Université du Québec INRS-Institut Armand-Frappier

Études des déshalogénases réductrices de Desulfitobacterium hafniense PCP-1

par Ariane Bisaillon

Thèse présentée pour l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph. D.) en biologie

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne

Michel Sylvestre, INRS-Institut Armand-Frappier

Examinateurs externe

Manon Couture, Université Laval

Examinateurs externe

Richard Sparling, Université du Manitoba

Directeur de recherche

Réjean Beaudet, INRS-Institut Armand-Frappier

Co-directeur de recherche

Richard Villemur, INRS-Institut Armand-Frappier

Résumé

Plusieurs composés halogénés, tel que le pentachlorophénol (PCP), sont des polluants persistants dans l'environnement qui ont entraîné la contamination des sols et des eaux de nombreux sites. Les microorganismes anaérobies offrent des possibilités intéressantes pour la biorestauration des sites contaminés; il importe donc de pousser plus loin leur caractérisation. Desulfitobacterium hafniense PCP-1 est la seule bactérie anaérobie connue pouvant déshalogéner le PCP en 3-chlorophénol (3-CP) et d'autres molécules aromatiques en positions ortho, meta et para ainsi que le tétrachloroéthène (PCE). Deux déshalogénases réductrices ont déjà été purifiées et caractérisées. Une première (CrdA) induite par le 2,4,6-trichlorophénol (2,4,6-TCP) peut déshalogéner principalement en position ortho. Une autre (CprA5) induite par le 3,5-dichlorophénol (3,5-DCP) peut déshalogéner principalement en positions meta et para.

Ce projet de recherche a permis dans un premier temps de réaliser la purification partielle d'une nouvelle déshalogénase de type CprA effectuant la déshalogénation du PCP d'une culture de D. hafniense PCP-1 induite avec du 2,4,6-TCP. La purification de l'enzyme a été réalisée en solubilisant les protéines de la membrane avec du Triton X-100 3 % suivie d'une première chromatographie sur colonne échangeuse ionique DEAE-5PW à pH 6,5 et d'une deuxième chromatographie sur colonne d'interaction hydrophobe HiTrap Butyl HP. Après l'analyse SDS-PAGE de la préparation enzymatique, nous avons observé 2 bandes de protéines. L'analyse de ces bandes par spectrométrie de masse a permis de relier une protéine de 47 kDa au gène cprA3 dans le génome de D. hafniense DCB-2. La séquence en acides aminés contient un peptide signal TAT ainsi que deux motifs conservés pour la liaison d'un centre fer-soufre. L'équivalent du gène cprA3 chez la souche PCP-1 a été séquencé. Sa séquence est identique à celle du gène de la souche DCB-2. L'enzyme CprA3 est souvent copurifiée avec une sous-unité d'une NADH-quinone oxydoréductase. La stabilité de la CprA3 semi-purifiée est très faible. Nous avons observé des pertes importantes de plus de 90 % de son activité après 4 h à 4 °C et de 95 % après 24 h. La caractérisation de la CprA3 a montré que l'enzyme est sensible à l'oxygène. Elle a une température optimale se situant entre 50-55 °C, un pH optimal de 7,0 et elle est inhibée par le sulfite mais non par le sulfate. Des essais d'inhibition réversible en présence de lumière par le 1-iodopropane de l'activité de déshalogénation du PCP suggèrent l'implication d'un cobalamine dans l'activité

enzymatique. La déshalogénation du PCP et d'autres chlorophénols est effectuée en position ortho. La valeur de la K_m apparente de l'enzyme pour le PCP en présence de méthyl viologène 2 mM a été évaluée à 46,7 μM.

Dans un deuxième temps, l'expression des gènes *cprA2-5* de *D. hafniense* PCP-1 a été étudiée par RT-PCR en temps réel. Les effets de différents chlorophénols par rapport au temps d'incubation, de leur concentration et de la température d'incubation de la culture sur l'expression de ces gènes ont été évalués. L'expression du gène *cprA3* est fortement induite 4 h suivant l'ajout de 2,4,6-TCP à 50 μM et celle du gène *cprA5* après 18 h, lorsque la concentration de 2,4-DCP est élevée. L'expression du gène *cprA5* est fortement induite 4 h suivant l'ajout de 3,5-DCP à 60 μM. Le PCP à 30 μM induit la transcription des gènes *cprA2* et *cprA3*. L'expression du gène *cprA4* n'est pas induite par le 2,4,6-TCP ni le 3,5-DCP et faiblement induite par le PCP. L'expression des gènes *cprA3* et *cprA5* est fortement induite par le 2,4,6-TCP à 0,125 μM et le 3,5-DCP à 0,15 μM respectivement et le niveau d'expression est maximal à 37 °C.

Dans son ensemble, cette étude a apporté une meilleure compréhension des facteurs influents sur l'activité de déshalogénation et a permis de mieux évaluer le potentiel de dégradation de *D. hafniense* PCP-1. Les résultats obtenus pourraient servir à l'élaboration de biotraitements anaérobies plus efficaces ou à faciliter la purification de nouvelles déshalogénases réductrices.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le professeur Réjean Beaudet, d'avoir accepté de superviser mes travaux. Sa riche expérience a permis d'engager ma thèse dans la bonne direction et de la mener à bien. Il a su m'épauler et me motiver dans les moments de doute. Je le remercie en outre pour la confiance et la liberté qu'il m'a accordées.

J'aimerais également souligner l'importante contribution du professeur Richard Villemur dans la réalisation de ce travail. J'ai apprécié sa grande disponibilité et son enthousiasme à l'égard de la recherche.

Pour leur généreuse assistance technique, je remercie Rita Alary, Anastasia Nikolakakis et Silvain Milot.

Je remercie vivement mes collègues Julie Auclair, Philippe Constant, Julie Disnard et les étudiants que j'ai côtoyés tout au long de mon séjour à l'IAF pour leurs précieux conseils, aide et amitié.

Pour leur support constant et indéfectible pendant toutes ces années, je souhaite exprimer ma reconnaissance à mes proches, parents et amis. Enfin, je remercie Dominic pour le soutien qu'il m'a apporté. Son esprit curieux et critique, de même que sa bonne humeur, ne cessent de m'émerveiller.

Table des matières

Résumé	i
Remerciements	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	Ж
Liste des sigles et des abréviations	xiii
INTRODUCTION	1
REVUE DE LITTÉRATURE	4
2.1 Les xénobiotiques chlorés	4
2.1.1 Le pentachlorophénol	4
2.1.2 Autres xénobiotiques chlorés	6
2.2 La déshalogénation	8
2.2.1 Mécanismes de déshalogénation	8
2.2.2 La déshalogénation réductrice	10
2.2.3 La déshalorespiration	10
2.3 Bactéries anaérobies effectuant la déshalogénation réductrice	14
2.3.1 D. tiedjei DCB-1	15
2.3.2 S. multivorans	15
2.3.3 D. restrictus PER-K23	16
2.3.4 Desulfuromonas chloroethenica	16
2.3.5 Desulfovibrio sp. TBP-1	16
2.3.6 Anaeromyxobacter dehalogenans 2CP-1	17
2.3.7 Enterobacter sp. MS-1	17
2.3.8 Dehalococcoides spp.	17
2.3.9 Desulfitobacterium spp. 2.3.9.1 D. dehalogenans JW/IU-DC1 2.3.9.2 D. chlororespirans Co23 2.3.9.3 D. dichloroeliminans DCA1 2.3.9.4 D. metallireducens 2.3.9.5 Desulfitobacterium sp. PCE1 2.3.9.6 Desulfitobacterium sp. KBC1 2.3.9.7 Desulfitobacterium sp. PCE-S	
2.3.9.8 D hafniense	22

2.3.10 D. hafniense PCP-1	24
2.4 Les déshalogénases réductrices	29
2.4.1 Description générale des déshalogénases réductrices	29
2.4.2 Modèles de mécanismes enzymatiques pour les déshalogénases réductrices de t CprA/PceA	ype
2.4.3 Les aryles déshalogénases réductrices	
2.4.3.1 La 3-CB RDase de <i>D. tiedjei</i> DCB-1	
2.4.3.2 La 3Cl-4OHBA RDase de D. chlororespirans Co23	37
2.4.3.3 La 3Cl-4OHPA RDase de D. hafniense DCB-2	
2.4.3.4 La 3-Cl-4OHPA RDase de D. dehalogenans	
2.4.3.5 Les RDases de <i>D. hafniense</i> PCP-1	
•	
2.4.4 Les PCE/TCE déshalogénases réductrices	
2.4.4.2 Les PCE et TCE RDases de <i>D. ethenogenes</i> 195	
2.4.4.3 La PCE RDase de Desulfitobacterium sp. PCE-S	
2.4.4.4 La PCE RDase de D. restrictus	
2.4.4.5 La PCE RDase de D. hafniense Y51	
2.4.4.6 Les RDases de <i>Desulfitobacterium</i> sp. PCE1 et <i>D. hafniense</i> TCE1	
2.4.4.7 La PCE RDase purifiée d'une culture de <i>C. bifermentans</i> DPH-1	
2.5 Organisation génétique des loci <i>cprA</i> et <i>pceA</i>	
2.5.1 Fonction des gènes associés à <i>cprA/pceA</i>	
2.5.2 Description des loci <i>cpr</i> et <i>pce</i> identifiés chez <i>D. hafniense</i> DCB-2	
2.6 Régulation transcriptionnelle des déshalogénases réductrices	
2.6.1 Le régulateur transcriptionnel CprK	
2.6.2 Autres régulateurs identifiés chez Dehalococcoides	60
2.6.3 Études transcriptionnelles effectuées chez Dehalococcoides	61
2.7 Objectifs de l'étude	63
CHAPITRE I : Purification et caractérisation d'une nouvelle déshalogénase réductrice produite par <i>Desulfitobacterium hafniense</i> PCP-1 ayant une forte actividéshalogénation du PCPdéshalogénation du PCP	
3.1 Rappel de la problématique et objectifs de la recherche	65
3.2 Matériel et méthodes	67
3.2.1 Manipulations en conditions anaérobies	67
3.2.2 Provenance de D. hafniense PCP-1	67
3.2.3 Culture de D. hafniense PCP-1 dans des houteilles de sérum	67

3.2.4 Purification de la PCP déshalogénase réductrice	68
3.2.4.1 Culture de <i>D. hafniense</i> PCP-1 dans une bouteille en verre de 15 litres	68 70
3.2.4.3 Solubilisation des protéines de la membrane	/U 70
3.2.4.4 Chromatographies liquides	71
3.2.5 Dosage de l'activité enzymatique	
3.2.6 Analyse des chlorophénols et autres composés aromatiques	
3.2.7 Dosage des protéines	
3.2.8 Électrophorèse en gel de polyacrylamide avec SDS	73
3.2.9 Analyse des protéines en spectrométrie de masse	74
3.2.10 Manipulations de l'ADN et séquençage d'un fragment du gène <i>cprA3</i>	. 74
3.2.10.2 Électrophorèse en gel d'agarose de l'ADN	
3.2.10.3 Réaction de polymérase en chaîne	
3.2.10.4 Amplification et séquençage	. 76
3.2.11 Caractérisation biochimique de la PCP déshalogénase réductrice	
3.2.11.1 Cinétique enzymatique	. 77
3.2.11.2 Stabilité à 4 °C	. 77
3.2.11.3 Détermination de la K _m et de la V _{max}	. 77
3.2.11.4 Spectre d'activité	70 . 70
3.2.11.6 Effet de l'air ambiant sur l'activité enzymatique	. /0 78
3.2.11.7 Essais d'inhibition réversible à la lumière par l'iodopropane	
3.2.11.8 Effet des métaux sur l'activité enzymatique	. 79
3.2.11.9 Effet du KCN, du citrate de sodium du nitrate, du sulfate et du sulfite et de	
l'EDTA sur l'activité enzymatique	
3.3 Résultats	. 81
3.3.1 Purification de la PCP déshalogénase réductrice	. 81
3.3.2 Identification de la PCP déshalogénase réductrice	. 83
3.3.3 Analyse de la séquence du gène cprA3 de D. hafniense PCP-1	. 84
3.3.4 Caractérisation biochimique de la PCP déshalogénase réductrice	
3.3.4.1 Cinétique enzymatique	. 86
3.3.4.2 Stabilité à 4 °C	. 88
3.3.4.3 Détermination de la K _m et de la V _{max}	. 89
3.3.4.5 Détermination du pH optimal et de la température optimale	09 01
3.3.4.6 Effet de l'air ambiant sur l'activité enzymatique	
3.3.4.7 Essais d'inhibition réversible à la lumière par l'iodopropane	. 94
3.3.4.8 Effet des métaux sur l'activité enzymatique	95
3.3.4.9 Effet du KCN et du citrate de sodium et de l'EDTA sur l'activité enzymatique	95
3.3.4.10 Effet du nitrate, du sulfate et du sulfite sur l'activité enzymatique	95

3.4 Discussion9
3.4.1 Purification de la PCP déshalogénase réductrice
3.4.2 Analyse de la séquence en acides aminés
3.4.3 Spectre d'activité
3.4.4 Caractérisation biochimique
CHAPITRE II : Étude de différentes conditions de culture sur le niveau d'expression des gènes cprA2-5 de Desulfitobacterium hafniense PCP-1
4.1 Rappel de la problématique et objectifs de la recherche 10
4.2 Matériel et méthodes
4.2.1 Culture de D. hafniense PCP-1
4.2.2 Extraction de l'ADN génomique
4.2.3 Extraction de l'ARN total
4.2.4 Réaction de transcription inverse et de PCR en temps réel 10
4.2.5 Quantification relative de l'expression des gènes
4.2.6 Cinétiques de la transformation des chlorophénols et du niveau d'expression des gènes <i>cprA</i> d'une culture de <i>D. hafniense</i> PCP-1 induite au 2,4,6-TCP et au 3,5-DCP 11
4.2.7 Effet de la température d'incubation sur le niveau d'expression des gènes <i>cprA</i> d'une culture de <i>D. hafniense</i> PCP-1 induite au 2,4,6-TCP et au 3,5-DCP
4.2.8 Effet de la concentration de 2,4,6-TCP, de 3,5-DCP et du PCP à 30 μM sur le niveau d'expression des gènes <i>cprA</i> d'une culture de <i>D. hafniense</i> PCP-1
4.3 Résultats
4.3.1 Cinétiques de la transformation des chlorophénols et du niveau d'expression des gènes <i>cprA</i> d'une culture de <i>D. hafniense</i> PCP-1 induite au 2,4,6-TCP et au 3,5-DCP 11
4.3.2 Effet de la température d'incubation sur le niveau d'expression des gènes <i>cprA</i> d'une culture de <i>D. hafniense</i> PCP-1 induite au 2,4,6-TCP et au 3,5-DCP
4.3.3 Effet de la concentration de 2,4,6-TCP, de 3,5-DCP et du PCP à 30 μM sur le niveau d'expression des gènes <i>cprA</i> d'une culture de <i>D. hafniense</i> PCP-1
4.4 Discussion
CONCLUSION 123
Liste des références
Annexe 1 : Manipulations en conditions anaérobies 14

Liste des tableaux

Tableau 1.	Propriétés physico-chimiques du pentachlorophénol
Tableau 2.	Exemples de potentiels d'oxydoréduction
Tableau 3.	Pourcentage de réassociation ADN-ADN des génomes de quelques souches de Desulfitobacterium
Tableau 4.	Spectre de déshalogénation des bactéries du genre Desulfitobacterium 27
Tableau 5.	Propriétés des aryles déshalogénases réductrices purifiées
Tableau 6.	Spectre de déshalogénation des aryles déshalogénases réductrices purifiées . 42
Tableau 7.	Propriétés des PCE/TCE déshalogénases réductrices purifiées
Tableau 8.	Spectre de déshalogénation des
Tableau 9.	Tableau de purification de la PCP déshalogénase réductrice
Tableau 10.	Analyse au CLHP de différents composés aromatiques
Tableau 11.	Spectre d'activité d'une préparation enrichie de la PCP déshalogénation réductrice pour différents chlorophénols
Tableau 12.	Essai d'inhibition réversible par l'iodopropane (0,5 mM) d'une préparation de la PCP déshalogénase réductrice enrichie
Tableau 13.	Effet des métaux (5 mM) sur l'activité de déshalogénation du PCP d'une préparation de la PCP déshalogénase réductrice enrichie
Tableau 14.	Effet du KCN et du citrate de sodium et de l'EDTA sur l'activité de déshalogénation d'une préparation de la PCP déshalogénase réductrice enrichie
Tableau 15.	Effet du nitrate, du sulfate et du sulfite et sur l'activité de déshalogénation sur l'activité enzymatique d'une préparation de la PCP déshalogénase réductrice enrichie
Tableau 16.	Amorces utilisées pour les réactions de transcription inverse et de PCR en temps réel

Liste des figures

Figure 1.	Schéma de la structure chimique du pentachlorophénol
Figure 2.	Mécanismes de déshalogénation
Figure 3.	Modèle pour la déshalorespiration de D. tiedjei DCB-1
Figure 4.	Arbre phylogénétique basé sur les séquences de l'ARNr 16S montrant la diversité des bactéries effectuant la déshalogénation réductrice
Figure 5.	Arbre phylogénétique basé sur les séquences en acides aminés des déshalogénases réductrices purifiées et hypothétiques de type CprA/PceA 31
Figure 6.	Alignement de séquences en acides aminés de la région N-terminale et des deux motifs pour la liaison de centres fer-soufre des déshalogénases réductrices de type CprA/PceA
Figure 7.	Schéma de la structure chimique des cobalamines
Figure 8.	Schéma de la structure de centres fer-soufre communs
Figure 9.	Représentation schématisée de l'inhibition réversible à la lumière par l'iodopropane
Figure 10.	Mécanismes enzymatiques proposés pour les déshalogénases réductrices 36
Figure 11.	Représentation schématisée de la PCE RDase de D. restrictus
Figure 12.	Schéma représentant la formation d'une enzyme CprA 53
Figure 13.	Détection des transcrits de <i>cprA2-5</i> par RT-PCR chez les souches <i>D. hafniense</i> PCP-1, TCP-A et DCB-2
Figure 14.	Organisation génétique de loci cpr et pce
Figure 15.	Représentation schématisée des changements de conformation de CprK1 pour la liaison à l'ADN
Figure 16.	Alignement de séquences des « dehalobox » putatives chez D. hafniense DCB-2
Figure 17.	Localisation des séquences « dehalobox » putatives pour la liaison de CprK chez D. hafniense DCB-2
Figure 18.	Électrophorèse en gel de polyacrylamide avec SDS

Figure 19.	Séquence en acides aminés de la protéine NADH-quinone oxydoréductase déduite de la séquence du génome de <i>D. hafniense</i> DCB-2
Figure 20.	Séquence en acides aminés de la protéine CprA3 déduite de la séquence du génome de <i>D. hafniense</i> DCB-2
Figure 21.	Séquence du génome de DCB-2 utilisée pour générer des oligonucléotides pour amplifier un fragment du gène <i>cprA3</i>
Figure 22.	Cinétique enzymatique de la formation de 2,3,4,5-TeCP en fonction du temps pour une préparation de la PCP déshalogénase réductrice enrichie
Figure 23.	Cinétique enzymatique de la formation de 2,3,4,5-TeCP en fonction du temps pour une préparation de la PCP déshalogénase réductrice semi-purifiée 87
Figure 24.	Stabilité d'une préparation de la PCP déshalogénase réductrice enrichie 88
Figure 25.	Effet du pH sur l'activité de déshalogénation du PCP d'une préparation enrichie de la PCP déshalogénase réductrice
Figure 26.	Effet de la température d'incubation sur l'activité de déshalogénation du PCP d'une préparation enrichie de la PCP déshalogénase réductrice
Figure 27.	Effet de l'exposition à l'air ambiant sur l'activité de déshalogénation du PCP d'une préparation enrichie de la PCP déshalogénase réductrice
Figure 28.	Cinétique de la transformation du 2,4,6-TCP d'une culture de <i>D. hafniense</i> PCP-1 induite au 2,4,6-TCP
Figure 29.	Cinétique de la transformation du 3,5-DCP d'une culture de <i>D. hafniense</i> PCP-1 induite au 3,5-DCP
Figure 30.	Effet du temps d'incubation sur le niveau d'expression des gènes <i>cprA</i> d'une culture de <i>D. hafniense</i> PCP-1 induite au 2,4,6-TCP
Figure 31.	Effet du temps d'incubation sur le niveau d'expression des gènes <i>cprA</i> d'une culture de <i>D. hafniense</i> PCP-1 induite au 3,5-DCP
Figure 32.	Effet de la température d'incubation sur le niveau d'expression des gènes <i>cprA</i> d'une culture de <i>D. hafniense</i> PCP-1 induite au 2,4,6-TCP
Figure 33.	Effet de la température d'incubation sur le niveau d'expression des gènes <i>cprA</i> d'une culture de <i>D. hafniense</i> PCP-1 induite au 3,5-DCP
Figure 34.	Effet de la concentration de 2,4,6-TCP sur le niveau d'expression du gène cprA3 d'une culture de D. hafniense PCP-1

Figure 35.	Effet de la concentration de 3,5-DCP sur le niveau d'expression du gène cprA5 d'une culture de D. hafniense PCP-1
Figure 36.	Effet du PCP à 30 μM sur le niveau d'expression des gènes <i>cprA</i> d'une culture de <i>D. hafniense</i> PCP-1
Figure 37.	Montage pour rendre une solution anaérobie
Figure 38.	Montage pour barboter le milieu de culture

Liste des sigles et des abréviations

3-CB: 3-chlorobenzoate

BP: bromophénol

BPC: biphényle polychloré

Bromoxynil: 3,5-dibromo-4-hydroxybenzonitrile

CBA: monochlorobenzoate

CDD: dibenzo-p-dioxine polychloré

CHAPS: 3- [(3-cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1- propanesulfonate

CLHP: chromatographie en phase liquide à haute performance

ClPA: chlorophényl acétate CP: monochlorophénol

CT: cycle seuil

DCA: dichloroéthane DCBA: dichlorobenzoate DCE: dichloroéthène DCP: dichlorophénol DEPC: diéthyl dicarbonate DNase: désoxyribonucléase DPA: dichloropentane DTT: dithiothréitol

 E'_{θ} : potentiel d'oxydoréduction

EDTA: acide éthylène-diamine-tétracétique RPE: résonance paramagnétique électronique

HCA: hexachloroéthane HCB: hexachlorobenzène

Ioxynil: 3,5-diiodo-4-hydroxybenzonitrile

MLA: milieu de culture liquide anaérobie

nkat: nanokatal, nmole par seconde

OHBP: hydroxy biphényl

OHBPC: hydroxy biphényl polychloré

OHBA: hydroxybenzoate OHPA: hydroxyphénylacétate

pb: paire de bases PCA: pentachloroéthane PCE: tétrachloroéthène PCP: pentachlorophénol

PCR: réaction de polymérisation en chaîne PMSF: fluorure de phénylméthanesulfonyl

RDase: déshalogénase réductrice

Redox: oxydoréduction

RT-PCR: réaction de transcription inverse suivi d'une réaction de

PCR

SDS: sodium dodécyl sulfate

SDS-PAGE: électrophorèse en gel de polyacrylamide avec SDS

TA: tampon d'activité enzymatique

TAE: tampon Tris-HCl, aide acétique, EDTA

TAT: « twin arginine translocation »

TBP: tribromophénol TCA: trichloroéthane TCAc: trichloroacétate TCB: trichlorobenzène TCBA: trichlorobenzoate TCE: trichloroéthène TCFE: trichlorofluoréthène TCHO: tétrachlorohydroquinone

TCMP: 2,3,5,6, tétrachloro-4-méthoxyphénol

TCP: trichlorophénol
TeCA: tetrachloroéthane
TeCB: tétrachlorobenzène
TeCMe: tetrachlorométhane
TeCP: tétrachlorophénol

TEMED: tétra-méthyl-éthylènediamine
TEN: tampon Tris-HCl, EDTA, NaCl
Tris: tris(hydroxyméthyl)aminométhane

U: μmole par minute

VC: chlorure de vinyle

INTRODUCTION

Les xénobiotiques chlorés constituent une menace réelle à la santé des écosystèmes et des hommes à cause de leur forte toxicité et de leur persistance dans l'environnement (Mohn et Tiedje, 1992). La présence de ces molécules dans l'environnement est une conséquence de leur emploi excessif dans diverses industries, notamment comme pesticide et comme solvant. Apparu en 1930, le PCP est toujours utilisé comme agent de préservation du bois (Crosby, 1981). Il existe des microorganismes anaérobies capables d'effectuer la déshalogénation de composés fortement chlorés comme le PCP. Pour espérer les utiliser dans la restauration des sites contaminés, leur croissance et leur activité métabolique doivent être améliorées.

La déshalogénation réductrice est le mécanisme de déshalogénation le plus commun en conditions anaérobies. La réaction consiste à enlever un atome d'halogène pour le remplacer par un atome d'hydrogène. La plupart des déshalogénases réductrices purifiées sont de types CprA/PceA. Leur séquence en acides aminés contient deux motifs riches en cystéine pour la liaison de centres fer-soufre, ainsi qu'un peptide signal pour l'exportation de la protéine vers le périplasme par le système de sécrétion TAT. Il s'agit d'enzymes sensibles à l'oxygène qui contiennent un cofacteur corrinoïde et deux centres fer-soufre. À l'exception de la déshalogénase réductrice de Sulfurospirillum multivorans isolée de la fraction cytoplasmique, les enzymes de type CprA/PceA ont toutes été isolées de la fraction membranaire (Neumann et al., 1996). La première déshalogénase réductrice purifiée est une 3-chlorobenzoate (3-CB) déshalogénase de Desulfomonile tiedjei DCB-1. Cette enzyme n'a aucune homologie de séquence avec les enzymes de type CprA/PceA. Elle est composée de deux sous-unités, contient un cofacteur hème et n'est pas sensible à l'oxygène (Ni et al., 1995). La PCE déshalogénase purifiée d'une culture de Clostridium bifermentans DPH-1 et la 2,4,6-TCP déshalogénase de Desulfitobacterium hafniense PCP-1 ne contiennent pas de centre fer-soufre (Okeke et al., 2001; Boyer et al., 2003). Ce sont les deux seules autres déshalogénases réductrices n'ayant pas d'homologie avec les enzymes de types CprA/PceA.

L'analyse des génomes de *D. hafniense* DCB-2 et de *Dehalococcoides ethenogenes* 195 a démontré respectivement la présence de 6 et 17 déshalogénases putatives de type

CprA/PceA (Villemur et al., 2002; Seshadri et al., 2005). Plus récemment, l'analyse du génome de Dehalococcoides sp. CBDB1 a révélé la présence de 32 déshalogénases réductrices hypothétiques et l'analyse du génome de D. hafniense Y51 seulement 2 (Kube et al., 2005; Nonaka et al., 2006). Le gène cprA/pceA est toujours associé au gène cprB/pceB qui code pour une protéine membranaire qui pourrait servir à ancrer l'enzyme à la membrane cytoplasmique. Un opéron de huit cadres de lectures, cprTKZEBACD, a été identifié chez Desulfitobacterium dehalogenans et D. hafniense DCB-2 (Smidt et al., 2000; Villemur et al., 2002). Les protéines CprC et CprK seraient des régulateurs transcriptionnels et CprD, CprE et CprT seraient des protéines impliquées dans le repliement des protéines et l'insertion des cofacteurs (Smidt et al., 2000).

Les bactéries du genre Desulfitobacterium constituent le plus important groupe de bactéries effectuant la déshalogénation réductrice. Elles peuvent agir sur le 3-chloro-4hydroxyphénylacétate (3Cl-4OHPA), certains chloroéthylènes, chlorophénols chlorobenzoates. Le spectre d'activité varie selon les souches et les espèces isolées (Villemur et al., 2006). D. hafniense DCB-2 a été isolée en 1992 d'un consortium effectuant la déshalogénation du 2,4,6-TCP. Elle a une activité de déshalogénation de plusieurs chlorophénols en positions ortho et meta (Madsen et Licht, 1992). D. hafniense PCP-1 a été isolée d'un consortium enrichi de sols contaminés au PCP pouvant dégrader complètement le PCP (Bouchard et al., 1996). Il s'agit de la seule bactérie anaérobie connue pouvant déshalogéner le PCP jusqu'au 3-CP, différents composés aromatiques halogénés en position ortho, meta et para (Dennie et al., 1998). Elle a déjà été utilisée dans des procédés anaérobies de dégradation du PCP en bioréacteurs (Lanthier et al., 2000; Lanthier et al., 2005). Deux déshalogénases réductrices ont déjà été purifiées et caractérisées de la souche PCP-1. Une première (CrdA) induite par le 2,4,6-TCP peut déshalogéner principalement en position ortho (Boyer et al., 2003). Une autre (CprA5), induite par le 3,5-DCP, peut déshalogéner le 3,5-DCP de même que certains autres chlorophénols principalement en position meta et para (Thibodeau et al., 2004). Quatre gènes cprA ont été identifiés chez la souche PCP-1: cprA2, cprA3, cprA4 et cprA5 (Villemur et al., 2002). La présence de plusieurs gènes codant pour des déshalogénases réductrices hypothétiques laisse croire que cette bactérie produit plusieurs enzymes distinctes ayant des spécificités de déshalogénation différentes.

Nos connaissances concernant les déshalogénases réductrices produites par les microorganismes anaérobies sont encore très limitées. Cette étude consiste, dans un premier temps, à effectuer la purification et la caractérisation d'une nouvelle déshalogénase réductrice de *D. hafniense* PCP-1 qui a une forte activité envers le PCP. La protéine semi-purifiée a été identifiée par spectrométrie de masse à partir du génome de *D. hafniense* DCB-2. L'activité envers différents substrats halogénés a été mesurée et plusieurs paramètres pouvant affecter l'activité enzymatique ont été étudiés. Dans un second temps, l'effet de différentes conditions de culture sur l'expression des gènes *cprA* identifiés chez cette souche a été étudié. Le niveau d'expression a été vérifié par la technique de RT-PCR en temps réel pour des cultures exposées à différents chlorophénols, différentes concentrations de chlorophénols et différentes températures d'incubation. L'étude biochimique et moléculaire décrite dans cette étude a permis de déterminer l'influence de différents facteurs sur l'activité de déshalogénation de ce microorganisme et de mieux évaluer son potentiel de dégradation.

REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Les xénobiotiques chlorés

2.1.1 Le pentachlorophénol

Le PCP est une molécule inventée dans les années 1930 utilisée comme fongicide, insecticide, molluside, herbicide, algicide, défoliant et désinfectant (Crosby, 1981). C'est un produit biocide si efficace qu'il est susceptible de causer de graves problèmes de santé et environnementaux. Aux États-Unis, le PCP était l'un des biocides les plus utilisés jusqu'à l'adoption en 1984 d'un règlement interdisant son utilisation sur des matériaux pouvant venir en contact avec les animaux et les humains. Depuis, la production du PCP aux États-Unis a graduellement décliné, passant de 45 millions de tonnes en 1983, à 9,1 millions de tonnes en 1996 (ATSDR, 2001). Au Canada, la production du PCP a été abolie au début des années 1980 et son utilisation est réglementée par Santé Canada aux termes de la *Loi sur les produits antiparasitaires*. Néanmoins, en 2000, 100 à 1 000 tonnes de PCP en concentration supérieure à 1 % ont été importées au Canada en vue de son utilisation comme produit de préservation du bois servant à la fabrication de poteaux de lignes électriques, de lignes téléphoniques et de traverses de chemins de fer (Stephens *et al.*, 2000; Environnement Canada, 2009).

La formule chimique du PCP est C₆Cl₅OH. Il est composé d'un noyau aromatique substitué par un groupement hydroxyle et cinq atomes de chlore (figure 1). La production industrielle du PCP est effectuée par chloration directe du phénol avec du chlore gazeux ou par hydrolyse de l'hexachlorobenzène. Le PCP de catégorie technique est pur à environ 86 %. Selon la méthode de production, il peut contenir d'autres chlorophénols, des dibenzodioxines polychlorés, des dibenzofurannes polychlorés, des éthers diphényliques polychlorés, des phénoxyphénols polychlorés, des cyclohexenones et des cyclohexadienones chlorinés, de l'hexachlorobenzène, et des biphényles polychlorés (BPC). Le PCP pur est un cristal blanchâtre volatil qui dégage une odeur phénolique à la température de la pièce. Il est soluble dans la plupart des solvants organiques, mais très peu soluble dans l'eau. Sa solubilité dans l'eau augmente avec la température (14 mg/l à 24 °C et 19 mg/l à 30 °C) et son caractère ionisable (pKa de 4,75) fait en sorte que sa solubilité augmente avec le pH. Les

propriétés physico-chimiques du PCP sont décrites dans le tableau 1 (Crosby, 1981; HSDB, 2006).

La forte toxicité du PCP réside dans sa capacité à rendre la membrane cellulaire perméable aux protons et aux ions. C'est un agent découplant de la phosphorylation oxydative (Steiert *et al.*, 1988). Le PCP est un irritant pour la peau, les yeux et les voies respiratoires. À forte dose, il peut entraîner de la fièvre, de la déshydratation, des spasmes musculaires et même le coma. Une exposition prolongée au PCP et aux impuretés qu'il contient peut causer des dommages au foie, aux reins, aux systèmes nerveux et immunitaire. Le PCP a des effets cancérigènes, mutagènes, tératogènes et embryotoxiques (ATSDR, 2001; HSDB, 2006).

Le PCP est un polluant ubiquitaire et persistant dans l'environnement parce qu'il est peu réactif, stable à l'hydrolyse et stable à l'oxydation. Il a été détecté dans les eaux de surface, les sédiments, l'eau de pluie, les organismes aquatiques, le sol, les aliments, le lait humain, les tissus adipeux et l'urine (ATSDR, 2001). Le PCP peut être adsorbé par les sols et les sédiments à un pH acide, volatilisé dans l'air, transformé par photolyse ou encore métabolisé par les animaux, les plantes, les bactéries et les champignons (ATSDR, 2001). La biodégradation par les microorganismes est le mécanisme principal de transformation du PCP dans le sol. Elle peut être effectuée dans des conditions aérobies ou anaérobies (Crosby, 1981). La biodégradation en conditions aérobies est principalement effectuée par hydroxylation et oxygénolyse et en conditions anaérobies par déshalogénation réductrice (McAllister et al., 1996) (section 2.2.1). En générale, la déshalogénation réductrice anaérobie est plus efficace sur les composés lourdement chlorés, comme le PCP, le PCE, l'hexachlorobenzène et les BPC. Elle génère des composés moins lourdement chlorés et par conséquent moins toxiques, plus solubles et moins récalcitrants à une dégradation totale par les bactéries aérobies (Crosby, 1981; Mohn et Tiedje, 1992; El Fantroussi et al., 1998). Parmi les bactéries aérobies isolées en culture pure capables de transformer le PCP on retrouve Arthrobacter sp., Flavobacterium sp., Mycobacterium sp., Pseudomonas sp., Rhodococcus sp. et Sphingomonas sp. (McAllister et al., 1996). Les principales bactéries anaérobies capables de transformer le PCP sont Dehalococcoides sp. CBDB1 et D. tiedjei DCB-1 et différentes souches de D. hafniense (Mohn et Kennedy, 1992; Villemur et al., 2006; Adrian et al., 2007a).

La capacité des microorganismes à métaboliser les organochlorés a motivé des recherches visant à développer des traitements biologiques efficaces, moins coûteux que les traitements thermiques ou physico-chimiques. Les traitements biologiques consistent à stimuler la flore microbienne déjà présente dans un sol contaminé ou encore à inoculer un sol contaminé avec une bactérie ou un consortium. Ils peuvent être effectués *in situ*, c'est-à-dire directement au site contaminé ou nécessiter le transport des matières contaminées à un site de traitement, *ex situ*. Les traitements biologiques anaérobies sont moins coûteux que les traitements aérobies et plus facilement applicables *in situ* parce qu'ils ne nécessitent pas de système d'aération. De plus, ils offrent des perspectives intéressantes pour la dégradation de molécules fortement chlorées, récalcitrantes à la dégradation par les bactéries aérobies. De nombreux facteurs limitent toutefois l'efficacité des traitements biologiques tels que la toxicité du PCP à concentrations élevées et le mélange de plusieurs contaminants. L'élaboration de biotraitements anaérobies du PCP plus efficaces repose sur une meilleure compréhension des facteurs influents sur la croissance des microorganismes et sur l'activité de déshalogénation (Fetzner et Lingens, 1994; McAllister *et al.*, 1996).

2.1.2 Autres xénobiotiques chlorés

Les xénobiotiques chlorés peuvent être divisés en trois classes, soit les pesticides organochlorés, les solvants aliphatiques et les aryles halogénés. Le lindane (y-1,2,3,4,5,6-hexachloro-cyclohexane), le DTT (1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophényl)éthane), le mirex et le toxaphène sont quelques exemples de pesticides organochlorés employés comme insecticides. Le dichlorométhane, le chloroforme, le PCE et le trichloroéthène (TCE) sont des solvants aliphatiques utilisés pour le dégraissage de machines, le nettoyage de pièces électroniques ou encore le nettoyage à sec. Les BPC et les chlorophénols font parties de la classe des aryles halogénés. Les BPC ont des propriétés d'isolation électrique, de stabilité thermique, de lubrifiant et de résistance au feu. Ils sont, entre autres, utilisés dans la fabrication de transformateurs électriques et d'appareils hydrauliques industriels (Mohn et Tiedje, 1992).

Figure 1. Schéma de la structure chimique du pentachlorophénol. Les chlores sont substitués en positions *ortho* (positions 2 et 6), *meta* (positions 3 et 5) et *para* (position 4) par rapport à la position du groupement hydroxyle.

Tableau 1. Propriétés physico-chimiques du pentachlorophénol (d'après Crosby, 1891; HSBD, 2006)

	
Apparence	cristalline
Couleur	blanchâtre
Odeur	phénolique
Point d'ébullition	309 °C
Point de fusion	190 °C
Densité	1,85 g/l
Masse moléculaire	266,3
Masse volumique	1,98
Constante de dissociation (pKa)	4,75
Solubilité dans l'eau à 20 °C	14 mg/l
Solubilité dans l'eau à 30 °C	19 mg/l
Solubilité dans des solvants organiques à 25 °	C
acétone	50 g/l
éthanol	120 g/1
méthanol	180 g/l
Coefficient de partage (Kp) à 25 °C	U
octanol-eau	log Kp 2,15
hexane-eau	log Kp 5,01
Photolyse dans l'eau, pH 7,3 (t _{1/2} vie)	. ,
Lumière	48 h
UV	3,5 h

2.2 La déshalogénation

2.2.1 Mécanismes de déshalogénation

La déshalogénation est effectuée selon sept mécanismes enzymatiques. Les différentes réactions pour le clivage du lien carbone-halogène sont illustrées dans la figure 2. (1) La déshalogénation réductrice consiste à remplacer un atome de chlore par un atome d'hydrogène selon deux modes réactionnels différents : (a) la dihaloélimination ou (b) l'hydrogénolyse. L'hydrogénolyse est le remplacement d'un seul substituant halogène par un atome d'hydrogène tandis que la dihaloélimination consiste à remplacer deux substituants halogènes par un seul atome d'hydrogène, ce qui entraîne la formation d'une double liaison. (2) Le second mécanisme, la déshalogénation oxygénolytique, consiste à remplacer un atome halogéné par un groupement hydroxyle. Il est catalysé par les monooxygénases et les dioxygénases. Ces enzymes utilisent respectivement un ou deux atomes d'oxygène. (3) Le troisième mécanisme est la déshalogénation hydrolytique. La réaction est catalysée par les halidohydrolases qui remplacent l'atome halogéné par un groupement hydroxyle dérivé de l'eau. (4) La déshalogénation thiolytique est catalysée par l'enzyme glutathione S-transférase. Cette enzyme catalyse la déshalogénation du dichlorométhane en formant un complexe S-chlorométhyl glutathione qui est rapidement hydrolysé. (5) Le cinquième mécanisme est la substitution intramoléculaire des alcools halogénés, une réaction qui produit des composés époxydes. (6) Le sixième mécanisme est la déshydrohalogénation. Dans cette réaction, l'élimination d'un atome halogéné et d'un atome d'hydrogène entraîne la formation d'une double liaison. (7) Le dernier mécanisme, l'hydratation, est catalysé par une hydratase et consiste à ajouter une molécule d'eau à une double liaison d'un composé vinylique tel que l'acide 3-chloroacrylique (Fetzner et Lingens, 1994).

(1a)
$$\stackrel{Cl}{\underset{H}{\longleftarrow}} \stackrel{Cl}{\underset{H}{\longleftarrow}} + \chi_{H^{-}} \longrightarrow \stackrel{H}{\underset{H}{\longleftarrow}} \stackrel{H}{\underset{H}{\longleftarrow}} + \zeta_{l^{-}} + \chi$$

(1b)
$$\stackrel{Cl}{\underset{Cl}{\longleftarrow}}$$
 $\stackrel{Cl}{\underset{Cl}{\longleftarrow}}$ + χ H $\stackrel{H}{\underset{Cl}{\longrightarrow}}$ $\stackrel{Cl}{\underset{Cl}{\longleftarrow}}$ + χ H $\stackrel{Cl}{\underset{Cl}{\longrightarrow}}$ + χ H

(2) OH OH OH OH
$$+ O_2 + NADH + H^+ \longrightarrow + CO_2 + NAD^+ + HCI$$

(3) R-CH₂CI + H₂O
$$\longrightarrow$$
 R-CH₂OH + HCI

(7) HOOC-CH=CHCI
$$+$$
 H₂O \longrightarrow [HOOC-CH₂-CHOHCI]
HOOC-CH₂-CHO $+$ HCI

Figure 2. Mécanismes de déshalogénation (d'après Fetzner et Lingens, 1994)

- (1) déshalogénation réductrice : a. dihaloélimination, b. hydrogénolyse;
- (2) déshalogénation oxygénolytique; (3) déshalogénation hydrolytique;
- (4) déshalogénation thiolytique; (5) substitution intramoléculaire;
- (6) déshydrohalogénation; (7) hydratation.

2.2.2 La déshalogénation réductrice

La déshalogénation réductrice peut avoir lieu par une réaction fortuite, non spécifique, dite de co-métabolisme. Une réaction de co-métabolisme est réalisée par des enzymes ou des cofacteurs qui normalement catalysent une autre réaction et n'est pas énergétiquement utile pour la cellule (Holliger et al. 2003). La déshalogénation peut aussi être couplée à une production d'énergie pour la croissance par un processus respiratoire qu'on appelle la déshalorespiration (Holliger et Schraa, 1994). La déshalorespiration est connue chez un bon nombre de bactéries anaérobies du genre Desulfitobacterium, Dehalococcoides. Sulfurospirillum, Dehalobacter, Desulfomonile, Desulfovibrio, Desulfuromonas, Trichlorobacter et Anaeromyxobacter (se référer à la section 2.3 pour une description des principales souches isolées en culture pure). Il s'agit d'une voie métabolique où le composé halogéné est l'accepteur final d'une chaîne de transport d'électrons qui est couplée à la synthèse d'ATP. La réaction de déshalogénation est catalysée par des enzymes très spécifiques et très efficaces appelées déshalogénases réductrices (RDases). À part quelques exceptions, les RDases sont des enzymes membranaires, sensibles à l'oxygène qui contiennent un cofacteur corrinoïde, deux centres fer-soufre et un peptide signal pour l'exportation au périplasme par le système de sécrétion TAT (« twin arginine translocation ») (Smidt et de Vos, 2004) (se référer à la section 2.4 pour une description des RDases purifiées).

