais aucune restauration n'a été observée après l'exposition à la lumière.

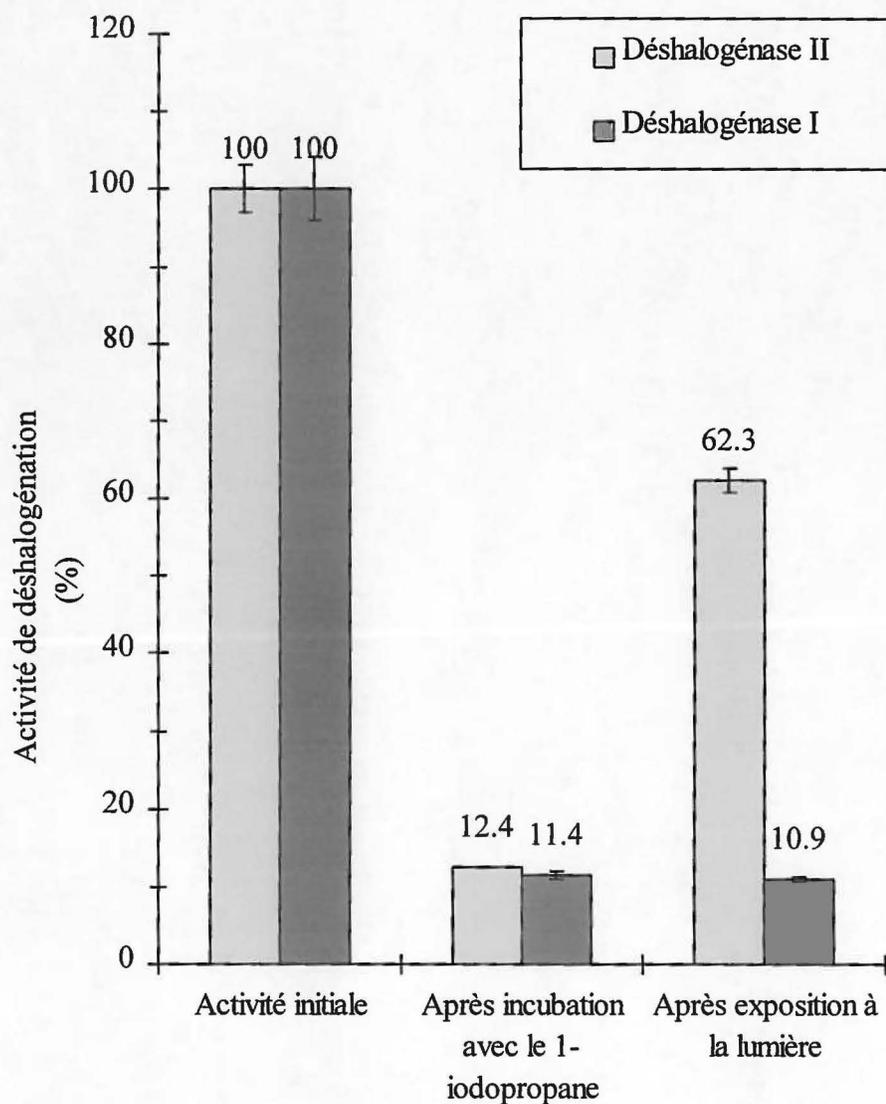


FIGURE 17: Inhibition réversible de l'activité de déshalogénéation par l'iodopropane de préparations de déshalogénases I et II solubilisées. Concentration d'iodopropane utilisée: 1 mM pour la déshalogénase II et 0,1 mM pour la déshalogénase I.

Note : L'activité spécifique était de 0,066 nmoles 3-MCP $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ pour la préparation de déshalogénase II et de 15,179 nmoles 2,4-DCP $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ pour la préparation de déshalogénase I.

10. ESSAI DE PURIFICATION DE LA DÉSHALOGÉNASE II SOLUBILISÉE

Plusieurs essais ont été effectués afin de purifier la déshalogénase II. Des essais préliminaires sur Sep-Pak QMA light à pH 7 et 8,5 et CM light à pH 7 ont permis de retrouver 48%, 84% et 100% de l'activité initiale respectivement. Cependant, dans les trois cas, l'enzyme n'était pas retenue par la colonne. Différents types de colonnes tels une colonne échangeuse ionique (DEAE-5PW), un tamis moléculaire (Sephacryl S300), une colonne à interactions hydrophobiques (t-butyl-CIH) et une colonne d'affinité (hydroxyapatite) ont été utilisées. Après chromatographie sur tamis moléculaire ou sur colonne échangeuse-ionique, aucune activité n'était observée dans les différents pics récoltés, malgré les différentes conditions de tampon et d'élution utilisées. Seules les chromatographies utilisant les colonnes butyl-CIH et hydroxyapatite nous ont permis de retrouver une certaine activité de déshalogénéation. Pour la chromatographie sur t-butyl-CIH, la déshalogénase II a été retenue par la colonne et a été éluée dans le tampon ne contenant pas de sulfate d'ammonium. Dans le cas de la chromatographie sur hydroxyapatite, l'activité a été retrouvée uniquement dans le volume mort de la colonne, suggérant que dans les conditions utilisées, l'enzyme n'a pas été retenue par la colonne.

Les résultats d'une purification partielle de la déshalogénase II sont présentés au tableau 7. Deux étapes de purification ont été effectuées soit une première chromatographie sur colonne butyl-CIH, suivie d'une colonne hydroxyapatite. Les valeurs de l'activité totale obtenues étaient de 15,2 nmoles 3-MCP/hre après l'étape butyl et seulement de 1,3 nmoles 3-MCP/hre après passage sur hydroxyapatite, ce qui représente des rendements respectifs de 29,6 et de 2,6%. L'activité spécifique à chaque étape est passée de 13,82 à 31,79 et à 7,54 nmoles de 3-MCP/min/mg de protéines. Finalement, le facteur de purification qui a été obtenu était de 2,29 après

TABLEAU 7: Charte de purification partielle de la déshalogénase II.

| Étape | Activité totale (nmoles 3-MCP /hre) | (%) | Activité spécifique (nmoles 3-MCP/hre /mg protéines) | Facteur de purification |
|-------------------------|---|------|---|-------------------------------|
| Fraction solubilisée | 51,43 | 100 | 13,82 | 1 |
| Butyl-CIH | 15,21 | 29,6 | 31,79 | 2,29 |
| Hydroxyapatite | 1,32 | 2,6 | 7,54 | 0,55 |

l'étape butyl-CIH et de 0,54 après l'hydroxyapatite, suite à la perte importante d'activité observée à cette étape.

Les échantillons après chacune des étapes ont été analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide effectué en condition dénaturante et non-dénaturante. Ces gels, colorés au bleu de Coomassie sont présentés à la figure 18. Après électrophorèse en gel de polyacrylamide (10%) contenant 0,1% de SDS, on observe pour la fraction membranaire solubilisée la présence d'un grand nombre de bandes de protéine. Pour l'échantillon obtenu après l'étape t-butyl-CIH, un nombre limité de bandes est détecté dont les plus importantes correspondent à 97,4, 66, 60 et 45 kDa. L'étape hydroxyapatite a permis l'élimination de la bande correspondant à 97,4 kDa ainsi que de quelques autres bandes de faible intensité.

Pour l'électrophorèse en condition non-dénaturante, on observe pour l'échantillon obtenu après l'étape hydroxyapatite la présence de deux bandes majeures diffuses ainsi que de plusieurs bandes moins intenses. Le même profil est observé pour l'échantillon après l'étape t-butyl-CIH (résultat non présenté). Ces résultats suggèrent que dans les conditions utilisées, certaines protéines pourraient être présentes sous forme d'aggrégats.