2.2.3 La déshalorespiration

Tout comme l'oxygène dans la respiration aérobie, les composés minéraux oxygénés, les composés organiques et même les métaux peuvent servir d'accepteur final d'électrons dans la respiration anaérobie. Les bactéries utilisent ces différents composés selon leur disponibilité et elles utilisent préférentiellement l'accepteur qui a un potentiel d'oxydoréduction (redox) plus élevé, capable de procurer plus d'énergie. Le potentiel redox des composés halogénés réduits par hydrogénolyse varie entre +260 et +600 mV selon le couple R-Cl/R-H (tableau 2). La réduction par hydrogénolyse est donc thermodynamiquement plus favorable que la réduction du sulfate (SO₄²/H₂S, $E'_0 = -217 \text{ mM}$) et elle est équivalente à la réduction du nitrate (NO₃/NO₂, $E'_0 = +433 \text{ mV}$) (Villemur et al., 2006).

Tableau 2. Exemples de potentiels d'oxydoréduction (tiré de Villemur et al., 2006)

		E ₀ ' mV
Dihaloélimination		
1,2-dichloroéthane + 2H ⁺ + 2e ⁻	Éthène + 2H ⁺ + 2Cl ⁻	+739
Hydrogénolyse		
$PCE + 2H^{+} + 2e^{-}$	$TCE + H^+ + CI^-$	+574
$TCE + 2H^{+} + 2e^{-}$	$DCE + H^+ + CI^-$	+550
$PCP + 2H^{+} + 2e^{-}$	$TeCP + H^+ + Cl^-$	+455
$2,4,6-TCP + 2H^{+} + 2e^{-}$	$DCP + H^+ + Cl^-$	+438
$4-CP + 2H^+ + 2e^-$	Phénol + H ⁺ + Cl ⁻	+319
$1,2-DCA + 2H^{+} + 2e^{-}$	1-chloroéthane + H ⁺ + Cl ⁻	+375
Respiration aérobie		
$\frac{1}{2}O_2 + 2H^+ + 2e^-$	H_2O	+818
Dénitrification		
$NO_3^- + 2H^+ + 2e^-$	$NO_2^- + H_2O$	+433
Sulfato-réduction	_	
$SO_4^{-2} + 9H^+ + 8e^-$	$HS^- + 4H_2O$	-217

Abréviations : CP : monochlorophénol; DCA : dichloroéthane; DCE : dichloroéthène; PCE : tétrachloroéthène; PCP : pentachlorophénol; TCE :

trichloroéthène; TCP: trichlorophénol; TeCP: tétrachlorophénol.

Il a été démontré que la déshalogénation réductrice du 3-CB était couplée à la production d'ATP chez *D. tiedjei* DCB-1 (Mohn et Tiedje, 1992). Un ensemble de protéines induites par le 3-CB pouvant constituer une chaîne respiratoire a été identifié chez cette bactérie. Il s'agit d'une hydrogénase et d'une formiate déshydrogénase membranaires localisées du côté périplasmique, d'un cytochrome-c de 50 kDa et d'une 3-CB RDase associée à la membrane du côté cytoplasmique (Ni et al., 1995; Louie et al., 1997; Louie et Mohn, 1999). D'autres protéines non identifiées à ce jour pourraient être impliquées dans le transport d'électrons lors de la respiration du 3-CB. Entre autres, une ménaquinone serait essentielle puisque la déshalogénation du 3-CB est inhibée par le 2-heptyl-4-hydroxyquinoline *N-oxyde*, un inhibiteur de quinones, et aussi parce que l'activité de déshalogénation est dépendante du 1,4-naphtoquinone, un précurseur des quinones (Louie et Mohn, 1999).

Un modèle pour la respiration du 3-CB chez *D. tiedjei* DCB-1 a été élaboré selon lequel les électrons libérés de la réaction d'oxydation du formiate ou de l'hydrogène seraient transférés par le biais du cytochrome-*c* et d'une quinone jusqu'à la RDase et seraient utilisés par l'enzyme pour réduire le 3-CB. L'illustration de ce modèle dans la figure 3 montre que l'oxydation du formiate et de l'hydrogène relâche des protons dans le périplasme tandis que la réduction du 3-CB consomme des protons dans le cytoplasme. Le gradient électrochimique de protons ainsi formé fournirait l'énergie nécessaire pour la production d'ATP par l'ATP synthétase (Louie et Mohn, 1999). Un modèle similaire impliquant une hydrogénase membranaire localisée du côté périplasmique, un cytochrome, une ménaquinone et une PCE RDase localisée du côté cytoplasmique de la membrane a été proposé pour la respiration du PCE chez *Dehalobacter restrictus* (Schumacher et Holliger, 1996). Certaines RDases ont été détectées par buvardage de type Western du côté périplasmique de la membrane (Suyama *et al.*, 2002; John *et al.*, 2006). Un système pour la translocation de protons à travers la membrane serait alors nécessaire pour générer un gradient électrochimique.

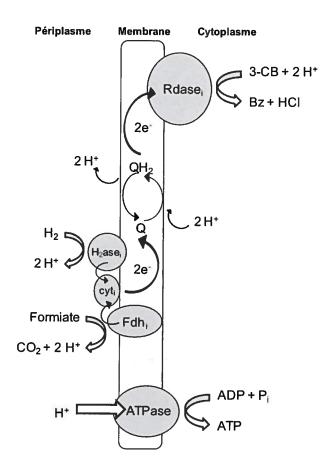


Figure 3. Modèle pour la déshalorespiration de *D. tiedjei* DCB-1 (d'après Louie et Mohn, 1999)

Abréviations : H_2 ase_i : hydrogénase induite; Fdh_i : formiate déshydrogénase induite; cyt_i : $cytochrome\ c$ induit; $RDase_i$: 3-CB RDase induite; ATPase : ATP synthétase; Q : quinone; Bz : benzoate; 3-CB : 3-chlorobenzoate.

2.3 Bactéries anaérobies effectuant la déshalogénation réductrice

Les différentes souches bactériennes anaérobies capables d'effectuer déshalogénation réductrice qui ont été isolées en culture pure proviennent, pour la plupart, de sols, de boues activées ou de déchets industriels contaminés par des polluants halogénés. Elles diffèrent grandement dans le spectre de substrats et dans la position des substituants halogènes qu'elles peuvent déshalogéner, et sont phylogénétiquement très diversifiées. Les bactéries du genre Desulfitobacterium et Dehalobacter sont Gram positives, ont un faible contenu en GC, et appartiennent au phylum des Firmicutes. Desulfomonile, Desulfuromonas, Desulfovibrio, Anaeromyxobacter et Trichlorobacter sont membres des δ-Protéobactéries. Sulfurospirillum fait partie des E-Protéobactéries et Dehalococcoides des Chloroflexi (figure 4). Desulfitobacterium et Dehalococcoides constituent les groupes bactériens les importants et les plus étudiés (Smidt et de Vos, 2004; Villemur et al., 2006).

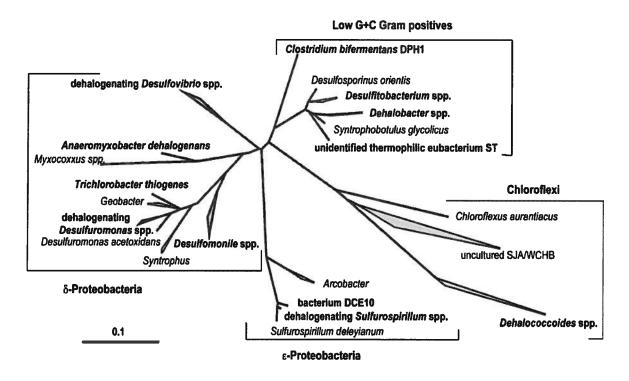


Figure 4. Arbre phylogénétique basé sur les séquences de l'ARNr 16S montrant la diversité des bactéries effectuant la déshalogénation réductrice (caractères gras) (tirée de Smidt et de Vos, 2004). La longueur de la barre de référence représente une diversité de 10 %.

2.3.1 D. tiedjei DCB-1

D. tiedjei DCB-1 est la première bactérie anaérobie stricte effectuant la déshalogénation réductrice isolée. Elle a été isolée d'un consortium méthanogène enrichi de boues d'épuration capable d'utiliser le 3-CB comme seule source de carbone et d'énergie. Cette bactérie est en forme de bâtonnet, de coloration Gram négative, anaérobie stricte, non motile et non sporulante (Shelton et Tiedje, 1984). D. tiedjei DCB-1 croît en présence de pyruvate, de formiate ou d'hydrogène comme donneurs d'électrons. Elle peut utiliser le sulfate, le sulfite, le thiosulfate ainsi que le 3-CB comme accepteurs d'électrons (Stevens et al., 1988). L'activité de déshalogénation est inhibée lorsqu'une culture est mise en présence de 3-CB et d'un deuxième accepteur d'électrons comme le sulfite, le sulfate ou le thiosulfate. Par contre, si le sulfite, le sulfate ou le thiosulfate est ajouté à des bactéries cultivées seulement en présence de 3-CB, l'activité de déshalogénation est inhibée par le sulfite et le thiosulfate, mais le sulfate n'a aucun effet (Deweerd et Suflita, 1990; Townsend et Suflita, 1997). D. tiedjei DCB-1 peut aussi effectuer la déshalogénation du PCE en cisdichloroéthène (cis-DCE), du PCP et de plusieurs autres chlorophénols en position meta. Avec le formiate comme donneur d'électrons, le PCP est déshalogéné en position meta à un taux de 54 µmol de Cl'/h/g de protéines (Fathepure et al., 1987; Mohn et Kennedy, 1992). La déshalogénation est induite par les benzoates halogénés substitués en position meta ou des analogues (Mohn et Tiedje, 1992). La déshalogénation du PCE en cis-DCE est probablement une réaction fortuite catalysée par la RDase du 3-CB (Cole et al., 1995; Townsend et Suflita, 1996).

2.3.2 S. multivorans

S. multivorans est une bactérie anaérobie stricte isolée de boues activées qui n'avaient pas été exposées au chloroéthène dans un milieu contenant du pyruvate, de l'hydrogène et du PCE. C'est une bactérie en forme de spirillum, non sporulante et de coloration Gram négative. Elle effectue la déshalogénation du PCE en cis-DCE. Elle peut utiliser l'hydrogène, le pyruvate, le lactate, l'éthanol, le formiate ou le glycérol comme donneurs d'électrons et le PCE, le TCE, le fumarate, le nitrate ou le polysulfure comme accepteurs d'électrons. Le temps de doublement est de 2,5 h avec le PCE comme donneur d'électrons dans les conditions de croissance optimale (30 °C, pH 7,5). Le taux maximal de déshalogénation du

PCE est de 50 nmoles/min*mg de protéines (Scholz-Maramatsu *et al.*, 1995). L'activité de déshalogénation d'une culture est inhibée en présence d'un accepteur d'électrons alternatif comme le fumarate ou le polysulfure. Le sulfate et le nitrate n'ont pas d'effet sur l'activité de déshalogénation (Neumann *et al.*, 1994).

2.3.3 D. restrictus PER-K23

D. restrictus PER-K23 a été isolée d'un enrichissement de culture contenant du lactate et du PCE qui provenait d'un réacteur à film fixe contenant des sédiments du Rhin et des boues granulaires anaérobies provenant d'une raffinerie de sucre (Holliger et al., 1993; Holliger et al., 1998). Il s'agit d'une bactérie anaérobie stricte, en forme de bâtonnet, non sporulante et de coloration Gram négative qui contient un flagelle latéral. Elle n'a pas de membrane externe, mais plutôt une paroi de type-S. Elle effectue la déshalogénation du PCE en cis-DCE. Le PCE et le TCE sont les uniques accepteurs d'électrons et l'hydrogène est l'unique donneur d'électrons. À la température de croissance optimale (25 à 35 °C) et au pH optimal (pH 6,8 à 7,6), le temps de doublement est de 19 h avec le PCE comme donneur d'électrons (Holliger et al., 1998).

2.3.4 Desulfuromonas chloroethenica

D. chloroethenica TT4B a été isolée de sédiments anaérobies provenant d'un cours d'eau au Massachusetts contaminé avec plusieurs solvants organiques, dont le TCE et le toluène. La bactérie est en forme de bâtonnet, non motile, non sporulante et de coloration Gram négative (Krumholz et al., 1996). Elle peut déshalogéner le PCE en cis-DCE. Elle croît avec l'acétate ou le pyruvate comme donneurs d'électrons et le PCE, le TCE, le fumarate, le polysulfure ou le nitriloacétate de Fer(III) comme accepteurs d'électrons. À la température de croissance optimale entre 21 et 31 °C et au pH optimal de 7,4, le temps de doublement est de 48 à 96 h avec le PCE comme accepteur d'électrons (Krumholz et al., 1996; Krumholz, 1997).

2.3.5 *Desulfovibrio* sp. TBP-1

Desulfovibrio sp. TBP-1 a été isolée de sédiments anaérobies pouvant effectuer la déshalogénation du 2,4,6-tribromophénol (2,4,6-TBP) qui provenaient de l'estuaire de

l'Arthur Kill aux États-Unis. C'est une bactérie anaérobie stricte, en forme de bacille incurvé et motile. Elle croît avec le lactate, le pyruvate, l'hydrogène ou le fumarate comme donneurs d'électrons. Le sulfate, le sulfite, le soufre, le thiosulfate ou le 2,4,6-TBP peuvent servir d'accepteurs d'électrons. Le 2,4-dibromophénol est déshalogéné jusqu'au phénol (Boyle et al., 1999).

2.3.6 Anaeromyxobacter dehalogenans 2CP-1

A. dehalogenans 2CP-1 a été isolée d'un enrichissement de cultures provenant de sédiments anaérobies d'un cours d'eau au Michigan en présence d'un mélange de monochlorophénols (CPs). C'est une bactérie anaérobie facultative qui a une pigmentation rouge. Elle est en forme de bâtonnet, motile et de coloration Gram négative (Cole et al., 1994). Elle utilise comme accepteurs d'électrons le 2-CP, le 2,6-DCP, le 2,5-DCP, le 2-bromophénol (2-BP), le nitrate, le fumarate et l'oxygène. L'acétate, l'hydrogène, le succinate, le pyruvate et le lactate peuvent servir de donneurs d'électrons (Sanford et al., 2002). L'activité de déshalogénation du 2-CP est induite par le 2-DCP, le 2,6-DCP, le 2,5-DCP, le 2,4-DCP et le 2-BP. Une culture sans chlorophénol effectue la déshalogénation du 2-CP à un taux de 0,138 μmol de Cl'/h*mg de protéines tandis qu'une culture avec du 2-CP effectue la déshalogénation du 2-CP à un taux de 116 μmol de Cl'/h*mg de protéines (He et Sanford, 2002).

2.3.7 Enterobacter sp. MS-1

La souche *Enterobacter* sp. MS-1 a été isolée d'un enrichissement de culture de matériel aquifère contaminé au PCE dans un milieu contenant du benzoate, du PCE et du sulfate. C'est une bactérie anaérobie facultative qui peut déshalogéner le PCE en *cis*-DCE en présence de glucose, de pyruvate, de formiate, de lactate, d'acétate ou d'extrait de levure. L'activité de déshalogénation est inhibée par l'oxygène et le nitrate (Sharma et McCarty, 1996).

2.3.8 Dehalococcoides spp.

Les bactéries du genre *Dehalococcoides* sont anaérobies strictes et de forme coccoidale irrégulière. Elles ont une paroi cellulaire qui ressemble au microscope

électronique à la couche-S des *Archaea*. Le séquençage des génomes de *D. ethenogenes* 195, *Dehalococcoides*. sp. CBDB1 et *Dehalococcoides* sp. BAV1 a démontré que ces bactéries sont très spécialisées. Leur génome est de petite taille et il contient un nombre important de RDases hypothétiques. Le génome de la souche *D. ethenogenes* 195 est composé de 1,47 x 10⁶ de paires de bases (pb) et contient 17 gènes de RDases putatives, celui de *Dehalococcoides*. sp. CBDB1 contient 1,4 x 10⁶ de pb et 32 gènes de RDases putatives, et celui de *Dehalococcoides* sp. BAV1 contient 1,3 x 10⁶ de pb et au moins 7 gènes de RDases putatives (Krajmalnik-Brown *et al.*, 2004; Kube *et al.*, 2005; Seshadri *et al.*, 2005).

D. ethenogenes 195 a été isolée d'un enrichissement de culture capable de déshalogéner le PCE en éthène. Elle utilise l'hydrogène, le méthanol ou le butyrate comme donneur d'électrons. La souche effectue la déshalogénation du PCE, du TCE, du cis-DCE, du 1,1-DCE, du 1,2-dichloroéthane (DCA) et du 1,2-dibromoéthane. La présence d'un chloroéthène ou d'un chlorophénol est essentielle pour sa croissance (Maymo-Gatell et al., 1997). Le PCE induit la déshalogénation du TCE, du cis-DCE, du trans-DCE, du 1,1-DCE et du 1,2-DCA. Le temps de génération avec le PCE et l'hydrogène est d'environ 19 h. La déshalogénation du trans-DCE et du chlorure de vinyle (VC) sont des réactions de cométabolisme (Maymo-Gatell et al., 1999). D. ethenogenes 195 effectue également la déshalogénation du 2,3-DCP, du 2,3,4-TCP et du 2,3,6-TCP (Adrian et al., 2007a).

Les souches *Dehalococcoides* sp. FL2 et *Dehalococcoides* sp. BAV1 peuvent transformer le PCE jusqu'à l'éthène. La souche FL2 a été isolée de sédiments d'une rivière non contaminée et la souche BAV1 d'un enrichissement de culture capable de déshalogéner le PCE provenant de matériel aquifère non contaminé au Michigan. (He *et al.*, 2003; He *et al.*, 2005). BAV1 est la seule souche connue pouvant utiliser le VC comme accepteur d'électrons. Elle peut également utiliser comme accepteurs d'électrons le *cis*-DCE, le *trans*-DCE, le 1,1-DCE, le bromure de vinyle et le 1,2-DCA. Le PCE et le TCE sont transformés par co-métabolisme. Le temps de doublement est de 2,2 jours à la température de la pièce (He *et al.*, 2003). La souche FL2 peut utiliser le TCE, le *cis*-DCE ou le *trans*-DCE comme accepteurs d'électrons et effectuer la déshalogénation du PCE et du VC par co-métabolisme. Le temps de doublement est de 2,4 jours avec le VC et l'hydrogène à la température de la pièce (He *et al.*, 2005).

Dehalococcoides sp. CBDB1 a été isolée d'un enrichissement anaérobie d'une culture mixte capable de déshalogéner le chlorobenzène provenant de sédiments de rivières (Adrian et al., 2000). Cette souche ne croît pas sans l'ajout d'un chlorobenzène. Elle effectue la déshalogénation du 1,2,3-trichlorobenzène (1,2,3-TCB), du 1,2,4-TCB, du 1,2,3,4-tétrachlorobenzène (1,2,3,4-TeCB), du 1,2,3,5-TeCB, du 1,2,4,5-TeCB, du pentachlorobenzène et de l'HCB (Adrian et al., 2000; Holscher et al., 2003). Elle peut également déshalogéner certains dibenzo-p-dioxines polychlorés (CDDs), soit le 1,2,3,7,8-pentaCDD, le 1,2,3,4-tétraCDD et le 2,3-diCDD ainsi que plusieurs chlorophénols, soit le PCP, les tétrachlorophénols (TeCPs), les TCPs, le 2,3-DCP, le 2,6-DCP et le 2,4-DCP (Bunge et al., 2003; Adrian et al., 2007a).

2.3.9 *Desulfitobacterium* spp.

Le genre Desulfitobacterium est constitué d'au moins 5 espèces : Desulfitobacterium metallireducens, Desulfitobacterium dichloroeliminans, D. dehalogenans, Desulfitobacterium chlororespirans et D. hafniense. Ce sont des bactéries anaérobies strictes, en forme de bâtonnet et Gram positives. Certaines souches ont une coloration Gram négative même si la membrane est de type Gram positif au microscope électronique. L'extrait de levure est un supplément nécessaire pour la croissance. Elles peuvent croître par fermentation du pyruvate ou utiliser différents composés organiques comme donneurs d'électrons pour la respiration. Elles peuvent utiliser un nombre important d'accepteurs d'électrons comme le sulfite, le thiosulfate, le soufre, le fumarate, le nitrate, l'acide humique, des métaux et des organochlorés. Le sulfate n'est pas utilisé. Elles ont la capacité de déshalogéner le PCE, le TCE, le 3Cl-4OHPA, certains chlorophénols et chlorobenzoates (Villemur et al., 2006). La liste des substrats halogénés utilisés par chacune des souches est détaillée dans le tableau 4.

2.3.9.1 D. dehalogenans JW/IU-DC1

D. dehalogenans souche JW/IU-DC1 a été isolée en 1994 à partir de sédiments méthanogènes provenant d'un étang en Géorgie aux États-Unis. La bactérie est non sporulante et de coloration Gram positive. Son temps de génération est de 3,5 h à la température optimale de croissance de 38 °C et au pH optimal de 7,5. Elle utilise le nitrate, le fumarate, le sulfite, le soufre et le 3Cl-4OHPA comme accepteurs d'électrons. Le pyruvate,

le lactate, le formiate et l'hydrogène sont utilisés comme donneurs d'électrons (Utkin et al., 1994). En présence à la fois de nitrate, de 3Cl-4OHPA, de fumarate et de sulfite en milieu liquide, le nitrate et le 3Cl-4OHPA sont réduits en premier lieu et le fumarate en second lieu. Le sulfite n'est pas utilisé dans ces conditions (Mackiewicz et Wiegel, 1998). Une étude a mis en évidence que des éléments communs sont utilisés pour le transport d'électrons dans la respiration du 3Cl-4OHPA et du nitrate. Dans cette étude, la majorité des mutants de D. dehalogenans incapables d'effectuer la déshalogénation du 3Cl-4OHPA générés par transposition aléatoire de Tn916 présentaient également un défaut de croissance avec le nitrate. Dans cette même étude, deux mutants de D. dehalogenans incapables d'effectuer la déshalogénation du 3Cl-4OHPA avaient une insertion du transposon Tn916 à proximité d'un gène codant pour une histidine kinase putative d'un système de régulation à deux composantes. Le site d'insertion du transposon dans l'un de ces mutants était à proximité d'un gène similaire à la coproporphyrinogene oxydase, une enzyme impliquée dans la biosynthèse des porphyrines. L'histidine kinase pourrait donc avoir un rôle dans la régulation de la biosynthèse du cofacteur corrinoïde de la 3Cl-4OHPA RDase (Smidt et al., 1999). Une culture de D. dehalogenans exposée au 3Cl-4OHPA peut déshalogéner le 2,6-dichloro-4-Rphénol et le 2-chloro-4-R-phénol (R = -H, -F, -NO₂, -CO₂ ou -COOH₃). Un substituant chloré en position 3 (meta), 4 (para) ou 6 (ortho) du groupement hydroxyle facilite le déshalogénation en position 2 (ortho), tandis qu'un chlore en position 5 (meta) diminue le taux de déshalogénation en position ortho (Utkin et al., 1995). La bactérie effectue également la déshalogénation en position ortho de certains bromophénols et biphényles hydroxylés polychlorés (Wiegel et al., 1999). Des analyses par buvardage de type Northern ont montré que la transcription du gène codant pour la 3Cl-4OHPA RDase était induite en présence de 3Cl-4OHPA (Smidt et al., 2000).

2.3.9.2 D. chlororespirans Co23

D. chlororespirans Co23 a été isolée à partir de compost pouvant déshalogéner le 2,3-DCP. Cette souche est sporulante et de coloration Gram négative. La température optimale pour la croissance est de 37 °C. Elle utilise le pyruvate, le formiate, le butyrate ou l'hydrogène comme donneurs d'électrons. Elle peut réduire le sulfite, le thiosulfate et le soufre et effectue la déshalogénation en position ortho du 2,3-DCP, du 2,6-DCP, du 2,4,6-

TCP, du 2,4,6-TBP, du 3Cl-4OHBA (3-chloro-4-hydroxybenzoate) et du 3Cl-4OHPA (Sanford et al., 1996).

2.3.9.3 D. dichloroeliminans DCA1

D. dichloroeliminans DCA1 a été isolée à partir d'un sol contaminé au 1,2-DCA. La croissance est optimale à une température entre 25 et 30 °C et une valeur de pH entre 7,2 et 7,8. Cette souche peut déshalogéner complètement de façon stéréosélective le 1,2-DCA et tous les dichloropropanes et dichlorobutanes contenant des atomes de chlore vicinaux. Le formiate, le lactate et l'hydrogène peuvent servir de donneurs d'électrons, et le sulfite, le thiosulfate et le nitrate d'accepteurs d'électrons. La ménaquinone est un facteur de croissance essentiel (De Wildeman et al., 2003).

2.3.9.4 D. metallireducens

D. metallireducens a été isolée de sédiments aquifères contaminés à l'uranium. Elle utilise comme donneurs d'électrons le formiate, l'éthanol, le butanol, butyrate, le malate, le pyruvate et le lactate. Elle utilise comme accepteurs d'électrons le thiosulfate, le soufre, divers métaux, l'acide humique, le 3Cl-4OHPA, le PCE et le TCE. La température optimale pour sa croissance est de 30 °C (Finneran et al., 2002).

2.3.9.5 Desulfitobacterium sp. PCE1

Desulfitobacterium sp. PCE1 a été isolée d'enrichissements capables de déshalogéner le PCE jusqu'à l'éthène, obtenus d'un sol contaminé par le PCE. Cette souche est non sporulante, de coloration Gram négative, et a quatre flagelles latéraux. La croissance est optimale à une température entre 34 et 38 °C et à un pH entre 7,2 et 7,8. Elle peut déshalogéner le PCE en DCE ainsi que le 3Cl-4OHPA, le 2-CP et le 2,4,6-TCP en position ortho. Elle croît avec du lactate, du pyruvate, du butyrate, du formiate, du succinate ou de l'éthanol comme donneurs d'électrons. Le TCE, le 2-CP, le 2,4,6-TCP, le 3Cl-4OHPA, le sulfite, le thiosulfate ou le fumarate peuvent servir d'accepteurs d'électrons (Gerritse et al., 1996).

2.3.9.6 *Desulfitobacterium* sp. KBC1

Desulfitobacterium sp. KBC1 a été isolée d'un enrichissement de culture d'un échantillon de sol. La souche est motile et non sporulante. La température et le pH optimaux pour sa croissance sont de 34 °C et de 7,5 respectivement. Celle-ci effectue la déshalogénation du PCE, du 2,4,6-TCP et du 2,4-DCP. Elle utilise le formiate, le lactate et le pyruvate comme donneurs d'électrons. Le sulfite, le thiosulfate et le fumarate sont des accepteurs d'électrons (Tsukagoshi et al., 2006).

2.3.9.7 Desulfitobacterium sp. PCE-S

Desulfitobacterium sp. PCE-S a été isolée à partir d'un sol contaminé par le PCE. Cette souche peut déshalogéner le PCE en cis-DCE (Miller et al., 1997; Miller et al., 1998).

2.3.9.8 D. hafniense

D. hafniense DCB-2 a été isolée en 1992 d'un consortium effectuant la déshalogénation du 2,4,6-TCP provenant de boues municipales. D. hafniense DCB-2 est une bactérie motile, sporulante et de coloration Gram négative. La température optimale pour la croissance est de 37 °C (Christiansen et Ahring, 1996). Elle utilise comme donneurs d'électrons le formiate, le lactate, le pyruvate, le fumarate, le butyrate, le succinate, le malate et l'éthanol (Niggemyer et al., 2001). La souche DCB-2 effectue la déshalogénation du 3Cl-4OHPA et de plusieurs chlorophénols. Le PCP, le 2,4,5-TCP, le 2,4,6-TCP et le 2,4-DCP sont déshalogénés en position ortho. Le 3,5-DCP est déshalogéné en position meta. Il n'y a aucune activité de déshalogénation en position para. Le taux maximal de déshalogénation du 2,4,6-TCP est de 1,8 mmol de Cl⁻/h*g de protéines et le taux maximal de déshalogénation du PCP est de 29 μmol de Cl⁻/h*g de protéines (Madsen et Licht, 1992). Son génome est composé de 5,2 millions de pb pouvant coder pour 5049 protéines, dont 6 RDases de type CprA/PceA (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) (section 2.5.2).

D. hafniense Y51 a été isolée de sols contaminés au PCE au Japon. Elle est motile et non sporulante. La température optimale pour la croissance est de 37 °C et le pH optimal se situe entre 6,5 et 7,5. Elle effectue la déshalogénation du PCE en cis-DCE, du tétra-, du penta- et de l'hexachloroéthane (Suyama et al., 2001). Le génome de cette souche contient 5,7 millions de pb pouvant coder pour 5 060 protéines. L'analyse de son génome a révélé la

présence de seulement 2 gènes de RDases : pceA et crdA (Nonaka et al., 2006). Le premier code pour une enzyme déjà purifiée effectuant la déshalogénation du PCE (Suyama et al., 2002). Le deuxième est similaire au gène crdA qui code pour une RDase purifiée de D. hafniense PCP-1 ayant une activité envers le 2,4,6-TCP (Boyer et al., 2003). Le génome contient plusieurs gènes pouvant être impliqués dans la production d'une enzyme RDase ainsi qu'un nombre important de gènes pour l'utilisation de divers accepteurs d'électrons, démontrant la grande diversité métabolique de cette souche (Nonaka et al., 2006).

D. hafniense TCE1 a été isolée d'un bioréacteur anoxique capable de déshalogéner le PCE. Elle effectue la déshalogénation du PCE en cis-DCE. Elle est non sporulante, de coloration Gram positive, et contient 6 flagelles latéraux. Sa croissance est optimale à une température de 35 °C et à un pH de 7,2. Cette souche peut croître avec l'hydrogène, le formiate, le lactate, le butyrate ou l'éthanol comme donneurs d'électrons et avec le PCE, le TCE, le sulfite, le thiosulfate, le nitrate ou le fumarate comme accepteurs d'électrons. La déshalogénation est induite par un chloroéthène et inhibée par le sulfite (Gerritse et al., 1999).

D. hafniense TCP-A a été isolée d'une culture mixte capable de déshalogéner le 2,4,6-TCP en position ortho provenant de sédiments d'une rivière en Allemagne. Elle est motile et sporulante. La souche utilise l'hydrogène, le formiate, le lactate, le butyrate, le glutamate ou le pyruvate comme donneurs d'électrons. Le sulfite, le thiosulfate, le nitrate et le fumarate sont des accepteurs d'électrons. Elle effectue la déshalogénation du PCE et de divers chlorophénols. Le PCP, le 2,3,4,5-TeCP, le 2,3,5-TCP, le 2,4,6-TCP, le 2,3-DCP, le 2,4-DCP et le 2-CP sont déshalogénés en position ortho; le 2,3,5,6-TCP en positions ortho et meta; et le 3,5-DCP en position meta (Breitenstein et al., 2001).

D. hafniense G2 est une souche motile et sporulante qui effectue la déshalogénation du PCE en DCE. Elle utilise l'hydrogène, le formiate et le pyruvate comme donneurs d'électrons. Le sulfite, le thiosulfate, le nitrate et le fumarate sont des accepteurs d'électrons (Shelobolina et al., 2003).

D. hafniense JH1 a été isolée d'une culture de C. bifermentans DPH-1 (Fletcher et al., 2008). C. bifermentans DPH-1 avait été décrite comme étant capable de déshalogéner le PCE en cis-1,2-DCE (Chang et al., 2000). Cependant, le gène pceA, codant pour la PCE RDase qu'on croyait avoir purifiée de C. bifermentans DPH-1, a ultérieurement été détecté chez

D. hafniense JH1 (Okeke et al., 2001; Fletcher et al., 2008). D. hafniense JH1 est une bactérie non sporulante qui peut déshalogéner le PCE en cis-DCE et le 1,1,2,2-tétrachloroéthane. Elle utilise le formiate, l'éthanol ou l'hydrogène comme donneurs d'électrons et elle peut réduire le nitrate, le sulfite et le fer (Fletcher et al., 2008).

2.3.10 D. hafniense PCP-1

D. hafniense PCP-1 provient d'un consortium méthanogène capable de dégrader le PCP qui a été enrichi à partir de boues activées et de sols contaminés au PCP (Juteau et al., 1995a; Juteau et al., 1995b). Sur 48 enrichissements de sols échantillonnés au Québec et à l'extérieur de la province, dont 24 provenaient de sites industriels contaminés, la souche PCP-1 a été détectée par PCR dans 26 échantillons et Desulfitobacterium spp. dans 31 échantillons. Aucune corrélation n'a été observée entre la présence de ces bactéries et la présence de contaminants (Lanthier et al., 2001).

Lors d'essais en bioréacteur où le PCP était ajouté graduellement et en présence d'une source complémentaire de carbone, le PCP était complètement dégradé par le consortium méthanogène à une concentration de 20 mg/l. À une concentration de 50 mg/l, du PCP, du 3-CP et du 3,5-DCP ont été détectés à des concentrations inférieures à 2 mg/l (Juteau *et al.*, 1995b). L'ajout du consortium à un microcosme contenant 10, 20 ou 40 % de sol contaminé par 100 mg de PCP par kg de sol pouvait déshalogéner plus de 100 mg de PCP par kg de sol en 3-CP en moins de 7 jours pour les microcosmes contenant 10 % de sol et en moins de 30 jours pour les autres (Beaudet *et al.*, 1998).

La souche PCP-1 est un bâtonnet de 2,2 à 4,5 µm de longueur par 0,7 µm de largeur, sporulant, non-mobile et de coloration Gram négative (Bouchard *et al.*, 1996). Elle nécessite pour sa croissance du pyruvate et de l'extrait de levure. Le formiate, le lactate, le pyruvate, le fumarate, le butyrate, le succinate, le malate et l'éthanol sont utilisés comme donneurs d'électron. La souche PCP-1 utilise une variété d'accepteurs d'électrons tels que le sulfite, le thiosulfate, le nitrate, des métaux tels l'As(V), le Fe(III), le Se(VI), le Mn(IV) (Niggemyer *et al.*, 2001). Les conditions de croissance optimales sont un pH de 7,5 et une température de 38 °C. Le temps de génération est de 3 h à pH 7,5 et à 29 °C dans un milieu de culture contenant du pyruvate 20 mM, 0,02 % d'extrait de levure et du PCP (5 mg/l) (Bouchard *et al.*, 1996).

D. hafniense PCP-1 a été décrite comme une nouvelle espèce, frappieri, possédant 95 % d'homologie avec D. dehalogenans JWIU-DC1D sur la base de l'analyse des gènes codant pour l'ARNr 16S (Bouchard et al., 1996). Niggemyer el al. (2001) a démontré que D. hafniense et D. frappieri sont en fait une seule et même espèce en se basant sur des tests d'hybridation ADN-ADN puisque le pourcentage de réassociation ADN-ADN entre la souche PCP-1 et DCB-2 est de 89 % (tableau 3). La séquence d'ARNr 16S de PCP-1 contient une insertion de 128 nucléotides dans la région 5' (Bouchard et al., 1996; Villemur et al., 2007). Lorsque cette insertion est exclue de l'analyse comparative des séquences d'ARNr 16S, les souches PCP-1 et DCB-2 sont identiques à plus de 99 %. On retrouve une insertion d'une longueur variant entre 100 et 200 nucléotides dans le gène codant pour l'ARNr 16S de sept autres souches de l'espèce D. hafniense: DP7, TCE1, Y51, GBFH, TCP-A, G2, PCE-S. Ces souches ont un pourcentage de réassociation ADN-ADN supérieur à 80 % (Villemur et al., 2006; Villemur et al., 2007) (tableau 3).

Tableau 3. Pourcentage de réassociation ADN-ADN des génomes de quelques souches de Desulfitobacterium (tiré de Villemur et al., 2006)

	PCP-1	DCB-2	TCE1	DP7	GBFH	D. dehalogenans
D. hafniense PCP-1	-	-	~			
D. hafniense DCB-2	89	-				
D. hafniense TCE1	ND	ND	-			
D. hafniense DP7	ND	ND	83	-		
D. hafniense GBFH	81	80	ND	ND	-	
D. dehalogenans	46	44	45	35	41	_
D. chlororespirans	68	64	ND	71	70	37

Abréviation : ND : non déterminé.

D. hafniense PCP-1 effectue la déshalogénation aux positions ortho, meta et para d'un large spectre de molécules aromatiques substituées avec un groupement hydroxyle, nitro, méthoxy ou aminé et également du PCE en TCE. La souche pure peut déshalogéner le PCP en 3-CP dans l'ordre suivant : PCP \rightarrow 2,3,4,5-TeCP \rightarrow 3,4,5-TCP \rightarrow 3,5-DCP \rightarrow 3-CP, donc en position ortho, ortho, para et meta. À notre connaissance, il s'agit du seul

microorganisme connu capable d'effectuer la déshalogénation dans les trois positions et de déshalogéner le PCP jusqu'au 3-CP. Le PCP, le 2,3,4,5-TeCP, le 2,3,5,6-TeCP, le 2,3,4-TCP, 2,3,5-TCP, le 2,3,6-TCP, le 2,4,5-TCP, le 2,4,6-TCP, le 2,6-DCP et le 2,4-DCP sont déshalogénés en position *ortho*; le 2,3,4-TCP, 2,3,5-TCP et le 3,5-DCP en position *meta*; le 3,4,5-TCP et le 2,4-DCP en position *para*. Le 2,3-DCP, le 2,5-DCP, le 3,4-DCP et les monochlorophénols ne sont pas déshalogénés (Dennie *et al.*, 1998).

Deux RDases ont déjà été purifiées et caractérisées. Une première, CrdA, induite par le 2,4,6-TCP peut déshalogéner principalement en position *ortho* (Boyer *et al.*, 2003). Une autre, CprA5, induite par le 3,5-DCP peut déshalogéner le 3,5-DCP de même que certains autres chlorophénols principalement en positions *meta* et *para* (Thibodeau *et al.*, 2004). Une culture de PCP-1 en présence de 3,5-DCP incubée à 22 °C avait une activité de déshalogénation du 3,5-DCP 10 fois plus élevée qu'un culture incubée à 37 °C, soit de 4030 nmoles de 3-CP/h*mg de protéines à 22 °C, comparativement à 420 nmoles de 3-CP/h*mg de protéines à 37 °C (Thibodeau *et al.*, 2004).

Tableau 4. Spectre de déshalogénation des bactéries du genre Desulfitobacterium (d'après Villemur et al., 2006)

iense PCP-1 Substrats iense DCB-2 Substrats Non désh. iense Y51 Substrats Non désh. iense TCE1 Substrats Non désh. iense TCPA Substrats Non désh. iense G2 Substrats Non désh. logenans Substrats DC1 Non désh. Non désh. orespirans Substrats Non désh.	Souche	Composé	r halonánás
		Sendinos	
2 1 1 2 1 1 1 1 1 1	D. hafniense PCP-1	Substrats	PCP, TeCPs, TCPs, DCPs en positions ortho meta et para, TBPs, catéchol, gaïacol, veratrole,
2 su us			anisole, aniline, nitrobenzène et pyridine polychlorés, TCMP, TCHQ, 3,5-DCl-4OHBP, PCE
			en TCE
7.		Non désh.	3CI-40HPA, 2,3-DCP, 2,5-DCP, 3,4-DCP, CPs, 3,5-DCI-20HBP, 2',5'-DCI-20HBP, 2,2',5'-
Non désh. Substrats Non désh. Non désh. Non désh. Non désh. Non désh.			TCI-40HBP, 2,4,6-TCBA, 2,3,5-TCBA
Non désh. Substrats Non désh. Non désh. Non désh.	D. hafniense DCB-2	Substrats	PCP, TeCP, TCP, DCPs en positions ortho et meta, PCE en TCE, 3Cl-40HPA, TCMP,
Non désh. Substrats Non désh. Non désh. Non désh. Non désh. Non désh.			ТСНО
Substrats Non désh. Non désh. Non désh.		Non désh.	chlorophénols en position para, CPs
Non désh. Substrats Non désh. Non désh. Non désh. Non désh.	D. hafniense Y51	Substrats	PCE en DCE, hexa, penta, tétra chloroéthanes en DCE
Substrats Non désh. Non désh. Non désh. Non désh.		Non désh.	tri-chloroéthanes, ortho-, para-, meta-CBAs
PA Substrats Non désh. Substrats Non désh. Substrats Non désh. ns Substrats Non désh. nans Substrats Non désh. Non désh.	D. hafniense TCE1	Substrats	PCE en DCE
PA Substrats Non désh. Substrats Non désh. Substrats Non désh. Non désh. Non désh. Non désh. Non désh.		Non désh.	
Non désh. Substrats Non désh. Non désh. Non désh. Non désh. nans Substrats Non désh. Non désh.	D. hafniense TCPA	Substrats	PCP, TeCP, TCP, DCP en positions ortho, meta, 2-CP en phénol, PCE en TCE
Substrats Non désh. Substrats Non désh. Non désh. Non désh. Non désh.		Non désh.	3-CP, 4-CP
Non désh. Substrats Non désh. Substrats Non désh. ans Substrats Non désh.	D. hafniense G2	Substrats	PCE en DCE
Substrats Non désh. Substrats Non désh. ans Substrats Non désh.		Non désh.	
Non désh. Substrats Non désh. Substrats Non désh.	D. dehalogenans	Substrats	PCP, TeCPs, TCPs, DCPs, BPs en positions ortho, 3Cl-40HPA, OHBPC, PCE en DCE,
Non désh. Substrats Non désh. Substrats Non désh.	JW/IU-DCI		I CMP, I CHQ, 2,6-dichloro(ou bromo)-4-R-phenol (R: -H, -Cl, -F, -NO ₂ , -COOH, -
Non désh. Substrats Non désh. Substrats Non désh.			COOCH ₃), 2-dichloro(ou bromo)-4-R-phénol (R:-Cl,-F,-Br,-NO ₂ ,-CO ₂ H,-COOCH ₃ ,-
Non désh. Substrats Non désh. Substrats Non désh.			CH_2COOH)
Substrats Non désh. Substrats Non désh.		Non désh.	fluorophénols et CPs
	D. chlororespirans	Substrats	TCP, DCP en position ortho, 3Cl-4OHPA, 3Cl-4OHBA, TCMP, TCHQ, bromoxynil, ioxynil,
	C023		3,3-dibromo-4-OhBA
		Non désh.	PCP, CPs, fluorophénols
	D. dichloroeliminans	Substrats	1,2-dichloroéthane en éthène, 1,1,2-trichloroéthane en VC, 1,2-dichloropropane en propène,
Non désh. VC, hydrocarbones insaturés chlorés, hexa-, penta-, tétrachloroéthanes, chlo monochloroalcanes, dichloroalcanes avec chlores non vicinaux	DCA1		1,2-dichlorobutane en butène, L-, D-, meso-2,3-dichloro butane en E-, Z-2-butène
monochloroalcanes, dichloroalcanes avec chlores non vicinaux		Non désh.	VC, hydrocarbones insaturés chlorés, hexa-, penta-, tétrachloroéthanes, chlorométhanes,
		i	monochloroalcanes, dichloroalcanes avec chlores non vicinaux

Tableau 4. Suite

Souche	Composés	Composés halogénés
D. metallireducens	Substrats Non désh.	Substrats 3CI-4OHPA, TCE, PCE Non désh.
Desulfitobacterium sp. PCE1	Substrats PCE TCH(PCE en TCE, TCE en DCE; TCP en DCP en position ortho, 2-CP, 3Cl-4OHPA, TCMP et TCHQ en 2,3,5-TCP
•	Non désh.	Non désh. PCP, HCB, 2,5- et 3,4-DCBA, 2,3,6-TCBA, DCE, 4CIPA, di et triCMA, HCA, TCAc
Desulfitobacterium	Substrats	Substrats PCE en TCE, 2,4,6-TCP, 2,4-DCP
sp. KBC1	Non désh.	CPs
Desulfitobacterium	Subrats	PCE en DCE
sp. PCE-S	Non désh.	Non désh. composés aromatiques, autres composés aliphatiques chlorés

dichloroéthène; VC: chlorure de vinyle; TCMP: 2,3,5,6, tétrachloro-4-méthoxyphénol; TCHQ: tétrachlorohydroquinone; OHPA: hydroxyphénylacétate; CIPA: chlorophénylacétate; OHBA: hydroxybenzoate; OHBPC: hydroxy biphényl polychlore; OHBP: hydroxybiphényl; Abréviations : non déshal.: composé testé qui n'est pas déshalogéné; PCP: pentachlorophénol; TeCP: tétrachlorophénol; TCP: trichlorophénol; DCP: dichlorophénol; CP: monochlorophénol; TBP: tribromophénol; BP: bromophénol; PCE: tétrachloroéthène; TCE: trichloroéthène; DCE: bromoxynil: 3,5-dibromo-4-hydroxybenzonitrile; ioxynil: 3,5-diiodo-4-hydroxybenzonitrile; HCB: hexachlorobenzène; TCBA: trichlorobenzoate; DCBA: dichlorobenzoate; CBA: monochlorobenzoate; HCA: hexachloroéthane; TCAc: trichloroacétate.

2.4 Les déshalogénases réductrices

2.4.1 Description générale des déshalogénases réductrices

La plupart des RDases font partie d'une famille d'enzyme appelée CprA/PceA. Ce sont des enzymes membranaires, sensibles à l'oxygène et qui contiennent un cofacteur corrinoïde de type cobalamine ainsi que deux centres fer-soufre (Smidt et de Vos, 2004). Les déshalogénases CprA regroupent des enzymes qui agissent principalement sur des composés aromatiques tandis que les déshalogénases PceA agissent principalement sur le PCE et le TCE. Même si les différentes espèces de bactéries effectuant la déshalogénation réductrice sont phylogénétiquement éloignées, les gènes *cprA/pceA* sont fortement conservés (figure 5). Toutes les RDases de la famille CprA/PceA ont deux motifs riches en cystéine pour la liaison de centres fer-soufre, ainsi qu'un peptide signal TAT (Smidt et de Vos, 2004) (figure 6). Le système de sécrétion TAT est impliqué dans l'exportation de protéines repliées, souvent associées à des cofacteurs redox (Berks, 1996). À l'exception de la PCE RDase de *S. multivorans* qui a été purifiée de la fraction cytoplasmique, les RDases ont toutes été purifiées de la fraction membranaire (Neumann *et al.*, 1996). Elles n'ont pas de domaine transmembranaire mais seraient retenues à la membrane par une petite protéine hydrophobique, CprB/PceB (Smidt et de Vos, 2004).

Les cofacteurs qu'on retrouve chez les enzymes de types CprA/PceA sont impliqués dans la réaction enzymatique (voir section 2.4.2). Les cofacteurs cobalamines sont caractérisés par un noyau tétrapyrrole lié par coordinance à un atome de cobalt (figure 7). Le représentant le plus connu de cette classe de molécules est la vitamine B12 (ou cyanocobalamine). Le cobalt des facteurs cobalamines peut varier entre trois degrés d'oxydation : Co(I), Co(II) et Co(III). À l'état d'oxydation Co(III), le cobalt peut être lié à un atome de carbone. Le Co(III) et le Co(II) sont coordonnés avec un noyau azoté benzamidazole, une liaison qui est rompue lorsque le cobalt est réduit à l'état Co(I). Les propriétés du cobalt des corrinoïdes rendent possibles des réactions radicalaires, de transpositions et de transfert de méthyle (Pelmont, 2005). Les centres fer-soufre sont des cofacteurs très répandus, impliqués dans le transport d'électrons, dans des réactions d'oxydoréduction et ils peuvent jouer le rôle de senseur d'oxygène. Les plus communs sont formés de fer et de soufre à part égal, comme le [4Fe-4S] et le [2Fe-2S] (figure 8). Les

centres fer-soufre sont attachés à la protéine par des liaisons entre le fer et un résidu cystéine, parfois histidine, et ils sont facilement détachables par un traitement acide. En conditions réductrices avec suffisamment de fer et de soufre, les centres fer-soufre peuvent se former spontanément (Pelmont, 2005).

Certaines RDases purifiées n'ont pas d'homologie de séquences avec les gènes cprA/pceA. C'est le cas de la 3-CB RDase de D. tiedjei DCB-1 qui se distingue des enzymes de type CprA/PceA à plusieurs égards (Ni et al., 1995). La 3-CB RDase est une hétéromère avec un cofacteur hème qui n'est pas sensible à l'oxygène. Toutes les autres RDases purifiées à ce jour sont constituées d'une seule unité, contiennent un cofacteur corrinoïde et sont sensibles à l'oxygène. La PCE déshalogénase purifiée d'une culture de C. bifermentans DPH-1 et la 2,4,6-TCP déshalogénase de D. hafniense PCP-1 contiennent un facteur corrinoïde mais n'ont pas de centre fer-soufre. Ces enzymes forment un deuxième groupe de RDases qui n'ont pas d'homologie de séquence avec les gènes cprA/pceA (Okeke et al., 2001; Boyer et al., 2003). Le mode d'action de ces enzymes atypiques n'est pas connu.

Une description des aryles et des PCE/TCE RDases purifiées est donnée dans les sections 2.4.3 et 2.4.4, respectivement.

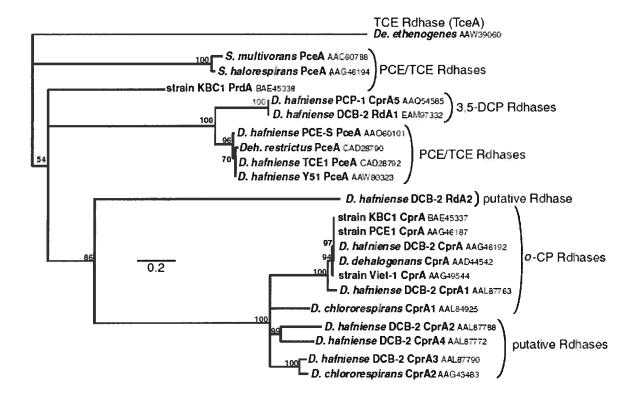


Figure 5. Arbre phylogénétique basé sur les séquences en acides aminés des déshalogénases réductrices purifiées et hypothétiques de type CprA/PceA (tirée de Villemur *et al.*, 2006). La longueur de la barre de référence correspond à un nombre moyen de 0,2 changement par position.

Abréviations : D. : Desulfitobacterium; De. : Dehalococcoides; Deh. : Dehalobacter; S. : Sulfurospirillum;

```
CPrA deh ------MENNEQRQQTGMNRRSFLK---VGAA.....TUDLPLAPDKFIDFGLLDFCRVCKKCADNCPN
CprA1 haf ------MENNQKRQQSGMSRRSPLK---VGAA.....TUDLFLAPDQFLDFGLLDFGRVCKKCADNCPN
CprA1 chl --MTRSGKMEKLKKNEESKALSINPRNELK---IGAA......TUDLPLEPDKFIDFGLQDFCRICGKCAENCPG
CprA3 haf --MFRSSD---RQNKPQEQKFQMNRRKFLK---AGVA.....TUDLFLLPDKFIDFGLQDFCRVCKKCADNCRS
CprA2 chl --MFRSSD---RQGQRLEQKMQMSRRKFLK---AGMA......TIDLPLLPDKFIDFGLQDFCRVCKKCADNCPS
CprA2 haf --MSGVLDKNRDEQNEAHRQPRISRRGFLK---TGAV.....TUDLPLVPDKFIDFCMLDFCRVCMKCAENCPA
CprA4 haf --MKGLIRLADSSKNQ--QKLQLSRRGPLK---TGAA.....TTDLPLVPDKFIDFGMADFCRVCNKCADNCPA
PceA mul -------MEKKKKPELSRRDFGKLIIGGGA.....FINMPLVPDKFIDFGVTEFGETCKKCARECPS
PceA Y51 ------MGEINRRNFLKVSILGAA.....YTDLELAPDKFRKFGVREFCRLCKKCADACPA
Prda KBC1 ---MDREKENTLDQKEEKRSVGISRRNFFKASGIAAG.....LIDLPIAPDKFISFGAAEFCRTCMKCAEACPS
CprA5 PCP ------MNLDRRSPLKASLVSVA.....YIDLELVPDKFINICAREFCRLCLKCADVCPA
RdA2 haf MFEGRSGEFKELLKLKIKGEEDMDRREFFKLVGVAAA.....VINMPLEPDKPIDVGIPKFCMNCKICADQCPS
ToeA Cocc ------MSEKYHSTVTRPDFMKRLGLAGA.....LIDLPLAFTKPIDAGIREFCKTCGICAEHOPT
                                RRXFXK
CprA deh DAITFDEDPIEYNGY------LRWNSDFKKCTEFRTTNEEGSSGTCLKVCFWNS-KEDSWFLK......
CprAl haf EATSFDEDPIEYNGY------LPWNSDFRK TEFRTTNEEGSSCGTCMKVCFWNS-KEDSWFHK......
CprA1 chl EAITTDRDHVEFNGY------LRWNSDMKK AVFRITNEEGSSCGRCMKVCFWNS-KEDSWFHE......
CprA3 haf EATTHDTDMVEYNGY------LPWNSDMKK AEFRLTNSE SS GR MKV WNS-KEESWFHS......
CprA2 chl EAITQDRDLVEYNGY------LR NSDMKK TEFRLTNSE SS GR MKV WNS-KEES FIS......
CprA2 haf EATTQDKDPVAFNGY------LRWNTDAKKCAEFRTGNEEGVNGGRCVKVCFWNS-KEASWFHD......
CprA4 haf EAITHDKDMVEYNGY------LRWNSDYKKCAEFRAGNDE VSCGROIKVCFWSS-KEDSWFHE......
PceA mul KAITE--GPRTFEGR--SIHNQSGKLCWQNDYNK LGYWPES--GGYGGVCVAVCPFT--KGNIWIHD......
PCEA Y51 QATSHEKDPKVLQPEDCEVAENPYTEKWHLDSNP.GSFWAYN--GSPCSNCVAVGSWN--KVETWNHD......
Prda kBC1 ESISKDKDP---SDKVACASNNPGMKKWYVNTWT LNQWVEN--GGGNIGLSACFYN--KPKT ILD......
CprA5 haf QAISHVKDPWVLQFEDCTPSENPYTEKWQFDSQR LSFFAYN--GGDCGSCIAVCSWN--KIDAWQHD......
RdhA haf GSISFD-GPKEINGR-----GYDGWQINAST HNFWMSVP-NGGGRVGLAVCFFS--KESNWLHT......
TCEA COCC QAISHEGPRYDSPHWDCVSG---YEGWHLDYHK------GINGTIGEAVCFFFTMSNNSWVFN......
                                         C
                                                  G C C CP
```

Figure 6. Alignement de séquences en acides aminés de la région N-terminale et des deux motifs pour la liaison de centres fer-soufre des déshalogénases réductrices de type CprA/PceA (tirée de Villemur *et al.*, 2006). Les résidus conservés, incluant le motif TAT (RRXFXK), les résidus cystéines du motif de liaison des centres fer-soufre, sont surlignés en gris.

Abréviations: deh: D. dehalogenans; haf: séquences de D. hafniense DCB-2; PCP, KBC1 et Y51: D. hafniense souches PCP-1, KBC1 et Y51; ch1: D. chlororespirans; mul: S. multivorans; Cocc: D. ethenogenes.

Figure 7. Schéma de la structure chimique des cobalamines (tirée de Banerjee et Ragsdale, 2003). R est un groupement CN dans la vitamine B12 (ou cyanocobalamine), un résidu déoxyadénosyl dans le adénosylcobalamine (ou cobamamide), un groupement méthyl dans le méthylcobalamine, ou un groupement OH dans le hydroxocobalamine.

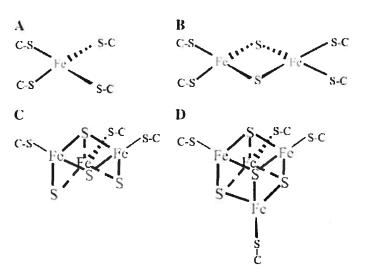


Figure 8. Schéma de la structure de centres fer-soufre communs (tirée de Imlay, 2006). Le C-S représente le résidu cystéine du peptide lié à l'atome de fer. (A) Centre de type rubrédoxine; (B) [2Fe-2S]; (C) [3Fe-4S]; (D) [4Fe-4S].

2.4.2 Modèles de mécanismes enzymatiques pour les déshalogénases réductrices de type CprA/PceA

La PCE RDase de *S. multivorans* contient 1,0 mole de cobalt, 9,8 moles de fer et 8 moles de soufre par mol de protéine. Le spectre d'absorbance UV-visible de l'enzyme a démontré des sommets d'absorption typiques des centres fer-soufre (400 nm) et du cob(II)alamine (310 nm). L'activité enzymatique est inhibée par le cyanure, qui peut former un complexe cyano-cobalamine en se liant au Co(III), et le spectre du cofacteur extrait par la chaleur en présence de cyanure a un spectre d'absorption typique d'un complexe dicyanocob(III)alamine. La présence du cobalamine dans le site actif de l'enzyme a aussi été démontrée par l'inhibition réversible à lumière de l'activité enzymatique par l'iodopropane capable de se lier au Co(I) (Neumann *et al.*, 1995; Neumann *et al.*, 1996) (figure 9). Mis ensemble, ces résultats suggèrent que le cobalt joue un rôle essentiel dans l'activité enzymatique et qu'il peut osciller entre les degrés d'oxydation Co(I) à Co(III).

Figure 9. Représentation schématisée de l'inhibition réversible à la lumière par l'iodopropane (d'après Brot et Weissbach, 1965)

L'iodopropane est un inhibiteur qui se lie de façon covalente au cobalamine réduit, le Co(I), pour former un complexe enzyme-Co-C-C. Lorsque la préparation enzymatique est exposée à la lumière, ce lien se rompt, et l'activité est restaurée Abbréviations : Co-enzyme : atome de cobalt du cofacteur corrinoïde; C-C-C-I : iodopropane.

Neumann et al. (1996) ont élaboré un modèle enzymatique théorique pour la déshalogénation réductrice du PCE (figure 10.1). Dans ce modèle, le substrat chloré est réduit par deux électrons transférés du cob(I)alamine, ce qui entraîne la formation d'un complexe alkyl-cob(III)alamine et l'élimination d'un ion de chlorure. La liaison est ensuite clivée par l'addition d'un proton. Le cob(III)alamine ainsi généré est réduit à son état initial,

d'abord en cob(II)alamine par le transfert d'un électron d'un centre fer-soufre, puis en cob(I)alamine par le transfert d'un second électron du deuxième centre fer-soufre. Les électrons servant à la réduction du substrat sont puisés de la chaîne de transport d'électrons, et proviennent de l'oxydation d'un donneur d'électrons tel que l'hydrogène ou le formiate (Neumann *et al.*, 1996).

Schumacher et al. (1997) ont purifié partiellement la PCE RDase de D. restrictus. Ils ont observé par spectrométrie par résonance paramagnétique électronique (RPE) que le cob(I)alamine réduit par le citrate de titane est transformé en cob(II)alamine suivant l'ajout de PCE (Schumacher et al., 1997). Hors, selon le modèle enzymatique de Neumann et al. (1996), il devrait avoir apparition de cob(III)alamine et non de cob(II)alamine. Ils ont proposé un modèle selon lequel le substrat chloré est d'abord réduit par un électron provenant du cob(I)alamine (figure 10.2). Cette réaction permet l'élimination d'un ion de chlorure et produit un radical très instable qui réagit avec un deuxième électron provenant d'un centre fer-soufre. Un atome d'hydrogène est ensuite incorporé à la molécule. Finalement, un électron est transféré du second centre fer-soufre pour ramener le cob(II)alamine au degré d'oxydation Co(I) (Schumacher et al., 1997). L'apparition du Co(II) en présence du substrat a aussi été détectée à la suite d'une analyse RPE de la 3Cl-4OHPA RDase purifiée de D. dehalogenans (van de Pas et al., 1999).

Figure 10. Mécanismes enzymatiques proposés pour les déshalogénases réductrices (d'après Futagami et al., 2008)

2.4.3 Les aryles déshalogénases réductrices

2.4.3.1 La 3-CB RDase de D. tiedjei DCB-1

La 3-CB RDase de *D. tiedjei* DCB-1 est la première aryle RDase purifiée. L'enzyme d'origine membranaire est formée de deux sous-unités de poids moléculaire de 67 et 37 kDa et contient un cofacteur hème. La température optimale de l'activité enzymatique est de 38 °C et le pH optimal se situe entre 7,2 et 7,5 (Ni *et al.*, 1995). L'activité de déshalogénation d'un extrait cellulaire n'est pas sensible à l'oxygène. La 3-CB RDase peut déshalogéner le PCE et le TCE par une réaction de co-métabolisme (Townsend et Suflita, 1996). L'ajout de sulfite ou de thiosulfate à un extrait cellulaire inhibe l'activité de déshalogénation. Le sulfate n'a aucun effet (Townsend et Suflita, 1997).

2.4.3.2 La 3Cl-4OHBA RDase de D. chlororespirans Co23

Une caractérisation préliminaire de la 3Cl-4OHBA RDase a été effectuée avec la fraction membranaire d'une culture de D. chlororespirans Co23 contenant du pyruvate et du 3Cl-4OHBA. Cette préparation catalyse la déshalogénation du 3Cl-4OHBA et d'autres substrats chlorés en position ortho seulement. Elle peut déshalogéner 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. Le taux maximal de déshalogénation du 3Cl-4OHBA est de 17,2 nmoles/min*mg de protéines et celui du PCP est seulement de 1,4 nmoles/min*mg de protéines. L'activité est optimale à une température de 60 °C et à un pH de 6,5. L'activité est inhibée par le sulfite 1,75 mM et par le dithionite 4 mM. Le sulfate n'a pas d'effet même à une concentration aussi élevée que 100 mM. D'autres substances testées n'ayant pas d'effet sur l'activité enzymatique sont le Fe(NH₄)₂(SO₄)₂, le MnCl₂, le MgCl₂, le ZnCl₂, le NaSO₄, le CoCl₂, le Na₂SeO₄, le NaN₃, le NaCl, KCl, le dithiothréitol (DTT) à 1 mM, le CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonate) 20 mM, le Triton X-100 0,5 %, l'EDTA (acide éthylène-diamine-tétracétique) 200 mM et le citrate de sodium 200 mM. L'activité est diminuée de 75 % en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS) 1 mM (Loffler et al., 1996).

L'enzyme a été purifiée par un facteur de 181 à partir de membranes solubilisées avec du Triton X-100 3 %. Le poids moléculaire a été estimé à 50 kDa par SDS-PAGE. Le spectre

d'absorption visible d'une préparation enzymatique traitée avec le cyanure de potassium et dénaturée par la chaleur est typique du dicyanocob(III)alamine. L'inhibition par l'iodopropane est réversible à la lumière. L'enzyme est inhibée par le cyanure de potassium 45 mM, le sulfite 4 mM et l'EDTA 7 mM. Le citrate de sodium 170 mM n'a aucun effet. L'enzyme contient 0,84 mole de facteur corrinoïde, 7,6 moles de fer et 8,1 moles de sulfure par mole d'enzyme. L'enzyme purifiée a une activité envers le 3Cl-4OHBA, le 3,5-DCl-4OHBA, le 3Cl-4OHPA, le 2,3-DCP, le 2,6-DCP, le 2,4,6-TCP et le PCP. Avec du 3Cl-4OHBA, la K_m est de 12,4 μM et la V_{max} est de 14,8 U/mg de protéines. Avec du PCP, la K_m est de 390 μM et la V_{max} est de 0,12 U/mg de protéines. Le 3OHBA, le 4OHBA et 3,6-DCl-2OHBA sont des inhibiteurs compétitifs de la déshalogénation du 3Cl-4OHBA. Le 3-CB et le 3,6-dichloro-2-méthoxybenzoate ne sont pas des inhibiteurs (Krasotkina *et al.*, 2001).

2.4.3.3 La 3Cl-4OHPA RDase de D. hafniense DCB-2

La 3Cl-4OHPA RDase de *D. hafniense* DCB-2 a été purifiée par un facteur de 11,3 à partir de la membrane solubilisée avec du CHAPS 50 mM en présence de glycérol 17,4 %. Elle est composée d'une sous-unité de poids moléculaire estimé par SDS-PAGE de 46,5 kDa et contient 0,68 mole de facteur corrinoïde, 12 moles de fer et 12 moles de soufre par mole d'enzyme. Elle catalyse la déshalogénation du 3-Cl-4OHPA à un taux de 103,2 nkat/mg de protéines. L'activité n'était pas inhibée par l'iodopropane malgré la présence d'un corrinoïde. L'addition de sulfate d'ammonium 4,3 mM a augmenté l'activité de 40 % (Christiansen *et al.*, 1998).

2.4.3.4 La 3-Cl-4OHPA RDase de *D. dehalogenans*

La 3-Cl-4OHPA RDase de *D. dehalogenans* a été purifiée à partir de la membrane solubilisée avec du Triton X-100 1 % en présence de glycérol 20 % par un facteur de 90. Le poids moléculaire de l'enzyme a été estimé à 48 kDa par SDS-PAGE. Elle catalyse la déshalogénation en position *ortho* du 3Cl-4OHPA, du 2CP, du 2,3-DCP, du 2,4-DCP, du 2,6-DCP, du PCP et du 2Br-4CP. Le pH optimal est de 8,2 et la température optimale est de 52 °C. La K_m avec le 3Cl-4OHPA est de 20 μM et la V_{max} est de 28 U/mg de protéines. La vitesse de déshalogénation du PCP est seulement 2 % de celle mesurée avec le 3Cl-4OHPA.

Des analyses spectroscopiques RPE ont démontré que l'enzyme contient un centre [4Fe-4S], un centre [3Fe-4S] et un cobalamine (van de Pas et al., 1999).

2.4.3.5 Les RDases de D. hafniense PCP-1

Une caractérisation de l'activité enzymatique d'une préparation membranaire brute extraite de *D. hafiniense* PCP-1 cultivée en présence de 2,4,6-TCP a été réalisée. L'activité de déshalogénation du 2,4,6-TCP est sensible à l'oxygène et le pH optimal est de 7,0. Le sulfite à 1 mM inhibe complètement l'activité enzymatique, le nitrate inhibe 50 % de l'activité entre 5 et 100 mM et le sulfate n'a aucun effet. Le KCl, le ZnCl₂, le MgCl₂, le MnCl₂, le NaCl, le CoCl₂ et le FeNH₄(SO₄)₂ à 5 mM et l'EDTA 10 mM n'ont aucun effet. Le NaN₃ 5 mM inhibe 53 % de l'activité enzymatique. L'inhibition par l'iodopropane est réversible à la lumière. La préparation membranaire brute effectue la déshalogénation du PCP, du 2,3,4,5-TeCP, du 2,4,6-TCP, du 2,3,4-TCP, du 2,3,6-TCP, du 2,4,5-TCP, du 2,3-DCP et du 2,4-DCP en position *ortho*; du 3,4,5-TCP en position *meta*; et du PCE en TCE. Le 2,5-DCP, le 2,6-DCP, le 3,4-DCP, le 3,5-DCP, le 2-CP, le 3-CP, le 4-CP et le 3Cl-4OHPA ne sont pas déshalogénés. L'activité la plus élevée a été mesurée avec le PCP et le 2,3,4,5-TeCP. La valeur de la K_m est de 18,3 μM avec le 2,4,6-TPC et de 26,8 μM avec le PCP (Boyer *et al.*, 2003).

Une protéine, CrdA, a été purifiée par un facteur de 3,4 d'une culture induite au 2,4,6-TCP à partir de membranes solubilisées avec du Triton 0,1 % et du glycérol 20 %. Elle montre une activité de déshalogénation en position *ortho* de différents chlorophénols et son expression est constitutive (Boyer *et al.*, 2003; Gauthier *et al.*, 2006). L'enzyme a un poids moléculaire de 37 kDa par SDS-PAGE et de 33,8 kDa par analyse en spectrométrie de masse. Le gène correspondant, *crdA*, n'a aucune homologie avec les autres déshalogénases connues. Un domaine de liaison aux peptidoglycans, LysM, a été retrouvé dans la séquence en acides aminés. La valeur de la V_{max} est de 28,8 nmoles/min*mg de protéines avec le 2,4,6-TCP et de 882,8 nmoles/min*mg de protéines avec le PCP (Boyer *et al.*, 2003).

Une deuxième RDase, a été purifiée d'une culture induite au 3,5-DCP par un facteur de 12,7 à partir de membranes solubilisées avec du Triton 0,1 % et du glycérol 20 %. Son poids moléculaire est de 57 kDa par SDS-PAGE. La protéine de 548 acides aminés est codée par le gène *cprA5*. Ce gène a 66 % d'identité et 76-77 % de similitude avec les enzymes

PceA et moins de 40 % de similitude avec les enzymes CprA. L'inhibition par l'iodopropane est réversible à la lumière, suggérant la présence d'un cofacteur corrinoïde. L'activité enzymatique est sensible à l'oxygène et une préparation enzymatique semi-purifiée exposée à l'air ambiant à une demi-vie de 110 min. L'activité est optimale à un pH entre 6,8 et 7,0 et à une température de 50 °C. L'enzyme est complètement inhibée par le sulfite 2,5 mM et le cyanure de potassium 10 mM. L'azoture de sodium 5 mM inhibe 13,2 % de l'activité enzymatique. Le sulfate 75 mM, le nitrate 75 mM et l'EDTA 10 mM n'ont pas d'effet sur l'activité enzymatique. Une préparation enzymatique semi-purifiée effectue la déshalogénation du 2,3,4,5-TeCP, du 2,3,6-TCP, du 2,3,5-TCP, du 2,3-DCP et du 3,5-DCP en position *meta*; la déshalogénation du PCP, du 2,3,4,5-TeCP et du 2,4-5-TCP en position *para*; et la déshalogénation du 2,4,6-TCP, du 2,4,5-TCP et du 2,4-DCP en position *ortho*. L'activité la plus élevée a été mesurée avec le 3,5-DCP et le 2,3,5-TCP. La valeur de la K_m avec le 3,5-DCP est de 49,3 µM (Thibodeau *et al.*, 2004).

2.4.3.6 Identification de la chlorobenzène RDase de Dehalococcoides sp. CBDB1

Une RDase de type CprA/PceA effectuant la déshalogénation du 1,2,3,4-TeCB a été identifiée d'une culture de *Dehalococcoides* sp. CBDB1 à partir de membranes solubilisées avec du CHAPS 10 mM. La préparation protéique obtenue a été soumise à une électrophorèse dans un gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes et la bande correspondant à l'activité de déshalogénation du 1,2,3,4-TeCB en 1,2,3-TCB a été extraite du gel et analysée par spectrométrie de masse. La protéine identifiée, CbrA, contient un peptide signal TAT et deux motifs pour la liaison d'un centre fer-soufre (Adrian *et al.*, 2007b).

Les propriétés et le spectre de déshalogénation des différentes aryles déshalogénases réductrices sont résumés respectivement dans les tableaux 5 et 6.

Tableau 5. Propriétés des aryles déshalogénases réductrices purifiées

Enzyme	MW (kDa) ^a	K _m (μM)	pH opt.	T opt. (°C)	O ₂ 1/2 vie (min)	Cofacteurs	Références
D. hafniense PCP-1 2,4,6-TCP RDase	$37 \\ 33,8^{b}$	18	7,0	ND	> 60	corrinoïde	Boyer <i>et al.</i> , 2003
D. hafniense PCP-1 3,5-DCP RDase	57	49	6.8- 7.0	50	110	corrinoïde Fe, S ^c	Thibodeau et al., 2004
D. hafniense DCB-23Cl-4OHPA RDase	47	ND	ND	ND	ND	1 corrinoïde 12 Fe, 13 S	Christiansen et al., 1998
D. dehalogenans 3Cl-4OHPA RDase	48	ND	8,1	52	ND	1 corrinoïde 7 Fe, 10 S; [4Fe-4S], [3Fe-4S] ^d	van de Pas <i>et al.</i> , 1999
Desulfitobacterium sp. PCE1 3Cl-4OHPA RDase	48	ND	ND	ND	ND	corrinoïde	van de Pas <i>et al.</i> , 2001
D. chlororespirans 3Cl-4OHBA RDase	50	12,4	6,8	59	77	1 corrinoïde 8 Fe, 8 S	Loeffler et al., 1996 Krasotkina et al., 2001
D. tiedjei 3-CB RDase	64+34	ND	7,2- 7,5	38		hème	Ni <i>et al.</i> , 1995

^a Déterminé par SDS-PAGE; ^b déterminé par spectrométrie de masse; ^c déduit par analyse de séquence du gène; ^d déterminé par spectroscopie RPE; ND : non déterminé.

Tableau 6. Spectre de déshalogénation des aryles déshalogénases réductrices purifiées

Enzyme	Composés h	nalogénés	Références
D. hafniense PCP-1 2,4,6-TCP RDase ^a	Autres sub.	<i>o</i> : PCP, TCPs, 2,3-DCP, 2,4-DCP <i>p</i> : 3,4,5-TCP, PCE en TCE	Boyer <i>et al.</i> ,
	Non désh.	autres DCPs, CPs, 3Cl-4OHPA	2003
D. hafniense PCP-1	Autres sub.	m: 2,3,5-DCP	
3,5-DCP RDase		<i>p</i> : PCP, 2,3,4,5-TeCP, 3,4,5-TCP	Thibodeau et
		o: 2,4,6-TCP, 2,4-DCP, 2,4,5-DCP	al., 2004
	Non désh.	autres DCPs, CPs, 3C1-4OHPA	
D. hafniense DCB-2	Autre sub.		Christiansen et
3Cl-4OHPA RDase	Non désh.	PCE	<i>al.</i> , 1998
D. dehalogenans	Autres sub.	2-CP, 2,3-DCP, PCP, 2,4-DCP,	
3Cl-4OHPA RDase		2,6-DCP, 2-bromo-4-CP	van de Pas et
	Non désh.	PCE, TCE, 3-CP, 4-CP, 2,5-DCP,	al., 1999
		2-fluoro-4-CP	
Desulfitobacterium	Autre sub.	ND	van de Pas <i>et</i>
sp. PCE1	Non désh.		al., 2001
3Cl-4OHPA RDase			
D. chlororespirans	Autres sub.	PCP, TeCPs, TCPs, DCPs, 3Cl-	Loffler et al.,
3Cl-4OHBA RDase		40HPA, 3,5-DCl-40HBA	1996
	Non désh.	CBAs, DCPs, CPs, PCE	Krasotkina <i>et</i> al., 2001
D. tiedjei	Autre sub.	ND	Ni <i>et al.</i> , 1995
3-CB RDase	Non désh.		

^a Déterminé avec une préparation membranaire.

Abréviations : autre sub. : autre substrat déshalogéné; non déshal. : composé testé qui n'est pas déshalogéné; ND : non déterminé; PCP: pentachlorophénol; TeCP: tétrachlorophénol; TCP: trichlorophénol; DCP: dichlorophénol; CP: monochlorophénol; PCE: tétrachloroéthène; TCE: trichloroéthène; DCE: dichloroéthène; OHPA: hydroxyphénylacétate; OHBA: hydroxybenzoate; DCBA: dichlorobenzoate; CBA: monochlorobenzoate; 3-CB: 3-chlorobenzoate; HCA: hexachloroéthane; PCA: pentachloroéthane; TeCA: tétrachloroéthane; TCA: trichloroéthane; DCA: dichloroéthane; VC: chlorure de vinyle; TeCMe: tétrachlorométhane; TCFE: trichlorofluoréthène; DPA: dichloropentane.

2.4.4 Les PCE/TCE déshalogénases réductrices

2.4.4.1 La PCE RDase de S. multivorans

Une caractérisation préliminaire de la PCE RDase de S. multivorans effectuée à partir d'un extrait cellulaire a démontré que l'activité de déshalogénation du PCE est constitutive. L'inhibition par l'iodopropane est réversible à la lumière. De plus, l'activité est inhibée par l'EDTA, le cyanure, le N₂O et le nitrite mais pas par l'azoture de sodium et le monoxyde de carbone (Neumann et al., 1995). L'enzyme a été purifiée par un facteur de 100 à partir de l'extrait cellulaire de cellules cultivées en présence de pyruvate et de fumarate. Le poids moléculaire de l'enzyme a été estimé par SDS-PAGE à 57 kDa. La K_m est de 0,24 mM avec le TCE et de 0,20 mM avec le PCE. La température optimale est de 42 °C et le pH optimal est de 8,0. L'activité est peu sensible à l'oxygène. La concentration de facteur corrinoïde est de 1,0 mole par mole d'enzyme. La concentration de fer et de soufre est de 9,8 moles et 8,0 moles par mole d'enzyme respectivement. Les ions ammoniums augmentent l'activité de l'enzyme et les méthanes chlorés inhibent l'activité enzymatique (Neumann et al., 1996). La PCE RDase de S. multivorans est localisée dans le cytoplasme et dans la membrane, du côté cytoplasmique, lorsque les cellules sont cultivées avec du pyruvate et du fumarate. Lorsque les cellules sont cultivées avec du pyruvate ou du formiate comme donneur d'électrons et du PCE ou du TCE comme accepteur d'électrons, l'enzyme est localisée du côté périplasmique de la membrane (John et al., 2006).

Quatre facteurs corrinoïdes différents ont été détectés chez la souche K de S. multivorans. La souche peut synthétiser ses propres facteurs corrinoïdes puisqu'elle croît sans ajout de cyanocobalamine ou d'extrait de levure (Siebert et al., 2002). La structure du cofacteur extrait de la PCE RDase de cette souche est analogue à celle de la pseudovitamine B12 (Krautler et al., 2003). Les propriétés structurelles du cofacteur sont importantes puisque le cofacteur extrait de l'enzyme effectue la déshalogénation in vitro du TCE à un taux 50 fois plus élevé que le cyanocobalamine et 3 fois plus élevé que le pseudovitamine B12 (Neumann et al., 2002). La PCE RDase de S. multivorans K exprimée chez E. coli n'était pas fonctionnelle et le peptide signal n'était pas clivé de la protéine, même en conditions anaérobies dans un milieu de culture additionné de cyanocobalamine (Neumann et al., 1998). Une autre souche de S. multivorans, la souche N, produit un seul facteur corrinoïde similaire

à la cyanocobalamine. Cette souche est incapable de transformer le PCE, même si elle contient un gène identique à 100 % au gène codant pour la PCE RDase de la souche K. L'addition dans le milieu de culture du facteur corrinoïde extrait de la souche K n'induit pas l'activité de déshalogénation. Chez la souche N, moins de transcrits d'ARN de la PCE RDase sont produits et aucune PCE RDase n'est détectée par buvardage de type Western (Siebert et al., 2002).

2.4.4.2 Les PCE et TCE RDases de D. ethenogenes 195

Une PCE RDase et une TCE RDase provenant d'un enrichissement de culture de D. ethenogenes 195 ont été solubilisées de la membrane avec du Triton X-100 0,1 % et purifiées partiellement par chromatographie à interaction hydrophobique. Ensuite, les préparations enzymatiques ont été séparées dans un gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes, puis la bande contenant l'activité enzymatique a été analysée par SDS-PAGE. Le poids moléculaire de la PCE RDase a été estimé à 51 kDa. L'enzyme effectue la déshalogénation du PCE en TCE à un taux de 20 µmol/min*mg de protéines. Deux bandes étaient présentes suite à l'analyse SDS-PAGE de la bande liée à l'activité de déshalogénation du TCE : l'une de poids moléculaire de 110 kDa et l'autre de 61 kDa correspond à la TCE RDase. La TCE RDase peut déshalogéner le TCE, le cis-DCE et le 1,1-DCE à un taux de 8 à 12 μmol/min*mg de protéines ainsi que le trans-DCE et le VC à des taux plus faibles. (Magnuson et al., 1998). Les deux enzymes sont inhibées par l'iodopropane et l'inhibition est réversible à la lumière. La TCE RDase est inhibée à 50 % par le cyanure de sodium 2,5 mM et l'azoture de sodium 7 mM. La PCE RDase est inhibée à 20 % par le cyanure de sodium 20 mM. Le sulfite de sodium 2 mM inhibe complètement l'activité des deux enzymes. Le chlorure cuprique 1 mM et le chlorure de zinc 1 mM inhibent complètement la TCE RDase et partiellement la PCE RDase. À 2 mM, le sulfate de sodium, le sélénate de sodium, le sulfure de sodium, le monoxyde de carbone, l'EDTA, le disulfonate de bathophénanthroline et le 2,2,-dipyridyl n'ont aucun effet. L'absence d'inhibition par le cyanure et le monoxyde de carbone suggère l'implication d'un cofacteur corrinoïde. L'inhibition par le zinc et le cuivre suggère l'implication d'un cofacteur métallique. De plus, les cofacteurs seraient fortement liés aux enzymes ou inaccessibles aux agents chélateurs puisque l'EDTA n'a pas d'effet.

L'activité enzymatique d'un enrichissement de culture de *D. ethenogenes* 195 est augmentée par l'ajout de cyanocobalamine dans le milieu (Magnuson *et al.*, 1998).

2.4.4.3 La PCE RDase de Desulfitobacterium sp. PCE-S

L'activité de déshalogénation du PCE par la RDase de *Desulfitobacterium* sp. PCE-S est constitutive. La demi-vie à l'oxygène d'un extrait cellulaire est de 90 min. L'activité est inhibée par 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 1 mM. L'inhibition par l'iodopropane est réversible à la lumière. Le sulfate et le monoxyde de carbone n'ont pas d'effet sur l'activité enzymatique (Miller *et al.*, 1997). L'enzyme a été purifiée de la membrane solubilisée avec du Triton X-100 0,1 % par un facteur de 165. Le poids moléculaire de l'enzyme a été estimé par SDS-PAGE à 65 kDa. L'enzyme peut déshalogéner le PCE en *cis*-1,2-DCE. La valeur de la K_m avec le PCE est de 10 μM et avec le TCE de 4 μM. Le pH optimal est de 7,2 et la température optimale est de 50 °C. L'enzyme purifiée à une demi-vie à l'oxygène de 50 min. Elle contient 0,7 mole de facteur corrinoïde, 1 mole de cobalt, 7,8 moles de fer et 10,3 moles de soufre par mole d'enzyme (Miller *et al.*, 1998).

2.4.4.4 La PCE RDase de D. restrictus

La PCE RDase *D. restrictus* a été purifiée par un facteur de 25 à partir de membranes solubilisées avec du Triton X-100 1,2 % (Maillard *et al.*, 2003). L'enzyme effectue la déshalogénation du PCE en *cis*-DCE et d'autres chloroéthanes et chlorométhanes. La K_m avec le PCE est de 20,4 μM et avec le TCE de 23,7 μM. L'activité est optimale à un pH de 8,1 et la demi-vie à l'oxygène est de 280 min (Maillard *et al.*, 2003). Par SDS PAGE, le poids moléculaire de l'enzyme est estimé à 60 kDa. L'enzyme contient un cobalamine et deux centres [4Fe-4S]. L'activité de déshalogénation d'un extrait cellulaire est inhibée par l'iodopropane et l'inhibition est réversible à la lumière (Schumacher *et al.*, 1997).

La séquence en acides aminés contient un peptide signal TAT clivé à la position 120, et un motif pour la liaison d'un centre [4Fe-4S], CxxCxxCxxxC, et un motif pour la liaison d'un centre [3Fe-4S], CxxCxxxC. Maillard *et al.* (2003) ont proposé qu'une cystéine localisée 10 acides aminés en amont du deuxième motif de liaison d'un centre fer soufre pourrait servir pour la liaison d'un centre [4Fe-4S]. Le premier et le dernier acide aminé de la séquence de

10 acides aminés sont une glycine et une proline. Ces deux acides aminés peuvent briser les hélices α, la glycine parce qu'elle n'a pas de pouvoir rotatoire et la proline parce qu'elle ne peut pas former de liaison hydrogène, et ils permettraient la formation d'une boucle (Maillard et al., 2003) (figure 11).

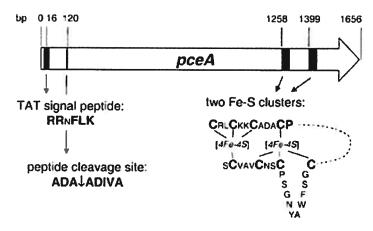


Figure 11. Représentation schématisée de la PCE RDase de D. restrictus (tirée de Maillard et al., 2003). La position du peptide signal TAT, du site de clivage du peptide signal et des motifs riches en cystéine pour la liaison des centres fer-soufre sont montrés.

2.4.4.5 La PCE RDase de D. hafniense Y51

La PCE RDase de *D. hafniense* Y51 a été enrichie de cellules brisées dans un tampon contenant du glycérol 10 % par un facteur de 2,55. L'enzyme catalyse la déshalogénation du PCE en *cis*-DCE et de certains chloroéthanes. La K_m avec le PCE est de 105,7 μM et avec le TCE de 535,3 μM. Le poids moléculaire a été estimé par SDS PAGE à 58 kDa. La demi-vie à l'oxygène est de 330 min, la température optimale est de 37 °C et le pH optimal se situe entre 7,0 et 7,5. L'activité est inhibée par l'iodopropane mais l'activité n'est pas restaurée par la lumière. Le sulfite 25 mM inhibe 53 % de l'activité enzymatique. L'enzyme a été détectée du côté périplasmique de la membrane par buvardage de type Western (Suyama *et al.*, 2002).

2.4.4.6 Les RDases de Desulfitobacterium sp. PCE1 et D. hafniense TCE1

Van de Pas et al. (2001) ont purifiées trois enzymes à partir de membranes solubilisées avec du Triton X-100 1 % et du glycérol 20 % par une combinaison de

chromatographie à interactions hydrophobiques et échangeuses ioniques. La première a été purifiée de la souche PCE1 cultivée en présence de PCE par un facteur de 136. C'est une PCE RDase de poids moléculaire de 48 kDa. L'analyse SDS-PAGE a démontré la présence d'une bande copurifiée de 44 kDa, cependant cette bande n'était pas retrouvée dans toutes les fractions avec une activité de déshalogénation. L'enzyme effectue la déshalogénation du PCE à un taux de 281 nmoles/Cl^{*}*min*mg de protéines et du TCE à un taux de 10 nmoles/Cl^{*} *min*mg de protéines. La deuxième enzyme est une 3Cl-4OHPA RDase qui a été purifiée de la souche PCE1 cultivée en présence de 3Cl-4OHPA par un facteur de 276. Par SDS-PAGE, la protéine a un poids moléculaire de 48 kDa. Cette enzyme effectue la déshalogénation du 3Cl-4OHPA, du 2,3-DCP, du 2,4-DCP, de 2,5-DCP et du 2,6-DCP à une vitesse de 218, 286, 54, 9 et 31 nmoles/Cl^{-*}min*mg de protéines, respectivement. La troisième enzyme est une PCE/TCE RDase qui a été purifiée de la souche Desulfitobacterium TCE1 cultivée en présence de PCE par un facteur de 100. Par SDS-PAGE, la protéine a un poids moléculaire de 59 kDa. Elle effectue la déshalogénation du PCE à un taux de 115 nmoles/Cl^{-*}min*mg de protéines et du TCE à un taux de 95 nmoles/Cl^{*}min*mg de protéines. L'activité enzymatique d'un extrait cellulaire de la souche PCE1 en présence de 3Cl-4OHPA ou de PCE et de la souche TCE en présence de PCE est inhibée par l'iodopropane et le N₂O. L'inhibition par l'iodopropane est réversible à la lumière (van de Pas et al., 2001).