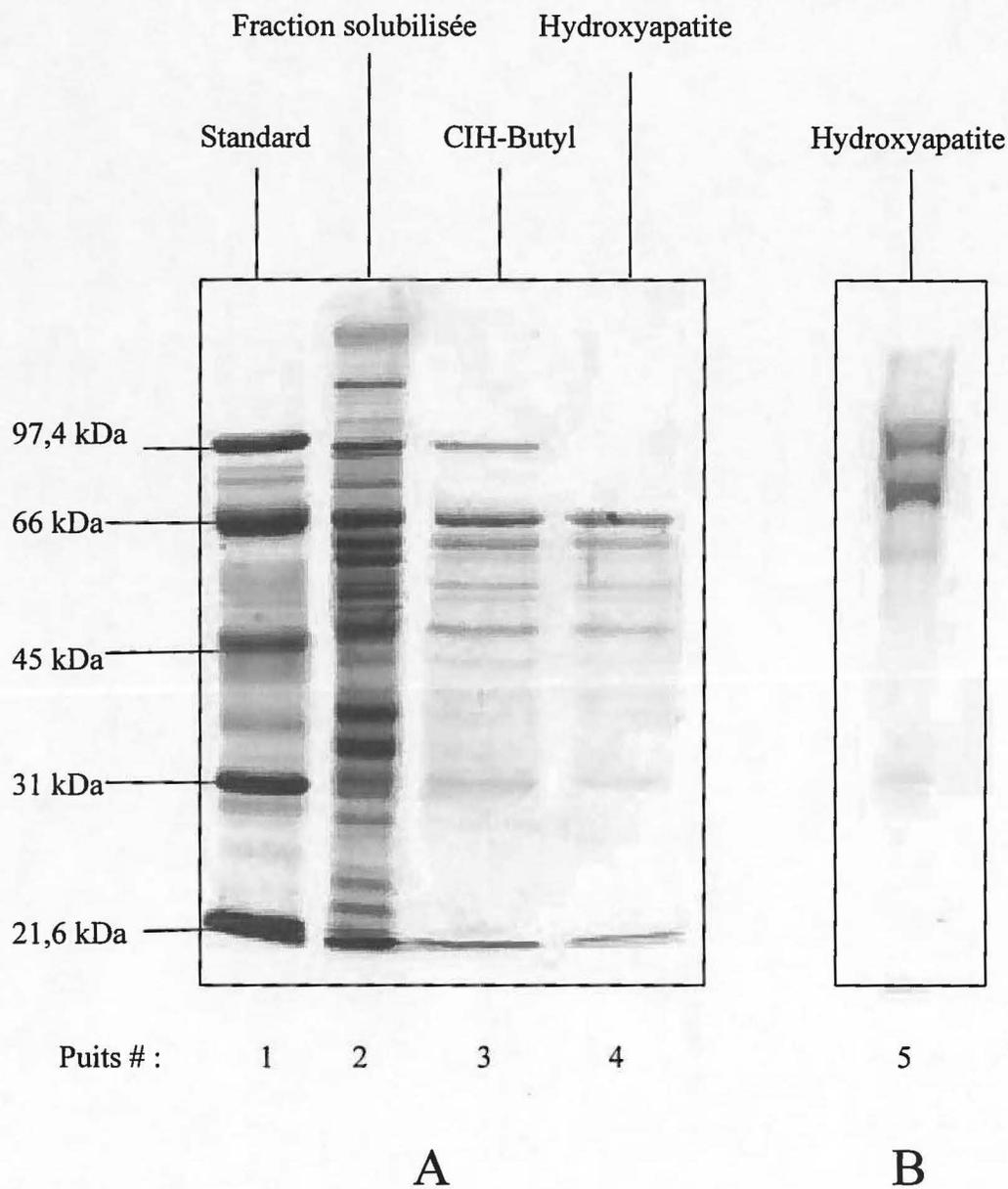


FIGURE 18 : Gels de polyacrylamide colorés au bleu de Coomassie: (A) gel de polyacrylamide 10% effectué en condition dénaturante (0,1% SDS) (B) gel de polyacrylamide 6% effectué en condition non-dénaturante. Quantité de protéines déposée dans les puits (μg): (#1) 20; (#2) 18,6; (#3) 3,3; (#4) 1,75 et (#5) 3,5.

DISCUSSION

1. CARACTÉRISATION DES DÉSHALOGÉNASES

Les activités de déshalogénéation des déshalogénases I et II de la souche PCP-1, induites respectivement par le 2,4,6-TCP et le 3,5-DCP, ont été retrouvées principalement au niveau des préparations membranaires. Ces deux enzymes ont été solubilisées en présence de 0,1% de Triton X-100. Leur caractérisation a révélé des différences importantes et des similitudes entre elles ainsi qu'avec les autres déshalogénases décrites dans la littérature.

Les conditions utilisées pour le dosage de l'activité de déshalogénéation des préparations enzymatiques des déshalogénases I et II étaient différentes. La préparation de la déshalogénase II nécessitait une incubation de 18 heures à 45°C, comparativement à 1 à 3 heures d'incubation à 37°C pour la préparation de la déshalogénase I, en plus d'utiliser des concentrations plus élevées d'enzyme. Dans les deux cas, une relation linéaire était retrouvée entre la quantité de produit formé et le temps d'incubation. Dans le cas de la préparation de la déshalogénase I, celle-ci excédait 6 heures, tandis que pour la préparation de la déshalogénase II celle-ci excédait 18 heures. Ces résultats montrent que les préparations de la déshalogénase II étaient stables dans les conditions utilisées, malgré un long temps d'incubation et une température de 45°C.

Le substrat normalement utilisé pour la préparation de la déshalogénase II était le 3,5-DCP. La faible absorbance au spectrophotomètre du produit, soit le 3-MCP, dans les longueurs d'ondes de l'ultraviolet, limitait également la sensibilité de l'essai enzymatique. L'utilisation du PCP, qui démontrait la plus grande activité spécifique, n'était pas facilement applicable. Ceci était dû à la difficulté de séparer par CLHP les différents tétrachlorophénols formés. De plus, la préparation de la déshalogénase I possède une forte activité sur le PCP et le risque toujours possible de sa présence en

trace dans les préparations, bien qu'elle ne soit pas induite dans les conditions utilisées, rendait l'utilisation du PCP plus difficile.

Les deux préparations de déshalogénases différaient grandement au niveau de leurs activités spécifiques telles qu'observées par l'étude de leur spectre d'activité. L'activité spécifique de la préparation de la déshalogénase I, pour la déshalogénéation en position *ortho*, varie de 3,7 à 40,9 nmole de produit min^{-1} mg de protéines $^{-1}$ (sauf pour le 2,4-DCP), alors que l'activité de la préparation de la déshalogénase II est inférieure à 0,069 nmole de produit min^{-1} mg de protéines $^{-1}$, à l'exception du PCP où elle est de 0,16 nmoles de TeCP min^{-1} mg de protéines $^{-1}$. Ces résultats suggèrent que les préparations ne contenaient que très peu de déshalogénase II ou que cette enzyme est peu active (note : le pourcentage d'enzyme active présente dans les préparations enzymatiques ne peut être déterminé de façon précise) ou encore que les conditions utilisées lors des essais *in vitro* ne sont pas idéales à son activité. Le méthyl viologen utilisé comme donneur d'électrons n'est peut être pas idéal pour remplacer les systèmes de transport d'électrons retrouvés *in vivo*. Les autres donneurs d'électrons artificiels étudiés soit l'éthyl viologen et le benzyl viologen n'ont pas amélioré l'activité de la préparation de la déshalogénase II. Le remplacement du méthyl viologen par l'éthyl viologen diminuait l'activité enzymatique de 37,7 % tandis qu'aucune activité n'était obtenue avec le benzyl viologen. Donc le méthyl viologen qui était utilisé lors de l'essai standard du dosage de l'activité s'avérait être le meilleur donneur d'électrons dans le cas de la préparation de la déshalogénase II. Miller *et al.* (1997) ont également étudié différents donneurs d'électrons artificiels (triquat, éthyl viologen, méthyl viologen, benzyl viologen et diquat) afin d'évaluer l'activité de déshalogénéation de la tétrachloroéthylène-déshalogénase de la souche PCE-S. Les mêmes résultats ont été obtenus que pour la préparation de la déshalogénase II, c'est-à-dire, qu'une activité spécifique plus élevée de leur enzyme était observée selon cette séquence: méthyl viologen > éthyl viologen > benzyl viologen.