2.4.4.7 La PCE RDase purifiée d'une culture de C. bifermentans DPH-1

Une enzyme effectuant la déshalogénation réductrice du PCE a été purifiée à partir d'un extrait cellulaire d'une culture de *C. bifermentans* DPH-1 par un facteur de 9. La K_m avec le PCE est de 12 μM et la V_{max} est de 73 nmoles/mg de protéines. Le poids moléculaire de l'enzyme a été estimé à 35,7 kDa. L'enzyme peut déshalogéner le PCE, le TCE, le *cis*-DCE, 1,1-DCE, 1,2-DCA, 1,2-dichloropropane, 1,1,2-trichloroéthane. La demi-vie à l'oxygène est de 20 h. L'activité maximale a été mesurée à 35 °C et à un pH de 7,5. L'inhibition par l'iodopropane est réversible à la lumière. L'enzyme n'est pas affectée par les ions métalliques (Co²⁺, Fe³⁺, Mg²⁺, Na⁺, Mn²⁺ et Hg²⁺), l'EDTA, le NADH et le cyanocobalamine (Okeke *et al.*, 2001). Récemment, la souche *D. hafniense* a été isolée de la culture de *C. bifermentans* DPH-1 et le gène *pceA*, codant pour la PCE RDase a été détecté chez *D. hafniense* JH1 et non chez *C. bifermentans* DPH-1 (Fletcher *et al.*, 2008).

2.4.4.8 La VC RDase de Dehalococcoides sp. VS

Une VC RDase a été purifiée partiellement d'un enrichissement de culture de *Dehalococcoides* sp. VS. L'enzyme a été purifiée par un facteur de 4,5 à partir de membranes solubilisées avec du CHAPS 2 mM. Elle effectue la déshalogénation du VC à un taux de 350 nmoles/min*mg de protéines et du *cis*-DCE, du *trans*-DCE et du 1,1-DCE à des taux entre 350 et 390 nmoles/min*mg. Par SDS-PAGE, deux bandes majeures de 62 et 45 kDa sont présentes ainsi que de nombreuses bandes mineures de 30 à 175 kDa. La séquence N-terminale de la bande de 62 kDa est similaire à la TCE RDase de *D. dehalogenans*. L'activité est très sensible à l'oxygène (demi-vie de 5 min) (Muller *et al.*, 2004).

Les propriétés et le spectre de déshalogénation des différentes PCE et TCE déshalogénases réductrices sont résumés respectivement dans les tableaux 7 et 8.

Tableau 7. Propriétés des PCE/TCE déshalogénases réductrices purifiées

Enzyme	MW (kDa) ^a	K _m (μM)	pH opt.	T opt. (°C)	O ₂ 1/2 vie (min)	Cofacteurs	Références
D. hafniense Y51 PCE/TCE RDase	58	106 (PCE) 535 (TCE)	7,0- 7,5	37	330	corrinoïde, Fe, S ^b	Suyama et al., 2002
D. hafniense PCE-S PCE/TCE RDase	65	10 (PCE) 4 (TCE)	7,2	50	50	0,7 corrinoïde, 8 Fe, 10 S	Miller <i>et al.</i> , 1997 Miller <i>et al.</i> , 1998
Desulfitobacterium sp. PCE1 PCE/ TCE RDase	48	ND	ND	ND	ND	corrinoïde, Fe-S ND	van de Pas <i>et</i> al., 2001
Desulfitobacterium sp. TCE1 PCE/TCE RDase	1 59	ND	ND	ND	ND	ND	van de Pas <i>et</i> al., 2001
D. restrictus PCE/TCE RDase	60	20 (PCE) 24 (TCE)	8,1	ND	280	1 cobalamine, 7 Fe, 6 S, 2 [4Fe-4S] ^c	Schumacher 97 Maillard et al., 2003
S. multivorans PCE/TCE RDase	57	200 (PCE) 240 (TCE)	8	42	120	1 corrinoïde, 10 Fe, 8 S	Neumann et al., 1996 Neumann et al., 1998
C. bifermentans PCE/PCE RDase ^d	35,7	12 (PCE)	7,5	35	1200	corrinoïde, Fe-S ND	Okeke <i>et al.</i> , 2001
D. ethenogenes 195 PCE RDase	51	ND	ND	ND	ND	corrinoïde, Fe-S ND	Magnuson et al., 1998
D. ethenogenes 195 TCE RDase	61	ND	ND	ND	ND	corrinoïde, Fe-S ND	Magnuson et al., 1998 Magnuson et al., 2000
Dehalococcoides sp. VS VC RDase	62	ND	ND	ND	5	ND	Muller <i>et al.</i> , 2004

^a Déterminé par SDS-PAGE; ^b déduit par analyse de séquence du gène; ^c déterminé par spectroscopie RPE; ^d le gène codant pour cette enzyme est présent chez *D. hafniense* JH1 et non chez *C. bifermentans* DPH-1 (Fletcher *et al.* 2008); ND : non déterminé; Fe-S ND : contenu en fer et en soufre non déterminé.

Tableau 8. Spectre de déshalogénation des PCE/TCE déshalogénases réductrices purifiées

Enzyme	Composés	halogénés	Références
D. hafniense Y51 PCE/TCE RDase		HCA, PCA, 1,1,2,2-TeCA, 1,1,1,2- TeCA	Suyama et al., 2002
D lafeiouse	Autres sub	DCEs, TCAs, CBAs	Miller et al.,
D. hafniense PCE-S PCE/TCE RDase	Non désh.	DCEs, 3-CB, CCl ₄ , PCP, 2,4,6-TCP, 2,4,5-TCP, 3-Cl-4OHPA	1997 Miller <i>et al.</i> , 1998
Desulfitobacterium sp. PCE1 PCE RDase	Autres sub Non désh.	cis-DCE, CPs	van de Pas <i>et</i> al., 2001
D. hafniense TCE1 TCE RDase	Autres sub Non désh.	cis-DCE, CPs	van de Pas <i>et</i> al., 2001
Dehalobacter restrictus PCE/PCE RDase		TCFE, TeCMe, HCA, TeCA, TCA, 1,1,1-trichloro-2,2,2-trifluoroéthane DCEs	Schumacher <i>et al.</i> , 1997 Maillard <i>et al.</i> , 2003
S. multivorans PCE/PCE RDase		Tétraiodoéthène DCEs, 1,1,1-TCA, HCA, 3-CB, 3,4-DCBA, 4-CP	Neumann et al., 1996 Neumann et al., 1998
C. bifermentans PCE/PCE RDase ^a	Autres sub Non désh.	1,1-DCEs, TCE, <i>cis</i> -DCE, 1,2-DPA, 1,1,2-TCA, 1,2-DCA VC	Okeke <i>et al.</i> , 2001
D. ethenogenes 195 PCE RDase	Autres sub Non désh.	PCE TCE, DCEs, VC	Magnuson et al., 1998
D. ethenogenes 195 TCE RDase	Autres sub Non désh.	chloro et bromo éthènes, éthanes, propènes, propanes, butanes, pentanes et pentènes PCE, CCl ₄ , CHCl ₃ , CHBr ₃ , CH ₂ Cl ₂ ,	Magnuson et al., 1998 Magnuson et al., 2000
Dehalococcoides sp. VS VC RDase	Autres sub Non désh.	VC, DCEs, TCE PCE	Muller <i>et al.</i> , 2004

^a Le gène codant pour cette enzyme est présent chez *D. hafniense* JH1 et non chez *C. bifermentans* DPH-1 (Fletcher *et al.* 2008); voir tableau 6 pour la liste des abréviations.

2.5 Organisation génétique des loci cprA et pceA

2.5.1 Fonction des gènes associés à cprA/pceA

Le gène codant pour les RDases (*cprA/pceA*) est toujours associé au gène *cprB/pceB*. Ce gène code pour une protéine d'environ 100 acides aminés contenant trois domaines transmembranaires. La fonction de cette protéine n'a pas été déterminée expérimentalement, mais l'hypothèse la plus probable est que son interaction avec CprA sert à stabiliser l'insertion de l'enzyme dans la membrane. Le gène *cprB* est toujours localisé en amont de *cprA* et le gène *pceB* en aval de *pceA* (Villemur *et al.*, 2006).

Huit cadres ouverts de lectures désignés dans l'ordre par *cprTKZEBACD* ont été identifiés chez *D. dehalogenans* et *D. hafniense* DCB-2 (Smidt *et al.*, 2000; Villemur *et al.*, 2002) (figure 14). Les deux opérons ont 83 % d'identité de séquences. Le gène *cprA* code pour les 3Cl-4OHPA RDases déjà purifiées de ces bactéries (Christiansen *et al.*, 1998; van de Pas *et al.*, 1999). Une analyse par buvardage de type Northern a démontré que la transcription de l'opéron chez *D. dehalogenans* est induite en conditions de déshalorespiration, à l'exception du gène *cprK. CprT* est transcrit sous un seul ARNm, tandis que les gènes *cprZE* ainsi que *cprBA* sont cotranscrits. Occasionnellement, la lecture se fait jusqu'au bout des gènes *cprBACD*. Un faible taux de transcription de *cprKZE* a été observé, même en absence de 3Cl-4OHPA, et un faible niveau constitutif de la protéine CprK a été détecté (Smidt *et al.*, 2000).

CprZ n'a pas de fonction connue ni d'homologie avec des protéines de fonction connue (Smidt et al., 2000).

CprK est un régulateur transcriptionnel de la famille CRP/FNR (« cyclic AMP receptor protein » / « fumarate and nitrate reductase regulator »). Les régulateurs de type CRP/FNR ont un domaine de liaison à l'ADN hélice-tour-hélice en C-terminal et un domaine effecteur en N-terminal (Korner et al., 2003). Chez D. dehalogenans et D. hafniense DCB-2, la liaison de 3Cl-4OHPA à CprK permet la fixation du complexe à une région promotrice de l'ADN appelée « dehalobox » et le recrutement de l'ARN polymérase. La séquence consensus des « dehalobox », TTAAT-N₄-ATTAA, est similaire au motif pour la liaison du régulateur transcriptionnel FNR (Pop et al., 2004; Gabor et al., 2006).

CprC est similaire aux régulateurs transcriptionnels membranaires des gènes de dénitrification *nos* (NosR) et *nir* (NirI). Elle contient six domaines transmembranaires, un domaine pour la liaison du cofacteur FMN (flavine mononucléotide) et un domaine ferrédoxine. Le rôle de la protéine CprC n'a pas été élucidé (Smidt *et al.*, 2000).

CprT est similaire à la protéine TF (« trigger factor ») de *E. coli*, une protéine chaperonne impliquée dans le repliement des protéines (Smidt *et al.*, 2000). La protéine TF est une enzyme ATP-indépendante capable de s'associer au ribosome et à une chaîne polypeptidique naissante qui accélère le repliement des protéines en catalysant l'isomérisation *cis/trans* des liaisons peptidiques impliquant un résidu proline. Elle est composée de trois domaines : un domaine N-terminal qui interagit avec le ribosome, un domaine central qui interagit avec le substrat peptidique et un domaine C-terminal qui a une fonction chaperonne et une activité isomérase (Hoffmann *et al.*, 2010). Morita *et al.* (2009) ont démontré que la protéine PceT purifiée de *D. restrictus* avait une activité peptidyl-propyl *cis-trans* isomérase et une activité chaperonne, et qu'elle pouvait se lier à un précurseur de l'enzyme PceA contenant le signal peptide TAT, mais pas à la forme mature de l'enzyme (Morita *et al.*, 2009).

CprD et CprE appartiennent à la famille de chaperonnes GroEL (Smidt et al., 2000). Les chaperonnes GroEL sont des protéines qui préviennent l'agrégation de protéines, facilitent le repliement et l'assemblage des protéines (Fink, 1999). Les protéines CprD, CprE et CprT seraient donc impliquées dans le repliement de l'enzyme CprA ou l'insertion des cofacteurs. Cette activité aurait lieu dans le cytoplasme et l'enzyme repliée serait exportée par le système de sécrétion TAT après la fixation des cofacteurs (Jack et al., 2005; Lee et al., 2006a). Les étapes menant à la formation d'une enzyme CprA sont illustrées dans la figure 12.

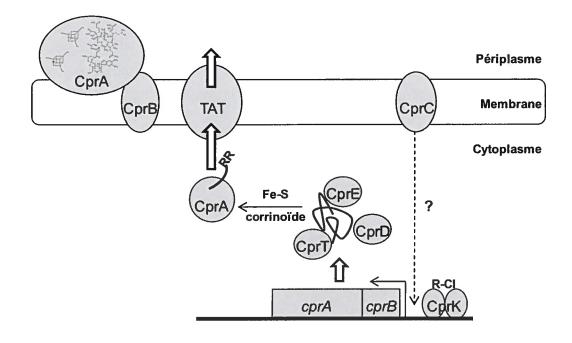


Figure 12. Schéma représentant la formation d'une enzyme CprA (d'après Smidt et de Vos, 2004)

(1) Un dimère de la protéine CprK se fixe à l'ADN en présence d'un composé chloré (R-Cl). (2) La transcription des gènes *cprAB* est induite. (3) Les protéines chaperonnes CprD, CprE et CprT se lient à la chaîne polypeptidique naissante pour faciliter le repliement de la protéine et l'insertion des cofacteurs (centres fer-soufre, corrinoïde). (4) La protéine est exportée au périplasme par le système de sécrétion TAT. (5) Le peptide signal est clivé de l'enzyme mature qui est ancrée à la membrane grâce à la protéine CprB.

Certaines CprA sont localisées du côté cytoplasmique de la membrane ou dans le cytoplasme. CprC et d'autres types régulateurs (non montrés) pourraient être impliqués dans la régulation de la transcription de gènes *cpr*. Abréviations : RR : peptide signal « twin arginine translocation »; TAT : système de sécrétion TAT.

2.5.2 Description des loci cpr et pce identifiés chez D. hafniense DCB-2

Cinq régions contenant des gènes cpr/pce ont été identifiées d'une analyse du génome de D. hafniense DCB-2 (Villemur et al., 2002) (figure 14). La première région, cprTKZEBA1CD, contient le gène CprA1 qui code pour la 3Cl-4OHPA RDase (Christiansen et al., 1998). La deuxième région contient les gènes cprKBA2BA3KZDCD. La présence de deux copies des gènes cprA, cprB, cprK et cprD, indique qu'une duplication génétique est survenue. On retrouve également une duplication du gène cprA dans un fragment d'ADN génomique de la souche PCP-1 contenant les gènes cprA2BA3 et dans un opéron de D. chlororespirans contenant les gènes cprKBA1BA2C, où cprA1 code pour la 3C1-4OHPA RDase (Loffler et al., 1996; Villemur et al., 2002) (figure 14). Un élément transposable est présent en amont du troisième opéron identifié chez la souche DCB-2 qui contient les gènes rdh-tr-ACA1BCTK. Le gène rdhA1 diffère d'un seul nucléotide du gène de la 3,5-DCP RDase de la souche PCP-1, cprA5 (Villemur et al., 2002). Ces gènes ont une plus grande similarité avec les gènes pceA que les gènes cprA et la localisation des gènes rdhB et cprB correspond à l'arrangement des gènes pce (Thibodeau et al., 2004) (figure 14). La séquence rdhA1BCT de la souche DCB-2 a 65 % d'identité avec l'opéron pceABCT de D. hafniense Y51, D. hafniense TCE1 et D. restrictus (figure 14). La séquence pceABCT est identique à plus de 99 % chez ces bactéries et elle est flanquée par deux éléments transposables, indiquant qu'il y aurait eu un transfert horizontal de ces gènes entre D. restrictus et D. hafniense (Maillard et al., 2003; Furukawa et al., 2005; Maillard et al., 2005; Futagami et al., 2006; Villemur et al., 2006). La quatrième région identifiée chez la souche DCB-2 contient les gènes cprKBA4rdhB et la cinquième région contient les gènes rdhKA2BC. L'arrangement des gènes *rdhA2B* est celui des gènes *pce* (Villemur *et al.*, 2006).

Gauthier et al. (2006) ont vérifié la présence et la transcription des gènes cprA1, cprA2, cprA3, cprA4 et cprA5 chez différentes souches de Desulfitobacterium (D. hafniense DCB-2, PCP-1, TCE1, TCP-A, DP7, D. chlororespirans Co23, D. dehalogenans JW/IU-DC1 et Desulfitobacterium sp. PCE1). Le gène cprA1 était présent chez les souches pouvant effectuer la déshalogénation du 3-Cl-4OHPA, soit D. hafniense DCB-2, D. dehalogenans et Desulfitobacterium sp. PCE1. Les gènes cprA2, cprA3, cprA4 et cprA5 ont été détectés chez les souches D. hafniense DCB-2, PCP-1 et TCP-A. Aucun de ces gènes n'a été détecté chez la souche D. hafniense DP7, une souche qui n'a aucune activité de déshalogénation, ni chez

la souche TCE1, une souche qui effectue seulement la déshalogénation du PCE en *cis*-DCE grâce à une PCE/TCE RDase codée par l'opéron *pceABCT*. Les transcrits des gènes *cprA2*, *cprA3* ont été détectés dans les souches *D. hafniense* PCP-1, DCB-2 et TCP-A en présence de 2,4,6-TCP, de 3,5-DCP ou sans chlorophénol par RT-PCR (figure 13). Les transcrits du gène *cprA4* ont été détectés en présence de 2,4,6-TCP, de 3,5-DCP et sans chlorophénol chez les souches DCB-2 et TCP-A. Il a été détecté en quantité trace avec du 2,4,6-TCP et plus abondamment avec du 3,5-DCP ou sans chlorophénol chez la souche PCP-1. Le transcrit du gène *cprA5* a été détecté en présence de 2,4,6-TCP ou de 3,5-DCP chez les trois souches (Gauthier *et al.*, 2006).

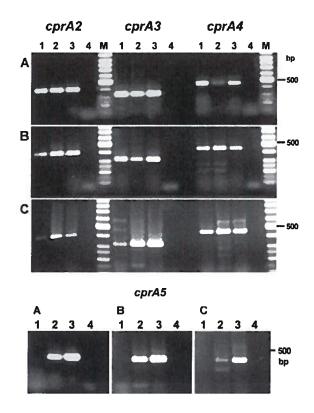


Figure 13. Détection des transcrits de *cprA2-5* par RT-PCR chez les souches *D. hafniense* PCP-1 (A), TCP-A (B) et DCB-2 (C) (tirée de Gauthier *et al.*, 2006). (1) aucun chlorophénol; (2) 2,4,6-TCP; (3) 3,5-DCP; (4) témoin négatif.

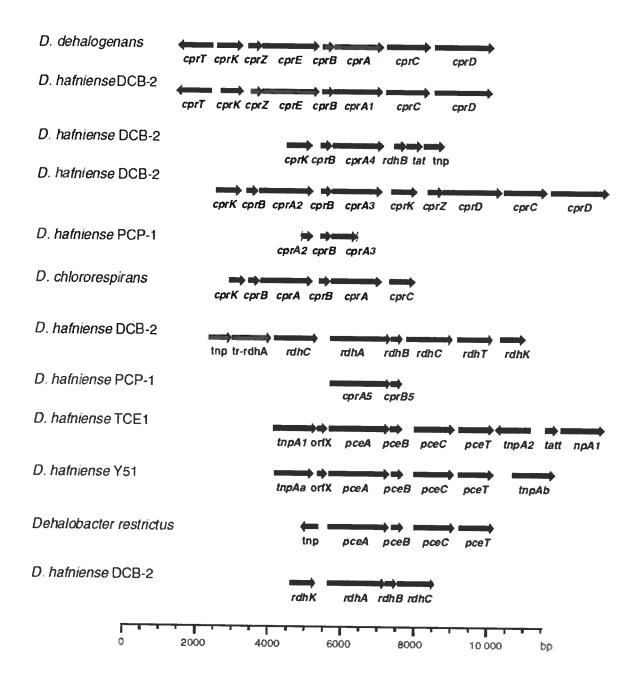


Figure 14. Organisation génétique de loci cpr et pce (d'après Villemur et al., 2006)

Abbréviations: *tnp*: transposase; *tr-rdhA*: gène *rdhA* tronqué; *cpr*, *pce*, *rdhCDKTZ*: gènes similaires aux gènes identifiés chez *D. dehalogenans* qui sont associés aux déshalogénases réductrices caractérisées ou putatives.

2.6 Régulation transcriptionnelle des déshalogénases réductrices

2.6.1 Le régulateur transcriptionnel CprK

Des structures cristallographiques de CprK1 en présence ou en absence de ligand et dans différents états d'oxydation ont été obtenues (Joyce *et al.*, 2006; Levy *et al.*, 2008). Elles ont révélé que deux sous-unités de la protéine CprK forment un dimère asymétrique, même en absence du ligand. En présence d'oxygène, un pont disulfure entre les résidus Cys11 et Cys 200 rend le complexe moins flexible (figure 15.1). Le 3Cl-4OH peut se lier à la protéine mais le complexe ne se lie pas à l'ADN. En conditions réductrices, la liaison de 3Cl-4OHPA aux domaines N-terminaux modifie la conformation du complexe protéique (figure 15.2-15.3) et les domaines C-terminaux se lient à une séquence régulatrice de l'ADN appelée « dehalobox » (figure 15.4) (Joyce *et al.*, 2006; Mazon *et al.*, 2007; Levy *et al.*, 2008).

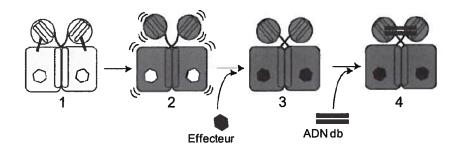


Figure 15. Représentation schématisée des changements de conformation de CprK1 pour la liaison à l'ADN (tirée de Mazon *et al.*, 2007). (1) CprK1 en conditions oxydées; (2) CprK1 en conditions réduites; (3) CprK1 en conditions réduites, en présence de l'effecteur; (4) CprK1 lié à l'ADN double brin en conditions réduites, en présence de l'effecteur.

Cinq gènes pouvant coder pour des protéines CprK, *cprK1-5*, et onze séquences « dehalobox » (DB0 à DB10), qui divergent plus ou moins de la séquence consensus TTAAT-N₄-ATTAA, ont été identifiées dans le génome de *D. hafniense* DCB-2 (figure 16). La localisation des « dehalobox » hypothétiques est montrée dans la figure 17. Des essais *in vivo* effectués afin de déterminer la spécificité de CprK1, CprK2 et CprK4 en présence de 3Cl-4OHPA pour les différentes « dehalobox » ont montré que CprK1 avait une affinité très

forte pour la séquence consensus TTAAT-N₄-ATTAA (DB7), localisée dans la région promotrice des gènes *cprBA1C*. CprK1 se lie aussi fortement à DB5 et plus faiblement à DB6, localisées respectivement en amont des gènes *cprK1* et *cprZE*. CprK2 se lie principalement aux séquences promotrices DB1 et DB3, en amont des gènes *cprBA2* et *cprK3* respectivement, et se lie plus faiblement aux séquences DB2 et DB4, en amont des gènes des gènes *cprBA3* et *cprZECD* respectivement. CprK4 se lie fortement à DB8, localisée en amont du gène *macA*, même en absence de 3C1-4OHPA, et à la séquence DB7 (Gabor *et al.*, 2008).

Des tests de EMSA (« *electrophoretic mobility shift assay* » ou retard sur gel) ont montré que la liaison de CprK1 à la séquence consensus TTAAT-N₄-ATTAA est principalement induite par le 3-Cl-4OHPA et le 2,4-DCP, deux composés substitués en position *ortho* (Gabor *et al.*, 2008). Une autre étude a montré que le 3Cl-4OHPA, le 2,4-DCP, le 2-Br-4-CP et le 2,4,5-TCP se lient à CprK1 et entraînent la liaison de CprK1 à l'ADN à faible concentration (40 μM). Le 2,4,6-TCP peut se lier à CprK1 à 40 μM, mais le complexe protéique ne se lie pas à l'ADN. Le 2,3-DCP forme un complexe capable de se lier à l'ADN seulement à 400 μM et le 4-OHPA, le 3,5-DCP et le AMPc ne se lient pas à CprK1, même à fortes concentrations (Mazon *et al.*, 2007).

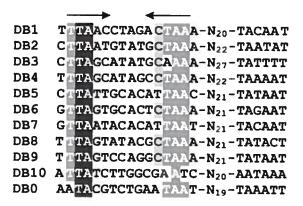


Figure 16. Alignement de séquences des « dehalobox » putatives chez D. hafniense DCB-2 (tirée de Gabor et al., 2008). Des flèches sont placées au dessus de la séquence répétée inverse de 5 nucléotides. Les séquences promotrices TATAAT (ou « Pribnow box ») situées environ 10 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription sont montrées.

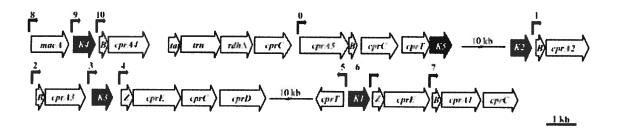


Figure 17. Localisation des séquences « dehalobox » putatives pour la liaison de CprK chez *D. hafniense* DCB-2 (tirée de Gabor *et al.*, 2008). Les sites de liaison putatifs 0 à 10 sont indiqués par une flèche.

2.6.2 Autres régulateurs identifiés chez Dehalococcoides

L'analyse du génome de *D. ethenogenes* 195 a démontré que tous les gènes de déshalogénases réductrices, *rdhAB*, à l'exception du gène *tceA* codant pour la TCE RDase, étaient associés aux gènes de systèmes régulateurs à deux composantes qui sont composés d'une histidine kinase et d'un régulateur de réponse. Les histidines kinases identifiées contiennent un motif PAS/PAC et n'ont pas de domaine transmembranaire (Seshadri *et al.*, 2005), ce qui indique qu'elles pourraient avoir un rôle de senseur du potentiel redox ou du statut énergétique de la cellule et que ces systèmes régulateurs agiraient dans le cytoplasme (Taylor et Zhulin, 1999).

Une analyse génomique de la souche *Dehalococcoides* CBDB1 a permis d'identifier 15 systèmes régulateurs à deux composantes et 13 régulateurs de type MarR associés aux gènes *rdhAB*. Trois régulateurs de type MarR associés aux gènes *rdhAB* ont aussi été trouvés chez *D. ethenogenes* 195 (Kube *et al.*, 2005). Les régulateurs MarR sont des répresseurs qui se fixent à l'ADN grâce à un domaine hélice-tour-hélice. La liaison de la protéine à l'ADN est rompue en présence d'un effecteur, permettant la transcription des gènes sous son contrôle. Les composés aromatiques sont connus comme étant des effecteurs des régulateurs MarR (Alekshun et Levy, 1999; Tropel et van der Meer, 2004).

La VC RDase chez *Dehalococcoides* sp. VS est une RDase de type *cprA/pceA* qui est codée par l'opéron *vcrABC*. VcrC a 25 % d'identité avec la séquence en acide aminé de la protéine CprC de *D. dehalogenans* et pourrait être impliquée dans la régulation transcriptionnelle des gènes de déshalogénases réductrices (section 2.5.1). Quatre cadres de lectures ouverts similaires à *vcrC* ont été trouvés chez *D. ethenogenes* 195. Deux d'entre eux sont à proximité de gènes codants pour des RDases putatives et les deux autres sont à proximité des gènes similaires à *tatB* et *tatC*, pouvant coder pour des composantes du complexe de sécrétion TAT (Muller *et al.*, 2004).

2.6.3 Études transcriptionnelles effectuées chez Dehalococcoides

Différentes études se sont intéressées à l'effet des chloroéthènes sur la transcription des gènes codant pour des RDases de cultures mixtes ou pures de *Dehalococcoides*.

L'expression du gène *tceA* d'une culture mixte de *D. ethenogenes* 195 augmentait 90 fois en présence de TCE. Le niveau d'ARN de la culture exposée au TCE diminuait lorsque le milieu de culture était remplacé par un milieu sans TCE et atteignait un niveau de base après 2 jours. La demi-vie de l'ARN du gène *tceA* était de 4,8 h (Lee *et al.*, 2006b).

L'expression du gène *tceA* d'un enrichissement de culture de *Dehalococcoides* augmentait 40 fois suivant l'ajout de TCE, de *cis*-DCE et de 1,1-DCE mais n'était pas affecté par l'ajout de PCE et de VC. L'expression a augmenté 30 fois suivant l'ajout de *trans*-DCE, une molécule que l'enrichissement de culture ne peut pas utiliser pour sa croissance. Le niveau d'expression était comparable à des concentrations de chloroéthènes variant entre 2,2 et 333 µM. Il n'était pas affecté par la concentration d'hydrogène entre 12 nM et 17 µM, ni par la présence d'un accepteur d'électrons alternatif comme le fumarate, le sulfate, le sulfite, le thiosulfate, le nitrate, et le nitrite. Par contre, le niveau d'expression augmentait avec la température (Johnson *et al.*, 2005).

Une culture de *D. ethenogenes* 195 exposée au PCE effectuait la déshalogénation du PCE en VC et du 2,3-DCP en 3-CP tandis qu'une culture cultivée en présence de 2,3-DCP effectuait la déshalogénation du PCE en TCE et du 2,3-DCP en 3-CP. Fung *et al.* (2007) ont mesuré par RT-PCR en temps réel le niveau d'expression de 19 gènes de RDases, normalisé par rapport au gène de l'ARN de la polymérase *rpoB*, en présence de PCE, de TCE ou de 2,3-DCP. La transcription du gène *pceA* était plus élevée que celle de *rpoB* avec le PCE, le TCE et le 2,3-DCP. La transcription du gène *tceA* et du gène *rdhA* codant pour une RDase putative (DET0162) était plus élevée seulement en présence de PCE et de TCE. Celle des autres gènes était inférieure à l'expression de *rpoB* et le niveau d'expression variait selon le gène et selon la présence de PCE, de TCE ou de 2,3-DCP. Une analyse protéomique LC/MS/MS (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem) a identifié la TceA et la PceA comme étant les protéines les plus abondantes de la fraction membranaire d'une culture cultivée avec du PCE. La PceA était toujours aussi abondante lorsque la culture était cultivée avec du 2,3-DCP, mais la TceA n'était plus détectée. Ces

résultats suggèrent que la PceA pourrait avoir une activité de déshalogénation des chlorophénols (Fung et al., 2007).

Rahm et al. (2006) ont mesuré le niveau d'expression de différents gènes impliqués dans la respiration d'une culture mixte de *D. ethenogenes* 195 mis en présence de PCE. Le niveau d'expression était normalisé par rapport au gène rpoB. L'expression du gène fdh codant pour une formiate déshydrogénase putative, du gène hup codant pour l'hydrogénase principale lors de la déshalorespiration, du gène tceA et du gène rdhA DET0162 était augmentée en moyenne par un facteur de 34, 23, 16 et 13, respectivement suite à l'ajout de PCE. Le PCE et le TCE étaient complètement transformés en VC après 4 h. L'expression des gènes fdh et hup atteignait leur niveau maximal en 1 h et décroissait après 3 h. Le gène tceA et le gène DET0318 atteignaient leur sommet d'expression après 4 h. Le sommet d'expression du gène rdhA DET1559 était atteint après 6 h et celui du gène rdhA DET0162 après 1 h. L'expression du gène DET1545 augmentait progressivement à partir de 3 h (Rahm et al., 2006).

L'expression des gènes hup, fdh, tceA, pceA, rdhA DET1559 et rdhA DET1545 d'une culture en continu d'un enrichissement de culture contenant D. ethenogenes 195 a été mesurée à différents taux de respiration du PCE. À un taux de respiration faible, la transcription des gènes de RDases putatives DET1559 et DET1545 était induite respectivement par un facteur de 25 et de 2,4 par rapport au niveau d'expression avant l'ajout de PCE. L'expression des autres gènes était inchangée (Rahm et Richardson, 2008a). À un taux de respiration plus élevé, le niveau de transcription des gènes tceA, pceA, rdhA DET1545, rdhA DET1559 et hup augmentait jusqu'à un certain seuil, puis le niveau de la transcription se maintenait ou diminuait. Seul le niveau de la transcription du gène fdh continuait d'augmenter à des taux de respiration très élevés (Rahm et Richardson, 2008a; Rahm et Richardson, 2008b).

Une analyse transcriptomique a permis d'identifier plus de 415 gènes chez D. ethenogenes 195 dont la transcription était affectée lors de la transition entre la phase exponentielle et la phase stationnaire de croissance. Le niveau de transcription de deux gènes codant pour des RDases putatives (DET0311, DET1559) était augmenté d'un facteur de 2 à 3 et celui de quatre autres gènes de RDases putatives (DET0173, DET0180, DET1535, DET1545) était augmenté d'un facteur de 8 à 10. La transcription des gènes tceA, pceA et

hup était stable dans des conditions où l'hydrogène et le TCE étaient en excès, même 30 jours suivant l'arrêt de la croissance, suggérant que l'expression de la RDase et de l'hydrogénase n'est pas couplée à la croissance. Les concentrations élevées de TCE et d'hydrogène pourraient expliquer le maintien de l'expression de ces gènes (Johnson *et al.*, 2008).

2.7 Objectifs de l'étude

La production en quantité importante de composés halogénés, leur utilisation industrielle et la nature persistante et toxique de certaines de ces substances ont entraîné une contamination environnementale importante et motivé la recherche de bioprocédés efficaces. L'utilisation des microorganismes anaérobies est une avenue prometteuse pour la biorestauration des sites contaminés, mais il reste beaucoup d'efforts à investir pour développer des procédés anaérobies de biodégradation efficace. Diverses études ont permis de caractériser des bactéries anaérobies strictes effectuant la déshalorespiration et d'identifier des enzymes responsables de l'activité de déshalogénation. Des déshalogénases réductrices de la famille des CprA-PceA seraient principalement responsables de ces réactions. Les enzymes impliquées dans la déshalogénation de composés aromatiques halogénés qui ont été purifiées jusqu'à maintenant agiraient principalement sur les molécules faiblement chlorées. D. hafniense PCP-1, isolée d'un consortium méthanogène, est un microorganisme pouvant dégrader efficacement le PCP. Cette souche possède la capacité de déshalogéner le PCP en 3-CP et plusieurs déshalogénases de type CprA-PceA ont été identifiées. Nos connaissances concernant ces déshalogénases réductrices produites par des microorganismes anaérobies ainsi que leur fonctionnement sont encore très limitées.

Le but de ce projet de recherche consiste à étudier les déshalogénases réductrices impliquées dans la déshalogénation du PCP et autres chlorophénols produites par D. hafniense PCP-1. Plus spécifiquement, l'étude vise à effectuer la purification et la caractérisation d'une nouvelle déshalogénase réductrice produite par la souche PCP-1 ayant une forte activité de déshalogénation du PCP. À ce jour, aucune enzyme pouvant déshalogéner efficacement le PCP n'a été purifiée. Dans un deuxième temps, l'étude vise à étudier les effets des chlorophénols et de différentes conditions de culture sur le niveau d'expression des gènes cprA2-5 de la souche PCP-1 par RT-PCR en temps réel. Alors que

différentes études transcriptionnelles ont été réalisées chez les bactéries du genre Dehalococcoides effectuant principalement la déshalogénation des chloroéthènes, il existe peu d'études sur la transcription des gènes de déshalogénases réductrices chez les bactéries du genre Desulfitobacterium pouvant déshalogéner un large spectre de chlorophénols. La réalisation des travaux proposés dans ce projet permettra d'acquérir des connaissances fondamentales sur les déshalogénases réductrices, et ultimement, d'améliorer les capacités de dégradation de la souche PCP-1.

CHAPITRE I

Purification et caractérisation d'une nouvelle déshalogénase réductrice produite par Desulfitobacterium hafniense PCP-1 ayant une forte activité de déshalogénation du PCP

3.1 Rappel de la problématique et objectifs de la recherche

La plupart des RDases purifiées à ce jour ont été isolées de la membrane dans des conditions anaérobies et sont de type CprA/PceA. Cette famille d'enzymes se caractérise par la présence d'un cofacteur corrinoïde, de deux centres fer-soufre et d'un peptide signal TAT (Villemur et al., 2006). Des analyses génomiques ont révélé la présence de plusieurs gènes codant pour des RDases de type CprA/PceA hypothétiques chez différentes souches de Desulfitobacterium et Dehalococcoides. La présence de multiples gènes cprA/pceA laisse présager que les bactéries anaérobies effectuant la déshalogénation possèdent des enzymes distinctes ayant des spécificités différentes. Quatre gènes cprA ont été identifiés chez la souche D. hafniense PCP-1 (Villemur et al., 2002). Cette souche se distingue des autres parce qu'elle peut effectuer la déshalogénation du PCP et de différents chlorophénols aux positions ortho, meta et para. Une déshalogénase, CrdA, pouvant déshalogéner principalement en position ortho a été purifiée d'une culture induite par le 2,4,6-TCP (Boyer et al., 2003). Une autre enzyme, CprA5, pouvant déshalogéner le 3,5-DCP de même que certains autres chlorophénols principalement en positions meta et para a été purifiée d'une culture induite par le 3,5-DCP (Thibodeau et al., 2004).

Une forte activité **PCP** de déshalogénation du 2.3.4.5-TeCP en (204,1 nmoles/min*mg de protéines) avait été mesurée avec un extrait membranaire brut d'une culture de D. hafniense PCP-1 induite au 2,4,6-TeCP lors des études de caractérisation de la CrdA (Boyer et al., 2003). Des essais entrepris dans le but de vérifier si une biomasse induite au 2,4,6-TCP produisait une RDase différente de la CrdA capable de déshalogénation du PCP ont confirmé la présence d'une autre enzyme. La présence de cette nouvelle déshalogénase réductrice chez la souche PCP-1 ayant une forte activité de déshalogénation du PCP nous fournit une opportunité unique d'acquérir des connaissances sur le fonctionnement de ces enzymes. Jusqu'à présent, les bactéries anaérobies et les

déshalogénases réductrices étudiées ont démontré une activité de déshalogénation du PCP relativement faible.

Les objectifs du projet présenté dans cette section sont : (1) effectuer la purification d'une nouvelle déshalogénase réductrice capable de déshalogénation du PCP; (2) identifier le gène codant pour l'enzyme; (3) effectuer la caractérisation biochimique de l'enzyme.

3.2 Matériel et méthodes

3.2.1 Manipulations en conditions anaérobies

Une chambre anaérobie (Bactron Anaerobic Environmental Chamber, modèle BACII, Sheldon Manufacturing Inc., Orégon, É.-U.) a été utilisée pour exécuter la majorité des manipulations nécessitant des conditions anaérobies. Le mélange gazeux dans l'enceinte anaérobie était composé de 10 % de H₂, 10 % de CO₂ et 80 % de N₂.

Pour rendre une solution anaérobie, la solution est placée dans une jarre anaérobie et des lavages sont effectués en alternant l'introduction d'un mélange gazeux (10 % de H₂, 10 % de CO₂ et 80 % de N₂) et l'évacuation du gaz par l'application d'un vide (figure 37). La jarre est ensuite transférée dans la chambre anaérobie et la solution est transvidée dans une bouteille de sérum de 12 à 100 ml (Canlab, Pointe-Claire, QC, Canada). La bouteille de sérum est fermée avec un bouchon de butyle (Geo-Microbial Technologies, Ochelata, N.J, É.-U.) fixé par un anneau en métal. Le prélèvement d'une solution de la bouteille de sérum à l'extérieur de l'enceinte anaérobie est effecté avec une seringue. Pour stériliser une solution anaérobie, la solution est prélevée et filtrée sur 0,2 μm (Starsted, Montréal, QC, Canada) dans une bouteille de sérum anaérobie préalablement stérilisée par autoclavage.

3.2.2 Provenance de D. hafniense PCP-1

D. hafniense PCP-1 (ATCC 700357) a été isolée d'un consortium méthanogénique enrichi de sols contaminés au PCP pouvant dégrader complètement le PCP (Juteau et al., 1995a; Juteau et al., 1995b; Bouchard et al., 1996). D. hafniense PCP-1 est conservée sous forme lyophilisée et sous forme congelée à -80 °C dans un milieu liquide anaérobie dans des bouteilles de sérum.

3.2.3 Culture de D. hafniense PCP-1 dans des bouteilles de sérum

Le milieu de culture liquide anaérobie (MLA) utilisé était un milieu minéral de Boyd et al. (1983) supplémenté d'extrait de levure (Difco, Détroit, MI, É.-U.) 0,1 % (p/v) et de pyruvate (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) 55 mM. Une solution composée des substances suivantes a été préparée dans un premier temps : 0,27g/l de KH₂PO₄ (J.T. Baker, Phillipsburg, N.J., É.-U.), 0,35 g/l de K₂HPO₄ (J.T. Baker), 0,53g/l de NH₄Cl (J.T. Baker),

0,001 g/l de résazurin (Sigma-Aldrich) et 10 ml/l d'une solution stock de minéraux (0,1 g/l : MnCl₂·2H₂O (J.T. Baker); ZnCl₂ (J.T. Baker); CoCl₂·6H₂O (J.T. Baker); H₃BO₃ (J.T. Baker); Na₂MoO_{4·2}H₂O (Anachemia, Montréal, QC, Canada)). Le pH de la solution a été ajusté à 7,8 avec une solution saturée de NaHCO₃ (BDH Inc., Toronto, ON, Canada). Ensuite, la solution a été transférée dans des ballons de 500 ml par volume de 250 ml et bouillie pendant 1 h sous une colonne réfrigérante. La solution a ensuite été transférée dans des bouteilles de sérum de 70 ml par volumes de 35 ml et barbotée avec un mélange gazeux (10 % de H₂, 10 % de CO₂ et 80 % de N₂) pendant 5 min. Les bouteilles de sérum ont été fermées avec un bouchon de butyle fixé par un anneau en métal puis stérilisées par autoclavage à 120 °C pendant environ 20 min. Ensuite, des solutions anaérobies de 0,05 g/l de Na₂S·9H₂O (BDH Inc.), 0,1 % d'extrait de levure, 55 mM de pyruvate, 0,10 g/l de MgCl₂.6H₂O (Mallinckrodt, Paris, KY), 0,073 g/l de CaCl₂.2H₂O (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) et 0,005 g/l de FeCl₂.4H₂O (Anachemia) et du 2,4,6-TCP 50 μM (Sigma-Aldrich) ont été stérilisées par filtration sur 0,2 μm et ajoutées au milieu avec une seringue aux concentrations finales indiquées.

Une bouteille de sérum contenant 35 ml de MLA a été inoculée avec 3 ml d'une culture de la souche PCP-1 conservée à -80 °C ou avec 1,5 ml d'une culture en phase exponentielle de croissance (D.O. à 600 nm entre 0,3 et 0,5). La culture a été incubée à 37 °C pendant 24 à 48 h.

3.2.4 Purification de la PCP déshalogénase réductrice

3.2.4.1 Culture de D. hafniense PCP-1 dans une bouteille en verre de 15 litres

D. hafniense PCP-1 a été cultivée dans une bouteille en verre de 15 litres contenant 9 litres de MLA pour les expériences portant sur la purification et la caractérisation de la PCP RDase et une préculture de 500 ml cultivée dans une bouteille de Schott de 1 litre a servi d'inoculum. Le milieu MLA a été préparé de la façon suivante : 9 litres d'une solution contenant 1,74 g/l de K₂HPO₄, 0,53 g/l de NH₄Cl, 0,001 g/l de résazurin et 1 ml/l d'une solution stock de minéraux (0,1 g/l: MnCl₂·2H₂O, ZnCl₂, CoCl₂·6H₂O, H₃BO₃ et Na₂MoO_{4·2}H₂O) a été préparée dans une bouteille en verre de 15 litres et un volume de 500 ml de la solution a été transféré dans une bouteille de Schott de 1 litre. Les bouteilles ont été stérilisées par autoclavage à 120 °C pendant 3 h, puis barbotées avec un mélange gazeux

(10 % de H₂, 10 % de CO₂ et 80 % de N₂) pendant 1 h (figure 38). Ensuite, une solution de Na₂S'9H₂O a été stérilisée par filtration avec un filtre de 0,2 μm et ajoutée au milieu avec une seringue à une concentration finale de 0,05 g/l. Une solution anaérobie d'extrait de levure 0,1 %, de pyruvate 55 mM, de 2,4,6-TCP 50 μM, de 0,1 g/l MgCl₂.6H₂O, de 0,073 g/l CaCl₂.2H₂O et de 0,005 g/l FeCl₂.4H₂O (concentrations finales) a été stérilisée par filtration sur 0,2 μm et ajoutée de façon anaérobie à la bouteille de Schott de 1 litre et à la bouteille en verre de 15 litres.

Une bouteille de Schott de 1 litre contenant 500 ml de MLA a été inoculée avec 35 ml d'une culture en phase exponentielle de croissance cultivée dans une bouteille de sérum de 70 ml. Après 24 h d'incubation à 30 °C, le contenu de la bouteille de Schott (500 ml) a été transvidé de façon anaérobie dans la bouteille en verre de 15 litres contenant 9 litres de MLA préchauffé à 37 °C. La culture a d'abord été incubée à 37 °C pendant 6 h afin de favoriser la croissance bactérienne, puis la température d'incubation a été diminuée à 28 °C pour les 42 dernières heures d'incubation. Des échantillons ont été prélevés périodiquement avec une seringue afin de vérifier la pureté de la culture par coloration de Gram, le pH du milieu, la densité optique à 600 nm et la transformation du 2,4,6-TCP. Le pH a été ajusté au besoin avec une solution stérile saturée de NaHCO3 pour maintenir le pH à une valeur au dessus de 7,2. Du 2,4,6-TCP 25 µM a été ajouté après environ 8, 24, et 31 h d'incubation. Pour le dosage des chlorophénols, 0,5 ml d'acétonitrile (Fisher Scientific) contenant 0,33 % (v/v) d'acide acétique (Fisher Scientific) a été ajouté à 1 ml de culture. La suspension a été centrifugée à 13 000 x g pendant 5 min et le surnageant a été récupéré pour l'analyse par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP).

Les cellules ont été récoltées à la fin de la phase exponentielle de croissance par centrifugation à 9,000 x g à 4 °C pendant 20 min dans des bouteilles de polycarbonate (Beckman, Palo, Alto, CA, É.-U.) de 500 ml. Les culots de cellules ont été repris à l'intérieur de l'enceinte anaérobie dans 300 ml de tampon phosphate de potassium 50 mM à pH 7,5 contenant du DTT 1 mM (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, É.-U.). Les bouteilles ont été fermées hermétiquement, puis centrifugées à nouveau à 9,000 x g à 4 °C pendant 20 min. Ensuite, le culot de bactéries a été divisé en fractions d'environ 2 g à l'intérieur de l'enceinte anaérobie dans des bouteilles de sérums de 12 ml. Les bouteilles ont été fermées et les

bactéries ont été conservées telles quelles à -80 °C. Une culture de 9 litres produisait environ 5 fractions de 2 g de bactéries.

3.2.4.2 Fractionnement cellulaire

Les culots de bactéries conservées à -80 °C ont été repris à l'intérieur de l'enceinte anaérobie dans 30 ml de tampon phosphate de potassium 50 mM à pH 7,5 contenant du DTT 1 mM et du fluorure de phénylméthanesulfonyl (PMSF; Sigma-Aldrich) 57 μM. Les cellules ont été brisées par deux passages à la presse de French (Aminco, Silver Spring, modèle 5-598, MA, É.-U.) à une pression de 1200 psi dans un montage en circuit fermé pour minimiser l'exposition à l'oxygène. Ensuite, la suspension de cellules brisées a été versée dans un tube en plastique de 40 ml à l'intérieur de l'enceinte anaérobie puis centrifugée à 17 000 x g à 4 °C pendant 30 min pour enlever les débris cellulaires. Le surnageant a été transféré dans des tubes de 40 ml pour ultracentrifugeuse (Beckman), toujours à l'intérieur de l'enceinte anaérobie, et centrifugé à 160 000 x g à 4 °C pendant 90 min.

3.2.4.3 Solubilisation des protéines de la membrane

Plusieurs essais ont été effectués pour mettre au point le tampon de solubilisation utilisé pour la purification de la PCP RDase. Les tampons de solubilisation testés étaient des tampons phosphatés contenant du DTT, du glycérol (Fisher Scientific) et un détergent. Des concentrations de glycérol variant entre 10 et 20 % (v/v) ont été testées. Les détergents testés étaient le Triton X-100 (Bio-Rad Laboratories) à 0,1, 1 et 3 % (v/v) et le CHAPS (Roche diagnostics, Laval, QC, Canada) à 6, 10, 15 et 30 mM. Le tampon de solubilisation finalement utilisé pour la purification de la PCP RDase était un tampon phosphate de potassium 50 mM à pH 6,5 contenant du DTT 1 mM, du glycérol 20 % et du Triton X-100 3 %. Le culot composé de membranes cellulaires a été repris dans 5 ml de tampon de solubilisation. Après 45 min d'incubation à 4 °C sous agitation, la préparation a été transférée dans des tubes de 10 ml pour ultracentrifugeuse (Beckman) et centrifugée à 160 000 x g à 4 °C pendant 90 min.

3.2.4.4 Chromatographies liquides

De nombreux essais ont été effectués dans le but d'élaborer une méthode pour la purification de la PCP RDase. Des chromatographies ont été effectuées sur colonnes échangeuses ioniques (DEAE-5PW, 8.0 x 75 mm; Waters Corporation, Milford, MA, É.-U. et Mono Q-HR 10/10, 10 mm x 10 cm; Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède), sur minicolonnes échangeuses ioniques (Sep-Pak QMA light et CM light; Waters Corporation), sur tamis moléculaire (Protein Pak 300SW, 8,0 x 300 mm; Waters Corporation) et sur colonnes d'interactions hydrophobes (Macro-Prep Butyl, Macro-Prep Methyl, Hitrap Butyl HP et Hitrap Phenyl HP; Bio-Rad Laboratories). Les chromatographies ont été effectuées avec le système Waters 650 Advanced Purification System (Millipore-Waters, Mississauga, ON, Canada). Les protéines ont été détectées par leur absorbance à une longueur d'onde de 280 nm. Les fractions protéiques ont été collectées manuellement dans des bouteilles de sérum anaérobies avec une aiguille afin de limiter l'exposition à l'oxygène. Les fractions ont ensuite été introduites dans l'enceinte anaérobie pour effectuer des prélèvements. Après chaque chromatographie, l'activité enzymatique a été mesurée, un dosage de protéines a été effectué et le profil protéique des fractions a été évalué par SDS-PAGE.

Une méthode a finalement été mise au point pour la purification de la PCP RDase. La fraction de membranes solubilisées a été filtrée sur 0,2 μm, puis injectée sur la colonne Protein Pak DEAE-5PW (8.0 x 75 mm). La colonne avait été préalablement équilibrée avec un tampon phosphate de potassium 50 mM à pH 6,5 contenant du DTT 1 mM, du glycérol 10 % et du Triton X-100 0,1 %. L'élution a été effectuée avec un gradient linéaire de 0 à 1 M NaCl (Fisher Scientific) à un débit 1 ml/min. Les fractions contenant l'activité enzymatique ont été combinées à l'intérieure de l'enceinte anaérobie. Ensuite, du (NH₄)₂SO₄ 0,5 M a été ajoutée et la préparation enzymatique a été filtrée sur 0,2 μm avant d'être injectée sur la colonne Hitrap Butyl HP (1ml). La colonne avait été équilibrée avec un tampon phosphate de potassium 50 mM à pH 6,5 contenant du DTT 1 mM, du glycérol 10 % et du (NH₄)₂SO₄ 0,5 M (tampon A). L'enzyme a été éluée dans le tampon A à un débit de 1 ml/min avec un gradient linéaire de sulfate d'ammonium de 0,5 à 0 M en 10 min, suivi d'un gradient linéaire de CHAPS de 0 à 6 mM en 10 min, et d'un plateau de CHAPS 6 mM pendant 10 min. L'enzyme était éluée à environ 22 min.

3.2.5 Dosage de l'activité enzymatique

L'essai enzymatique standard pour le dosage de l'activité de déshalogénation a été effectué en conditions anaérobies dans un tampon d'activité enzymatique (TA) composé de phosphate de potassium 100 mM à pH 7,0, de citrate de titane (III) 2 mM, de méthyle de viologène 2 mM (Sigma-Aldrich), de glycérol 20 % et de PCP (Sigma-Aldrich) 0,25 mM ou d'un autre composé halogéné à 1 mM. Les dosages ont été effectués dans des bouteilles du sérum de 12 ml contenant 2,0 ml de TA préchauffé à 37 °C. La réaction a été initiée en ajoutant 100 µl de la préparation enzymatique avec une seringue. Après 20 à 45 min d'incubation à 37 °C, la réaction a été arrêtée en ajoutant 1 ml d'acétonitrile contenant 0,33 % d'acide acétique. Ensuite, 1 ml de l'échantillon a été transféré dans un microtube de 1,5 ml et centrifugé 5 min à 13 000 x g. Le surnageant a été transféré dans une fiole de 1 ml pour l'injecteur automatique du système de CLHP. Tous les dosages enzymatiques ont été effectués en duplicata ou en triplicata.

3.2.6 Analyse des chlorophénols et autres composés aromatiques

Les produits du dosage de l'activité enzymatique ont été analysés par CLHP. L'appareil de CLHP (modèle 600; Waters Corporation) était couplé à un spectrophotomètre (modèle 486; Waters Corporation) et à un injecteur automatique (modèle 717 Plus; Waters Corporation). Le système était dirigé par ordinateur avec le logiciel Empower 2 (Waters Corporation).

Les chlorophénols ont été analysés avec une colonne hydrophobe NovaPak C₁₈ (3,9 x 150 mm; Waters Corporation), à une longueur d'onde de 220 nm (Juteau *et al.*, 1995a). Deux phases mobiles ont été utilisées : la phase mobile A était composée d'eau déionisée et d'acide acétique à 0,1 % et la phase mobile B était composée d'acétonitrile et d'acide acétique à 0,1 %. La colonne était équilibrée avec 70 % de la phase mobile A et 30 % de la phase mobile B. La concentration de la phase mobile A a été diminuée à 45 % et la concentration de la phase mobile B a été augmentée à 55 % en 4 min avec un gradient linéaire, à un débit de 2 ml/min. La concentration d'acétonitrile a été maintenue à 55 % pendant 6 min, puis ramenée aux conditions initiales de la colonne (70 % de la phase mobile A et 30 % de la phase mobile B) en 3 min avec un gradient concave, toujours à un débit de 2 ml/min.

Une colonne hydrophobe NovaPak C₁₈ (3,9 x 150 mm) équilibrée avec 100 % d'eau déionisée a été utilisée pour l'analyse par CLHP des composés aromatiques suivant : 4-chlorophénoxy acide acétique; 2,4-dichlorophénoxy acide acétique; 4OHPA; 3Cl-4OHPA; 3Cl-4OHBA; 3,5-DCl-4OHBA; 2,4,6-TCBA; 3,4,5-TCBA. Un gradient linéaire de 100 % d'eau déionisée à 100 % de méthanol (Fisher Scientific) en 10 min à un débit de 1 ml/min a été utilisé. Ces conditions ont été maintenues pendant 10 min, puis ramenées aux conditions initiales (100 % d'eau déionisée) en 3 min avec un gradient linéaire. La longueur d'onde pour la détection était de 270 nm.

3.2.7 Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été effectué selon la méthode de Bradford utilisant la trousse de Bio-Rad (« Bio-Rad Protein Assay »; Bio-Rad Laboratories) (Bradford, 1976). Une courbe standard entre 2,5 µg et 10 µg a été produite avec de l'albumine sérique bovine (Sigma-Aldrich).

3.2.8 Électrophorèse en gel de polyacrylamide avec SDS

Le profil protéique des fractions obtenues à la suite des différentes étapes de purification a été évalué par SDS-PAGE selon la méthode de Laemmli (Laemmli, 1970). Les gels de polyacrylamide 10 % (p/v) contenant du SDS 0,1 % (p/v) (Bio-Rad Laboratories) et du Tris (Tris(hydroxyméthyl)aminométhane; Bio-Rad Laboratories) 0,375 M à pH 8,8 ont été préparés selon la méthode de Bio-Rad (« Reagent and gel preparation for Laemmli SDS polyacrylamide gel electrophoresis »; Bio-Rad Laboratories). Un mélange de 48 μL de l'échantillon à analyser et de 12 μL de tampon de chargement (Tris HCl 62,5 mM à pH 6,8, glycérol 20 %, SDS 2 % et β-mercaptoéthanol 5 % (v/v)) dans un microtube de 1,5 ml a été chauffé à 100 °C pendant 5 min pour dénaturer les protéines. L'échantillon a été chargé sur le gel et la migration a été effectuée à 200 volts (0,03 Amp) pendant environ 45 min dans un tampon de Tris 25 mM à pH 8,3 contenant de la glycine 192 mM et du SDS 0,1 %. Des standards protéiques de faibles poids moléculaires de Bio-Rad (97, 66, 45, 31, 21 et 14 kDa) ont été utilisés. Le gel a été coloré au bleu de Coomassie ou au nitrate d'argent. Pour la coloration au bleu de Coomassie le gel a été immergé pendant 30 min dans une solution de méthanol 40 %, d'acide acétique 10 % et de bleu de Coomassie R-250 0,1 % (p/v) (Bio-Rad

Laboratories). Le gel a ensuite été décoloré dans la même solution sans bleu de Coomassie. Pour la coloration à l'argent, les produits « Silver Stain Plus » de Bio-Rad ont été utilisés selon la méthode décrite par le fabricant.

3.2.9 Analyse des protéines en spectrométrie de masse

Les bandes d'intérêts séparées par SDS-PAGE ont été découpées et envoyées pour identification au service de spectrométrie de masse de l'INRS-Institut Armand-Frappier dirigé par le professeur François Lépine (Charbonneau *et al.*, 2007). Les bandes ont été digérées par la trypsine (Promega, Madison, WI, É.-U.) et les peptides générés ont été extraits du gel selon la méthode décrite par Hellman *et al.* (1995). L'appareil triple quadripôle à trappe d'ions (Q-Trap LC/MS/MS; Applied Biosystems, MDS SCIEX Instruments, CA, É.-U.) utilisé pour l'analyse en spectrométrie de masse était équipé d'une une source d'ionisation nanospray. Une recherche dans les banques de données a été effectuée avec le logiciel d'analyse Mascot Server 2,0 (Matrix Science, Londres, UK) pour identifier les protéines pouvant générer les patrons de fragmentation des peptides.

3.2.10 Manipulations de l'ADN et séquençage d'un fragment du gène cprA3

3.2.10.1 Extraction de l'ADN génomique

L'extraction de l'ADN génomique de *D. hafniense* PCP-1 a été réalisée par la méthode de broyage par billes de verre, suivie d'une extraction au phénol-chloroforme (Gauthier *et al.*, 2006). Un volume de 5 ml d'une culture incubée à 30 °C pendant 48 h a été prélevé et centrifugé à 7700 x g pendant 10 min à la température de la pièce. Le culot bactérien a été dispersé dans 1 ml de tampon TEN (Tris-HCl 50 mM (Fisher Scientific), EDTA.2Na 10 mM (Fisher Scientific), NaCl 150 mM, pH 8,0) et transféré dans un microtube de 1,5 ml. La suspension a été centrifugée pendant 5 min à 13 000 x g. Le culot a été dispersé dans 500 µl de tampon TEN et transféré dans un microtube vissé stérile de 1,5 ml contenant 250 mg de billes de verre de 0,25 à 0,5 mm de diamètre (Fisher Scientific) et placé sur glace. Ensuite, 25µL de SDS 20 % et 500 µl de phénol (Fisher Scientific) : chloroforme (Fisher Scientific) : alcool isoamylique (A&C Produits Chimiques Américains, Montréal, QC, Canada) (25 : 24 : 1) ont été ajoutés. Les cellules ont été homogénéisées 2 fois à une vitesse

de 4,0 pendant 30 secondes avec l'appareil FastPrep 24 Instrument (MP BioMedicals, Solon, OH, É.-U.). Le tube a ensuite été centrifugé 15 min à 13 000 x g et le surnageant a été transféré dans un microtube de 1,5 ml. Un volume égal d'une solution de chloroforme : alcool isoamylique (49 : 1) a été ajouté. La suspension a été mélangée par inversion pendant 1 min puis centrifugée pendant 1 min à 13 000 x g. La phase aqueuse a été transférée dans un microtube de 1,5 ml et 2 volumes d'éthanol 100 % (Éthanol Greenfield Inc., Brampton, ON, Canada) et ¼ de volume d'acétate d'ammonium 10M (A&C Produits Chimiques Américains) ont été ajoutés. La suspension a été mélangée par inversion puis placée à -20 °C pendant 2 à 16 h pour précipiter les acides nucléiques. Le tube a ensuite été centrifugé à 13 000 x g pendant 15 min. Le culot a été lavé avec de l'éthanol 70 %, centrifugé pendant 2 min et séché. Ensuite, le culot a été dissous dans 50 μl d'H₂O stérile. La concentration d'ADN a été estimée par lecture de l'absorbance avec l'appareil NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific NanoDrop Products, Wilmington, DE, É.-U.). Les extractions ont été vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose. L'ADN a été conservé à -20 °C.

3.2.10.2 Électrophorèse en gel d'agarose de l'ADN

Les échantillons d'ADN ont été séparés par électrophorèse sur gel de 0,5 à 2 % (p/v) d'agarose (Invitrogen, Grand Island, NY, É.-U.) selon la méthode de Sambrook et Russell (2001). L'agarose a été dissous dans un tampon contenant du Tris-HCl 40 mM, de l'acide acétique 40 mM (Fisher Scientific) et de l'EDTA 1 mM (TAE). L'ADN (5 μl) a été mélangé à un tampon de charge contenant une concentration finale de 30 % de glycérol (Fisher Scientific), 0,25 % de xylène cyanol (p/v) (Sigma-Aldrich) et 0,25 %. de bleu de bromophénol (p/v) (Sigma-Aldrich). L'échelle de poids moléculaire « 100 bp DNA Ladder » (Promega, Madison, WI, É.-U.) a été utilisée. L'électrophorèse a été effectuée dans un tampon TAE à un courant d'environ 80 V pendant 1 h ou plus. Les gels ont été colorés dans une solution de bromure d'éthidium (Sigma-Aldrich) à 10 μg/ml et visualisés sous rayons ultraviolets avec l'appareil AlphaImager3400 (Alpha Innotec Corporation, San Leandro, CA, É.-U).

3.2.10.3 Réaction de polymérase en chaîne

Les réactions de polymérase en chaîne (PCR) ont été effectuées dans un volume de 50 µl avec environ 2 ng d'ADN génomique de *D. hafniense* PCP-1, des déoxynucléotides

triphosphates (200 μM chacun; Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC, Canada), 10 pmol de chacune des paires d'amorces, 0,4 mg/mL d'albumine sérine bovine, 2,5 U de *Taq* polymérase (GE Healthcare, Chalfont St.Giles, UK) et du tampon d'ADN *Taq* polymérase (GE Healthcare). Un contrôle négatif contenait tous les réactifs mais pas d'ADN. Les amorces ont été synthétisées par la compagnie Alpha DNA (Montréal, QC, Canada). Les appareils GeneAmpPCR System 2700 (Applied BioSystems, Foster City, CA, É.-U.) ou RoboCycler Gradient 96 (Stratagene, La Jolla, CA, É.-U.) ont été utilisés. Les réactions ont été effectuées selon le programme suivant : 5 min à 94 °C et 5 min à 57 °C, suivi de 35 cycles d'amplification à 72 °C pendant 1 min, à 94 °C pendant 1 min, et à 57 °C pendant 1 min et d'une étape d'élongation finale à 72 °C pendant 10 min. Les produits de PCR ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose.

3.2.10.4 Amplification et séquençage

Des oligonucléotides ont été générés à partir de la séquence génomique de *D. hafniense* DCB-2 (Numéro d'accession dans GenBank : CP001336) disponible sur le site du « National Centre for Biotechnology Information » (NCBI; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) et du « Joint Genome Institute » (JGI; http://www.jgi.doe.gov/). Les amorces CprA3_1047F (5' TGC CCG TCT GAA GCC ATA ACT CAT 3') et CprA3_1399R (5' GCA AAG TTT GAG ACC GGC TA 3') ont été sélectionnées pour amplifier un fragment de 352 pb débutant au nucléotide 1047 du gène *cprA3* (GenBank : YP_002457213). Le produit PCR généré de l'amplification de l'ADN génomique de *D. hafniense* PCP-1 a été envoyé au Centre d'Innovation Génome Québec (Montréal, QC, Canada) pour le séquençage dans les deux sens de lecture. La séquence a été analysée et corrigée avec le logiciel *Chromas Lite* version 2.01 (www.technelysium.com.au). La séquence a été comparée à celles retrouvées dans les banques de données avec le logiciel de recherche de séquence Nucleotide BLAST disponible sur le site du NCBI.

3.2.11 Caractérisation biochimique de la PCP déshalogénase réductrice

3.2.11.1 Cinétique enzymatique

La cinétique de déshalogénation du PCP 0,25 mM a été mesurée pour une préparation enzymatique enrichie (après passage sur la colonne Protein Pak DEAE-5PW) et une préparation enzymatique semi-purifiée (après passage sur la colonne HiTRap Butyl HP). Le dosage enzymatique pour la préparation enrichie a été effectué à 37 °C pendant 0, 25, 55, 65 et 75 min d'incubation. Pour la préparation semi-purifiée, le dosage a été effectué à 37 °C pendant 0, 10, 30 et 40 min d'incubation. Les dosages enzymatiques ont été effectués en duplicata.

3.2.11.2 Stabilité à 4 °C

L'activité de déshalogénation du PCP 0,25 mM a été mesurée sur une préparation enzymatique enrichie et une préparation semi-purifiée incubées à 4 °C pendant différents intervalles de temps. Des échantillons ont été prélevés avec une seringue après 0, 24 et 72 h d'incubation pour la préparation enrichie et après 0, 5, 24 et 48 h d'incubation pour la préparation semi-purifiée. Du DTT 100 mM, du BSA 1%, du Triton X-100 1 %, du Triton X-100 1 % avec du glycérol 20 % ou de l'eau déionisée (témoin) ont été ajoutés à une préparation enzymatique semi-purifiée et l'activité a été mesurée après 24 h d'incubation à 4 °C afin de déterminer s'ils ont un effet stabilisant sur l'activité enzymatique. Les dosages enzymatiques ont été effectués en duplicata à 37 °C pendant 45 min d'incubation.

3.2.11.3 Détermination de la K_m et de la V_{max}

Des essais ont été effectués afin de déterminer la quantité de produits formés par l'enzyme avec différentes concentrations de substrat à partir d'une préparation enrichie et d'une préparation semi-purifiée. Les dosages enzymatiques ont été effectués en triplicata à 37 °C pendant 25 min d'incubation à des concentrations de PCP variant entre 7,5 et 250 μ M. La K_m et la V_{max} ont été calculés avec le logiciel « Sigma Plot 2002 v.8.0, Enzyme kinetic module 1 ».

3.2.11.4 Spectre d'activité

Le spectre d'activité enzymatique a été déterminé dans les conditions de dosage standards avec du PCP 0,25 mM ou un autre chlorophénol 1 mM. Trois dosages enzymatiques indépendants à partir d'une préparation enrichie ont été effectués en triplicata à 37 °C pendant 30 min d'incubation. Deux essais enzymatiques indépendants à partir d'une préparation semi-purifiée ont été effectués en triplicata à 37 °C pendant 50 min d'incubation. L'activité enzymatique envers le 4-chlorophénoxyacétate, le 2,4-dichlorophénoxyacétate, le 3Cl-4OHPA, le 3Cl-4OHBA, le 3,5-DCl-4OHBA, le 2,4,6-TCBA et le 3,4,5TCBA à 1mM a été déterminé à partir d'une préparation enrichie. Les dosages enzymatiques ont été effectués en triplicata à 37 °C pendant 30 min d'incubation.

3.2.11.5 Détermination du pH optimal et de la température optimale

Le pH optimal de l'activité de déshalogénation d'une préparation enzymatique enrichie a été déterminé en effectuant un dosage enzymatique standard dans du TA à un pH de 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 et 8,0. Du TA à pH 5,5, 7,0 et 8,0 a été préparé dans un premier temps, puis les tampons ont été mélangés à l'intérieur de l'enceinte anaérobie afin d'obtenir les autres valeurs de pH. Les essais enzymatiques effectués en triplicata ont été arrêtés après 30 min d'incubation à 37 °C.

La température optimale de l'activité de déshalogénation d'une préparation enzymatique enrichie a été déterminée en effectuant un dosage enzymatique standard incubé à une température variant entre 5 et 70 °C. Les réactions ont été arrêtées après 60 min d'incubation aux différentes températures (5, 20, 27, 37, 40, 50, 55, 60 et 70 °C). Les dosages enzymatiques ont été effectués en duplicata.

3.2.11.6 Effet de l'air ambiant sur l'activité enzymatique

Pour déterminer l'effet de l'air sur l'activité de déshalogénation, une préparation enzymatique enrichie a été incubée avec 0 % et 10 % d'air ambiant pendant 1 h à 4 °C. Pour ce faire, un volume approprié de la phase gazeuse (10 %) d'une bouteille de sérum anaérobie contenant 1 ml d'une préparation enzymatique a été retiré avec une seringue et un volume équivalent d'air ambiant a été injecté. Une autre bouteille de sérum anaérobie (0 %)

contenant 1 ml de la préparation enzymatique a été incubée telle quelle. Après l'incubation, des dosages enzymatiques standards ont été effectués en triplicata à 37 °C pendant 30 min.

La demi-vie à l'oxygène a été déterminée sur une préparation enzymatique enrichie exposée à l'air ambiant (100 %) ou incubée dans une bouteille de sérum anaérobie (0 %). Un volume de 0,4 ml de la préparation enzymatique a été dilué dans 12 ml d'un tampon phosphate de potassium 50 mM à pH 6,5 contenant du DTT 1 mM, du glycérol 10 % et du Triton X-100 0,1 %. La préparation a été séparée dans des bouteilles de sérum anaérobies par volumes de 4 ml. Ensuite, 2 bouteilles de sérums ont été exposées à l'air ambiant et 2 bouteilles ont servi de témoin anaérobie. Après différents temps d'incubation avec agitation à 4 °C, un volume de la préparation a été prélevé avec une seringue pour effectuer un dosage enzymatique standard. La préparation exposée à l'air a été prélevée après 0, 45, 90, 135, 180 et 225 min d'incubation et la préparation incubée en conditions anaérobies a été prélevée après 0, 45, 135 et 225 min. Les dosages enzymatiques ont été effectués en duplicata à 37 °C pendant 25 min.

3.2.11.7 Essais d'inhibition réversible à la lumière par l'iodopropane

Les essais d'inhibition réversible à la lumière de l'activité de déshalogénation par l'iodopropane ont été effectués selon une méthode modifiée de Brot et Weissbach (1965). Une solution de 1-iodopropane (Sigma-Aldrich) 0,5 mM et de citrate de titane (III) 2 mM ou de l'eau déionisée (témoin) a été ajoutée à une préparation enzymatique enrichie. Le mélange a été incubé à 37 °C pendant 30 min dans des bouteilles de sérum recouvertes d'aluminium. Les bouteilles de sérum ont ensuite été placées sur glace et exposées à la lumière d'un projecteur de 300-W pendant 30 min. Un échantillon de la préparation traitée à l'iodopropane et du témoin a été prélevé avant et après l'exposition à la lumière pour effectuer un dosage de l'activité enzymatique standard. Les dosages enzymatiques ont été effectués en duplicata à 37 °C pendant 30 min d'incubation. Deux essais indépendants ont été effectués.

3.2.11.8 Effet des métaux sur l'activité enzymatique

L'effet de différents métaux a été déterminé avec une préparation enrichie. Du KCl, du MgCl₂, du MnCl₂, du CoCl₂, du NaCl, de l'azoture de sodium (NaN₃) et du sulfate d'ammonium ferreux (Fe(NH₄)₂(SO₄)₂) à 5 mM ou de l'eau déionisée (témoin) a été ajouté

au tampon d'activité enzymatique. Les dosages enzymatiques ont été effectués en triplicata à 37 °C pendant 60 min d'incubation.

3.2.11.9 Effet du KCN, du citrate de sodium du nitrate, du sulfate et du sulfite et de l'EDTA sur l'activité enzymatique

Du cyanure de potassium (KCN) 100 mM, du citrate de sodium (100 mM), du sulfate (Na₂SO₄) 10 et 100 mM, du sulfite (Na₂SO₃) 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2,5 et 5 mM, du nitrate (NaNO₃) 10 et 100 mM ou de l'eau déionisée (témoin) ont été ajoutés au tampon d'activité enzymatique afin de déterminer l'effet de ces molécules sur l'activité de déshalogénation d'une préparation enzymatique enrichie. Les réactions effectuées en triplicata ont été arrêtées après 40 min d'incubation à 37 °C. De l'EDTA 0 mM (témoin) ou 10 mM a été ajouté à une préparation enzymatique enrichie. L'activité enzymatique a été mesurée après 1 h d'incubation à 4 °C. Les dosages enzymatiques ont été effectués en triplicata à 37 °C pendant 40 min d'incubation.

3.3 Résultats

3.3.1 Purification de la PCP déshalogénase réductrice

La méthode développée pour la purification de la PCP RDase, telle que décrite dans la méthodologie (section 3.2.6), implique la solubilisation de la préparation membranaire avec du Triton X-100 3 % et du glycérol 20 %, une première chromatographie sur une colonne échangeuse ionique DEAE-5PW à pH 6,5, suivie d'une seconde chromatographie par interaction hydrophobe sur une colonne de butyle au même pH.

Les principaux résultats obtenus sont résumés dans le tableau 9. L'activité totale des membranes était de 6177,8 nmoles de 2,3,4,5-TeCP/min et diminuait à 3738,9 nmoles de 2,3,4,5-TeCP/min après la solubilisation, ce qui donne un rendement pour cette étape de la purification de 60,5 %. Après le passage sur la première colonne, l'activité a diminué, pour un rendement à 26,2 %. L'ajout de sulfate d'ammonium 0,5 M n'a pas eu d'effet sur l'activité sinon une légère augmentation. Après la deuxième colonne, une perte importante de l'activité a été mesurée. Celle-ci est passée à 257,4 nmoles de 2,3,4,5-TeCP/min, donnant un rendement final de 4,2 %. L'activité spécifique a augmenté après chaque étape de la purification, passant de 145,2 pour la fraction membranaire à 395,6 et 780 nmoles de 2,3,4,5-TeCP/min*mg de protéine pour la première et la deuxième colonne respectivement. Le facteur de purification final est de 5,4.

La figure 18 montre l'analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide 10 % avec SDS coloré au bleu de Coomassie R-250 des fractions protéiques obtenues après les différentes chromatographies. Un nombre important de bandes était présent dans la fraction après le passage sur la première colonne. Après le passage sur la deuxième colonne, deux protéines de poids moléculaire estimées à 42 et 47 kDa étaient présentes.

Tableau 9. Tableau de purification de la PCP déshalogénase réductrice

Étape de purification	Activité totale (nmoles de 2,3,4,5- TeCP/min)	Rendement (%)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (nmoles de 2,3,4,5-TeCP/ min*mg de protéines)	Facteur de purification
Fraction membranaire	6177,8	100	42,56	145,2	1
Membranes solubilisées	3738,9	60,5	27,04	138,3	0,95
DEAE-5PW	1618,2	26,2	4,09	395,6	2,7
Traitement (NH ₄) ₂ SO ₄	1700,1	27,5	4,09	415,7	2,9
HiTrap Butyl	257,4	4,2	0,33	780	5,4

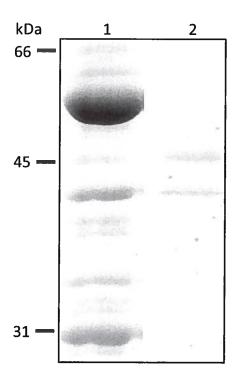


Figure 18. Électrophorèse en gel de polyacrylamide avec SDS. Le gel a été coloré au bleu de Coomassie R-250. (1) fraction enrichie après passage sur la colonne DEAE-5PW, (2) fraction semi-purifiée après passage sur la colonne HiTrap Butyl.

3.3.2 Identification de la PCP déshalogénase réductrice

Les bandes de protéines séparées par SDS-PAGE ont été extraites du gel, traitées à la trypsine et analysées par spectrométrie de masse. Les séquences peptidiques obtenues ont été analysées à partir du génome de *D. hafniense* DCB-2 à l'aide du logiciel Mascot. Dans un premier temps, l'absence de la protéine CrdA après le passage sur la colonne Protein Pak DEAE-5PW (fraction enrichie) a été vérifiée et celle-ci n'a pas été détectée parmi les bandes présentes suite à l'électrophorèse SDS-PAGE de la fraction enrichie. Ensuite, les deux bandes présentes sur gel SDS-PAGE de la fraction après le passage sur la colonne HiTRap Butyl HP (fraction semi-purifiée) ont été identifiées. La bande de 42 kDa a été identifiée comme étant une NADH-quinone oxydoréductase (GenBank : YP_002460200) avec un score Mascot de 810. Cette protéine est composée de 369 acides aminés (figure 19) et son poids moléculaire théorique est de 41712 Da. La bande de 47 kDa a été reliée à la déshalogénase réductrice de type CprA codée par le gène *cprA3* (GenBank : YP_002457213). La protéine a été identifiée à la suite de deux analyses de spectrométrie de masse indépendantes avec un score Mascot de 495 et de 471. Parmi les bandes de la fraction enrichie, CprA3 est la seule déshalogénase réductrice détectée.

La séquence en acides aminés de la protéine CprA3 déduite de la séquence du génome de *D. hafniense* DCB-2 est montrée à la figure 20. La région N-terminale est très hydrophobe et contient le motif, RRXFXK (R²⁰RKFLK), caractéristique des peptides signaux de type TAT. Une analyse avec le programme SIGNALP prédit un site de clivage après l'acide aminé 47 de la protéine. Le site de clivage a été confirmé par l'analyse Mascot qui a permis d'identifier un peptide avec l'acide aminé 48 en position N-terminale (A⁴⁸EAVASTGSSGSVNGAR). La protéine mature CprA3 est composée de 411 acides aminés. Le poids moléculaire théorique de la protéine mature de 45796 Da est très proche du poids moléculaire estimé à 47 kDa par SDS-PAGE. La valeur théorique du pI de la protéine mature est de 6,1.

```
1TDLYNEGTEELLLNMGPQHPSMHGVFRMVVRLQGETVTGIEPKIGYLHRG51LEKIAESRTYPQFIPYTDRLDYLASPHNNLAYVQTVEKLMGLEIPERAEY101LRIILAELARFASHQVFIASAALDMAGWTAWGYPFRDRERILDLFEMMSG151SRLTVNCMRIGGVSAEPPAEFWPALESFLDDMPEKLEEYFNIYMGNEIAQ201ARMKKVGILSKEVAENLCITGPALRASGVQYDVRKAEPYGIYDRFDFEVP251VLYGCDTYDRNLIRFMEMNESLKIIRQAVRDIPEGPIMAKVPKIIKPPAG301EVYHRVENPKGELGFYIVSNGTPKPERVKIRAGAFVNLQCLNEIGVGTYI351QDLIASFASLDAVLGEVDK
```

Figure 19. Séquence en acides aminés de la protéine NADH-quinone oxydoréductase déduite de la séquence du génome de *D. hafniense* DCB-2. Les séquences soulignées ont été identifiées par à une analyse par spectrométrie de masse avec le logiciel Mascot.

1	MFRSSDRQNK	PQEQKFQMNR	RKFLKAGVAS	ALTAGMVGAM	RTLPVSA/AEA
51	VASTGSSGSV	NGARSKLHPK	VDYGGASVRF	VENNDQWLGT	SQIVGTVNRT
101	HEAEQGFNLA	LRGKLSSEAQ	VAMYHYNFVM	KHPFDGALGI	FSNYVSAENI
151	VGGTPNQEKL	PIPDPEQMSQ	NIKDTAYFLR	ADEVGIGKMP	EYAYYSHKAP
201	FSHEELIRDD	ISHSTPVTEK	LPYVIVVMVD	QHLETMLAST	GYDGISSAQS
251	MRGYHATAVI	SVILAQYIRN	LGYNAR <u>AHHF</u>	ANYAAAMPPV	TIAAGLGELS
301	RTGDCTVHPR	LGYRHKVAAV	TTDLPLLPDK	PIDFGLQDFC	RVCKKCADNC
351	PSEAITHDTD	MVEYNGYLRW	NSDMKKCAEF	RLTNSEGSSC	GRCMKVCPWN
401	SKEESWFHSA	GIWIGSKGET	SSRLLKQIDD	MFGYGDEIIE	KYKWWLEWPE
451	RYTLPKHL				

Figure 20. Séquence en acides aminés de la protéine CprA3 déduite de la séquence du génome de *D. hafniense* DCB-2. Les séquences soulignées ont été identifiées par à une analyse par spectrométrie de masse avec le logiciel Mascot. Les deux motifs pour la liaison d'un centre fer-soufre et le motif caractéristique d'un peptide signal TAT sont surlignés en gris. Une barre oblique indique le site de clivage du peptide signal.

3.3.3 Analyse de la séquence du gène cprA3 de D. hafniense PCP-1

Villemur et al. (2002) ont séquencé un fragment de 1,9 kb provenant d'une génothèque de cosmides de D. hafniense PCP-1 qui contient les 81 derniers codons du gène cprA2, le gène cprB3 et les 380 premiers codons du gène cprA3, soit 1140 nucléotides (GenBank : AF321226). Le gène cprB3 code pour une protéine de 101 acides aminés. Le gène cprA2 est localisé à 219 nucléotides en amont du gène cprB3 et le gène cprA3 est

localisé 14 nucléotides en aval du gène *cprB3*. La séquence du fragment est identique à celle de la souche DCB-2 (Villemur *et al.*, 2002). Chez DCB-2, le gène *cprA3* est constitué de 1377 nucléotides.

Afin de compléter la séquence du gène *cprA3* de la souche PCP-1, des oligonucléotides ont été sélectionnés à partir de la séquence génomique de la souche DCB-2 pour l'amplification d'un fragment de 352 pb débutant au nucléotide 1047 (figure 21). Les oligonucléotides ont été utilisés pour amplifier l'ADN génomique de la souche PCP-1 et le produit de PCR a été séquencé. L'analyse de la séquence complète du gène *cprA3* de la souche PCP-1 a révélé 100 % d'identité avec la séquence de la souche DCB-2 (GenBank : YP_002457213) et 86 % d'identité avec un gène codant pour une RDase de type CprA putative de *Desulfitobacterium chlororespirans* Co23 (GenBank : AF204275).

ATGTTTAGATCATCGGATCGTCAGAACAAACCGCAGGAACAGAAATTTCAGATGAACCG TCGCAAATTTCTCAAAGCCGGAGTTGCTTCGGCACTGACCGCTGGAATGGTCGGGGCGA TGAGAACTCTGCCGGTAAGTGCCGCCGAGGCGGTGGCAAGCACAGGTTCATCCGGTTCA GTTAACGGTGCCCGCTCGAAGCTTCATCCCAAAGTGGATTATGGCGGTGCCAGTGTGCG CTTTGTGGAAAATAATGATCAGTGGCTGGGGACAAGCCAGATTGTCGGTACAGTAAACC GTACCCATGAAGCGGAGCAGGGCTTTAACCTGGCTTTGCGCGGCAAGCTTTCTTCTGAA GCACAGGTTGCCATGTACCATTATAATTTTGTCATGAAGCATCCTTTCGATGGAGCGCT GGGTATTTTCTCCAATTACGTTTCGGCAGAAAATATAGTGGGAGGAACCCCGAACCAGG AGAAACTGCCCATACCTGACCCGGAACAGATGTCCCAGAATATCAAGGATACGGCTTAC TTTCTGCGGGCCGATGAAGTAGGAATCGGCAAAATGCCGGAATATGCCTACTATTCCCA CAAGGCGCCTTTTTCCCATGAAGAACTGATCAGAGACGATATTTCCCATTCCACTCCGG TAACGGAGAAGCTTCCCTATGTCATTGTTGTGATGGTTGACCAGCATCTGGAAACTATG CTGGCATCTACCGGCTATGATGGGATAAGTTCCGCCCAGTCCATGCGCGGCTATCATGC CACAGCCGTCATTTCCGTCATTCTTGCCCAGTATATCCGCAATCTGGGCTATAATGCCA GAGCGCACCATTTTGCCAACTATGCTGCTGCGATGCCCCCGGTCACCATAGCGGCGGGC CTGGGAGAATTGTCCCGGACCGGGGATTGCACGGTTCATCCGCGCCTGGGCTACCGCCA CAAAGTAGCCGCAGTTACCACGGATTTACCCCTTCTCCCCGATAAACCCATTGACTTTG GATTGCAGGATTTCTGCCGGGTATGCAAGAAATGCGCGGACAATTGCCCGTCTGAAGCC ATAACTCATGATACTGATATGGTGGAATACAATGGCTATCTGCGCTGGAACAGTGACAT GAAGAAATGCGCCGAATTC/CGTCTGACCAACAGTGAAGGGTCCTCCTGCGGACGTTGT ATGAAGGTGTCCTTGGAATTCCAAGGAAGAGTCCTGGTTCCATTCAGCCGGCATTTG GATCGGCAGCAAAGGCGAAACCTCCTCCCGGCTGCTTAAGCAGATTGACGATATGTTTG GCTATGGGGATGAAATCATTGAAAAATATAAATGGTGGCTGGAATGGCCGGAAAGATAC ACCCTTCCCAAGCATTTATAAqataqccqqtctcaaactttqc

Figure 21. Séquence du génome de DCB-2 utilisée pour générer des oligonucléotides pour amplifier un fragment du gène *cprA3*. Le codon d'initiation (ATG) et le codon de terminaison (TAA) du gène *cprA3* sont surlignés en gris. Les oligonucléotides utilisés pour amplifier l'ADN génomique de la souche PCP-1 sont soulignés. Une barre oblique indique la fin de la séquence connue du gène *cprA3* chez la souche PCP-1 obtenue par Villemur *et al.*, 2002.

3.3.4 Caractérisation biochimique de la PCP déshalogénase réductrice

3.3.4.1 Cinétique enzymatique

La cinétique de déshalogénation du PCP 0,25 mM a été mesurée à partir d'une préparation enzymatique enrichie et d'une préparation enzymatique semi-purifiée. Les essais ont été effectués 12 h après la purification, ce qui explique les différences entre les activités spécifiques des figures 22 et 23. La figure 22 montre une relation linéaire entre le temps d'incubation et la quantité de 2,3,4,5-TeCP formée jusqu'à 75 min d'incubation pour la préparation enrichie. La figure 23 montre une relation linéaire entre le temps d'incubation et

la quantité de 2,3,4,5-TeCP formée jusqu'à 40 min d'incubation pour la préparation semipurifiée.