L'activité maximale a été observée à un pH de 6,9 pour la préparation de la déshalogénase I, dans les conditions déterminées lors du dosage de l'activité enzymatique. Pour la préparation de la déshalogénase II, le pH optimal a varié selon le tampon utilisé soit 7,4 pour le tampon potassium phosphate 0,1 M et respectivement de 8,1 et 8,5 pour le tampon Tris-HCl 0,1 M et 0,2 M. Le tampon Tris-HCl avait pour effet de diminuer l'activité de déshalogenation comparativement au tampon potassium phosphate. La plupart des déshalogénases décrites dans la littérature possèdent également une activité maximale se situant entre pH 7 et 8. En effet, l'activité maximale de déshalogenation de la 3-chlorobenzoate déshalogénase réductrice de *Desulfomonile tiedjei* (Ni *et al.*, 1995) a été observée entre pH 7,2 et 7,5. Dans les autres cas, l'activité maximale a été observée à des pH respectifs de 6,9, 8,0 et de 7,5 à 7,8 pour les déshalogénases de *Desulfitobacterium chlororespirans* (Löffler *et al.*, 1996), *Dehalospirillum multivorans* (Neumann *et al.*, 1996) et de *Desulfitobacterium* souche PCE-S (Miller *et al.*, 1997a).

Les deux préparations de déshalogénases diffèrent au niveau de leur température optimale d'activité qui est de 55°C pour la préparation de la déshalogénase I et de 45°C pour la préparation de la déshalogénase II. Ces différences pourraient s'expliquer par la longue période d'incubation (18 heures) nécessaire pour mesurer l'activité de la préparation de la déshalogénase II, où la température élevée entraînerait sa dénaturation. Les déshalogénases citées dans la littérature, possèdent une activité maximale à des températures de 38°C, 60°C et 42°C pour *D. tiedjei* (Ni *et al.*, 1995), *D. chlororespirans* (Löffler *et al.*, 1996) et *D. multivorans* (Neumann *et al.*, 1996) respectivement. Parmi celles-ci, la déshalogénase de *D. chlororespirans* est l'enzyme qui se rapproche le plus de la déshalogénase I de la souche PCP-1 par ses caractéristiques.

En ce qui concerne la stabilité thermique, la préparation de la déshalogénase de

D. chlororespirans est stable au moins 2 heures à 57°C tandis que Miller *et al.* (1997a) rapporte que la déshalogénase de la souche PCE-S est stable pendant 10 minutes à 50°C. La préparation de la déshalogénase I, quant à elle, est stable pendant au moins deux heures à des températures allant de 5 °C à 50°C dans le cas des fractions membranaires et à 45°C dans le cas des préparations solubilisées. Cependant, une perte totale de l'activité est observée respectivement à 65°C et à 57°C, lorsque les fractions membranaires et les préparations solubilisées de la déshalogénase I sont incubées deux heures à ces températures. La stabilité à la température de l'activité de déshalogénéation est plus élevée dans le cas des fractions membranaires que des préparations solubilisées. Dans ces conditions, la déshalogénase est probablement stabilisée par la présence des phospholipides et autres composantes de la membrane, ce qui la rend moins sensible aux températures élevées et à la dénaturation.

L'absence d'inhibition par le sulfate à des concentrations de 100 mM et la forte inhibition par le sulfite à 1 mM observée pour les préparations des déshalogénases I et II ont également été observées pour d'autres déshalogénases. Ainsi, Townsend & Suflita (1997) ont démontré que le sulfite et le thiosulfate inhibaient l'activité de la 3-chlorobenzoate déshalogénase de *D. tiedjei*, présente dans les fractions membranaires, qui provenaient de cellules bactériennes cultivées en présence de 3-CB. Ces auteurs suggéraient que cette inhibition était due à l'interaction des oxyanions soufrés directement avec les enzymes membranaires responsables de la déshalogénéation. Cependant, ils avançaient que la possibilité que les oxyanions puissent se lier à d'autres composés responsables de la respiration anaérobie ne pouvait être exclue, ce qui pourrait avoir pour conséquence d'inhiber l'activité enzymatique. Le sulfate ne démontrait aucune inhibition de l'activité de la déshalogénase de *D. tiedjei*.

La déshalogénase aryle réductrice de *D. chlororespirans* possède les mêmes caractéristiques que les préparations enzymatiques des déshalogénases I et II de la souche PCP-1 en ce qui a trait à l'effet de ces composés. Effectivement, le sulfite à

une concentration de 1,75 mM inhibe complètement l'activité enzymatique de la déshalogénase de *D. chlororespirans*, tandis que le sulfate ne démontre aucun effet (Löffler *et al.*, 1996). Les mêmes résultats ont été observés pour les déshalogénases de *D. ethenogenes* (Magnuson *et al.*, 1998), de *Desulfitobacterium* souche PCE-S (Miller *et al.*, 1997a) et de *D. multivorans* (Neumann *et al.*, 1994). Étant donné que les extraits cellulaires de *D. multivorans* et de *Desulfitobacterium* souche PCE-S ne contiennent pas de sulfite réductase, et que *D. multivorans* ne peut utiliser le sulfite, Miller *et al.* (1997a) ont suggéré que les inhibitions des PCE-déshalogénases ne pouvaient être causées par une compétition entre le sulfite et le tétrachloroéthylène pour le donneur d'électrons. Comme le sulfite est connu pour se lier au cob(III)alamine pour former un sulfito-cobalamine (Friedrich, 1975), ils ont proposé que dans ces conditions, l'inhibition par le sulfite suggérait l'implication d'une cob(III)alamine dans le site catalytique de l'enzyme.

L'inhibition de l'activité de la préparation de la déshalogénase II, par l'iodopropane et sa restauration par exposition à la lumière suggèrent fortement que la déshalogénase II de *D. frappieri* contient une cobalamine, puisque les résultats obtenus corroborent avec ceux observés par d'autres auteurs, pour des déshalogénases qui possèdent une cobalamine. Effectivement, Neumann *et al.* (1995) ont démontré que la tétrachloroéthylène-déshalogénase et la trichloroéthylène-déshalogénase de *D. multivorans* contenait une cob(I)alamine qui serait impliquée dans la déshalogénéation réductrice du TCE. Ces auteurs ont démontré que la forme oxydée de l'enzyme (sans l'ajout du citrate de titane(III) servant à réduire le système) n'était pas inactivée par l'iodoalcane. Donc, ceux-ci ont suggéré que l'enzyme était probablement présente dans les extraits sous forme oxydée, soit cob(II)alamine ou cob(III)alamine. Magnuson *et al.* (1998), ont également démontré que la PCE-déshalogénase et la TCE-déshalogénase de *D. ethenogenes* contenaient une cobalamine. La TCE-déshalogénase perdait 93% de son activité initiale lorsqu'elle était incubée à la noirceur en présence de 1-iodopropane et l'activité initiale était restaurée à 80%. La PCE-déshalogénase, quant à elle, perdait 85% de son activité et en retrouvait 83% après

exposition à la lumière. Ces résultats concordent bien avec ceux obtenus pour la préparation de la déshalogénase II. Finalement, Miller *et al.* (1997a) ont démontré que la déshalogénase réductrice de *Desulfitobacterium* sp. souche PCE-S possédait aussi une cobalamine.