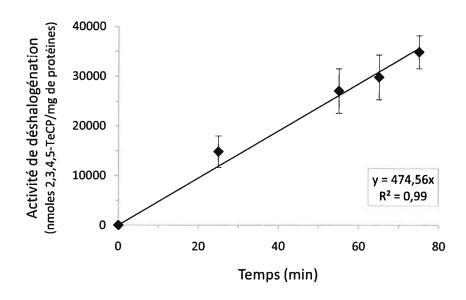


Figure 22. Cinétique enzymatique de la formation de 2,3,4,5-TeCP en fonction du temps pour une préparation de la PCP déshalogénase réductrice enrichie

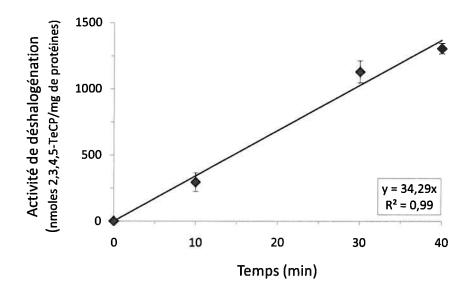


Figure 23. Cinétique enzymatique de la formation de 2,3,4,5-TeCP en fonction du temps pour une préparation de la PCP déshalogénase réductrice semi-purifiée

3.3.4.2 Stabilité à 4 °C

L'activité de déshalogénation du PCP d'une préparation enzymatique enrichie et d'une préparation semi-purifiée placées à 4 °C a été mesurée après différents intervalles de temps (figure 24). L'activité initiale de la préparation enrichie était de 572,98 nmoles de 2,3,4,5-TeCP/min*mg de protéines. L'activité enzymatique a diminuée de 20 % après 24 h d'incubation et de 80 % après 72 h. L'activité initiale de la préparation semi-purifiée était de 1065,1 nmoles de 2,3,4,5-TeCP/min*mg de protéines. La préparation semi-purifiée perd plus de 90 % de son activité après seulement 5 h d'incubation. Après 24 h, l'activité a diminué de plus de 95 %. Après 24 h d'incubation à 4 °C, l'activité d'une préparation semi-purifiée contenant du Triton X-100 1 % et du glycérol 20 % était 28 % plus élevée par rapport à l'activité d'une préparation non traitée et l'activité de la préparation contenant du BSA 1 % était 16 % plus élevée. Le DTT 100 mM et le Triton X-100 1 % n'ont eu aucun effet stabilisant.

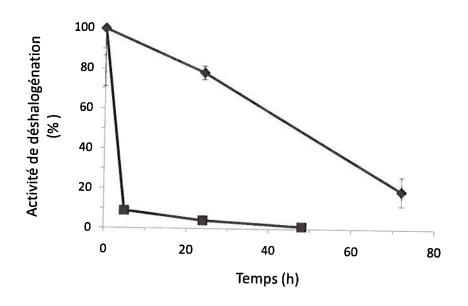


Figure 24. Stabilité d'une préparation de la PCP déshalogénase réductrice enrichie (◆) et d'une préparation semi-purifiée (■) après incubation à 4 °C

3.3.4.3 Détermination de la K_m et de la V_{max}

Des essais enzymatiques ont été effectués à différentes concentrations de PCP avec une préparation enzymatique enrichie et semi-purifiée. Avec la préparation semi-purifiée, la valeur de la K_m était de 48,6 \pm 8,5 μ M (R^2 = 0,94). Avec la préparation enrichie, la valeur de la K_m était de 46,7 \pm 4,2 μ M (R^2 = 0,98) et la valeur de la V_{max} était de 1145 \pm 33,1 nmoles de 2,3,4,5-TeCP/min*mg de protéines.

3.3.4.4 Spectre d'activité

Le spectre d'activité enzymatique de la PCP RDase a été déterminé à partir de la PCP RDase enrichie (tableau 11). Trois dosages enzymatiques indépendants avec différentes préparations ont été effectués avec du PCP à 0,25 mM ou une autre chlorophénol à 1 mM. L'activité de déshalogénation la plus élevée a été mesurée pour la transformation du PCP en 2,3,4,5-TeCP. La première préparation avait une activité de 458,1 ± 30,2 nmoles de 2,3,4,5-TeCP/ml*mg de protéines avec le PCP, la seconde de 381,7 ± 13,5 nmoles de 2,3,4,5-TeCP/ml*mg de protéines et la troisième 318,1 ± 11,3 nmoles de 2,3,4,5-TeCP/ml*mg de protéines. Une forte activité a été mesurée avec le 2,3,4,5-TeCP, soit 60 % et 86 % de l'activité mesurée avec le PCP dans le premier essai et dans le troisième essai respectivement. Une activité importante a aussi été mesurée avec le 2,3,4-TCP, soit 30 % et 25 % de l'activité mesurée avec le PCP dans le premier essai et dans le troisième essai respectivement. L'activité était inférieure à 5 % de l'activité mesurée avec le PCP pour tous les autres chlorophénols. La déshalogénation avait lieu en position *ortho* seulement. Il n'y avait aucune activité envers le 2,4,5-TCP et le 3,4,5-TCP, les DCPs (2,3-DCP; 2,4-DCP; 2,5-DCP; 2,6-DCP; 3,4-DCP; 3,5-DCP) et les CPs (2-CP; 3-CP; 4-CP).

L'activité de déshalogénation des composés aromatiques chlorés (1 mM) suivant a été testée : 4-chlorophenoxyacétate; 2,4-dichlorophenoxyacétate; 3Cl-4OHPA; 3Cl-4OHBA; 3,5-DCl-4OHBA; 2,4,6-TCBA; 3,4,5-TCBA. Le temps de rétention avec la méthode de CLHP mise au point pour l'analyse de ces composés aromatiques est montré dans le tableau 10. Il n'y avait aucune activité de déshalogénation envers les autres composés aromatiques chlorés testés. La préparation enrichie utilisée avait une activité de 783,0 ± 20,2 nmoles de 2,3,4,5-TeCP/min*mg de protéines avec le PCP.

L'activité enzymatique envers différents chlorophénols a aussi été mesurée à partir de deux préparations de la PCP RDase semi-purifiée. L'activité la plus élevée a été mesurée avec le PCP. La première préparation avait une activité de 699,6 ± 54,7 nmoles de 2,3,4,5-TeCP/ml*mg de protéines avec le PCP et la seconde de 94,9 ± 13,8 nmoles de 2,3,4,5-TeCP/ml*mg protéines. Le 2,3,4,5-TeCP, le 2,3,5,6-TeCP, le 2,4,6-TCP, le 2,3,6-TCP et le 2,3,5-TCP étaient déshalogénés à un taux de 1 à 16 % du taux d'activité mesurée avec le PCP. Le 2,4,5-TCP et le 3,4,5-TCP et les DCPs testés (2,3-DCP, 2,6-DCP, 3,5-DCP) n'étaient pas déshalogénés.

Mis ensemble, les résultats obtenus montrent qu'un groupement hydroxyle en position *ortho* relativement au chlore qui est déshalogéné est nécessaire mais pas suffisant pour l'activité de la CprA3. De plus, des chlores aux positions 3 et 4 du groupement hydroxyle augmentent le taux d'activité de déshalogénation alors que la soustraction d'un chlore à n'importe quelle position diminue l'activité.

Tableau 10. Analyse au CLHP de différents composés aromatiques

Composé aromatique	Temps de rétention
4-chlorophenoxyacétate	13,36
2,4-dichlorophenoxyacétate	14,24
4-hydroxyphényl acétate	10,07
3-chloro-4-hydroxyphénylacétate	11,60
3-chloro-4-hydroxybenzoate	11,71
3,5-dichloro-4-hydroxybenzoate	12,90
2,4,6-trichlorobenzoate	13,17
3,4,5-trichlorobenzoate	14,89

Tableau 11. Spectre d'activité d'une préparation enrichie de la PCP déshalogénation réductrice pour différents chlorophénols

Substrat	Produit	Position de déshalogénation	Activité spécifique (nmoles/min*mg de protéines) ^a
Expérience 1			
PCP	2,3,4,5-TeCP	ortho	$458,1 \pm 30,2 (1,0)$
2,3,5,6-TeCP	2,3,5-TCP	ortho	$9.3 \pm 0.7 (0.02)$
2,3,4,5-TeCP	3,4,5-TCP	ortho	$271,7 \pm 2,6 (0,6)$
2,4,6-TCP	2,4-DCP	ortho	$7.0 \pm 0.7 (0.02)$
2,3,6-TCP	2,5-DCP	ortho	$3,4 \pm 0,9 (0,01)$
2,3,4-TCP	3,4-DCP	ortho	$153,0 \pm 8,3 (0,3)$
Expérience 2			
PCP	2,3,4,5-TeCP	ortho	$381,7 \pm 13,5 (1,0)$
2,4,6-TCP	2,4-DCP	ortho	$4,1 \pm 1,0 (0,01)$
2,3,6-TCP	2,5-DCP	ortho	$11.1 \pm 0.2 (0.03)$
2,3,5-TCP	3,5-DCP	ortho	$14.8 \pm 0.7 (0.04)$
2,3,4-TCP	3,4-DCP	ortho	$88.5 \pm 2.5 (0.2)$
Expérience 3			
PCP	2,3,4,5-TeCP	ortho	$318,1 \pm 11,3 (1,0)$
2,3,5,6-TeCP	2,3,5-TCP	ortho	$3.9 \pm 0.2 (0.01)$
2,3,4,5-TeCP	3,4,5-TCP	ortho	$273,3 \pm 7,7 (0,86)$
2,4,6-TCP	2,4-DCP	ortho	$3,4 \pm 0,2 \ (0,01)$
2,3,6-TCP	2,5-DCP	ortho	$5,6 \pm 0,9 (0,02)$
2,3,4-TCP	3,4-DCP	ortho	$81,0 \pm 5,8 (0,25)$

^a Les valeurs entre parenthèses représentent le ratio de l'activité par rapport à l'activité avec le PCP. Les essais ont été effectués en triplicata.

3.3.4.5 Détermination du pH optimal et de la température optimale

L'effet du pH sur l'activité de déshalogénation du PCP d'une préparation enzymatique enrichie a été mesuré. L'activité maximale a été obtenue à un pH de 7,0 (figure 25).

L'effet de la température sur l'activité de déshalogénation du PCP d'une préparation enzymatique enrichie a été mesuré. La figure 26 montre que l'activité de déshalogénation augmentait graduellement de 4 °C à 50 °C. L'activité était optimale à une température entre

50 et 55 °C. Par contre, aucune activité n'a été observée lorsque l'essai enzymatique est effectué à 60 °C.

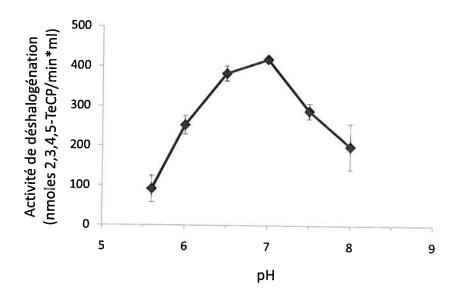


Figure 25. Effet du pH sur l'activité de déshalogénation du PCP d'une préparation enrichie de la PCP déshalogénase réductrice

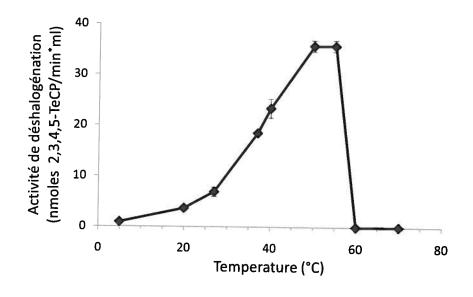


Figure 26. Effet de la température d'incubation sur l'activité de déshalogénation du PCP d'une préparation enrichie de la PCP déshalogénase réductrice

3.3.4.6 Effet de l'air ambiant sur l'activité enzymatique

L'effet de l'air ambiant sur l'activité de déshalogénation d'une préparation enzymatique enrichie a été évalué en présence de 0% et 10% d'air ambiant pendant 1 h à 4%C. L'activité initiale était de $783,0\pm20,2$ nmoles de 2,3,4,5-TeCP/min*mg de protéines. L'activité de déshalogénation de la préparation enzymatique exposée à 10% d'air ambiant avait diminué de 25% après la période d'incubation comparativement aux bouteilles anaérobies.

La demi-vie à l'oxygène a été mesurée à partir d'une préparation enzymatique enrichie incubée à 4 °C avec agitation. La préparation a été incubée en conditions anaérobies (témoin) ou exposée à l'air ambiant (100%). L'activité initiale de déshalogénation du PCP était de 884,9 ± 22,7 nmoles de 2,3,4,5-TeCP/min*mg de protéines. La figure 27 montre que l'activité de déshalogénation de la préparation exposée à l'oxygène a diminué rapidement dans le temps. La demi-vie de l'activité enzymatique lorsqu'incubé en présence d'oxygène était d'environ 128 min.

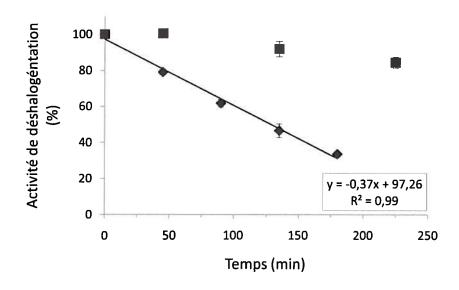


Figure 27. Effet de l'exposition à l'air ambiant sur l'activité de déshalogénation du PCP d'une préparation enrichie de la PCP déshalogénase réductrice. Préparation exposée à l'air ambiant (•), témoin anaérobie (•).

3.3.4.7 Essais d'inhibition réversible à la lumière par l'iodopropane

Deux essais indépendants d'inhibition par l'iodopropane ont été effectués avec une préparation enzymatique enrichie. Des préparations contenant du 1-iodopropane 0 mM (témoin) ou 0,5 mM en présence de citrate de titane (III) 2 mM ont été incubées pendant 30 min à 37 °C à la noirceur, puis pendant 30 min à 4 °C à la lumière d'un projecteur. L'activité enzymatique a été mesurée avant et après l'exposition à la lumière par le dosage enzymatique standard. Dans le premier essai, l'activité de déshalogénation de la préparation en présence d'iodopropane était inhibée à 80 % par rapport à l'activité de la préparation témoin (42,7 ± 2,5 nmoles de 2,3,4,5-TeCP/min*ml) après l'incubation à la noirceur. L'activité de déshalogénation de la préparation en présence d'iodopropane était restaurée à 45 % par rapport à l'activité de la préparation témoin (25,4 ± 0,9 nmoles de 2,3,4,5 TeCP/min*ml) après l'exposition à la lumière (tableau 12). Dans le deuxième essai, il y a eu une baisse de 91 % par rapport à l'activité de la préparation témoin (117,3 ± 7,6 nmoles de 2,3,4,5 TeCP/min*ml) à la suite de l'incubation à la noirceur avec l'iodopropane et une restauration à 38 % par rapport à l'activité du témoin (95,1 ± 10,0 nmoles de 2,3,4,5 TeCP/min*ml) après l'exposition à la lumière (tableau 12).

Tableau 12. Essai d'inhibition réversible par l'iodopropane (0,5 mM) d'une préparation de la PCP déshalogénase réductrice enrichie

	Activité de déshalogénation (%)		
	Expérience 1	Expérience 2	
Avant exposition à la lumière			
Préparation témoin	100 ± 6.5	100 ± 5.8	
Préparation incubée avec l'iodopropane	$19,7 \pm 1,6$	$8,6 \pm 0.8$	
Après exposition à la lumière			
Préparation témoin	$100 \pm 10,6$	$100 \pm 3,4$	
Préparation incubée avec l'iodopropane	$44,6 \pm 0,7$	$37,6 \pm 5,3$	

3.3.4.8 Effet des métaux sur l'activité enzymatique

L'effet de métaux 5 mM a été déterminé avec une préparation de la PCP RDase enrichie (tableau 13). L'activité de déshalogénation du PCP d'une préparation témoin (H₂O) était de 202,9 ± 7,4 nmoles de 2,3,4,5-TeCP/min*ml. La NaCl, le MgCl₂, le MnCl₂ et le KCl n'ont pas d'effet sur l'activité enzymatique. Le CoCl₂ a augmenté l'activité de 15 % (± 3), le Fe(NH₄)₂SO₄ a augmenté l'activité de 31% (± 11) et le NaN₃ a diminué l'activité de 32 % (± 17).

3.3.4.9 Effet du KCN et du citrate de sodium et de l'EDTA sur l'activité enzymatique

L'effet du cyanure de potassium, du citrate de sodium et de l'EDTA a été déterminé avec une préparation de la PCP RDase enrichie (tableau 14). L'ajout de cyanure de potassium 100 mM a inhibé 90 % (± 2) de l'activité de déshalogénation. L'ajout de citrate de sodium 100 mM n'a eu aucun effet. L'activité de déshalogénation d'une préparation témoin (0 mM) était de 84,3 ± 5,4 nmoles de 2,3,4,5-TeCP/min*ml. Une préparation incubée avec de l'EDTA 10 mM à 4 °C pendant 1 h avait une activité enzymatique augmentée de 31 % (± 14) par rapport à une préparation témoin (EDTA 0 mM). L'activité de déshalogénation du PCP de la préparation témoin était de 97,0 ± 4,1 nmoles de 2,3,4,5-TeCP/min*ml.

3.3.4.10 Effet du nitrate, du sulfate et du sulfite sur l'activité enzymatique

L'effet du nitrate, du sulfate et du sulfite a été déterminé avec une préparation de la PCP déshalogénase réductrice enrichie. Les résultats sont montrés dans le tableau 15. Le nitrate et le sulfate n'ont eu aucun effet sur l'activité de déshalogénation du PCP à des concentrations de 10 et 100 mM. Le sulfite a inhibé 96 % (± 1) de l'activité enzymatique à 0,5 mM et 99 % de l'activité à 2,5 mM. L'activité de déshalogénation du PCP d'une préparation témoin (0 mM) était de 84,3 ± 5,4 nmoles de 2,3,4,5-TeCP/min*ml.

Tableau 13. Effet des métaux (5 mM) sur l'activité de déshalogénation du PCP d'une préparation de la PCP déshalogénase réductrice enrichie

	Activité de déshalogénation (%)
H ₂ O	100 ± 2
KC1	102 ± 6
$MgCl_2$	95 ± 9
$MnCl_2$	91 ± 9
$CoCl_2$	115 ± 3
NaCl	86 ± 5
NaN_3	68 ± 17
$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$	131 ± 11

Tableau 14. Effet du KCN et du citrate de sodium et de l'EDTA sur l'activité de déshalogénation d'une préparation de la PCP déshalogénase réductrice enrichie

	Activité de déshalogénation (%)
KCN (mM)	
0	100 ± 2
100	10 ± 2
Citrate de sodium (mM)	
0	100 ± 2
100	107 ± 5
EDTA (mM)	
0	100 ± 4
10	131 ± 14

Tableau 15. Effet du nitrate, du sulfate et du sulfite et sur l'activité de déshalogénation sur l'activité enzymatique d'une préparation de la PCP déshalogénase réductrice enrichie

	Activité de déshalogénation (%)
NaNO ₃ (mM)	
0	100 ± 2
10	92 ± 2
100	95 ± 6
Na_2SO_4 (mM)	
0	100 ± 2
10	94 ± 2
100	107 ± 3
Na_2SO_3 (mM)	
0	100 ± 2
0,05	66 ± 15
0,1	29 ± 1
0,5	4 ± 1
ĺ	4 ± 2
2,5	1 ± 0
5	0.1 ± 0.2

3.4 Discussion

3.4.1 Purification de la PCP déshalogénase réductrice

Une nouvelle déshalogénase réductrice pouvant déshalogéner efficacement le PCP a été purifiée presque jusqu'à homogénéité d'une culture de *D. hafniense* PCP-1 produite en présence de 2,4,6-TCP comme inducteur de l'activité de déshalogénation. L'activité enzymatique était retrouvée principalement au niveau des préparations membranaires. L'utilisation d'un tampon contenant du Triton X-100 3 % et du glycérol 20 % pour la solubilisation des protéines de la membrane a permis de récupérer 60 % de l'activité initiale tout en réduisant la formation de complexes protéiques. La combinaison des chromatographies par échange d'ions (colonne de DEAE) et par interaction hydrophobe (colonne de butyle) que nous avons utilisée par la suite est une approche qui a aussi été utilisée pour la purification de la 3,5-DCP RDase de *D. hafniense* PCP-1 et de la 3C1-4OHPA RDase de *D. hafniense* DCB-2 (Christiansen *et al.*, 1998; Thibodeau *et al.*, 2004). Ces deux enzymes sont les seules RDases purifiées jusqu'à homogénéité à la suite de seulement deux chromatographies. Les autres ont nécessité trois ou quatre chromatographies.

Le poids moléculaire de la CprA3 de 47 kDa tel qu'estimé par SDS-PAGE, correspond au poids moléculaire des autres RDases de type CprA/PceA effectuant la déshalogénation en position *ortho*. Ces enzymes ont un poids moléculaire de 47 à 50 kDa (Christiansen *et al.*, 1998; van de Pas *et al.*, 1999; Krasotkina *et al.*, 2001; van de Pas *et al.*, 2001). Le poids moléculaire des PCE/TCE RDases varie entre 35,7 à 65 kDa et celui de la CprA5 est de 57 kDa (Miller *et al.*, 1998; Okeke *et al.*, 2001; Thibodeau *et al.*, 2004).

Une électrophorèse sur gel SDS-PAGE de la fraction enzymatique après le passage sur la colonne de butyle montre la présence d'une deuxième bande d'environ 42 kDa. La bande de 42 kDa a été identifiée comme étant une NADH-quinone oxydoréductase (GenBank: YP_002460200) avec un score Mascot de 810. Cette famille de protéine catalyse le transfert d'électrons du NADH aux quinones (Yano et al., 2001). La protéine copurifiée n'est probablement pas impliquée dans la réaction de déshalogénation, par contre, d'autres travaux seraient nécessaires pour déterminer son rôle potentiel dans la voie de déshalorespiration (Villemur et al., 2006). Des essais visant à purifier la protéine CprA3 de cette préparation n'ont pas été fructueux à cause d'importantes pertes de l'activité

enzymatique à la suite des différentes chromatographies et à cause de la faible stabilité de l'enzyme pure jusqu'à presque homogénéité, et ce, peu importe les conditions et le type de colonne utilisés.

Des pertes importantes d'activité et de faibles rendements de purification ont été observés lors de la purification de plusieurs RDases et certaines RDases n'ont pas pu être purifiées jusqu'à homogénéité. La PCE RDase de Desulfitobacterium sp. Y51 a été purifiée par un facteur de 2,55 et un rendement de seulement 0,2 % a été obtenu (Suyama et al., 2002). La PCE RDase provenant d'une culture de C. bifermentans a été purifiée à la suite de quatre chromatographies par un facteur de 9, pour un rendement de 5 %. L'enzyme purifiée était instable à 4 et -30 °C (Okeke et al., 2001). Après la dernière étape de purification de la VC RDase de *Dehalococcoides* sp. VS, purifiée par un facteur de 4,5, donnant un rendement de 5 %, deux bandes majeures de 45 et 62 kDa ainsi que de nombreuses bandes mineures de 30 à 175 kDa étaient présentes sur gel SDS-PAGE (Muller et al., 2004). L'analyse SDS-PAGE de la fraction purifiée de la PCE RDase de Desulfitobacterium sp. PCE1 présentait deux bandes, l'une de 44 kDa et l'autre de 48 kDa. Cette enzyme a été purifiée par un facteur de 275, donnant un faible rendement de 1 % (van de Pas et al., 2001). Les PCE et TCE RDases de Dehalococcoides ethenogenes ont été identifiées de préparations partiellement purifiées ayant migrées dans un premier temps dans un gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes. La bande contenant l'activité enzymatique a été éluée du gel et migrée sur un gel SDS-PAGE (Magnuson et al., 1998). Dans le même ordre d'idée, la chlorobenzène RDase de Dehalococcoides CBDB1 a été identifiée d'une préparation membranaire après la solubilisation et la migration dans un gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes (Adrian et al., 2007b).

Un facteur de difficulté associé à la purification des RDases est la localisation membranaire de ce type d'enzyme. Il est possible que les RDases aient tendance à s'associer à d'autres protéines qui pourraient stabiliser l'activité. Des agrégats ou des complexes de protéines pourraient être formés et rendre plus difficile la purification. Du CHAPS 6 mM a été utilisé pour éluer l'enzyme CprA3 fortement retenue sur la colonne d'interaction hydrophobe HiTrap Butyl, ce qui met en évidence le caractère hydrophobe de cette enzyme. Nous avons étudié l'effet de l'addition de différentes substances sur la stabilité de la CprA3. L'ajout de DTT n'offre aucune stabilisation à l'enzyme. Le Triton X-100 avec du glycérol et

le BSA montrent un léger effet stabilisant. Pour aider à prévenir la formation de complexes protéiques et pour aider à stabiliser l'enzyme, les membranes ont été solubilisées dans un tampon contenant du Triton X-100 3 % et du glycérol 20 %. De plus, du Triton X-100 0,1 % et du glycérol 10 % étaient ajoutés aux différents tampons d'élution.

Une autre cause possible pouvant entraîner des pertes d'activité est la sensibilité à l'oxygène. La demi-vie à l'oxygène des RDases varie de 5 min pour la VC RDase de Dehalococcoides à 1200 min pour la PCE RDase purifiée d'une culture de C. bifermentans (Okeke et al., 2001; Muller et al., 2004). Seule la 3-CB RDase de Desulfomonile tiedjei contenant un cofacteur hème n'est pas sensible à l'oxygène (Ni et al., 1995). La demi-vie à l'oxygène de la CprA3 a été estimée à 128 min. Dans cette étude, la majorité des manipulations ont été effectuées à l'intérieur de l'enceinte anaérobie ou dans des bouteilles de sérum anaérobies. Cependant, certaines manipulations, telles que le fractionnement des cellules, les étapes de centrifugations et de chromatographies ont dû être effectuées à l'extérieur de l'enceinte.

Les diminutions de l'activité enzymatique lors des différentes étapes de purification de certaines RDases pourraient être causées par la perte de cofacteurs. L'ajout de sulfate d'ammonium ferreux et de cystéine a stabilisé l'activité des PCE et TCE RDases de D. ethenogenes (Magnuson et al., 1998). L'ajout de sulfate d'ammonium 4 mM a stimulé plus de deux fois l'activité de déshalogénation chez Sulfurospirillum multivorans et a augmenté l'activité de 40 % chez D. hafniense DCB-2 (Neumann et al., 1996; Christiansen et al., 1998). L'activité enzymatique de la CprA3 était augmentée de 30 % par l'ajout de sulfate d'ammonium ferreux. L'ajout d'ions d'ammonium et de cystéine stabiliseraient les centres fer-soufre (Magnuson et al., 1998). Les ions d'ammoniums n'ont cependant eu aucun effet chez D. hafniense sp. PCE-S et l'activité enzymatique en présence d'ions d'ammoniums était inhibée de 25 % chez Dehalobacter restrictus (Schumacher et al., 1997; Miller et al., 1998).

3.4.2 Analyse de la séquence en acides aminés

Les protéines observées sur SDS-PAGE ont été identifiées par spectrométrie de masse en utilisant le logiciel Mascot pour effectuer une analyse comparative des séquences peptidiques obtenues avec la séquence du génome de *D. hafniense* DCB-2. Les scores Mascot élevés obtenus de l'analyse de la protéine CprA3 ont permis d'identifier un nombre

important de peptides. La séquence complète du gène *cprA3* de la souche PCP-1 a été obtenue et elle est identique à la séquence de la souche DCB-2.

Les protéines exportées par le système de sécrétion TAT, contiennent un peptide signal qui est clivé une fois la protéine exportée. Les peptides signaux TAT sont composés de trois régions : une région N-terminale composée de résidus basiques qui contient la séquence signature RRXFXK (région n), une région hydrophobe (région h) et une région composée de résidus basiques contenant le site de clivage représenté par la séquence A-x-A (région h) (Berks, 1996). Une analyse de la séquence en acides aminés déduite du gène *cprA3* a prédit un peptide signal TAT de 47 acides aminés. Le peptide avec le résidu alanine 48 en position N-terminale (A⁴⁸EAVASTGSSGSVNGAR) identifié avec Mascot confirme le site de clivage entre le résidu alanine en position 47 et le résidu alanine en position 48 parce que la trypsine scinde les chaînes peptidiques spécifiquement en position C-terminale des résidus basiques de lysine ou d'arginine. Le poids moléculaire théorique de la protéine sans le peptide signal de 45,8 kDa, correspond à la masse estimée par SDS-PAGE.

La séquence en acides aminés de CprA3 contient deux motifs riches en cystéine : un motif CxxCxxCxxxC (C340RVCKKCADNC) pour la liaison d'un centre [4Fe-4S] et un motif CxxCxxxC (C³⁹⁰GRCMKVC) pour la liaison d'un centre [3Fe-4S]. Des analyses par spectroscopie RPE ont montré que l'enzyme PCE RDase de D. restrictus contient deux centres [4Fe-4S] tandis que la 3Cl-4OHPA de Desulfitobacterium dehalogenans contient un centre [4Fe-4S] et un centre [3Fe-4S] (Schumacher et al., 1997; van de Pas et al., 1999). Maillard et al. (2003) ont émis l'hypothèse que le résidu cystéine séparé du motif CxxCxxxC par une séquence de 10 acides aminés qui débute par une glycine et qui se termine par une proline dans la séquence de la RDase de D. restrictus pourrait être le site de liaison d'un atome de fer du centre [4Fe-4S] (Maillard et al., 2003) (figure 11). La séquence de la RDase de D. dehalogenans contient une quatrième cystéine séparée de 12 acides aminés du motif CxxCxxxC. Cependant, on ne retrouve pas de résidu glycine et proline au début et à la fin de la séquence de 12 acides aminés (van de Pas et al., 1999). Dans la séquence de la protéine CprA3, une quatrième cystéine est séparée du motif CxxCxxxC par une séquence de 12 acides aminés débutant par une alanine et se terminant par une sérine (C³⁷⁷AEFRLTNSEGSSC³⁹⁰). Il est donc possible que la CprA3 contienne un centre [4Fe-4S] et un centre [3Fe-4S] tel qu'observé chez D. dehalogenans.

3.4.3 Spectre d'activité

L'activité de déshalogénation du PCP de 882,8 nmoles de 2,3,4,5-TeCP/min*mg de protéines mesurée avec une préparation membranaire brute induite au 2,4,6-TCP par Boyer et al. (2003) peut être dû à la présence de différentes enzymes, dont la CprA3. Une activité de déshalogénation du PCP en position para avait également été observée avec une préparation enzymatique de la CprA5 semi-purifiée. Cependant, l'activité de déshalogénation du PCP de 73,6 nmoles de 2,3,5,6-TeCP/min*mg de protéines était relativement faible en comparaison au taux mesuré avec le 3,5-DCP, soit seulement 30 % (Thibodeau et al., 2004). La forte activité envers le PCP de D. hafniense PCP-1 peut être expliquée par le fait que cette souche a été isolée d'un consortium provenant d'un enrichissement de sols contaminés au PCP adapté à la dégradation du PCP dans un réacteur pendant plusieurs années (Juteau et al., 1995a; Juteau et al., 1995b).

La CprA3 se distingue grandement des autres RDases au niveau de son spectre d'activité. Cette enzyme effectue la déshalogénation de différents chlorophénols spécifiquement en position ortho. La présence de chlores aux positions 3 et 4 du groupement hydroxyle favorise une plus forte activité et soustraire un chlore à n'importe quelle position diminue l'activité. Ainsi, l'activité la plus forte a été mesurée envers le PCP comme substrat et par ordre d'activité décroissante, on observe le PCP > 2,3,4,5-TeCP > 2,3,4-TCP > 2,3,5,6-TeCP > 2,3,6-TCP. L'affinité pour le PCP est élevée (K_m de 46,7 μ M).

La 3Cl-4OHBA RDase de *D. chlororespirans* et la 3Cl-4OHPA de *D. dehalogenans* effectuent la déshalogénation du PCP en position *ortho* à des taux beaucoup plus faibles que les dichlorophénols et autres composés aromatiques faiblement chlorés. Le PCP est déshalogéné par la RDase de *D. chlororespirans* à 1,4 nmoles de 2,3,4,5-TeCP/min*mg de protéines, soit à seulement 8 % du taux mesuré avec le 3-Cl-4OHBA et la K_m avec le PCP est de 390 μM (Krasotkina *et al.*, 2001). De même, pour la RDase de *D. dehalogenans*, le taux de déshalogénation du PCP de 0,2 U/mg de protéines est seulement 1,6 % du taux mesuré avec le 3-Cl-4OHPA (van de Pas *et al.*, 1999).

La RDase de *D. dehalogenans* catalyse également la déshalogénation en position *ortho* du 2-Br-4-CP à 202 %, du 2,3-DCP à 129 %, du 2,4-DCP à 35 %, du 2,6-DCP à 7 % et du 2-CP à 1,6 % du taux mesuré avec le 3-Cl-4OHPA. Elle ne peut pas déshalogéner le PCE, le TCE, le 3-CP, le 4-CP, le 2,5-DCP et le 2-F-4-CP (van de Pas *et al.*, 1999). La 3Cl-

4OHBA RDase de *D. chlororespirans* peut aussi déshalogéner en position *ortho* le 3,5-diCl-4OHBA à 50 %, le 3Cl-4OHPA à 28 %, le 2,3-DCP à 15 %, le 2,4,6-TCP à 9 % et le 2,6-DCP à 2 % du taux mesuré avec le 3-Cl-4OHBA. Le groupement carboxyle en position *meta* relativement au chlore qui est déshalogéné peut être substitué par un groupement acétyle (3Cl-4OHPA). Il peut aussi être substitué par un chlore en position *meta* ou *para* (2,3-DCP, 2,4,6-TCP), mais le taux d'activité envers les chlorophénols est beaucoup plus faible que le taux envers le 3Cl-4-OHBA et le 3Cl-4OHPA. Le groupement hydroxyle en position *ortho* serait nécessaire pour la fixation du substrat au site catalytique puisque le 4-OHB est un inhibiteur compétitif au 3Cl-4OHBA alors que le 3-CB n'a aucun effet. (Krasotkina *et al.*, 2001). La 3Cl-4OHBA RDase de *D. chlororespirans* et la 3Cl-4OHPA RDase de *D. dehalogenans* peuvent déshalogéner des chlorophénols avec un chlore additionnel en position 3, 4 ou 6 du groupement hydroxyle (2,3-DCP, 2,4-DCP, 2,6-DCP, 2,4,6-TCP) mais pas en position 5 (2,5-DCP). La CprA3 peut déshalogéner des chlorophénols avec un chlore en position 5 (2,3,5-TCP, 2,3,4,5-TeCP, 2,3,5,6-TeCP), mais elle ne peut pas déshalogéner les DCPs, le 3-Cl-4OHPA ni le 3Cl-4OHBA.

Parmis les RDases purifiées à ce jour, la 3-CB RDase de *D. tiedjei* et l'enzyme CprA5 de *D. hafniense* PCP-1 sont les seules capables d'effectuer la déshalogénation en position *meta* (Ni *et al.*, 1995; Thibodeau *et al.*, 2004). La séquence nucléique de la CprA5 présente plus de similitude aux gènes d'enzymes de type PceA et la 3-CB RDase contenant un cofacteur hème n'est pas une enzyme de type CprA/PceA. La 3Cl-4OHBA RDase de *D. chlororespirans* a 64 % d'indentité (75 % de similitude) avec la CprA3 et la 3Cl-4OHPA RDase de *D. hafniense* DCB-2 a 60 % d'identité (72 % de similitude) avec la CprA3. Sur la base de l'homologie de leur séquence, les enzymes effectuant la déshalogénation en position *ortho* formeraient une classe d'enzyme distincte de celles effectuant la déshalogénation en position *meta* (figure 5).

3.4.4 Caractérisation biochimique

L'enzyme semi-purifiée était moins stable que l'enzyme enrichie à 4 °C. La faible stabilité de l'enzyme après le passage sur la deuxième colonne ne permettait pas d'effectuer les expériences de caractérisation avec la préparation semi-purifiée.

Le pH optimal et la température optimale de la CprA3 se comparent aux autres enzymes CprA/PceA déjà décrites. La plupart des RDases ont un pH optimal entre 7 et 8 et une température optimale qui varie entre 38 à 60 °C (Villemur *et al.*, 2006). L'activité de la CprA3 est optimale à un pH de 7 et à une température entre 50-55 °C et chute à des températures plus élevées. La température optimale de la 3,5-DCP RDase de *D. hafniense* PCP-1 est de 50 °C et l'activité diminue aussi rapidement à des températures plus élevées (Thibodeau *et al.*, 2004).

La présence du cofacteur corrinoïde chez la CprA3 est suggérée par l'inhibition réversible à la lumière par l'iodopropane qui se lie de façon covalente au Co(I) à la noirceur ainsi que par l'inhibition par le cyanure et le sulfite qui peuvent se fixer au Co(III) (Neumann et al., 1995; Miller et al., 1997). Neuman et al. (1996) ont démontré que le PCE/TCE RDase de S. multivorans contient une mole de cofacteur cobalamine par mol d'enzyme. De plus, l'activité enzymatique d'un extrait cellulaire de S. multivorans n'est pas inactivée par l'iodopropane sans l'ajout de citrate de titane (III), ce qui suggère que l'enzyme est présente sous forme oxydée, Co(II) ou Co(III) (Neumann et al., 1995). L'activité enzymatique des extraits cellulaires Desulfitobacterium sp. PCE-S et de D. restrictus est inhibée par l'iodopropane en présence de citrate de titane (III) et l'inhibition est réversible à la lumière (Miller et al., 1997; Schumacher et al., 1997). Les PCE RDases purifiées de Desulfitobacterium sp. PCE-S et de D. restrictus contiennent respectivement 0,7 mol de corrinoïde par mol d'enzyme et un facteur cobalamine par mol d'enzyme (Miller et al., 1998; Maillard et al., 2003). La 3Cl-4OHBA RDase de D. chlororespirans contient 0,84 mol de corrinoïde par mol d'enzyme. L'enzyme est aussi complètement inactivée par l'iodopropane et l'activité est restaurée à 50 % en présence de lumière (Krasotkina et al., 2001). Par contre, la 3-Cl-4OHPA RDase de D. hafniense DCB-2 contient 0,68 mol de facteur corrinoïde par mol d'enzyme et l'iodopropane en présence de citrate de titane (III) n'a aucun effet (Christiansen et al., 1998). La TCE RDase de D. ethenogenes était inhibée par l'iodopropane tandis que la PCE n'était pas inhibée par l'iodopropane mais plutôt par l'iodoéthane et l'activité des deux enzymes était restaurée à environ 80 % par la lumière. La structure du site catalytique pourrait expliquer l'absence d'inhibition par l'iodopropane de certaines enzymes. Le cobalt ne serait pas accessible à l'iodopropane mais une molécule plus petite comme l'iodoéthane pourrait y pénétrer (Magnuson et al., 1998).

La CprA3 était inhibée à 95 % par 0,5 mM de sulfite. Le sulfate et le nitrate n'ont eu aucun effet à 100 mM. L'inhibition par le sulfite à moins de 5 mM mais pas par le sulfate et le nitrate à fortes concentrations a été observée pour la 3-Cl-4OHPA RDase de D. chlororespirans et la 3,5-DCP RDase de D. hafniense PCP-1 (Loffler et al., 1996; Thibodeau et al., 2004). La 3-CB RDase de D. tiedjei est aussi inhibée par le sulfite et le thiosulfate, mais pas par le sulfate (Ni et al., 1995). Les composés halogénés constituent des accepteurs d'électrons énergétiquement moins favorables que le sulfite. L'inhibition directe de l'enzyme par ce dernier est un mécanisme qui permet d'inhiber la déshalorespiration en présence d'un accepteur d'électrons alternatif (Townsend et Suflita, 1997).

La CprA3 était inhibée à 90 % par 100 mM de cyanure de potassium. L'inhibition par le cyanure a aussi été observée pour la CprA5 de *D. hafniense* PCP-1, la PCE RDase de *S. multivorans*, les PCE et TCE RDases de *D. ethenogenes* et la PCE RDase de *D. hafniense* PCE-S (Neumann *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 1997; Magnuson *et al.*, 1998; Thibodeau *et al.*, 2004). L'inhibition par le cyanure suggère la présence d'un métal de transition tel que le cobalt ou le fer (Neumann *et al.*, 1995).

La PCE RDase de *S. multivorans* était inhibée à 50 % par l'EDTA à 1 mM et la PCE RDase de *D. hafniense* PCE-S était inhibée à 100 % par l'EDTA 2 mM (Neumann *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 1997). L'activité de la PCE RDase de *Desulfitobacterium* sp. PCE-S inhibée par l'EDTA était restaurée par l'addition de 2,5 mM de sulfate d'ammonium ferreux. L'activité était également restaurée lorsque l'agent chélateur était séparé de la protéine par filtration sur gel. Ce résultat suggère que l'EDTA inhibe l'enzyme en se liant au cobalt plutôt qu'à un autre métal et que l'activité enzymatique est restaurée par l'addition de Fe(II) parce que l'EDTA libérerait le site catalytique en se complexant au Fe(II) (Miller *et al.*, 1997). L'EDTA n'a aucun effet sur l'activité de la 3-Cl-4OHPA RDase de *D. chlororespirans* à 200 mM, sur l'activité de la CprA5 à 10 mM, des PCE et TCE RDases de *D. ethenogenes* et de la PCE RDase purifiée d'une culture de *C. bifermentans* à 5 mM (Loffler *et al.*, 1996; Magnuson *et al.*, 1998; Okeke *et al.*, 2001; Thibodeau *et al.*, 2004). L'activité de la CprA3 n'était pas inhibée par l'EDTA. Une explication possible est que les cofacteurs ne sont pas accessibles pour la liaison de la molécule ou encore que les cofacteurs métalliques sont fortement liés à l'enzyme.

L'azoture de sodium n'a eu aucun effet sur l'activité de la RDase de *S. multivorans* (Neumann *et al.*, 1995). L'activité de la RDase de *D. chlororespirans* n'était pas affectée par l'azoture de sodium ou d'autres métaux (Fe(NH₄)₂(SO₄)₂, MnCl₂, MgCl₂, ZnCl₂, NiSO₄, CoCl₂, Na₂SeO₄, NaCl, KCl) (Loffler *et al.*, 1996). Les métaux n'ont pas eu d'effet sur l'activité de la PCE RDase purifiée d'une culture de *C. bifermentans* (Okeke *et al.*, 2001). La TCE RDase de *D. dehalogenans* était complètement inhibée par le chlorure de cuivre 1 mM et le chlorure de zinc 5 mM. L'inhibition pourrait être due à l'interaction de ces métaux avec des acides aminés importants pour l'activité enzymatiques (Magnuson *et al.*, 1998). La PCE RDase de *Desulfitobacterium* sp. PCE-S et la TCE RDase de *D. ethenogenes* étaient inhibées à 50 % par l'azoture de sodium à 5 mM et 7 mM respectivement (Miller *et al.*, 1997; Magnuson *et al.*, 1998). L'azoture de sodium 5 mM a inhibé l'activité de la CprA5 à 13 % et l'activité de la CprA3 à 30 % (Thibodeau *et al.*, 2004). L'activité de la CprA3 était légèrement augmentée en présence de chlorure de cobalt (15 %) et de sulfate d'ammonium ferreux (30 %). L'effet du sulfate d'ammonium ferreux est une indication de l'implication de centres fer-soufre.