Les résultats obtenus dans le cas de la préparation de la déshalogénase II permettent de supposer qu'une cobalamine est présente chez cette enzyme. Celle-ci pourrait faire partie intégrante de la structure de l'enzyme ou encore jouer un rôle de cofacteur essentiel à l'activité de la déshalogénase II. Cependant, les résultats obtenus dans le cas de la préparation de la déshalogénase I ne permettent pas de tirer une conclusion aussi claire que dans le cas de la déshalogénase II. La préparation de la déshalogénase I a été inactivée par l'iodopropane, ce qui laissait supposer que ce composé avait réagi avec une cobalamine, mais dans aucun des essais l'activité n'a pu être restaurée par exposition à la lumière. Une hypothèse pour expliquer ces résultats serait qu'en plus de réagir avec la cobalamine, le 1-iodopropane aurait réagi avec une autre composante de l'enzyme, comme par exemple avec les thiols libres des résidus cystéines alkylant ceux-ci, rendant donc l'enzyme inactive. Cette inactivation ne serait pas réversible par exposition à la lumière, peut-être à cause de la force de la liaison unissant le 1-iodopropane et le composé inconnu. Des études ultérieures sur l'enzyme purifiée permettront de confirmer ou non la présence d'une cobalamine.

Par ailleurs, l'effet de d'autres composés ont été étudiés sur l'activité des préparations enzymatiques des déshalogénases I et II. L'inhibition partielle de l'activité de la préparation de la déshalogénase I a été observée pour le nitrate. Les raisons de cette inhibition sont inconnues. Toutefois comme le nitrate agit comme accepteur d'électrons et qu'il possède de l'affinité pour les métalloprotéines, on peut supposer qu'il pourrait se lier aux déshalogénases et ainsi interférer dans leur activité. Cette interférence pourrait provenir de l'obstruction du site catalytique ou par une réaction avec un cofacteur métallique. Peu d'exemple de l'effet de ce composé sur

l'activité des déshalogénases, a été observé dans la littérature. L'effet du nitrite et du nitrate a été étudié sur l'activité de la tétrachloroéthylène-déshalogénase réductrice de *D. multivorans*. Le nitrite inhibait complètement l'activité de déshalogénéation (Fantroussi *et al.*, 1998), tandis que le nitrate ne démontrait aucun effet sur l'activité de déshalogénéation (Neumann *et al.*, 1995).

L'étude des métaux sur l'activité de déshalogénéation a montré que le CoCl_2 et le NaN_3 diminuait l'activité initiale de la préparation de la déshalogénase I de 18% et 55% respectivement, tandis que les autres métaux n'avaient aucun effet. Pour la préparation de la déshalogénase II seul le NaN_3 (azoture de sodium) diminuait l'activité de 86%. Contrairement aux préparations enzymatiques des déshalogénases I et II de *D. frappieri*, la déshalogénase de *D. chlororespirans* Co23 (Löffler *et al.*, 1996) et la tétrachloroéthylène-déshalogénase de *D. multivorans* (Neumann *et al.*, 1995) ne sont pas sensibles à aucun de ces métaux, incluant l'azoture de sodium. Cependant, deux déshalogénases possédant une cobalamine démontraient une inhibition complète en présence respective de 7 mM et de 20 mM de NaN_3 , soit la TCE-déshalogénase réductrice de *D. ethenogenes* (Magnuson *et al.*, 1998) et la déshalogénase de *Desulfitobacterium* souche PCE-S (Miller *et al.*, 1997a).

De plus, les activités de déshalogénéation des préparations des déshalogénases I et II de la souche PCP-1, diminuaient respectivement de 58,4% et de 49,1% en présence de citrate de sodium (200 mM), contrairement à la déshalogénase de *D. chlororespirans* Co23, qui ne démontrait aucune sensibilité à ce produit, à une concentration similaire (Löffler *et al.*, 1996). Par ailleurs, la déshalogénase réductrice de *D. ethenogenes* ne démontrait aucune inhibition lorsqu'elle était mise en présence d'EDTA (Magnuson *et al.*, 1998) tout comme les préparations enzymatiques des déshalogénases I et II de *D. frappieri*, tandis, que les déshalogénases de *D. multivorans* (Neumann *et al.*, 1995) et de *Desulfitobacterium* souche PCE-S étaient

complètement inhibées par cet agent chélateur (2 mM) (Miller *et al.*, 1997a).

Selon Zubay (1988), les agents chélateurs sont reconnus pour se lier aux métaux trivalents et divalents. Les résultats obtenus avec les agents chélateurs pour les préparations enzymatiques des déshalogénases I et II de *D. frappieri*, soit les inhibitions par le citrate de sodium, peuvent suggérer l'implication de métaux dans la structure de ces deux enzymes. Le fait que les préparations de déshalogénases de la souche PCP-1 ne soient pas inactivées par l' EDTA n'est pas nécessairement contradictoire, puisqu'il faut également prendre en considération que les métaux pourraient être fortement liés à l'enzyme ou encore inaccessibles aux agents chélateurs de grandes dimensions. Cette hypothèse a également été soutenue par Magnuson *et al.* (1998), dans le cas des déshalogénases (PCE-Dase et TCE-Dase) de *D. ethenogenes*.

2. ESSAIS DE PURIFICATION DE LA DÉSHALOGÉNASE II

Une purification partielle de la déshalogénase II a été obtenue. Seule une chromatographie hydrophobique sur t-butyl et sur hydroxyapatite a permis de retrouver une activité. La chromatographie sur t-butyl a permis d'obtenir un bon rendement de purification alors que l'hydroxyapatite ne retenait pas l'enzyme, mais permettait d'éliminer une bande, tel qu'observé après électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec SDS. Différentes hypothèses peuvent être avancées pour expliquer les pertes d'activité. Tout d'abord, la faible activité de la déshalogénase II ainsi que sa sensibilité à l'oxygène n'ont pas facilité la purification de cette enzyme. Effectivement, une incubation d'une heure en présence de 50% d'air diminuait l'activité initiale de déshalogénéation de 56,6%. En comparaison, la déshalogénase de *D. chlororespirans* n'était pas sensible à l'oxygène, puisque la même activité était retrouvée lorsque les fractions membranaires étaient préparées en absence ou en présence d'air (Löffler *et al.*, 1996). Également, la déshalogénase réductrice de

Desulfitobacterium sp. souche PCE-S, n'était que peu sensible à l'oxygène puisqu'après une incubation de 90 minutes en présence d'air, 50% de l'activité initiale était toujours retrouvée (Miller *et al.*, 1997a).

De plus, puisque la déshalogénase II est une enzyme membranaire et qu'elle est hydrophobique, elle a probablement tendance à s'associer à d'autres protéines qui pourrait la stabiliser, notamment pour le dosage de l'activité enzymatique qui dans les conditions utilisées nécessite 18 heures d'incubation à 45°C. La perte de ces protéines lors de la purification ou d'un cofacteur nécessaire à l'activité pourrait être responsable des pertes d'activité observées

Par ailleurs, dans une étude ultérieure, il serait important d'améliorer les méthodes de production et de purification. Trois avenues pourraient être étudiées en ce sens, soit l'amélioration de la méthode de production de l'enzyme, au niveau des conditions de culture de la souche PCP-1 et de l'âge de la culture lors du prélèvement des cellules pour leur fractionnement. Une meilleure production d'enzyme au départ, pourrait permettre d'augmenter l'activité des préparations membranaires. Cette augmentation pourrait permettre de diminuer la concentration d'enzyme utilisée pour le dosage de l'activité enzymatique, ou encore de diminuer la période d'incubation. La deuxième avenue concerne l'amélioration du dosage de l'activité enzymatique, par entre autre, l'augmentation de la sensibilité de l'essai et la troisième concerne l'amélioration de la stabilité de l'enzyme au cours de la purification, afin de minimiser les pertes d'activité. Par exemple, l'addition de substrat à l'enzyme pourrait possiblement protéger le site catalytique de celle-ci la rendant ainsi plus stable. L'effet de d'autres détergents pouvant agir sur la stabilité de l'enzyme serait également intéressant à étudier.