CHAPITRE II

Étude de différentes conditions de culture sur le niveau d'expression des gènes *cprA2-5* de *Desulfitobacterium hafniense* PCP-1

4.1 Rappel de la problématique et objectifs de la recherche

D. hafniense PCP-1 est la seule bactérie anaérobie capable de déshalogéner le PCP jusqu'au 3-CP et différents composés aromatiques halogénés en positions ortho, meta et para. Le 3,5-DCP est un inducteur de l'activité de déshalogénation en position meta tandis que le 2,4,6-TCP est un inducteur de l'activité en position ortho (Dennie et al., 1998). On a identifié chez la souche PCP-1 quatre gènes de types cprA/pceA: cprA2, cprA3, cprA4 et cprA5 (Villemur et al., 2002). Gauthier et al. (2006) ont confirmé par RT-PCR que ces gènes étaient transcrits. Les travaux de Thibodeau et al. (2004) ont montré que l'enzyme CprA5 a une activité de déchlorination en positions para et meta envers différents chlorophénols et que le rendement d'activité de cette enzyme était favorisé lorsque les cultures étaient réalisées à la température de la pièce. Nos propres travaux ont montré que l'enzyme CprA3 a une activité de déshalogénation en position ortho envers le PCP, certains TeCPs et TCPs.

Une meilleure compréhension des facteurs qui influencent l'expression des gènes *cprA* pourrait permettre d'augmenter de manière substantielle le rendement de la déshalogénation et améliorer l'efficacité d'éventuels traitements anaérobies, ou encore faciliter la purification de nouvelles déshalogénases réductrices. Le projet décrit dans cette section consiste à analyser les effets de différentes conditions de culture sur le niveau d'expression des gènes *cprA2-5* de *D. hafniense* PCP-1 par RT-PCR en temps réel. Les objectifs sont : (1) étudier les effets de différents chlorophénols par rapport au temps d'incubation de la culture; (2) étudier les effets de la température d'incubation de la culture; (3) étudier les effets de chlorophénols.

4.2 Matériel et méthodes

4.2.1 Culture de *D. hafniense* PCP-1

D. hafniense PCP-1 a été cultivée dans des bouteilles de sérum contenant 35 ml de milieu MLA ou dans une bouteille de Schott de 1 litre contenant 500 ml de MLA. Le MLA utilisé était un milieu minéral de Boyd et al. (1983) supplémenté d'extrait de levure 0,1 % (p/v) et de pyruvate 55 mM. Certaines cultures contenaient du 2,4,6-TCP, du 3,5-DCP ou du PCP. La composition du milieu et la méthode de préparation du milieu ont déjà été décrites dans les sections 2.2.3 et 2.2.4.1. Les milieux de 500 ml et de 35 ml ont été inoculés avec respectivement 25 et 1,75 ml (5 % v/v) d'une culture en phase exponentielle de croissance (D.O. à 600 nm entre 0,3 et 0,5). Le pH a été ajusté au besoin avec une solution saturée de NaHCO3 pour maintenir le pH au dessus de 7,2. La densité optique a été mesurée à 600 nm. La pureté de la culture a été vérifiée par coloration de Gram. Pour le dosage des chlorophénols, 0,5 ml d'acétonitrile contenant 0,33 % d'acide acétique a été ajouté à 1 ml de culture dans un microtube de 1,5 ml. La suspension a été centrifugée 5 min à 13 000 x g et le surnageant a été récupéré pour l'analyse par CLHP effectuée selon la méthode décrite dans la section 2.2.8.

4.2.2 Extraction de l'ADN génomique

La méthode d'extraction de l'ADN génomique de *D. hafniense* PCP-1 est décrite dans la section 2.2.11.1.

4.2.3 Extraction de l'ARN total

L'ARN total a été extrait avec le système commercial « RiboPure-Bacteria Kit, Isolation of High Quality RNA from Bacteria » selon les instructions du fabricant (Ambion, Applied Biosystems, Austin, TX, É.-U.). Un volume d'environ 12 ml d'une culture de D. hafniense PCP-1 a été transféré sur la glace dans un tube Falcon de 15 ml et centrifugé immédiatement à 4 °C pendant 4 min à 6000 x g. Le culot de cellules a été repris dans 450 µl de la solution RNAwiz (Ambion, Applied Biosystems). L'ARN a été élué dans un volume de 40 à 100 µl d'eau stérile traitée au diéthyl dicarbonate (DEPC; Ambion, Applied Biosystems). L'ARN a été dosé avec l'appareil NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer. La

pureté de l'ARN a été déterminée par la mesure du rapport de l'absorbance à 260 et à 230 nm (contaminants organiques) et du rapport à 260 et 280 nm (contaminants protéiques).

Pour enlever les traces d'ADN, 16 µg d'ARN ont été transférés dans un microtube de 1,5 ml auquel 8 µl de désoxyribonucléase (DNase; 2 U/µl; Ambion, Applied Biosystems) et 10 µl de tampon « 10X DNase Buffer » (Ambion, Applied Biosystems) ont été ajoutés. Le volume a été complété à 100 µl avec de l'eau traitée au DEPC et le mélange a été incubé une première fois à 37 °C pendant 30 min. Ensuite, 8 µl de DNase ont été ajoutés et le mélange a été incubé à nouveau à 37 °C pendant 30 min. Pour inhiber la DNAse, 20 µl du tampon « DNase Inactivation Reagent » (Ambion, Applied Biosystems) ont été ajoutés et le tube a été agité délicatement pendant 2 min à la température de la pièce. Après une centrifugation de 1 min à 13 000 x g, le surnageant a été transféré dans un microtube de 1,5 ml, puis séparé dans des microtubes de 0,2 ml en fractions aliquotes de 10 µl. Les aliquotes ont été conservées à -80 °C. L'élimination de l'ADN a été vérifiée par une réaction de RT-PCR en temps réel effectuée selon la méthode décrite dans la section 4.2.4 avec 50 ng d'ARN total ou de l'eau traitée au DEPC, la paire d'amorces RpoB-F et RpoB-R (10 nM chacune) (tableau DEPC.

4.2.4 Réaction de transcription inverse et de PCR en temps réel

Les réactions de RT-PCR en temps réel ont été effectuées en une étape avec le système « iScriptTM One-Step RT-PCR Kit with SYBR® Green » de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories) dans un volume de 25 µl. Le mélange réactionnel contenait 50 ng d'ARN total ou de l'eau traitée au DEPC, 10 nM de chacune des paires d'amorces (tableau 16), du tampon « 2x SYBR Green RT-PCR Reaction Mix » (Bio-Rad Laboratories) et la transcriptase inverse « iScript reverse transcriptase » (Bio-Rad Laboratories) aux concentrations spécifiées par le fabricant. Les amorces ont été conçues à partir de la séquence des gènes de DCB-2 dans la de donnée du NCBI D. hafniense disponibles banque (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Elles ont été synthétisées par la compagnie Alpha DNA. Les réactions ont été effectuées selon le programme suivant : 10 min à 50 °C et 5 min à 95 °C, suivi de 30 à 45 cycles d'amplification à 95 °C pendant 10 sec et à 55 °C pendant 30 sec et d'une courbe de dénaturation de 55 °C à 95 °C pendant 10 sec. L'appareil Corbett RotorGene 6000 5-Plex +HMR a été utilisé avec la version 1,7 du logiciel d'analyse de données (Corbett Life Science, Concord, NSW, Australie). Les réactions de RT-PCR en temps réel ont été effectuées en duplicata.

4.2.5 Quantification relative de l'expression des gènes

La méthode des $\Delta\Delta$ CT (cycle seuil) décrite par Livak et Schmittgen (2001) a été utilisée pour la quantification relative de l'expression des gènes. Cette méthode consiste à calculer dans un premier temps, les différences entre le CT du gène cible et le CT d'un gène normalisateur (Δ CT) pour l'échantillon à analyser et pour un échantillon de référence et de calculer ensuite la différence entre les Δ CTs des deux échantillons ($\Delta\Delta$ CT). Le calcul du $\Delta\Delta$ CT est résumé par l'équation suivante :

$$\Delta\Delta CT = (CT_{Cible} - CT_{Normalisateur}) \ \underline{\acute{E}chantillon} \ x - (CT_{Cible} - CT_{Normalisateur}) \ \underline{R\acute{e}f\acute{e}rence}$$
 Dans un dernier temps, le nombre 2 est élevé à la puissance négative du $\Delta\Delta CT$:

$$2^{-\Delta\Delta CT}$$

Les échantillons analysés provenaient de cultures effectuées en présence de chlorophénols et des cultures sans chlorophénol ont servi d'échantillons de référence (les conditions de cultures sont décrites dans les sections 4.2.6-4.2.8). Les gènes cibles analysés sont *cprA2*, *cprA3*, *cprA4* et *cprA5*. *RpoB* a été choisi comme gène normalisateur à la suite d'essais préliminaires montrant que la valeur du CT pour ce gène de cultures exposées au 2,4,6-TCP µM, au 3,5-DCP 60 µM ou à aucun chlorophénol variait peu (1 CT ou moins). L'efficacité et la spécificité de la réaction d'amplification avec chaque paire d'amorces (tableau 16) ont été vérifiées par une réaction de PCR en temps réel sur une série de dilution d'ADN génomique de *D. hafniense* PCP-1. L'efficacité des amorces était supérieure à 0,99. Un facteur d'induction de 10 a été établi arbitrairement comme seuil d'induction significatif.

Tableau 16. Amorces utilisées pour les réactions de transcription inverse et de PCR en temps réel

Gène ciblé	Numéro d'accession dans GenBank	Amorce	Séquence (5'-3')	Longueur du fragment (pb)
cprA2	AAL87788	CprA2-F CprA2-R	AAGGCCAGTGGTCCAAGTTAAAGC AAATCCGCCGTCGTCTTCATTGGT	140
cprA3	YP_002457213	CprA3-F CprA3-R		119
cprA4	AAL87772	CprA4-F CprA4-R	TGACCAATGGCTTGGTACCTCGAA TAGCCATTCCCATGGCATCACTCA	167
cprA5	YP_002457196	CprA5-F CprA5-R	TTAAAGCATCTCTGGTGAGCGTCG ACTTGGTAAGGAAATTCCGCGGTC	139
гроВ	YP_002456917	Rbob-F Rpob-R	TCCTGAAGGTCCCAACATCGGTTT ATTTCTCTTCTTCGTCGGCGGTCA	152

4.2.6 Cinétiques de la transformation des chlorophénols et du niveau d'expression des gènes cprA d'une culture de D. hafniense PCP-1 induite au 2,4,6-TCP et au 3,5-DCP

Trois précultures successives de *D. hafniense* PCP-1 ont été effectuées dans du MLA sans chlorophénol pendant 48 h à 30 °C. Les deux premières cultures ont été produites dans 35 ml de milieu et la troisième dans 500 ml. La dernière culture a servi d'inoculum pour ensemencer 3 bouteilles de Schott de 1 litre contenant chacune 500 ml de MLA sans chlorophénol. Ces cultures de 500 ml ont été incubées à 30 °C pendant environ 24 h. Lorsque la D.O. à 600 nm était d'environ 0,250, du 2,4,6-TCP 50 µM a été ajouté à la première bouteille et du 3,5-DCP 60 µM a été ajouté à la deuxième. Aucun chlorophénol n'a été ajouté à la troisième bouteille (culture non induite). Ensuite, chaque culture a été distribuée par volumes de 20 ml dans 6 bouteilles de sérum anaérobies. Un volume d'environ 2 ml a été prélevé immédiatement d'une bouteille de sérum de chaque culture (temps 0 h) pour mesurer la D.O, le pH et pour effectuer un dosage des chlorophénols. La bouteille a été congelée rapidement dans un bain d'acétone (Fisher Scientific) et de glace carbonique. Les autres bouteilles de sérum ont été placées à 30 °C et traitées de la même façon après 4, 8, 18, 28 et 44 h d'incubation. Les bouteilles de sérum ont été conservées à -80 °C et dégelées dans de

l'eau à la température de la pièce au moment d'effectuer l'extraction de l'ARN total. Deux expériences indépendantes ont été effectuées.

4.2.7 Effet de la température d'incubation sur le niveau d'expression des gènes *cprA* d'une culture de *D. hafniense* PCP-1 induite au 2,4,6-TCP et au 3,5-DCP

Deux précultures successives de D. hafniense PCP-1 effectuées dans 35 ml de MLA sans chlorophénol et une troisième effectuée dans 500 ml du même milieu ont été incubées pendant 48 h à 30 °C. La dernière culture a servi d'inoculum pour ensemencer deux bouteilles de Schott de 1 litre contenant chacune 500 ml de MLA sans chlorophénol. Ces deux cultures ont été incubées à 30 °C jusqu'à une D.O. à 600 nm d'environ 0,270. Ensuite, chaque culture a été distribuée par volumes de 20 ml dans 12 bouteilles de sérum anaérobies. Pour chaque culture, 3 bouteilles de sérum ont été placées à 14 °C, 22 °C, 30 °C et 37 °C pendant 3 h. Ensuite, du 2,4,6-TCP 50 µM a été ajouté à la première bouteille de sérum de chaque culture placée aux différentes températures, du 3,5-DCP $60~\mu M$ a été ajouté à la deuxième et aucun chlorophénol n'a été ajouté à la troisième (culture non induite). Un échantillon de 2 ml a été prélevé immédiatement de chaque bouteille (temps 0 h) pour mesurer la D.O., le pH et les chlorophénols et les bouteilles ont été replacées à leur température respective. Après 12 h d'incubation, un autre échantillon de 2 ml a été prélevé pour effectuer les différentes analyses (temps 12 h). Ensuite, les bouteilles ont été congelées dans un bain d'acétone et de glace carbonique et conservées à -80 °C. Les bouteilles ont été dégelées au besoin dans de l'eau à la température de la pièce pour extraire l'ARN total.

4.2.8 Effet de la concentration de 2,4,6-TCP, de 3,5-DCP et du PCP à 30 μ M sur le niveau d'expression des gènes cprA d'une culture de D. hafniense PCP-1

Deux précultures successives de *D. hafniense* PCP-1 dans 35 ml de MLA sans chlorophénol et une troisième dans 500 ml du même milieu, incubées à 30 °C pendant 48 h, ont été réalisées. La dernière culture a servi d'inoculum pour ensemencer 2 bouteilles de Schott de 1 litre contenant chacune 500 ml de MLA sans chlorophénol. Les cultures ont été incubées à 30 °C jusqu'à une D.O. à 600 nm d'environ 0,270. Ensuite, chaque culture a été distribuée dans 11 bouteilles de sérum anaérobie par volumes de 20 ml. Du 2,4,6-TCP à 0,125, 5, 25 et 50 μM; du 3,5-DCP à 0,15, 3, 6, 30 et 60 μM; et du PCP à 30 μM ont été

ajoutés alors que la dernière bouteille n'a reçu aucun chlorophénol (culture non induite). Un échantillon de 2 ml a été prélevé immédiatement de chaque bouteille (temps 0 h) pour mesurer la D.O., le pH et les chlorophénols. Les cultures ont été placées à 30 °C pendant 12 h, puis un échantillon de 2 ml a été prélevé de chaque bouteille (temps 12 h) pour effectuer les différentes analyses. Les bouteilles ont été congelées rapidement dans un bain d'acétone et de glace carbonique et conservées à -80 °C. Elles ont été dégelées au besoin dans de l'eau à la température de la pièce pour extraire l'ARN total.

4.3 Résultats

4.3.1 Cinétiques de la transformation des chlorophénols et du niveau d'expression des gènes *cprA* d'une culture de *D. hafniense* PCP-1 induite au 2,4,6-TCP et au 3,5-DCP

Des cultures de *D. hafniense* PCP-1 en phase exponentielle de croissance ont reçu du 2,4,6-TCP ou du 3,5-DCP et la transformation des chlorophénols ainsi que le niveau d'expression des gènes *cprA2-5* ont été mesurés en fonction du temps d'incubation à 30 °C. Les résultats représentent la moyenne de deux expériences indépendantes.

La transformation du 2,4,6-TCP est montrée à la figure 28 et la transformation du 3,5-DCP à la figure 29. La concentration de 2,4,6-TCP avait très peu diminué dans les 8 premières heures d'incubation (figure 28). Après 18 h d'incubation, la concentration de 2,4-DCP (44,0 \pm 5,6 μ M) était élevée et après 44 h, il était presque entièrement déchloruré en 2-CP (45,3 \pm 5,1 μ M). La concentration de 3,5-DCP était également inchangée pendant les 8 premières heures (figure 29). La présence de 3-CP (14,6 \pm 5,2 μ M) a été observée après 18 h. Le 3,5-DCP était presque complètement transformé en 3-CP (54,7 \pm 5,7 μ M) après 28 h.

Le niveau d'expression des gènes *cprA* à différents temps suivant l'ajout de 2,4,6-TCP est montré dans la figure 30 et le niveau d'expression des gènes *cprA* à différents temps suivant l'ajout de 3,5-DCP dans la figure 31. Le niveau d'expression des gènes de cultures induites aux chlorophénols est calibré par rapport au niveau d'expression des gènes de cultures sans chlorophénols.

En présence de 2,4,6-TCP, l'expression du gène cprA3 était fortement induite (figure 30). Le niveau d'expression augmentait d'un facteur de plus de 10 000 fois ($\Delta\Delta$ C 12,81 ± 3,15) jusqu'à 18 h d'incubation et diminuait par la suite. À 44 h, niveau d'expression était toujours induit par un facteur d'environ 1400 ($\Delta\Delta$ Ct 10,52 ± 0,02). Le profil d'expression du gène cprA2 était similaire au profil de cprA3, mais le niveau d'expression était beaucoup plus faible. Le facteur d'induction du gène cprA2 était maximal à 18 h à environ 160 fois ($\Delta\Delta$ Ct 6,53 ± 2,35). L'expression du gène cprA4 n'était pas induite par le 2,4,6-TCP. Une augmentation de l'expression du gène cprA5 a été détectée à partir de 18 h suivant l'ajout de 2,4,6-TCP, lorsque la concentration de 2,4-DCP était la plus élevée. Le niveau d'expression du gène cprA5 était maximal au temps 44 h et comparable à celui du gène cprA3, soit une induction par un facteur d'environ 1200 ($\Delta\Delta$ Ct 10,14 ± 0,69).

La transcription du gène cprA5 était fortement induite en présence de 3,5-DCP, contrairement à celle des gènes cprA2, cprA3 et cprA qui n'était pas significativement induite (figure 31). Le niveau d'expression du gène cprA5 le plus élevé a été mesuré 18 h suivant l'ajout du 3,5-DCP. Le facteur d'induction à 18 h était d'environ 1200 ($\Delta\Delta$ Ct 10,02 ± 1,07).

4.3.2 Effet de la température d'incubation sur le niveau d'expression des gènes *cprA* d'une culture de *D. hafniense* PCP-1 induite au 2,4,6-TCP et au 3,5-DCP

L'effet de la température d'incubation sur le niveau d'expression des gènes *cprA2-5* de cultures de *D. hafniense* PCP-1 induite au 2,4,6-TCP et au 3,5-DCP (figures 32 et 33, respectivement) a été évalué par rapport à des cultures non induites. Des précultures de la souche PCP-1 produites à 30 °C ont été distribuées en aliquotes de 20 ml dans des bouteilles de sérum, et placées à 14, 22, 30 et 37 °C. Le 2,4,6,-TCP, le 3,5-DCP ou aucun chlorophénol a été ajouté aux cultures après 3 h d'incubation aux différentes températures. Le niveau d'expression des gènes a été mesuré 12 h suivant l'ajout des chlorophénols. Chaque résultat représente la moyenne de deux cultures.

Le niveau d'expression du gène cprA2 d'une culture induite au 2,4,6-TCP augmentait entre 14 °C et 22 °C mais pas aux températures plus élevées. Le facteur d'induction était d'environ 10 ($\Delta\Delta$ Ct 3,20 ± 0,74) à 14 °C et de 110 ($\Delta\Delta$ Ct 6,69 ± 0,75) à 22 °C. Le niveau d'expression du gène cprA3 augmentait fortement entre 14, 22 et 30 °C et était maximal à 37 °C à un facteur d'induction d'environ 7000 ($\Delta\Delta$ Ct 12,76 ± 0,11). L'expression du gène cprA4 n'était pas induite significativement par le 2,4,6-TCP, même à 37 °C. Le niveau d'expression du gène cprA5 en présence de 2,4,6-TCP était faible et augmentait légèrement avec la température (figure 32).

L'expression des gènes cprA2, cprA3 et cprA4 n'était pas induite par le 3,5-DCP, même à 37 °C. Le niveau d'expression du gène cprA5 en présence de 3,5-DCP augmentait fortement entre 22 et 30 °C. Les facteurs d'inductions étaient d'environ 20 et 877 ($\Delta\Delta$ Ct 4,30 \pm 0,07 et 9,70 \pm 0,66, respectivement) à 22 et 30 °C, respectivement (figure 33).

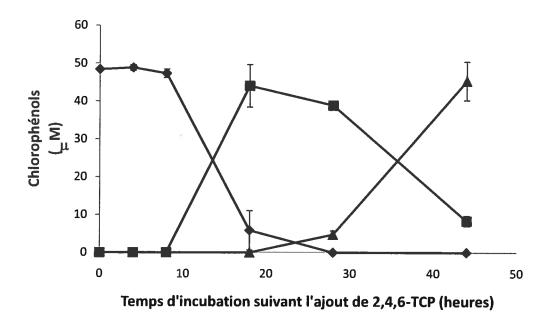


Figure 28. Cinétique de la transformation du 2,4,6-TCP d'une culture de D. hafniense PCP-1 induite au 2,4,6-TCP. 2,4,6-TCP (♠); 2,4-DCP (■); 2-CP (♠).

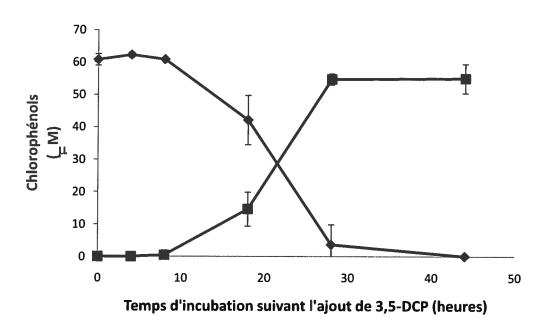


Figure 29. Cinétique de la transformation du 3,5-DCP d'une culture de D. hafniense PCP-1 induite au 3,5-DCP. 3,5-DCP (♠); 3-CP (■).

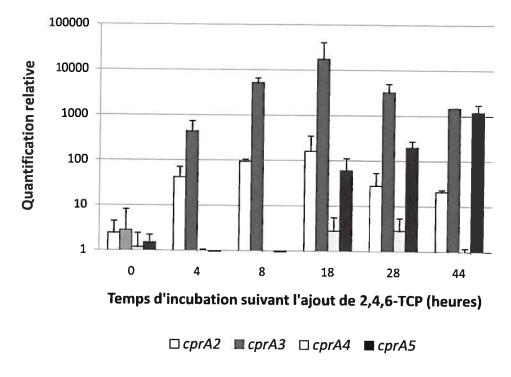


Figure 30. Effet du temps d'incubation sur le niveau d'expression des gènes cprA d'une culture de D. hafniense PCP-1 induite au 2,4,6-TCP. La quantification relative est exprimée en $2^{-\Delta\Delta CT}$.

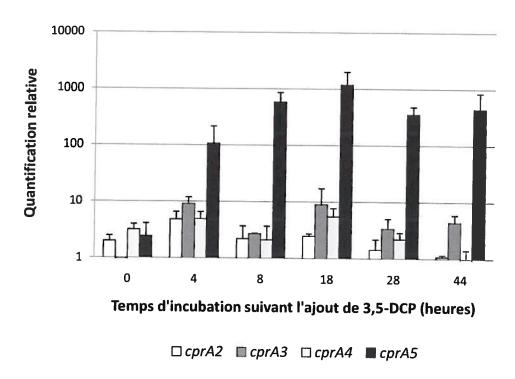
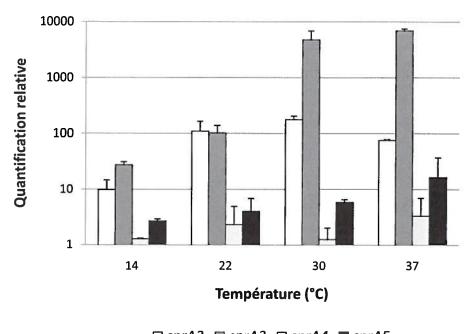


Figure 31. Effet du temps d'incubation sur le niveau d'expression des gènes cprA d'une culture de D. hafniense PCP-1 induite au 3,5-DCP. La quantification relative est exprimée en $2^{-\Delta\Delta CT}$.



□ cprA2 □ cprA3 □ cprA4 ■ cprA5

Figure 32. Effet de la température d'incubation sur le niveau d'expression des gènes cprA d'une culture de D. hafniense PCP-1 induite au 2,4,6-TCP. La quantification relative est exprimée en $2^{-\Delta\Delta CT}$.

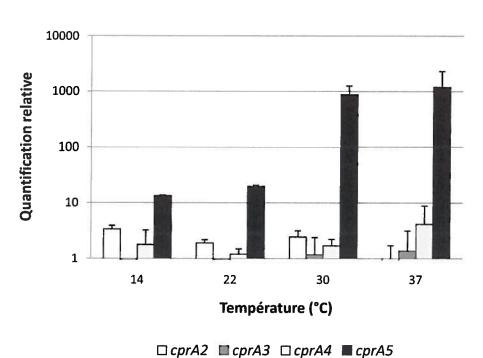


Figure 33. Effet de la température d'incubation sur le niveau d'expression des gènes cprA d'une culture de D. hafniense PCP-1 induite au 3,5-DCP. La quantification relative est exprimée en $2^{-\Delta\Delta CT}$.

4.3.3 Effet de la concentration de 2,4,6-TCP, de 3,5-DCP et du PCP à 30 μ M sur le niveau d'expression des gènes cprA d'une culture de D. hafniense PCP-1

Des expériences ont été effectuées pour déterminer quels gènes étaient induits par le PCP, et pour déterminer les effets de différentes concentrations de 2,4,6-TCP sur le niveau d'expression du gène *cprA3* et de différentes concentrations de 3,5-DCP sur le niveau d'expression du gène *cprA5*. Pour ce faire, deux cultures de la souche PCP-1 en phase de croissance exponentielle ont été séparées en aliquotes de 20 ml dans des bouteilles de sérum. Du PCP à 30 µM ou du 2,4,6-TCP et du 3,5-DCP à différentes concentrations a été ajoutée aux cultures. Certaines bouteilles n'ont rien reçu et représentaient les cultures non induites. Après 12 h d'incubation à 30 °C, le niveau d'expression des gènes *cprA* des cultures induites aux chlorophénols par rapport aux cultures non induites a été vérifié. Les résultats représentent la moyenne des deux cultures.

La figure 34 montre l'effet de la concentration de 2,4,6-TCP sur le niveau d'expression du gène cprA3. Le facteur d'induction du gène cprA3 était d'environ 1000 ($\Delta\Delta$ Ct 10,01 ± 0,30) 12 h suivant l'ajout de 2,4,6-TCP 0,125 μ M. Il augmentait peu lorsque la concentration était de 5 μ M ($\Delta\Delta$ Ct 10,72 ± 0,12). À 25 μ M, le facteur d'induction était d'environ 4000 ($\Delta\Delta$ Ct 12,00 ± 0,02) et il n'augmentait pas à 50 μ M ($\Delta\Delta$ Ct 12,02 ± 0,40).

La figure 35 montre l'effet de la concentration de 3,5-DCP sur le niveau d'expression du gène cprA5 après 12 h d'incubation. Le facteur d'induction du gène cprA5 était d'environ 200 ($\Delta\Delta$ Ct 7,60 \pm 0,26) à 0,15 μ M de 3,5-DCP. Le niveau d'expression augmentait à 3 et 6 μ M, pour un facteur d'induction d'environ 400 et 800, respectivement ($\Delta\Delta$ Ct 8,60 \pm 0,59 et 9,68 \pm 0,52, respectivement). Le niveau d'expression était inchangé aux concentrations plus élevées.

La figure 36 montre le niveau d'expression des gènes cprA2-5 d'une culture de D. hafniense PCP-1 après 12 h d'incubation en présence de PCP à 30 μ M. Après ce temps d'incubation, la concentration de PCP avait peu diminué. Le gène le plus fortement induit par l'ajout de PCP était cprA3. La transcription du gène cprA3 était induite par un facteur d'environ 33500 ($\Delta\Delta$ Ct 14,99 \pm 0,52). La transcription du gène cprA2 était induite par un facteur d'environ 700 ($\Delta\Delta$ Ct 9,48 \pm 0,04). L'expression du gène cprA4 était faiblement

induite par un facteur d'environ 13 ($\Delta\Delta$ Ct 3,71 \pm 0,31) et celle du gène *cprA5* n'était pas significativement induite par le PCP.

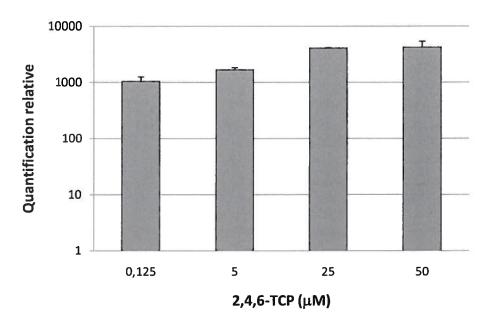


Figure 34. Effet de la concentration de 2,4,6-TCP sur le niveau d'expression du gène cprA3 d'une culture de D. hafniense PCP-1. La quantification relative est exprimée en $2^{-\Delta\Delta CT}$.

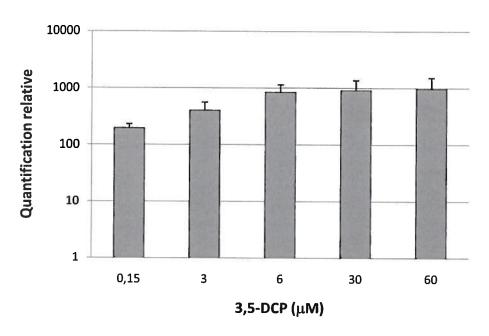


Figure 35. Effet de la concentration de 3,5-DCP sur le niveau d'expression du gène cprA5 d'une culture de D. hafniense PCP-1. La quantification relative est exprimée en $2^{-\Delta\Delta CT}$.

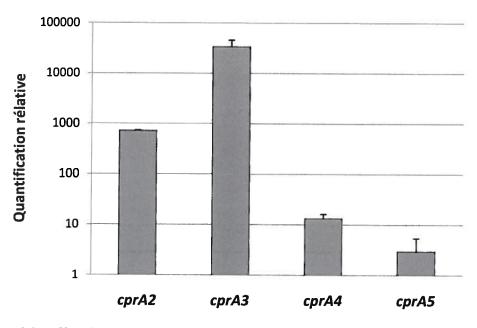


Figure 36. Effet du PCP à 30 μ M sur le niveau d'expression des gènes cprA d'une culture de D. hafniense PCP-1. La quantification relative est exprimée en $2^{-\Delta\Delta CT}$.

4.4 Discussion

L'activité de déshalogénation de D. hafniense PCP-1 doit être induite par les chlorophénols. Dennie et al. (1998) ont montré qu'il n'y a aucune activité de déshalogénation lorsque la synthèse protéique est inhibée avec du chloramphénicol avant l'ajout des chlorophénols. Le PCP, le 2,4,6-TCP, le 2,3,4-TCP, le 2,3,5-TCP, le 2,6-DCP et le 2,4-DCP induisent l'activité de déshalogénation en position ortho, tandis que le 3,4,5-TCP et le 3,5-DCP induisent l'activité en position meta (Dennie et al., 1998). Nous avons mesuré la transformation du 2,4,6-TCP et du 3,5-DCP ajoutés à des cultures non exposées aux chlorophénols en phase exponentielle de croissance. Le délai observé entre l'ajout du substrat et l'activité de déshalogénation (environ 8 h dans les deux cas) pourrait correspondre au temps nécessaire à la production d'une quantité suffisante d'enzymes dans les conditions expérimentales utilisées. La formation d'une enzyme fonctionnelle comporte plusieurs étapes qui incluent l'induction de la transcription des gènes cprAB et possiblement d'autres gènes impliqués dans la synthèse des cofacteurs et la maturation des déshalogénases réductrices, l'incorporation des cofacteurs, et l'exportation au périplasme de l'enzyme correctement repliée par le système de sécrétion TAT (Jack et al., 2005; Lee et al., 2006; Smidt et de Vos 2004; Smidt et al., 2000). Il existe peu d'études sur les protéines nécessaires à la production d'une enzyme fonctionnelle et sur la régulation des gènes correspondants dans la littérature.

La transcription des gènes de déshalogénases réductrices serait étroitement contrôlée. À ce jour, quatre types de régulateurs associés aux gènes rdhAB ou à des gènes codant pour des protéines hypothétiques qui pourraient être impliquées dans la production des RDases ont été identifiés : CprK, CprC, les systèmes régulateurs à deux composantes et, plus récemment, MarR (Smidt et al., 2000; Muller et al., 2004; Kube et al., 2005; Seshadri et al., 2005). CprK est un régulateur transcriptionnel dépendant du statut redox qui se fixe à la région promotrice de différents gènes cpr en présence d'effecteurs spécifiques (Mazon et al., 2007; Gabor et al., 2008). CprC est similaire aux régulateurs transcriptionnels de la famille NosR/NirI. Des gènes similaires à cprC ont été trouvés associés aux gènes de RDases chez Desulfitobacterium dehalogenans, D. hafniense DCB-2 et TCE1, Desulfitobacterium chlororespirans, Dehalobacter restrictus, Dehalococcoides sp. VS et Dehalococcoides ethenogenes Y51. Chez D. ethenogenes Y51, deux gènes similaires à cprC sont localisés à ethenogenes Y51. Chez D. ethenogenes Y51, deux gènes similaires à cprC sont localisés à

proximité de gènes pouvant coder pour des composantes du système de sécrétion TAT (Muller et al., 2004; Villemur et al., 2006). Plusieurs gènes de RDases sont associés chez Dehalococcoides spp. à des gènes de systèmes régulateurs à deux composantes qui pourraient jouer un rôle de senseur du potentiel redox ou du statut énergétique de la cellule (Kube et al., 2005). Deux mutants de D. dehalogenans incapables d'effectuer la déshalogénation du 3Cl-4OHPA avaient une insertion du transposon Tn916 à proximité d'un gène codant pour une histidine kinase putative d'un système de régulation à deux composantes. Le site d'insertion du transposon dans l'un de ces mutants était à proximité d'un gène pouvant coder pour une enzyme impliquée dans la biosynthèse des porphyrines (Smidt et al., 1999). Le quatrième type de régulateur associé aux gènes de RDases, MarR, pourrait agir sous l'effet de composés aromatiques. Il a été identifié chez D. ethenogenes 195 et Dehalococcoides sp. CBDB1 (Kube et al., 2005).

Gauthier et al. (2006) ont vérifié la transcription des gènes cprA de cultures de D. hafniense PCP-1, DCB-2 et TCP-A par RT-PCR (figure 13). Les transcrits des gènes cprA2 et cprA3 de ces trois souches ont été détectés en présence de 2,4,6-TCP, de 3,5-DCP ou sans chlorophénol et ceux du gène cprA5 seulement en présence de 2,4,6-TCP ou de 3,5-DCP. Les transcrits du gène cprA4 ont été détectés en présence de 2,4,6-TCP, de 3,5-DCP ou sans chlorophénol chez les souches DCB-2 et TCP-A. Chez la souche PCP-1, les transcrits de cprA4 ont été détectés en quantité trace avec du 2,4,6-TCP et plus abondamment avec du 3,5-DCP ou sans chlorophénol (Gauthier et al., 2006).

Dans cette étude, de nouvelles informations sur la transcription des gènes cprA de D. hafniense PCP-1 ont été obtenues en utilisant la technique de RT-PCR en temps réel en une étape, une méthode rapide qui permet de minimiser les erreurs de pipetage. Le principal avantage de la RT-PCR en temps réel par rapport à la RT-PCR classique est sa sensibilité. Les chlorophénols ont été ajoutés au début de la phase exponentielle de croissance et les ARN ont été extraits après un temps d'incubation déterminé afin de comparer le niveau d'expression de cultures induites par rapport à celui de cultures non induites, et ce, pour différentes conditions de cultures. La technique de quantification relative $\Delta\Delta$ Ct a permis d'éliminer les biais liés aux différences dans la quantité et la qualité des échantillons. De plus, les cellules entières ont été congelées rapidement et conservées en conditions anaérobies à -80 °C afin de conserver l'intégrité des ARN jusqu'au moment de l'extraction et

une trousse d'extraction permettant d'obtenir rapidement des ARN de bonnes qualités a été utilisée.

Nos résultats ont montré que la transcription du gène *cprA4* n'est pas induite par le 2,4,6-TCP, le 3,5-DCP et seulement faiblement par le PCP pour les différentes conditions de culture testées. La transcription du gène *cprA3* est fortement induite lorsque l'activité de déshalogénation du 2,4,6-TCP est la plus élevée, soit entre 4 et 18 h suivant l'ajout de 2,4,6-TCP. Après 18 h, le 2,4,6-TCP est complètement déshalogéné en 2,4-DCP et la transcription tend à diminuer. La transcription de *cprA3* est aussi induite par le PCP, mais pas par le 3,5-DCP. La transcription de *cprA3* pourrait être induite par différents composés fortement chlorés. D'autres études seraient nécessaires afin de déterminer la spécificité vis-à-vis les chlorophénols et d'autres composés chlorés dans l'induction de la transcription de ce gène.

La transcription du gène cprA2 est fortement induite par le PCP, mais pas par le 2,4,6-TCP ni par le 3,5-DCP. Il est possible que la RDase hypothétique codée par le gène cprA2 soit capable d'effectuer la déshalogénation du PCP. Le gène cprA2 est localisé à 219 nucléotides en amont du gène cprB3 et le gène cprA3 est localisé 14 nucléotides en aval du gène cprB3 (Villemur et al., 2002). Plusieurs séquences « déhalobox » putatives pour la fixation du régulateur transcription CprK dans les régions intergéniques des gènes cpr ont été identifiées de l'analyse du génome de D. hafniense DCB-2 (Gabor et al., 2008). Une séquence « dehalobox » est présente en amont des gènes cprBA2 (DB1) et une autre, différente, en amont des gènes cprBA3 (DB2) (figures 16 et 17). Gabor et al. (2008) ont démontré que CprK2 a une forte affinité pour la séquence DB1 et une affinité plus faible pour la séquence DB2 en présence de 3Cl-4OHPA. À la lumière des résultats obtenus dans notre étude, il serait intéressant de mesurer l'affinité des différents régulateurs CprK de la souche DCB-2 pour les séquences promotrices DB1 et DB2 en présence de PCP ou d'autres chlorophénols.

CprA5 est le seul gène fortement induit suite à l'ajout de 3,5-DCP à une culture de la souche PCP-1 en phase exponentielle de croissance. Dans une culture auquel du 2,4,6-TCP a été ajouté, le gène cprA5 est seulement induit après 18 h, lorsque la concentration de 2,4-DCP est la plus élevée. La transcription du gène cprA5 n'est pas induite par le PCP. Le gène cprA5 code pour une 3,5-DCP RDase qui effectue la déshalogénation, à des taux plus faibles, d'autres chlorophénols. Le 2,4,6-TCP et le 2,4-DCP sont déshalogénés en position ortho et le

PCP, le 2,3,4,5-TeCP et le 3,4,5-TCP en position *para* (Thibodeau *et al.*, 2004). Contrairement au gène *cprA3*, la transcription du gène *cprA5* n'est pas significativement induite par le 2,4,6-TCP, ni par le PCP, même s'il s'agit de substrats secondaires pour l'enzyme. Ce gène est plutôt induit par des composés faiblement chlorés, tel que le 3,5-DCP et le 2,4-DCP.

L'induction de la transcription du gène tceA de Dehalococcoides présente des similitudes avec celle des gènes cprA de la souche PCP-1. Le niveau d'expression du gène tceA codant pour une enzyme effectuant principalement la déshalogénation du TCE diminuait lorsque ce substrat était complètement transformé en VC dans une culture de D. ethenogenes 195 (Magnuson et al., 1998; Rahm et al., 2006). Dans un enrichissement de culture de Dehalococcoides, l'expression du gène tceA augmentait en présence de trans-DCE, une molécule que l'enrichissement ne peut pas utiliser pour sa croissance. Le gène tceA était aussi induit par le TCE, le cis-DCE et le 1,1-DCE, mais pas par le PCE ni le VC (Johnson et al., 2005). Le nombre de chlores retrouvé sur ces molécules semble donc être un facteur important pour l'induction de ce gène. Une autre étude a montré que la transcription des gènes tceA et pceA de D. ethenogenes 195 était fortement induite et n'était pas couplée à la croissance à des concentrations de TCE élevées (Johnson et al., 2008).

D. hafniense PCP-1 est la seule bactérie anaérobie connue capable d'effectuer la déshalogénation du PCP jusqu'au 3-CP. La CprA3 a une forte activité de déshalogénation du PCP et du 2,3,4,5-TeCP en position ortho et la CprA5 du 3,5-DCP en 3-CP et, entre autres, du 3,4,5-TCP en position para. Il serait intéressant de suivre l'expression des différents gènes cprA dans le temps suivant l'ajout de PCP. Les gènes cprA2 et cprA4 ont-ils un rôle dans la déshalogénation du PCP et des produits de sa déshalogénation? Il serait aussi intéressant de vérifier l'effet d'autres chlorophénols et molécules halogénés sur l'expression des gènes cprA. Quel est l'importance de la position des chlores et le nombre de chlores pour l'induction des gènes cprA3 et cprA5? Quels gènes sont induits par le 3,4,5-TCP? Le gène cprA5 qui est plus similaire aux gènes pceA qu'aux gènes cprA (figure 5) est-il induit par les chloroéthènes?

Le transcrit du gène *cprA5* a été détecté chez les souches DCB-2 et TCP-A en présence ou pas de chlorophénol (Gauthier *et al.*, 2006). Pourtant, ces souches n'effectuent pas la déshalogénation en position *para* et lorsque du PCP est ajouté à une culture de la

souche DCB-2 ou TCP-A, il y a accumulation de 3,4,5-TCP (Madsen et Licht, 1992; Breitenstein et al., 2001). Le résidu proline à la position 273 dans la séquence en acides aminés de l'enzyme CprA5 hypothétique de la souche DCB-2 est substitué par un résidu leucine dans la souche PCP-1 (Thibodeau et al., 2004). Il est possible que cette différence confère aux enzymes un spectre d'activité différent. Une autre possibilité est que les souches DCB-2 et TCP-A produisent des cofacteurs différents, résultant en des enzymes de spécificités différentes. Une souche de Sulfurospirillum multivorans incapable de transformer le PCE contient un gène identique à 100 % au gène codant pour la PCE RDase d'une souche capable de déshalogéner le PCE mais ne produit pas le même cofacteur corrinoïde. L'addition du cofacteur extrait de la souche capable de déshalogéner le PCE n'est pas suffisante pour produire une enzyme fonctionnelle. Il semblerait que d'autres éléments soient nécessaires pour la production d'une enzyme (Siebert et al., 2002). Une autre cause pouvant expliquer l'absence d'activité para chez les souches DCB-2 et TCP-A serait que la transcription du gène cprA5 ne soit pas significativement induite par les chlorophénols. La technique utilisée par Gauthier et al. (2006) ne permet pas de comparer le niveau d'induction du gène en présence de chlorophénols. Il serait intéressant d'étudier le profil d'expression du gène cprA5 chez ces souches en présence de 3,5-DCP par RT-PCR en temps-réel.