3. STRUCTURE DES DÉSHALOGÉNASES ET SPÉCIFICITÉ

La revue de la littérature montre que parmi les déshalogénases réductrices produites par des microorganismes anaérobies, deux types d'enzymes peuvent se distinguer en se basant sur les caractéristiques structurales. Les enzymes appartenant au premier sont généralement constituées d'une cobalamine et de trois ou quatre centres Fe_4S_4 , tandis que la seule enzyme appartenant au deuxième est constitué d'un hème tel que montré pour la 3-chlorobenzoate déshalogénase de *D. tiedjei*.

Le premier type comprend les enzymes suivantes soit: la 3-chloro-4-hydroxy-phénylacétate déshalogénase de *D. hafniense* souche DCB-2, la tétrachloroéthylène-déshalogénase de *D. multivorans*, la PCE-déshalogénase et la TCE-déshalogénase réductrice de *D. ethenogenes*, la déshalogénase réductrice de *Desulfitobacterium* sp. souche PCE-S et la *ortho*-chlorophénol déshalogénase de *Desulfitobacterium dehalogenans*. Des similitudes importantes, concernant les mécanismes et les propriétés structurales de la séquence primaire, entre la *ortho*-chlorophénol déshalogénase réductrice de *D. dehalogenans* et les PCE-déshalogénases réductrices de *D. multivorans* et de *D. restrictus* ont été établies par Van *et al.* (1999a). Ces similitudes importantes ont permis aux auteurs d'avancer que ces enzymes constituaient une nouvelle classe de réductases contenant une cobalamine.

Tout dernièrement, la *ortho*-chlorophénol déshalogénase de *Desulfitobacterium dehalogenans* a été purifiée (Van de Pas *et al.*, 1999a) et sa masse moléculaire a été établie à environ 48 kDa. La détermination plus précise de la masse moléculaire de la protéine native n'a pu être établie, étant donné la grande quantité de détergent utilisé afin de prévenir l'aggrégation des protéines. Sa caractérisation a

révélé la présence d'une cobalamine ainsi que de deux groupements fer-soufre (un Fe_4S_4 et un Fe_3S_4) par mole d'enzyme. Selon les auteurs, ces groupements seraient impliqués dans le transfert des électrons au site actif de la déshalogénase, qui contient la cobalamine. Les résultats obtenus ont amené les auteurs à proposer un mécanisme de réaction qui implique la formation d'un radical phénol-halogéné, qui réagit avec un électron transféré par les groupements fer-soufre (voir figure 19). Les gènes correspondants à la déshalogénase ont été clonés et séquencés. Ceci a révélé la présence de deux gènes soit: *cprA*, qui code la *o*-chlorophénol déshalogénase réductrice et *cprB*, qui code pour une protéine de membrane, qui possiblement agit à titre de protéine d'ancrage à la membrane pour la déshalogénase (Van de Pas *et al.*, 1999a). L'analyse de séquence primaire de ces gènes, avec les gènes *pceA* et *pceB* de *D. multivorans*, a révélé un haut degré de similitude au niveau des acides aminés de la séquence C-terminale des deux enzymes.

Les résultats obtenus pour les préparations enzymatiques des déshalogénases I et II de *D. frappieri*, suggèrent que les enzymes seraient du premier type et qu'elles contiendraient une cobalamine.

Récemment, la purification de la déshalogénase I a été complétée (Beaudet, R., communication personnelle) et les résultats montrent que cette enzyme possède un poids moléculaire de 37 kDa et que sa séquence NH_2 -terminale est différente des autres déshalogénases connues. De plus, des analyses spectroscopiques suggèrent la présence d'une cobalamine, ce qui confirmerait les résultats obtenus.

Même si elles possèdent des caractéristiques en commun, les déshalogénases du premier type, ne démontrent pas le même spectre d'activité. Comparativement aux autres déshalogénases décrites dans la littérature, les

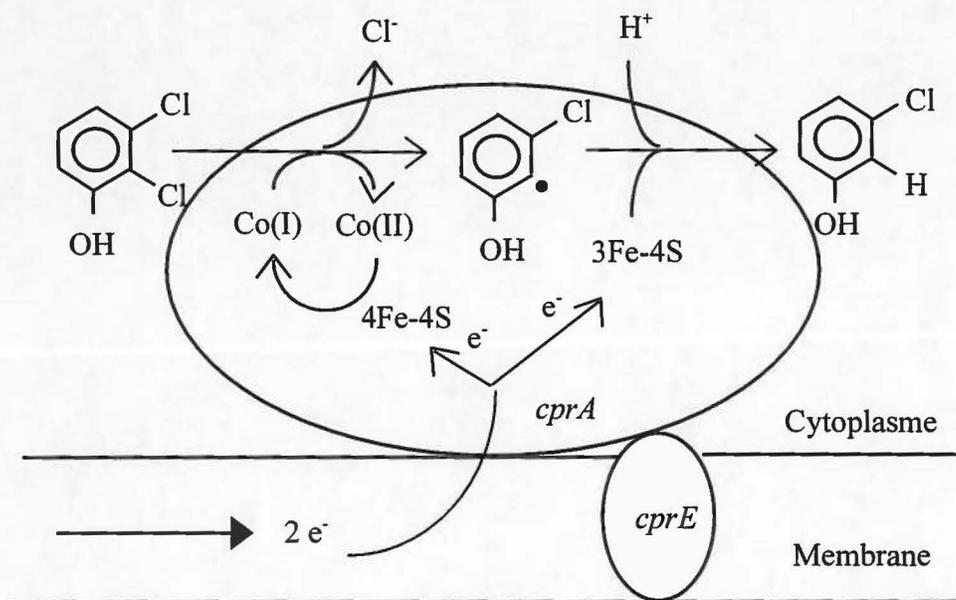


FIGURE 19: Mécanisme de réaction proposé pour la *ortho*-chlorophénol déshalogénase réductrice de *Desulfitobacterium dehalogenans*. (*cprE*: protéine d'ancrage, *cprA*: *ortho*-chlorophénol déshalogénase, $Co(I)$ ou $Co(II)$: cobalamine) Modifiée de Van de Pas *et al.* (1999b).

préparations enzymatiques des déshalogénases I et II de *D. frappieri* possèdent un spectre d'activité relativement large, puisqu'elles sont capables de transformer plusieurs trichlorophénols ainsi que le 2,3-DCP, le 2,4-DCP, le PCP, le 2,4,6-TBrP et le tétrachloroéthylène. La préparation de la déshalogénase I enlève des atomes de chlore principalement en position *ortho*, quoiqu'une faible activité soit observée en position *para* sur le 3,4,5-TCP, tandis que la préparation de la déshalogénase II enlève des atomes de chlore en position *ortho*, *meta* et *para*, ce qui s'avère être une différence importante. Pour la préparation de la déshalogénase II, l'activité de déshalogénéation maximale a été observée sur le PCP, qui a été transformé à 80% en position *para* et à 20% en position *meta*. Parmi les déshalogénases réductrices répertoriées, la préparation de la déshalogénase II de *D. frappieri* est la seule capable d'effectuer la déshalogénéation dans les trois positions.

En comparaison, la 3-chlorobenzoate-déshalogénase de *D. tiedjei* est capable de déshalogéner le tétrachloroéthylène et le trichloroéthylène en plus du 3-chlorobenzoate (Towsend & Suflita, 1997). La déshalogénase de *D. hafniense*, quant à elle, est capable de déshalogéner le 3-chloro-4-hydroxy-phénylacétate mais incapable de transformer le tétrachloroéthylène (Christiansen *et al.*, 1998). La déshalogénase de *D. chlororespirans* est capable de déshalogéner certains chlorophénols mais en position *ortho* seulement ainsi que le 3,5-dichloro-4-hydroxybenzoate et le 3-chloro-4-hydroxyphénylacétate (Löffler *et al.*, 1996). Cette déshalogénase transforme le PCP à une vitesse de 1,4 nmoles min⁻¹mg⁻¹, c'est-à-dire environ 29 fois moins rapidement que la déshalogénase I. Le 2,3-DCP, le 2,3,4-TCP, le 2,3,5-TCP et le 2,4,6-TCP sont également tous transformés par la déshalogénase de *D. chlororespirans* à des vitesses plus faibles que celles observées pour la préparation de la déshalogénase I (Löffler *et al.*, 1996). La vitesse élevée de déshalogénéation du PCP par la préparation de la déshalogénase I pourrait peut-être s'expliquer par le fait que la souche PCP-1 provient de sols contaminés au PCP et qu'elle a été enrichie par des méthodes utilisant entre autres le PCP. Par ailleurs, les déshalogénases réductrices de *D. ethenogenes*

possèdent un spectre d'activité très restreint (Magnuson *et al.*, 1998), comme la déshalogénase de *Desulfitobacterium* souche PCE-S, qui est capable de déshalogéner seulement le tétrachloroéthylène et le trichloroéthylène (Miller *et al.*, 1997a).

La *ortho*-chlorophénol déshalogénase de la souche *Desulfitobacterium dehalogenans* est capable de déshalogéner en position *ortho* les composés suivants: le 2-bromo-4-chlorophénol, le 3-chloro-4-hydroxyphénylacétate, le 2-CP, le 2,3-DCP, le 2,4-DCP, le 2,6-DCP et le PCP (Van de Pas *et al.*, 1999a). Le tétrachloroéthylène et le trichloroéthylène ne sont pas transformés par cette déshalogénase. Cependant, cette déshalogénase est la seule qui est comparable à la préparation de la déshalogénase I, quant à son spectre d'activité, mais elle en diffère quant à ses vitesses de déshalogénéation. Effectivement, parmi les chlorophénols transformés par cette enzyme, c'est le PCP qui possède l'activité spécifique la plus faible (0,2 unités/mg de protéines), comparativement à 15,5 unités/mg pour le 2,3-DCP (Van de Pas *et al.*, 1999). Pour la préparation de la déshalogénase I de *D. frappieri*, c'est le PCP qui possède l'activité spécifique la plus importante (40,933 nmoles min⁻¹ mg de protéines⁻¹), comparativement à 3,73 nmoles min⁻¹ mg de protéines⁻¹ pour le 2,3-DCP.

La capacité des préparations des déshalogénases I et II de la souche PCP-1 à déshalogéner plusieurs composés pourrait être éventuellement un avantage pour l'application de ces enzymes à la biodégradation des composés toxiques et récalcitrants que l'on retrouve dans l'environnement. La vitesse de déshalogénéation de la préparation de la déshalogénase I, alliée à la capacité de la préparation de la déshalogénase II à enlever des atomes de chlore en position *ortho*, *meta* et *para*, pourraient permettre une dégradation plus complète des produits xénobiotiques et de leurs intermédiaires, comparativement aux déshalogénases décrites ci-dessus, qui possèdent généralement une activité en position *ortho* et un spectre d'activité plus restreint, portant généralement sur la transformation du tétrachloroéthylène et du trichloroéthylène.

Le mécanisme de déshalogénéation de la déshalogénase I pourrait avoir certaines similitudes avec celui décrit pour la *ortho*-déshalogénase de *D. dehalogenans* (Van de Pas *et al.*, 1999b), bien que certaines différences structurales devraient être présentes afin d'expliquer leurs différences de spécificité. Une étude plus approfondie sur la caractérisation biochimique et moléculaire pourrait éventuellement permettre d'élucider les mécanismes de réaction de la déshalogénase I et de la déshalogénase II de *D. frappieri* souche PCP-1, et d'expliquer leurs différences de spécificité. Ces travaux pourraient éventuellement permettre, par ingénierie des protéines, de développer des déshalogénases à spectre plus large, capables de déshalogéner des substrats halogénés difficilement biodégradables.

CONCLUSION

A partir d'une culture de *D. frappieri*, une méthodologie a été mise au point afin de produire et d'isoler les déshalogénases I et II de la souche PCP-1. Les activités de déshalogenation des déshalogénases I et II de *D. frappieri*, induites respectivement par le 2,4,6-TCP et le 3,5-DCP, ont été retrouvées principalement au niveau des préparations membranaires. Ces déshalogénases ont été solubilisées en présence de 0,1% de Triton X-100. Leur caractérisation a révélé des similitudes et des différences importantes entre-elles ainsi qu'avec les autres déshalogénases décrites dans la littérature.

Les activités maximales de déshalogenation ont été observées à un pH de 6,9 et à une température de 55°C pour la préparation de la déshalogénase I de *D. frappieri* et à un pH de 7,4 et à une température de 45°C pour la préparation de la déshalogénase II. Le sulfate n'avait aucun effet sur les deux préparations de déshalogénases, tandis que le sulfite inhibait complètement l'activité enzymatique. La plupart des autres déshalogénases décrites dans la littérature possèdent le même profil d'inhibition au sulfite. Cette inhibition suggère que les déshalogénases I et II de *D. frappieri* contiendraient une cobalamine. L'inhibition des préparations enzymatiques des déshalogénases I et II, par le citrate de sodium suggère que des métaux seraient impliqués dans l'activité des enzymes. Dans le cas de la préparation de la déshalogénase II, l'hypothèse concernant la présence d'une cobalamine a également été soutenue par les essais d'inhibition réversible de l'activité de déshalogenation par le 1-iodopropane. Pour la préparation de la déshalogénase I, une inhibition par le 1-iodopropane a été observée mais aucune restauration de l'activité après exposition à la lumière n'a été obtenue. Toutefois, des analyses spectroscopiques sur la déshalogénase I purifiée suggéraient également la présence d'une cobalamine (Beudet *et al.*, résultats non publiés). Dans le cas de la déshalogénase II, une chromatographie à interaction hydrophobique et une chromatographie sur hydroxyapatite ont permis d'effectuer une purification partielle de cette enzyme.

Les déshalogénases I et II appartiennent au groupe de déshalogénases contenant une cobalamine, mais elles démontrent toutefois des différences importantes quant à leur spectre d'activité, avec les autres enzymes de ce groupe. Des études ultérieures permettront de déterminer si les déshalogénases I et II possèdent des centres Fe_4/S_4 . La préparation de la déshalogénase I de *D. frappieri* transforme plusieurs chlorophénols en position *ortho*, quoiqu'une faible activité soit observée en position *para* sur le 3,4,5-TCP, tandis que la préparation de la déshalogénase II les transforme principalement en position *meta* et *para*. Une activité en position *ortho* a également été observée. Les préparations enzymatiques des déshalogénases I et II de *D. frappieri* possèdent un spectre d'activité relativement large, puisqu'elles sont capables de transformer plusieurs trichlorophénols ainsi que le 2,3-DCP, le 2,4-DCP, le PCP, le 2,4,6-TBrP et le tétrachloroéthylène. Toutefois, elles ne peuvent déshalogéner les monochlorophénols, ni certains dichlorophénols.

La caractérisation enzymatique des préparations des déshalogénases I et II de *D. frappieri*, a permis d'acquérir de nouvelles connaissances sur les déshalogénases qui possèdent la capacité de déshalogéner les composés récalcitrants tel le pentachlorophénol. Une étude plus approfondie sur la caractérisation moléculaire et biochimique pourrait éventuellement permettre de connaître les mécanismes de réaction impliqués dans la déshalogénation chez *D. frappieri* et ainsi expliquer les différences observées entre les deux déshalogénases, plus précisément au niveau de leur spectre d'activité. Dans le futur, ces travaux pourraient permettre de développer, par ingénierie des protéines, des déshalogénases à spectre d'activité plus large capables de déshalogéner les composés xénobiotiques, toxiques et récalcitrants que l'on retrouve dans notre environnement. Ceci pourrait ainsi permettre d'améliorer les méthodes de biodégradation des composés halogénés qui contaminent notre environnement, afin de les rendre moins nuisibles.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je désire remercier le docteur Réjean Beaudet pour avoir accepté de diriger mes travaux de maîtrise, ainsi que pour sa constante disponibilité, ses encouragements et son support financier.