La température optimale de croissance de *D. hafniense* PCP-1 est de 38 °C (Bouchard et al., 1996). Un meilleur rendement d'activité a cependant été obtenu d'une culture induite au 3,5-DCP incubée à plus basse température (Thibodeau et al., 2004). Il semblerait qu'un ralentissement de la croissance peut favoriser la production de la CprA5. Étant donné que *D. hafniense* PCP-1 est une bactérie issue du sol, il est possible que le métabolisme de déshalogénation soit mieux adapté à des températures plus représentatives de son environnement naturel. Nous avons déterminé l'effet de la température d'incubation sur l'expression des gènes *cprA* de cultures de *D. hafniense* PCP-1 induites par le 2,4,6-TCP et le 3,5-DCP. Le niveau d'expression des gènes *cprA2*, *cprA3* et *cprA5* est lié à la température d'incubation. La transcription du gène *cprA2* en présence de 2,4,6-TCP et de 3,5-DCP respectivement est maximale à 37 °C. Des résultats similaires ont été obtenus pour la transcription du gène *tceA* d'un enrichissement de culture de *Dehalococcoides* (Johnson *et al.*, 2005). L'activité de déshalogénation plus faible mesurée par Thibodeau *et al.* (2003)

lorsque les cellules sont incubées à des températures plus élevées, pourrait être due à un retard dans la maturation de l'enzyme.

Le niveau d'expression des gènes *cprA3* et *cprA5* a été vérifié pour différentes concentrations de chlorophénols. Le niveau d'expression du gène *cprA3* augmente de 0,125 à 25 μM de 2,4,6-TCP. Doubler la concentration de 2,4,6-TCP à 50 μM n'a eu aucun effet. Le niveau d'expression du gène *cprA5* augmente entre 0,15 et 6 μM de 3,5-DCP et il est inchangé entre 6 et 60 μM de 3,5-DCP. Johnson *et al.* (2005) ont obtenu des résultats comparables pour l'expression du gène *tceA* d'un enrichissement de culture de *Dehalococcoides* qui a été fortement induite à 11, 119 et 333 μM de TCE. Le niveau d'expression était légèrement plus faible à une concentration de 11 μM, mais il était inchangé à 119 et 333 μM (Johnson *et al.*, 2005).

CONCLUSION

Les xénobiotiques halogénés sont des contaminants persistants dans l'environnement susceptibles de provoquer des problèmes de santé et environnementaux graves. Leur forte toxicité et leur faible biodégradabilité sont les mêmes propriétés qui les rendent extrêmement intéressants pour des applications industrielles multiples. Le PCP est un biocide puissant toujours utilisé au Canada dans le traitement du bois servant à la fabrication de poteaux utilitaires. L'élaboration de bioprocédés mettant à profit l'activité de déshalogénation des microorganismes anaérobies est une avenue prometteuse pour la restauration de sites ou d'effluents contaminés lorsque les traitements aérobies sont impossibles ou trop coûteux.

Dans cette étude, une nouvelle enzyme, CprA3, ayant une forte activité envers le PCP a été purifiée d'une culture de D. hafniense PCP-1 produite en présence de pyruvate comme source de carbone et d'électrons et de 2,4,6-TCP comme inducteur de l'activité de déshalogénation. La purification et la caractérisation de la CprA3 ont permis de déterminer les conditions d'activité optimale et son spectre de déshalogénation. Plusieurs facteurs ont rendu la purification de cette enzyme difficile tels que son origine membranaire, ses propriétés hydrophobes, sa sensibilité à l'oxygène et sa faible stabilité une fois purifiée. L'enzyme CprA3 comporte plusieurs similitudes avec d'autres RDases contenant un cofacteur corrinoïde et des centres fer-soufre. Le gène cprA3 est identique à celui retrouvé dans la souche DCB-2. La séquence en acides aminés contient deux motifs riches en cystéine pour la liaison de centres fer-soufre et un peptide signal TAT de 47 résidus. La présence du cofacteur corrinoïde est suggérée par l'inhibition par l'iodopropane réversible à la lumière ainsi que l'inhibition par le sulfite et le cyanure. L'activité est optimale entre 50-55 °C et à un pH de 7,0. Le poids moléculaire a été estimé à 47 kDa par SDS-PAGE. Les autres RDases de type CprA effectuant la déshalogénation en position ortho ont un poids moléculaire de 47-50 kDa (Christiansen et al., 1998; van de Pas et al., 1999; Krasotkina et al., 2001; van de Pas et al., 2001). Le spectre d'activité de la CprA3 est différent des autres RDases. Il s'agit de la seule enzyme CprA/PceA purifiée à ce jour ayant une forte activité envers le PCP. La CprA3 peut déshalogéner différents chlorophénols en position ortho seulement. Elle ne peut pas déshalogéner les DCPs, le 3Cl-4OHPA ni le 3Cl-4OHBA. La valeur de la $K_{\rm m}$ apparante pour le PCP en présence de 2 mM méthyl viologène a été évaluée à 42 μM. Il n'y a aucune

structure de déshalogénase réductrice et peu d'information disponible dans la littérature sur la structure des facteurs corrinoïdes. Il serait intéressant d'effectuer une étude plus approfondie des enzymes CprA3 et CprA5 de *D. hafniense* PCP-1 afin d'élucider les mécanismes impliqués dans la spécificité des RDases. L'identification d'inhibiteurs compétitifs permettrait d'évaluer le rôle du nombre de chlores, de la position des chlores ainsi que la présence d'un groupement hydroxyle, carboxyle, acétyle ou autre dans la fixation du substrat au site actif. Une analyse par spectrométrie de masse des cofacteurs extraits des enzymes purifiées permettrait de déterminer la structure de leur cyanocobalamine respective et les différences entre les cofacteurs s'il y a lieu. Une étude portant sur l'activité abiotique des cofacteurs corrinoïdes purifiés envers différents substrats halogénés permettrait également d'évaluer le rôle des différents cofacteurs dans la spécificité. Les nouvelles connaissances sur les enzymes effectuant la déshalogénation réductrice ayant des spectres d'activité différents pourraient servir ultérieurement à développer par génie moléculaire des enzymes dirigées vers des polluants halogénés spécifiques ou encore avec un spectre plus large.

Dans le deuxième volet de ce projet de recherche, nous avons étudié l'effet de différentes conditions de culture sur le niveau d'expression des gènes *cprA* de *D. hafniense* PCP-1 par RT-PCR en temps réel. Cette étude a apporté une meilleure compréhension des facteurs influents sur la régulation de ces gènes. Avec le pyruvate comme source de carbone et d'électrons, le PCP et le 2,4,6-TCP induisent fortement la transcription du gène *cprA3* et plus faiblement celle du gène *cprA2*. L'expression du gène *cprA5* n'est pas induite par le PCP. Elle est fortement induite par le 3,5-DCP et seulement 18 h après l'ajout de 2,4,6-TCP, lorsque celui-ci est complètement transformé en 2,4-DCP. Le niveau d'expression des gènes *cprA* augmente avec la température. La transcription du gène *cprA3* est fortement induite en présence de 2,4,6-TCP à 0,125 μM, et celle du gène *cprA5* avec du 3,5-DCP à 0,15 μM.

Il serait intéressant de mesurer le niveau d'induction des gènes *cprA* dans le temps suivant l'ajout de PCP, et de vérifier l'effet d'autres chlorophénols, comme le 3,4,5-TCP, que la souche PCP-1 est la seule à pouvoir déshalogéner en position *para*. Il serait aussi intéressant de vérifier l'effet de différentes substances halogénées sur la transcription des gènes *cprA* notamment *cprA2* et *cprA4*. On sait que la souche PCP-1 peut déshalogéner le PCE en TCE ainsi que différentes substances aromatiques halogénées (Dennie *et al.*, 1998). De la même manière, d'autres souches de *Desulfitobacterium* reconnues pour leurs activités

de déshalogénation pourraient être étudiées. Les résultats pourraient améliorer nos connaissances sur le rôle des RDases hypothétiques, étant donné que la purification et la caractérisation de ces enzymes sont souvent longues et difficiles.

Des études sur les déshalogénases réductrices, leur caractérisation biochimique, la détermination de leur spectre d'activité et l'évaluation des conditions de culture sur l'expression des gènes de RDases sont essentielles. Les connaissances acquises pourraient permettre d'augmenter de manière substantielle le rendement de la déshalogénation et l'utilisation de bactéries anaérobies dans les traitements biologiques serait plus rationnelle et efficace.

Liste des références

- Adrian, L., S. K. Hansen, J. M. Fung, H. Gorisch et S. H. Zinder (2007a). Growth of Dehalococcoides strains with chlorophenols as electron acceptors. Environ Sci Technol 41 (7): 2318-2323.
- Adrian, L., J. Rahnenfuhrer, J. Gobom et T. Holscher (2007b). Identification of a chlorobenzene reductive dehalogenase in *Dehalococcoides* sp. strain CBDB1. *Appl Environ Microbiol* 73 (23): 7717-7724.
- Adrian, L., U. Szewzyk, J. Wecke et H. Gorisch (2000). Bacterial dehalorespiration with chlorinated benzenes. *Nature* 408 (6812): 580-583.
- Alekshun, M. N. et S. B. Levy (1999). The *mar* regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. *Trends Microbiol* 7 (10): 410-433.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2001). Toxicological profile for Pentachlorophenol. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. [En ligne]. http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/ tp51.html. Page consultée le 2 février 2010.
- Banerjee, R. et S. W. Ragsdale (2003). The many faces of vitamin B12: catalysis by cobalamin-dependent enzymes. *Annu Rev Biochem* 72: 209-247.
- Beaudet, R., M. J. Levesque, R. Villemur, M. Lanthier, M. Chenier, F. Lepine 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 (1): 135-141.
- Berks, B. C. (1996). A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol Microbiol* 22 (3): 393-404.
- Bouchard, B., R. Beaudet, R. Villemur, G. McSween, F. Lepine 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 (4): 1010-1015.
- Boyd, S. A., D. R. Shelton, D. Berry et J. M. Tiedje (1983). Anaerobic biodegradation of phenolic compounds in digested sludge. *Appl Environ Microbiol* 46 (1): 50-54.
- Boyer, A., R. Page-Belanger, M. Saucier, R. Villemur, F. Lepine, P. Juteau et R. Beaudet (2003). Purification, cloning and sequencing of an enzyme mediating the reductive dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol from *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. *Biochem J* 373 (1): 297-303.

- Boyle, A. W., C. D. Phelps et L. Y. Young (1999). Isolation from estuarine sediments of a *Desulfovibrio* strain which can grow on lactate coupled to the reductive dehalogenation of 2,4, 6-tribromophenol. *Appl Environ Microbiol* 65 (3): 1133-1140.
- 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 (7): 248-254.
- Breitenstein, A., A. Saano, M. Salkinoja-Salonen, J. R. Andreesen et U. Lechner (2001). Analysis of a 2,4,6-trichlorophenol-dehalogenating enrichment culture and isolation of the dehalogenating member *Desulfitobacterium frappieri* strain TCP-A. *Arch Microbiol* 175 (2): 133-142.
- Brot, N. et H. Weissbach (1965). Enzymatic synthesis of methionine. Chemical alkylation of the enzyme-bound cobamide. *J Biol Chem* 240 (7): 3064-3070.
- Bunge, M., L. Adrian, A. Kraus, M. Opel, W. G. Lorenz, J. R. Andreesen, H. Gorisch et U. Lechner (2003). Reductive dehalogenation of chlorinated dioxins by an anaerobic bacterium. *Nature* 421 (6921): 357-360.
- Chang, Y. C., M. Hatsu, K. Jung, Y. S. Yoo et K. Takamizawa (2000). Isolation and characterization of a tetrachloroethylene dechlorinating bacterium, *Clostridium bifermentans* DPH-1. *J Biosci Bioeng* 89 (5): 489-491.
- Charbonneau, M. E., V. Girard, A. Nikolakakis, M. Campos, F. Berthiaume, F. Dumas, F. Lepine et M. Mourez (2007). O-linked glycosylation ensures the normal conformation of the autotransporter adhesin involved in diffuse adherence. *J Bacteriol* 189 (24): 8880-8889.
- Christiansen, N. et B. K. Ahring (1996). *Desulfitobacterium hafniense* sp. nov., an anaerobic, reductively dechlorinating bacterium. *Int J 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 Lett* 436 (2): 159-162.
- Cole, J. R., A. L. Cascarelli, W. W. Mohn et J. M. Tiedje (1994). Isolation and characterization of a novel bacterium growing via reductive dehalogenation of 2-chlorophenol. *Appl Environ Microbiol* 60 (10): 3536-3542.
- Cole, J. R., B. Z. Fathepure et J. M. Tiedje (1995). Tetrachloroethene and 3-chlorobenzoate dechlorination activities are co-induced in *Desulfomonile tiedjei* DCB-1. *Biodegradation* 6 (2): 167-172.
- Crosby, D. G. (1981). Environmental chemistry of pentachlorophenol. *Pure Appl Chem* 53: 1051-1080.

- De Wildeman, S., G. Diekert, H. Van Langenhove et W. Verstraete (2003). Stereoselective microbial dehalorespiration with vicinal dichlorinated alkanes. *Appl Environ Microbiol* 69 (9): 5643-5647.
- Dennie, D., I. I. Gladu, F. Lepine, R. Villemur, J.-G. Bisaillon et R. Beaudet (1998). Spectrum of the reductive dehalogenation activity of *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. *Appl Environ Microbiol* 64 (11): 4603-4606.
- Deweerd, K. A. et J. M. Suflita (1990). Anaerobic aryl reductive dehalogenation of halobenzoates by cell extracts of *Desulfomonile tiedjei*. Appl Environ Microbiol 56 (10): 2999-3005.
- El Fantroussi, S., H. Naveau et S. N. Agathos (1998). Anaerobic dechlorinating bacteria. Biotechnol Prog 14 (2): 167-88.
- Environnement Canada (2009). Publication of final decision on the screening assessment of six substances on the Domestic Substances List - benzenamine, 2,6-dinitro-N,Ndipropyl-4-(trifluoromethyl)- (trifluralin); 1,3,5-triazine-2,4-diamine, 6-chloro-Nethyl-N'-(1-methylethyl)- (atrazine); 1,3-benzenedicarbonitrile, 2,4,5,6-tetrachloro-(chlorothalonil): 1H-indene-1,3(2H)-dione, 2-[(4-chlorophenyl)phenylacetyl]-(chlorophacinone); benzene, 1,1'-(2,2,2-trichloroethylidene)bis[4-methoxy-(methoxychlor); and phenol, pentachloro- (pentachlorophenol) - (subsection 77(6) of the Canadian Environmental Protection Act, 1999). CEPA (Canadian Environmental Protection Environmental Registry. [En ligne]. http://www.ec.gc.ca/CEPARegistry/notices/NoticeText.cfm?intNotice=518&intDocu ment=4521. Page consultée le 16 mars 2010.
- Fathepure, B. Z., J. P. Nengu et S. A. Boyd (1987). Anaerobic bacteria that dechlorinate perchloroethene. *Appl Environ Microbiol* 53 (11): 2671-2674.
- Fetzner, S. et F. Lingens (1994). Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics, and biotechnological applications. *Microbiol Rev* 58 (4): 641-685.
- Fink, A. L. (1999). Chaperone-mediated protein folding. Physiol Rev 79 (2): 425-449.
- Finneran, K. T., H. M. Forbush, C. V. VanPraagh et D. R. Lovley (2002). *Desulfitobacterium metallireducens* sp. nov., an anaerobic bacterium that couples growth to the reduction of metals and humic acids as well as chlorinated compounds. *Int J Syst Evol Microbiol* 52 (6): 1929-1935.
- Fletcher, K. E., K. M. Ritalahti, K. D. Pennell, K. Takamizawa et F. E. Loffler (2008). Resolution of culture *Clostridium bifermentans* DPH-1 into two populations, a *Clostridium* sp. and tetrachloroethene-dechlorinating *Desulfitobacterium hafniense* strain JH1. *Appl Environ Microbiol* 74 (19): 6141-6143.

- Fung, J. M., R. M. Morris, L. Adrian et S. H. Zinder (2007). Expression of reductive dehalogenase genes in *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195 growing on tetrachloroethene, trichloroethene, or 2,3-dichlorophenol. *Appl Environ Microbiol* 73 (14): 4439-4445.
- Furukawa, K., A. Suyama, Y. Tsuboi, T. Futagami et M. Goto (2005). Biochemical and molecular characterization of a tetrachloroethene dechlorinating *Desulfitobacterium* sp. strain Y51: a review. *J Ind Microbiol Biotechnol* 32 (11-12): 534-541.
- Futagami, T., M. Goto et K. Furukawa (2008). Biochemical and genetic bases of dehalorespiration. *Chem Rec* 8 (1): 1-12.
- Futagami, T., Y. Tsuboi, A. Suyama, M. Goto et K. Furukawa (2006). Emergence of two types of nondechlorinating variants in the tetrachloroethene-halorespiring *Desulfitobacterium* sp. strain Y51. *Appl Microbiol Biotechnol* 70 (6): 720-728.
- Gabor, K., K. Hailesellasse Sene, H. Smidt, W. M. de Vos et J. van der Oost (2008). Divergent roles of CprK paralogues from *Desulfitobacterium hafniense* in activating gene expression. *Microbiology* 154 (12): 3686-3696.
- Gabor, K., C. S. Verissimo, B. C. Cyran, P. Ter Horst, N. P. Meijer, H. Smidt, W. M. de Vos et J. van der Oost (2006). Characterization of CprK1, a CRP/FNR-type transcriptional regulator of halorespiration from *Desulfitobacterium hafniense*. J Bacteriol 188 (7): 2604-2613.
- Gauthier, A., R. Beaudet, F. Lepine, P. Juteau et R. Villemur (2006). Occurrence and expression of *crdA* and *cprA5* encoding chloroaromatic reductive dehalogenases in *Desulfitobacterium* strains. *Can J Microbiol* 52 (1): 47-55.
- Gerritse, J., O. Drzyzga, G. Kloetstra, M. Keijmel, L. P. Wiersum, R. Hutson, M. D. Collins et J. C. Gottschal (1999). Influence of different electron donors and acceptors on dehalorespiration of tetrachloroethene by *Desulfitobacterium frappieri* TCE1. *Appl Environ Microbiol* 65 (12): 5212-5221.
- Gerritse, J., V. Renard, T. M. Pedro Gomes, P. A. Lawson, M. D. Collins et J. C. Gottschal (1996). *Desulfitobacterium* sp. strain PCE1, an anaerobic bacterium that can grow by reductive dechlorination of tetrachloroethene or *ortho*-chlorinated phenols. *Arch Microbiol* 165 (2): 132-140.
- He, J., K. M. Ritalahti, M. R. Aiello et F. E. Loffler (2003). Complete detoxification of vinyl chloride by an anaerobic enrichment culture and identification of the reductively dechlorinating population as a *Dehalococcoides* species. *Appl Environ Microbiol* 69 (2): 996-1003.

- He, J., Y. Sung, R. Krajmalnik-Brown, K. M. Ritalahti et F. E. Loffler (2005). Isolation and characterization of *Dehalococcoides* sp. strain FL2, a trichloroethene (TCE)- and 1,2-dichloroethene-respiring anaerobe. *Environ Microbiol* 7 (9): 1442-1450.
- He, Q. et R. A. Sanford (2002). Induction characteristics of reductive dehalogenation in the ortho-halophenol-respiring bacterium, Anaeromyxobacter dehalogenans. Biodegradation 13 (5): 307-316.
- Hellman, U., C. Wernstedt, J. Gonez et C. H. Heldin (1995). Improvement of an "In-Gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. *Anal Biochem* 224 (1): 451-455.
- Hoffmann, A., B. Bukau et G. Kramer Structure and function of the molecular chaperone Trigger Factor (2010). *Biochim Biophys Acta*. 1803 (6): 650-661.
- Holliger, C., C. Regeard et G. Diekert (2003). Dehalogenation by anaerobic bacteria. Dans: Häggblom M. M., I. D. Bossert (Dir.), Dehalogenation: microbial processes and environmental applications. Norwell, MA, Kluwer Academic Publisher Group.
- Holliger, C., D. Hahn, H. Harmsen, W. Ludwig, W. Schumacher, B. Tindall, F. Vazquez, N. Weiss et A. J. Zehnder (1998). *Dehalobacter restrictus* gen. nov. and sp. nov., a strictly anaerobic bacterium that reductively dechlorinates tetra- and trichloroethene in an anaerobic respiration. *Arch Microbiol* 169 (4): 313-321.
- Holliger, C. et G. Schraa (1994). Physiological meaning and potential for application of reductive dechlorination by anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 15 (2-3): 297-305.
- Holliger, C., G. Schraa, A. J. Stams et A. J. Zehnder (1993). A highly purified enrichment culture couples the reductive dechlorination of tetrachloroethene to growth. *Appl Environ Microbiol* 59 (9): 2991-2997.
- Holscher, T., H. Gorisch et L. Adrian (2003). Reductive dehalogenation of chlorobenzene congeners in cell extracts of *Dehalococcoides* sp. strain CBDB1. *Appl Environ Microbiol* 69 (5): 2999-3001.
- HSDB (Hazardous Substances Data Bank) (2006). Pentachlorophenol. U.S. National Library of Medicine. [En ligne]. http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB. Page consultée le 2 février 2010.
- Imlay, J. A. (2006). Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Mol Microbiol* 59 (4): 1073-1082.
- Jack, R. L., G. Buchanan, A. Dubini, K. Hatzixanthis, T. Palmer et F. Sargent (2004). Coordinating assembly and export of complex bacterial proteins. EMBO J 23 (20): 3962-3972.

- John, M., R. P. Schmitz, M. Westermann, W. Richter et G. Diekert (2006). Growth substrate dependent localization of tetrachloroethene reductive dehalogenase in Sulfurospirillum multivorans. Arch Microbiol 186 (2): 99-106.
- Johnson, D. R., E. L. Brodie, A. E. Hubbard, G. L. Andersen, S. H. Zinder et L. Alvarez-Cohen (2008). Temporal transcriptomic microarray analysis of *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195 during the transition into stationary phase. *Appl Environ Microbiol* 74 (9): 2864-2872.
- Johnson, D. R., P. K. Lee, V. F. Holmes, A. C. Fortin et L. Alvarez-Cohen (2005). Transcriptional expression of the *tceA* gene in a *Dehalococcoides*-containing microbial enrichment. *Appl Environ Microbiol* 71 (11): 7145-7151.
- Joyce, M. G., C. Levy, K. Gabor, S. M. Pop, B. D. Biehl, T. I. Doukov, J. M. Ryter, H. Mazon, H. Smidt, R. H. van den Heuvel, S. W. Ragsdale, J. van der Oost et D. Leys (2006). CprK crystal structures reveal mechanism for transcriptional control of halorespiration. *J Biol Chem* 281 (38): 28318-28325.
- Juteau, P., R. Beaudet, G. McSween, F. Lepine et J.-G. Bisaillon (1995a). Study of the reductive dechlorination of pentachlorophenol by a methanogenic consortium. *Can J Microbiol* 41 (10): 862-868.
- Juteau, P., R. Beaudet, G. McSween, F. Lepine, S. Milot et J.-G. Bisaillon (1995b). Anaerobic biodegradation of pentachlorophenol by a methanogenic consortium. *Appl Microbiol Biotechnol* 44 (1-2): 218-224.
- Korner, H., H. J. Sofia et W. G. Zumft (2003). Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol Rev* 27 (5): 559-592.
- Krajmalnik-Brown, R., T. Holscher, I. N. Thomson, F. M. Saunders, K. M. Ritalahti et F. E. Loffler (2004). Genetic identification of a putative vinyl chloride reductase in *Dehalococcoides* sp. strain BAV1. *Appl Environ Microbiol* 70 (10): 6347-6351.
- Krasotkina, J., T. Walters, K. A. Maruya et S. W. Ragsdale (2001). Characterization of the B12- and iron-sulfur-containing reductive dehalogenase from *Desulfitobacterium chlororespirans*. *J Biol Chem* 276 (44): 40991-40997.
- Krautler, B., W. Fierber, S. Ostermann, M. Fashing, K.-H. Ongania, K. Gruber, C. Kratky, C. Mikl, A. Siebert et G. Diekert (2003). The cofactor of tetrachloroethene reductive dehalogenase of *Dehalospirillum multivorans* is Norpseudo-B¹², a new type of a natural corrinoid. *Helv Chim Acta* 86 (11): 3698-3716.
- Krumholz, L. R. (1997). *Desulfuromonas chloroethenica* sp. nov. uses tetrachloroethylene and trichloroethylene as electron acceptors. *Int J Syst Bacteriol* 47 (4): 1262-1263.

- Krumholz, L. R., R. Sharp et S. S. Fishbain (1996). A freshwater anaerobe coupling acetate oxidation to tetrachloroethylene dehalogenation. *Appl Environ Microbiol* 62 (11): 4108-4113.
- Kube, M., A. Beck, S. H. Zinder, H. Kuhl, R. Reinhardt et L. Adrian (2005). Genome sequence of the chlorinated compound-respiring bacterium *Dehalococcoides* species strain CBDB1. *Nat Biotechnol* 23 (10): 1269-1273.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259): 680-685.
- Lanthier, M., P. Juteau, F. Lepine, R. Beaudet et R. Villemur (2005). *Desulfitobacterium hafniense* is present in a high proportion within the biofilms of a high-performance pentachlorophenol-degrading, methanogenic fixed-film reactor. *Appl Environ Microbiol* 71 (2): 1058-1065.
- Lanthier, M., R. Villemur, F. Lepine, J.-G. Bisaillon et R. Beaudet (2001). Geographic distribution of *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 and *Desulfitobacterium* spp. in soils from the province of Quebec, Canada. *FEMS Microbiol Ecol* 36 (2-3): 185-191.
- Lanthier, M., R. Villemur, F. Lepine, J.-G. Bisaillon et R. Beaudet (2000). Monitoring of Desulfitobacterium frappieri PCP-1 in pentachlorophenol-degrading anaerobic soil slurry reactors. Environ Microbiol 2 (6): 703-8.
- Lee, P. A., D. Tullman-Ercek et G. Georgiou (2006a). The bacterial twin-arginine translocation pathway. *Annu Rev Microbiol* 60: 373-395.
- Lee, P. K., D. R. Johnson, V. F. Holmes, J. He et L. Alvarez-Cohen (2006b). Reductive dehalogenase gene expression as a biomarker for physiological activity of *Dehalococcoides* spp. *Appl Environ Microbiol* 72 (9): 6161-6168.
- Levy, C., K. Pike, D. J. Heyes, M. G. Joyce, K. Gabor, H. Smidt, J. van der Oost et D. Leys (2008). Molecular basis of halorespiration control by CprK, a CRP-FNR type transcriptional regulator. *Mol Microbiol* 70 (1): 151-167.
- Livak, K. J. et T. D. Schmittgen (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods* 25 (4): 402-408.
- Loffler, F. E., R. A. Sanford et J. M. Tiedje (1996). Initial characterization of a reductive dehalogenase from *Desulfitobacterium chlororespirans* Co23. *Appl Environ Microbiol* 62 (10): 3809-3813.
- Louie, T. M. et W. W. Mohn (1999). Evidence for a chemiosmotic model of dehalorespiration in *Desulfomonile tiedjei* DCB-1. *J Bacteriol* 181 (1): 40-46.

- 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 (6): 520-527.
- 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 Environ Microbiol 64 (1): 352-355.
- Madsen, T. et D. Licht (1992). Isolation and characterization of an anaerobic chlorophenol-transforming bacterium. *Appl Environ Microbiol* 58 (9): 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 Environ Microbiol* 64 (4): 1270-1275.
- Maillard, J., C. Regeard et C. Holliger (2005). Isolation and characterization of Tn-Dha1, a transposon containing the tetrachloroethene reductive dehalogenase of *Desulfitobacterium hafniense* strain TCE1. *Environ Microbiol* 7 (1): 107-117.
- Maillard, J., W. Schumacher, F. Vazquez, C. Regeard, W. R. Hagen et C. Holliger (2003). Characterization of the corrinoid iron-sulfur protein tetrachloroethene reductive dehalogenase of *Dehalobacter restrictus*. Appl Environ Microbiol 69 (8): 4628-4638.
- Maymo-Gatell, X., T. Anguish et S. H. Zinder (1999). Reductive dechlorination of chlorinated ethenes and 1,2-dichloroethane by *Dehalococcoides ethenogenes* 195. *Appl Environ Microbiol* 65 (7): 3108-3113.
- Maymo-Gatell, X., Y. Chien, J. M. Gossett et S. H. Zinder (1997). Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science* 276 (5318): 1568-1571.
- Mazon, H., K. Gabor, D. Leys, A. J. Heck, J. van der Oost et R. H. van den Heuvel (2007). Transcriptional activation by CprK1 is regulated by protein structural changes induced by effector binding and redox state. *J Biol Chem* 282 (15): 11281-11290.
- McAllister, K. A., H. Lee et T. Trevors (1996). Microbial degradation of pentachlorophenol. Biodegradation 7 (1): 1-40.
- Miller, E., G. Wohlfarth et G. Diekert (1997). Comparative studies on tetrachloroethene reductive dechlorination mediated by *Desulfitobacterium* sp. strain PCE-S. *Arch Microbiol* 168 (6): 513-519.
- Miller, E., G. Wohlfarth et G. Diekert (1998). Purification and characterization of the tetrachloroethene reductive dehalogenase of strain PCE-S. *Arch Microbiol* 169 (6): 497-502.

- Mohn, W. W. et K. J. Kennedy (1992). Reductive dehalogenation of chlorophenols by Desulfomonile tiedjei DCB-1. Appl Environ Microbiol 58 (4): 1367-1370.
- Mohn, W. W. et J. M. Tiedje (1992). Microbial reductive dehalogenation. *Microbiol Rev* 56 (3): 482-507.
- Morita, Y., T. Futagami, M. Goto et K. Furukawa (2009). Functional characterization of the trigger factor protein PceT of tetrachloroethene-dechlorinating *Desulfitobacterium hafniense* Y51. *Appl Microbiol Biotechnol* 83 (4): 775-781.
- Muller, J. A., B. M. Rosner, G. Von Abendroth, G. Meshulam-Simon, P. L. McCarty et A. M. Spormann (2004). Molecular identification of the catabolic vinyl chloride reductase from *Dehalococcoides* sp. strain VS and its environmental distribution. *Appl Environ Microbiol* 70 (8): 4880-4888.
- Neumann, A., H. Scholz-Muramatsu et G. Diekert (1994). Tetrachloroethene metabolism of *Dehalospirillum multivorans. Arch Microbiol* 162 (4): 295-301.
- Neumann, A., A. Siebert, T. Trescher, S. Reinhardt, G. Wohlfarth et G. Diekert (2002). Tetrachloroethene reductive dehalogenase of *Dehalospirillum multivorans*: substrate specificity of the native enzyme and its corrinoid cofactor. *Arch Microbiol* 177 (5): 420-426.
- Neumann, A., G. Wohlfarth et G. Diekert (1995). Properties of tetrachloroethene and trichloroethene dehalogenase of *Dehalospirillum multivorans*. Arch Microbiol 163 (4): 276-281.
- Neumann, A., G. Wohlfarth et G. Diekert (1996). Purification and characterization of tetrachloroethene reductive dehalogenase from *Dehalospirillum multivorans*. *J Biol Chem* 271 (28): 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 Bacteriol* 180 (16): 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 Bacteriol* 177 (17): 5135-5139.
- Niggemyer, A., S. Spring, E. Stackebrandt et R. F. Rosenzweig (2001). Isolation and characterization of a novel As(V)-reducing bacterium: implications for arsenic mobilization and the genus *Desulfitobacterium*. Appl Environ Microbiol 67 (12): 5568-5580.

- Nonaka, H., G. Keresztes, Y. Shinoda, Y. Ikenaga, M. Abe, K. Naito, K. Inatomi, K. Furukawa, M. Inui et H. Yukawa (2006). Complete genome sequence of the dehalorespiring bacterium *Desulfitobacterium hafniense* Y51 and comparison with *Dehalococcoides ethenogenes* 195. *J Bacteriol* 188 (6): 2262-2274.
- Okeke, B. C., Y. C. Chang, M. Hatsu, T. Suzuki et K. Takamizawa (2001). Purification, cloning, and sequencing of an enzyme mediating the reductive dechlorination of tetrachloroethylene (PCE) from *Clostridium bifermentans* DPH-1. *Can J Microbiol* 47 (5): 448-456.
- Pelmont, J. (2005). Biodégradation et métabolismes. Les bactéries pour les technologies de l'environnement. Les Ulis, EDS sciences.
- Pop, S. M., R. J. Kolarik et S. W. Ragsdale (2004). Regulation of anaerobic dehalorespiration by the transcriptional activator CprK. *J Biol Chem* 279 (48): 49910-49918.
- Rahm, B. G., R. M. Morris et R. E. Richardson (2006). Temporal expression of respiratory genes in an enrichment culture containing *Dehalococcoides ethenogenes*. *Appl Environ Microbiol* 72 (8): 5486-5491.
- Rahm, B. G. et R. E. Richardson (2008a). Correlation of respiratory gene expression levels and pseudo-steady-state PCE respiration rates in *Dehalococcoides ethenogenes*. *Environ Sci Technol* 42 (2): 416-421.
- Rahm, B. G. et R. E. Richardson (2008b). *Dehalococcoides* gene transcripts as quantitative bioindicators of tetrachloroethene, trichloroethene, and *cis*-1,2-dichloroethene dehalorespiration rates. *Environ Sci Technol* 42 (14): 5099-5105.
- Sambrook, J. et D.W. Russell (2001). Molecular cloning: a laboratory manual (3e éd.). Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanford, R. A., J. R. Cole, F. E. Loffler 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 Environ Microbiol 62 (10): 3800-3808.
- Sanford, R. A., J. R. Cole et J. M. Tiedje (2002). Characterization and description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an aryl-halorespiring facultative anaerobic myxobacterium. *Appl Environ Microbiol* 68 (2): 893-900.
- 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 (1): 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 Bacteriol* 178 (8): 2328-2333.
- Schumacher, W., C. Holliger, A. J. Zehnder et W. R. Hagen (1997). Redox chemistry of cobalamin and iron-sulfur cofactors in the tetrachloroethene reductase of *Dehalobacter restrictus*. *FEBS Lett* 409 (3): 421-425.
- Seshadri, R., L. Adrian, D. E. Fouts, J. A. Eisen, A. M. Phillippy, B. A. Methe, N. L. Ward, W. C. Nelson, R. T. Deboy, H. M. Khouri, J. F. Kolonay, R. J. Dodson, S. C Daugherty, L. M. Brinkac, S. A. Sullivan, R. Madupu, K. E. Nelson, K. H. Kang, M. Impraim, K. Tran, J. M. Robinson, H. A. Forberger, C. M. Fraser, S. H. Zinder et J. F. Heidelberg (2005). Genome sequence of the PCE-dechlorinating bacterium Dehalococcoides ethenogenes. Science 307 (5706): 105-108.
- Sharma, P. K. et P. L. McCarty (1996). Isolation and characterization of a facultatively aerobic bacterium that reductively dehalogenates tetrachloroethene to *cis*-1,2-dichloroethene. *Appl Environ Microbiol* 62 (3): 761-765.
- Shelobolina, E. S., C. G. Vanpraagh et D. R. Lovley (2003). Use of ferric and ferrous iron containing minerals for respiration by *Desulfitobacterium frappieri*. Geomicrobiol J 20 (2): 143-156.
- Shelton, D. R. et J. M. Tiedje (1984). Isolation and partial characterization of bacteria in an anaerobic consortium that mineralizes 3-chlorobenzoic acid. *Appl Environ Microbiol* 48 (4): 840-848.
- Siebert, A., A. Neumann, T. Schubert et G. Diekert (2002). A non-dechlorinating strain of *Dehalospirillum multivorans*: evidence for a key role of the corrinoid cofactor in the synthesis of an active tetrachloroethene dehalogenase. *Arch Microbiol* 178 (6): 443-449.
- Smidt, H. et W. M. de Vos (2004). Anaerobic microbial dehalogenation. *Annu Rev Microbiol* 58: 43-73.
- Smidt, H., D. Song, J. van Der Oost et W. M. de Vos (1999). Random transposition by Tn916 in *Desulfitobacterium dehalogenans* allows for isolation and characterization of halorespiration-deficient mutants. *J Bacteriol* 181 (22): 6882-6888.
- Smidt, H., M. van Leest, J. van der Oost et W. M. de Vos (2000). Transcriptional regulation of the *cpr* gene cluster in *ortho*-chlorophenol-respiring *Desulfitobacterium* dehalogenans. J Bacteriol 182 (20): 5683-5691.
- Steiert, J. G., W. J. Thoma, K. Ugurbil et R. L. Crawford (1988). ³¹P nuclear magnetic resonance studies of effects of some chlorophenols on *Escherichia coli* and a pentachlorophenol-degrading bacterium. *J Bacteriol* 170 (10): 4954-4957.

- Stephens, R. W., G. E. Brudermann et D. E. Konasweich. (2002). Summary of the results of environment Canada's assessment 2000 program for the canadian wood preservation industry. Environnement Canada. [En ligne]. http://www.ec.gc.ca/toxics/woodbois/pubs/Assessment%202000.pdf. Page consultée le 14 janvier 2010.
- Stevens, T. O., T. G. Linkfield et J. M. Tiedje (1988). Physiological characterization of strain DCB-1, a unique dehalogenating sulfidogenic bacterium. *Appl Environ Microbiol* 54 (12): 2938-2943.
- Suyama, A., R. Iwakiri, K. Kai, T. Tokunaga, N. Sera et K. Furukawa (2001). Isolation and characterization of *Desulfitobacterium* sp. strain Y51 capable of efficient dehalogenation of tetrachloroethene and polychloroethanes. *Biosci Biotechnol Biochem* 65 (7): 1474-1481.
- Suyama, A., M. Yamashita, S. Yoshino et K. Furukawa (2002). Molecular characterization of the PceA reductive dehalogenase of *Desulfitobacterium* sp. strain Y51. *J Bacteriol* 184 (13): 3419-3425.
- Taylor, B. L. et I. B. Zhulin (1999). PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* 63 (2): 479-506.
- Thibodeau, J., A. Gauthier, M. Duguay, R. Villemur, F. Lepine, P. Juteau et R. Beaudet (2004). Purification, cloning, and sequencing of a 3,5-dichlorophenol reductive dehalogenase from *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. *Appl Environ Microbiol* 70 (8): 4532-4537.
- Townsend, G. T. et J. M. Suflita (1996). Characterization of chloroethylene dehalogenation by cell extracts of *Desulfomonile tiedjei* and its relationship to chlorobenzoate dehalogenation. *Appl Environ Microbiol* 62 (8): 2850-2853.
- Townsend, G. T. et J. M. Suflita (1997). Influence of sulfur oxyanions on reductive dehalogenation activities in *Desulfomonile tiedjei*. *Appl Environ Microbiol* 63 (9): 3594-3599.
- Tropel, D. et J. R. van der Meer (2004). Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiol Mol Biol Rev* 68 (3): 474-500.
- Tsukagoshi, N., S. Ezaki, T. Uenaka, N. Suzuki et R. Kurane (2006). Isolation and transcriptional analysis of novel tetrachloroethene reductive dehalogenase gene from *Desulfitobacterium* sp. strain KBC1. *Appl Microbiol Biotechnol* 69 (5): 543-553.
- Utkin, I., D. D. Dalton et J. Wiegel (1995). Specificity of reductive dehalogenation of substituted *ortho*-chlorophenols by *Desulfitobacterium dehalogenans* JW/IU-DC1. *Appl Environ Microbiol* 61 (1): 346-351.

- 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 Syst Bacteriol* 44 (4): 612-619.
- Van de Pas, B. A., J. Gerritse, W. M. de Vos, G. Schraa et A. J. Stams (2001). Two distinct enzyme systems are responsible for tetrachloroethene and chlorophenol reductive dehalogenation in *Desulfitobacterium* strain PCE1. *Arch Microbiol* 176 (3): 165-169.
- Van de Pas, B. A., H. Smidt, W. R. Hagen, J. van der Oost, G. Schraa, A. J. Stams et W. M. de Vos (1999). Purification and molecular characterization of *ortho*-chlorophenol reductive dehalogenase, a key enzyme of halorespiration in *Desulfitobacterium dehalogenans*. *J Biol Chem* 274 (29): 20287-20292.
- Villemur, R., P. Constant, A. Gauthier, M. Shareck et R. Beaudet (2007). Heterogeneity between 16S ribosomal RNA gene copies borne by one *Desulfitobacterium* strain is caused by different 100-200 bp insertions in the 5' region. *Can J Microbiol* 53 (1): 116-128.
- Villemur, R., M. Lanthier, R. Beaudet et F. Lepine (2006). The *Desulfitobacterium* genus. *FEMS Microbiol Rev* 30 (5): 706-733.
- Villemur, R., M. Saucier, A. Gauthier et R. Beaudet (2002). Occurrence of several genes encoding putative reductive dehalogenases in *Desulfitobacterium hafniense/frappieri* and *Dehalococcoides ethenogenes*. Can J Microbiol 48 (8): 697-706.
- Wiegel, J., X. Zhang et Q. Wu (1999). Anaerobic dehalogenation of hydroxylated polychlorinated biphenyls by *Desulfitobacterium dehalogenans*. Appl Environ Microbiol 65 (5): 2217-2221.
- Yano, T. et T. Ohnishi (2001). The origin of cluster N2 of the energy-transducing NADH-quinone oxidoreductase: comparisons of phylogenetically related enzymes. *J Bioenerg Biomembr* 33 (3): 213-222.

Annexe 1 : Manipulations en conditions anaérobies

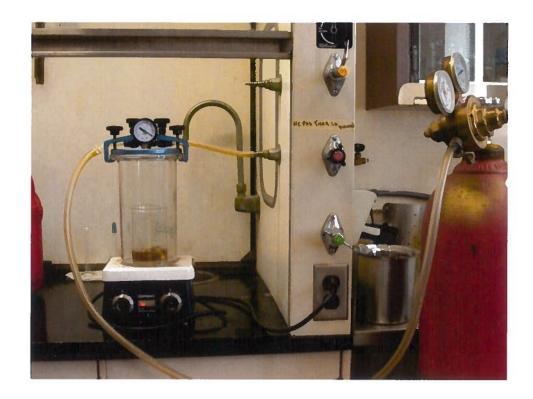


Figure 37. Montage pour rendre une solution anaérobie

Une jarre anaérobie contenant la solution est placée sur une plaque agitatrice. La jarre est reliée à une bombonne de gaz (10 % de H_2 , 10 % de CO_2 et 80 % de N_2) et à un système de vide. La solution est agitée tandis que des lavages sont effectués en alternant l'introduction du mélange gazeux et l'évacuation du gaz par l'application d'un vide.



Figure 38. Montage pour barboter le milieu de culture

Une bouteille en verre de 15 litres contenant 9 litres de MLA et une bouteille Schott de 1 litre contenant 500 ml de MLA sont reliées à une bombonne de gaz (10 % de H₂, 10 % de CO₂ et 80 % de N₂). Le milieu est barboté avec le mélange gazeux pendant 1 h pour le rendre anaérobie. Des pinces sont installées à différents endroits pour contrôler les entrées et les sorties. Des embouts en laine de verre sont placés aux extrémités pour maintenir la stérilité du milieu.