D'autres personnes m'ont également apporté leur aide au cours de ces deux années de maîtrise. Je remercie donc:

- madame Rita Alary, pour m'avoir fait bénéficier de ses connaissances, de son aide technique, de ses conseils et de son précieux soutien
- monsieur Guy McSween, pour l'aide apporté lors de la production de la souche PCP-1 et pour ses conseils
- et monsieur Sylvain Milot, pour l'aide apportée lors des extractions chimiques et des analyses effectuées avec le CG-DCE.

Finalement, je tiens à remercier mes parents pour leur support continu et à souligner l'apport financier offert par l'Institut Armand-Frappier et par la Fondation Armand-Frappier.

BIBLIOGRAPHIE

BEAUDET, R., M.-J. LÉVESQUE, R. VILLEMUR, M. LANTHIER, M. CHÉNIER, F. LÉPINE et J.-G. BISAILLON. 1998. Anaerobic biodegradation of pentachlorophenol in a contaminated soil inoculated with a methanogenic consortium or with *Desulfitobacterium frappieri* strain PCP-1. Appl. Microbiol. Biotechnol. **50**: 135-141.

BOUCHARD, B. 1995. Isolement et caractérisation d'un microorganisme anaérobie effectuant la déchloration du pentachlorophénol. Mémoire de maîtrise, Université du Québec, Institut Armand-Frappier, 105 pages.

BOUCHARD, B., R. BEAUDET, R. VILLEMUR, G. McSWEEN, F. LÉPINE et J.-G. BISAILLON. 1996. Isolation and characterization of *Desulfitobacterium frappieri*, sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates pentachlorophenol to 3-chlorophenol. Int. J. Syst. Bacteriol. **46**: 1010-1015.

BOYD, S.A. D.R. SHELTON, D. BERRY et J.M. TIEDJE. 1983. Anaerobic degradation of phenolic compounds in digested sludge. Appl. Environ. Microbiol. **46** :50-54.

BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72**: 248-254.

BROT, N. et H. WEISSBACH. 1965. Enzymatic synthesis of methionine: chemical alkylation of the enzyme-bound cobamide. J. of Biol. Chem. **240**: 3064-3070.

CHAUDRY, G.S. et S. CHAPALAMADUGU. 1991. Biodegradation of halogenated organic compounds. Microbiol. Rev. **55**:59-79.

CHÉNIER, M. 1997. Étude de la biodégradation du pentachlorophénol en conditions aérobies et anaérobies. Mémoire de maîtrise, Université du Québec, Institut Armand-

Frappier. 194 pages.

CHRISTIANSEN, N. et B.K. AHRING. 1996. *Desulfitobacterium hafniense* sp. nov., an anaerobic reductively dechlorinating bacterium. Int. J. of Syst. Bacteriol. **46**: 442-448.

CHRISTIANSEN, N., B.K. AHRING, G. WOHLFARTH et G. DIEKERT. 1998. Purification and characterization of the 3-chloro-4-hydroxy-phenylacetate reductive dehalogenase of *Desulfitobacterium hafniense*. FEBS Letters. **436**: 159-162.

COLE, J.R., A.L. CASCARELLI, W.W. MOHN et J. TIEDJE. 1994. Isolation and characterization of a novel bacterium growing via reductive dehalogenation of 2-chlorophenol. Appl. and Environ. Microbiol. **60**: 3536-3542.

COLE, J.R., B.Z. FATHERPURE et J.M. TIEDJE. 1995. Tetrachloroethene and 3-chlorobenzoate dechlorination activities are co-induced in *Desulfomonile tiedjei* DCB-1. Biodegradation. **6**: 167-172.

CROSBY, D.G. 1981. Environmental chemistry of pentachlorophenol. Pure Appl. Chem. **53**: 1051-1080.

DENNIE, D., I. GLADU, F. LÉPINE, R. VILLEMUR, J.-G. BISAILLON et R. BEAUDET. 1998. Spectrum of the reductive dehalogenation activity of *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. Appl. and Environ. Microbiol. **64**: 4603-4606.

DUDLEY, J.R. et P.A. GRIEVE. 1975. A simple technique for eliminating interference by detergents in the Lowry method of protein determination. Anal. Biochem. **64**: 136-141.

FANTROUSSI, S.E., H. NAVEAU et S.N. AGATHOS. 1998. Anaerobic dechlorinating bacteria. Biotechnol. Prog. **14**: 167-188.

FATHERPURE, B.Z., J.P.NENGU et S.A. BOYD. 1987. Anaerobic bacteria that dechlorinate perchloroethylene. *Appl. and Environ. Microbiol.* **53**: 2671-2674.

FETZNER, S. et F. LINGENS. 1994. Bacterial dehalogenases : biochemistry, genetics and biotechnological applications. *Microbiol. Rev.* **58** :641-685.

FRIEDRICH, W. 1975. Vitamin B12 und verwandte corrinoide. Thieme, Stuttgart.

GERRITSE, J., V. RENARD, T.M. PEDRO GOMES, P.A. LAWSON, M.D. COLLINS et J.C. GOTTSCHAL. 1996. *Desulfitobacterium* sp. strain PCE-1, an anaerobic bacterium that can grow by reductive dechlorination of tetrachloroethene or *ortho*-chlorinated phenols. *Arch. Microbiol.* **165**: 132-140.

HARDMAN, D.J. 1991. Biotransformation of halogenated compounds. *Crit. Rev. Biotechnol.* **11**: 1-40.

HOLLIGER, C., G. SCHRAA, A.J.M STAMS et A.J.B ZEHNBDER. 1993. A highly purified enrichment culture couples the reductive dechlorination of tetrachloroethene to growth. *Appl. and Environ. Microbiol.* **59**: 2991-2997.

HOLLIGER, C. et G. SCHRAA. 1994. Physiological meaning and potential for application of reductive dechlorination by anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**: 297-305.

HORTON, H.R., L.A. MORAN, R.S. OCHS, J.D. RAWN et K.G. SCRIMGEOUR. 1994. *Principes de biochimie*. De Boeck-Wesmael S.A., Bruxelles, Belgique. 720 pages.

JUTEAU, P., R. BEAUDET, G. McSWEEN, F. LÉPINE, S. MILOT et J.-G. BISAILLON. 1995a. Study of reductive dechlorination of pentachlorophenol by a

methanogenic consortium. *Can. J. Microbiol.* **41**: 862-868.

JUTEAU, P., R. BEAUDET, G. McSWEEN, F. LÉPINE, S. MILOT et J.-G. BISAILLON. 1995b. Anaerobic degradation of pentachlorophenol by a methanogenic consortium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**: 218-224.

KRUMHOLZ, L.R., R. SHARP et S.S. FISHBAIN. 1996. A freshwater anaerobe coupling acetate oxidation to tetrachloroethylene dehalogenation. *Appl. and Environ. Microbiol.* **62**: 4108-4113.

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

LEE, M.D., J.M. ODOM et R.J. BUCHANAN Jr. 1998. New perspectives on microbial dehalogenation of chlorinated solvents: insights from the field. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**:423-452.

LÉVESQUE, M.-J., R. BEAUDET, J.-G. BISAILLON et R. VILLEMUR. 1998. Quantification of *Desulfitobacterium frappieri* strain PCP-1 and *Clostridium*-like strain 6 in mixed bacterial populations by competitive polymerase chain reaction. *J. of Microbiol. Methods.* **32**:263-271.

LIU, D. 1989. Biodegradation of pentachlorophenol and its commercial formulation. *Tox. Assess.* **4** :115-127.

LÖFFLER, F.E., R.A. SANFORD, et J.M. TIEDJE. 1996. Initial characterization of a reductive dehalogenase from *Desulfitobacterium chlororespirans* Co23. *Appl. and Environ. Microbiol.* **62**: 3809-3813.

LOUIE, T.M., S. NI, L. XUN et W.W. MOHN. 1997. Purification, characterization and gene sequence analysis of a novel cytochrome *c* co-induced with reductive

dechlorination activity in *Desulfomonile tiedjei* DCB-1. Arch. Microbiol. **168**: 520-527.

LOUIE, T.M. et W.W MOHN. 1999. Evidence for a chemiosmotic model of dehalorespiration in *Desulfomonile tiedjei* DCB-1. J. of Bacteriol. **181**: 40-46.

LOWRY, O.H., N.H. ROSENBROUGH, A.L. FAN et R.J. RANDALL. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. of Biol. Chem. **193**: 265-275.

MACKIEWICZ, M. et J. WIEGEL. 1998. Comparison of energy and growth yields for *Desulfitobacterium dehalogenans* during utilization of chlorophenol and various traditional electron acceptors. Appl. and Environ. Microbiol. **64**: 352-355.

MADSEN, T. et D. LICHT. 1992. Isolation and characterization of an anaerobic chlorophenol-transforming bacterium. Appl. and Environ. Microbiol. **58**: 2874-2878.

MAGNUSON, J.K., R.V. STERN, J.M. GOSSETT, S.H. ZINDER et D.R. BURRIS. 1998. Reductive dechlorination of tetrachloroethene to ethene by a two-component enzyme pathway. Appl. and Environ. Microbiol. **64**: 1270-1275.

MAYMO-GATELL, X., Y. T. CHIEN, J.M. GOSSETT et S.H. ZINDER. 1997. Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. Science, **276**: 1568-1571.

McALLISTER, K.A., H. LEE et J.T. TREVORS. 1996. Microbial degradation of pentachlorophenol. Biodegradation. **7** : 1-40.

MILLER, E., G. WOHLFARTH et G. DIEKERT. 1997a. Comparative studies on tetrachloroethene reductive dechlorination mediated by *Desulfitobacterium* sp. strain PCE-S. Arch. Microbiol. **168**: 513-519.

MILLER, E., G. WOHLFARTH et G. DIEKERT. 1997b. Studies on tetrachloroethene respiration in *Dehalospirillum multivorans*. Arch. Microbiol. **166**: 379-387.

MILLER, E., G. WOHLFARTH et G. DIEKERT. 1998. Purification and characterization of the tetrachloroethene reductive dehalogenase of strain PCE-S. Arch. Microbiol. **169**: 497-502.

MOHN, W.W. et K.J. KENNEDY. 1992. Reductive dehalogenation of chlorophenols by *Desulfomonile tiedjei* DCB-1. Appl. and Environ. Microbiol. **58**: 1367-1370.

MOHN, W.W. et J.M. TIEDJE. 1992. Microbial reductive dehalogenation. Microbiol. Rev. **56**: 482-507.

NEILSON, A.H. 1994. Organic chemical in the aquatic environment - Distribution, fate and toxicology. Lewis Publishers/CRC Press, Boca Raton. Florida.

NEILSON, A.H. 1996. The biodegradation of halogenated organic compounds. J. of Appl. Bacteriol. **69**: 445-470.

NEUMANN, A., H. SCHOLZ-MURAMATSU et G. DIEKERT. 1994. Tetrachloroethene metabolism of *Dehalospirillum multivorans*. Arch. Microbiol. **162**: 295-301.

NEUMANN, A., G. WOHLFARTH et G. DIEKERT. 1995. Properties of tetrachloroethene and trichloroethene dehalogenase of *Dehalospirillum multivorans*. Arch. Microbiol. **163**: 276-281.

NEUMANN, A., G. WOHLFARTH et G. DIEKERT. 1996. Purification and characterization of tetrachloroethene reductive dehalogenase from *Dehalospirillum multivorans*. J. of Biol. Chem. **271**: 16515-16519.

NEUMANN, A., G. WOHLFARTH et G. DIEKERT. 1998. Tetrachloroethene dehalogenase from *Dehalospirillum multivorans*: cloning, sequencing of the encoding genes, and expression of the *pceA* gene in *Escherichia coli*. *J. of Bacteriol.* **180**: 4140-4145.

NI, S., J.K. FREDRICKSON et L. XUN. 1995. Purification and characterization of a novel 3-chlorobenzoate-reductive dehalogenase from the cytoplasmic membrane of *Desulfomonile tiedjei* DCB-1. *J. of Bacteriol.* **177**: 5135-5139.

ORSER, C.S. et C.C. LANGE. 1994. Molecular analysis of pentachlorophenol degradation. *Biodegradation.* **5** : 277-288.

REINEKE, W. et J.J. KNACKMUSS. 1988. Microbial degradation of monoaromatics. *Annu. Rev. Microbiol.* **42**: 263-287.

SANFORD, R.A., J.R. COLE, F.E. LÖFFLER et J.M. TIEDJE. 1996. Characterization of *Desulfitobacterium chlororespirans* sp. nov., which grows by coupling the oxidation of lactate to the reductive dechlorination of 3-chloro-4-hydroxybenzoate. *Appl. and Environ. Microbiol.* **62**: 3800-3808.

SCHOLZ-MARAMATSU, H., A. NEUMANN, M. MEßMER, E. MOORE et G. DIEKERT. 1995. Isolation and characterization of *Dehalospirillum multivorans* gen. nov., sp. nov., a tetrachloroethene-utilizing, strictly anaerobic bacterium. *Arch. Microbiol.* **163**: 48-56.

SCHUMACHER, W. et C. HOLLIGER. 1996. The proton/electron ratio of the menaquinone-dependent electron transport from dihydrogen to tetrachloroethene in *Dehalobacter restrictus*. *J. of Bacteriol.* **178**: 2328-2333.

SCHUMACHER, W., C. HOLLIGER, A.J.B. ZEHNDER et W.R. HAGEN. 1997. Redox chemistry of cobalamin and iron-sulfur cofactors in the tetrachloroethene

reductase of *Dehalobacter restrictus*. FEBS Letters. **409**: 421-425.

SHELTON, D.R. et J.M. TIEDJE. 1984. Isolation and partial characterization of bacteria in an anaerobic consortium that mineralizes 3-chlorobenzoic acid. Appl. and Environ. Microbiol. **48**: 840-848

STEVENS, T.O., T.G. LINKFIELD et J.M. TIEDJE. 1988. Physiological characterization of strain DCB-1, a unique dehalogenating sulfidogenic bacterium. Appl. and Environ. Microbiol. **54**: 2938-2943.

SYLVESTRE, P., J. HAWARI et R. MAYER. 1991. Sols contaminés par l'industrie de la préservation du bois, extraction et photodéchloration du PCP. Compte rendu du 14e Symposium International sur le traitement des eaux usées. Montréal. pp.1-24.

TOWNSEND, G.T. et J.M. SUFLITA. 1997. Influence of sulfur oxyanions on reductive dehalogenation activities in *Desulfomonile tiedjei*. Appl. and Environ. Microbiol. **63**: 3594-3599.

UTKIN, I., C. WOESE et J. WIEGEL. 1994. Isolation and characterization of *Desulfitobacterium dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates chlorophenolic compounds. Int. J. of Syst. Bacteriol. **44**: 612-619.

UTKIN, I., D.D. DALTON et J. WIEGEL. 1995. Specificity of reductive dehalogenation of substituted *ortho*-chlorophenols by *Desulfitobacterium dehalogenans* JW/IU-DC1. Appl. and Environ. Microbiol. **61**: 346-351.

VAN DE PAS, B., H. SMIDT, W. HAGEN, J. VAN DER OOST, G. SCHRAA, A. STAMS et W. DE VOS. 1999a. Purification and molecular characterization of *ortho*-chlorophenol reductive dehalogenase, a key enzyme of halorespiration in *Desulfitobacterium dehalogenans*. J. of Biol. Chem. **274** : 20287-20292.

VAN DE PAS, B., H. SMIDT, W. HAGEN, G. SCHRAA, A. STAMS et W. DE VOS. 1999b. Regulation and properties of *ortho*-chlorophenol reductive dehalogenase of *Desulfitobacterium dehalogenans*. Abstract for 99th Meeting of American Society for Microbiology. Chicago.

ZUBAY, GEOFFREY. Biochemistry. 1988. Macmillan Publishing Company. États-Unis. 1266 pages.