

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**Caractérisation des gènes codant pour des
déshalogénases réductrices chez *Desulfitobacterium*
frappieri PCP-1**

Par
Annie Gauthier

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

Jury d'évaluation

Examineur interne	Rolf Morosoli, Ph.D. INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Richard Sparling, Ph.D. Université du Manitoba Département de Microbiologie
Directeur de recherche	Richard Villemur, Ph.D. INRS-Institut Armand-Frappier

RÉSUMÉ

Le pentachlorophénol (PCP) figure parmi les composés les plus toxiques retrouvés dans l'environnement. Malheureusement, celui-ci est difficilement biodégradable et a tendance à s'accumuler dans l'environnement. *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1, une bactérie anaérobie stricte, est la seule souche bactérienne connue à ce jour pouvant réduire le PCP jusqu'au 3-chlorophénol. Pour y parvenir, celle-ci utilise deux systèmes enzymatiques : le premier est responsable de la déshalogénéation des composés chlorés en position *ortho* du cycle aromatique et le second en position *para* et *meta*.

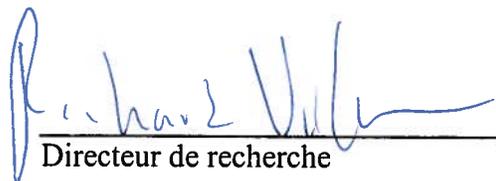
Au cours de ce projet de maîtrise, le gène codant pour la deuxième déshalogénase (*frdA1*) ainsi qu'un gène codant au bon fonctionnement de celle-ci (*frdB1*) ont été identifiés, clonés et séquencés. La séquence protéique du gène *frdA1* s'apparente grandement à des tétrachloroéthylènes déshalogénases chez les souches *D. frappieri* TCE1, *Desulfitobacterium* sp. Y51, *Desulfitobacterium* sp. PCE-S et chez *Dehalobacter restrictus*. Ce gène a également été retrouvé chez les souches *D. frappieri* TCP-A et chez *D. hafniense* DCB-2. Il a également été démontré que ce gène était transcrit lorsque les cultures de ces dernières souches avaient été mises en contact avec du 3,5-dichlorophénol (3,5-DCP) et avec du 2,4,6-trichlorophénol (2,4,6-TCP). Aucune transcription n'a pu être observée lorsque ces cultures n'étaient pas cultivées en présence de chlorophénol.

La séquence du gène codant pour la première déshalogénase (*crdA1*) avait déjà été identifiée auparavant. Au cours de ce projet, la présence de ce gène a été identifiée chez toutes les souches à l'étude, soit les souches *D. frappieri* DP7, TCP-A et TCE1, *D. hafniense* DCB-2, *Desulfitobacterium* sp. PCE1, *D. dehalogenans* et *D. chlororespirans*. Il a été démontré par la technique de buvardage de type Northern que ce gène était transcrit de façon constitutive chez la souche PCP-1. Une étude de la transcription de ce gène a été effectuée chez les souches pouvant être amplifiées par la technique de RT-

PCR, soit les souches PCP-1, DP7, TCE1 et DCB-2. Les résultats ont démontré que chez toutes ces souches, à l'exception de la souche DP7, le gène *crdA1* était transcrit.

Quatre autres gènes codants pour des déshalogénases hypothétiques, les gènes *cprA1*, *cprA2*, *cprA3* et *cprA4* ont été investigués au cours de ce projet de maîtrise. Ces gènes ont tous été retrouvés chez la souche PCP-1, à l'exception du gène *cprA1*. Celui-ci semble être responsable de la déshalogénéation du 3-chloro-4-hydroxyphényle acétate qui ne peut être réduit par la souche PCP-1. Ce gène a également été retrouvé chez les souches pouvant déshalogéner ce composé soit *D. hafniense* DCB-2, *Desulfitobacterium* sp. PCE1 et chez *D. dehalogenans*. Par la technique de buvardage de type Southern, la plupart des trois autres gènes ont été retrouvés chez les sept autres souches de *Desulfitobacterium* à l'étude. Il a été possible d'étudier la transcription de ces gènes par la technique de RT-PCR chez les souches PCP-1, TCP-A ainsi que chez DCB-2. Les résultats ont démontré que ceux-ci étaient transcrits de façon constitutive, c'est-à-dire qu'ils étaient transcrits lorsque ces cultures étaient cultivées en absence de chlorophénol et également lorsqu'elles étaient mises en contact avec du 2,4,6-TCP et du 3,5-DCP. De plus, aucun transcrit du gène *cprA1* n'a pu être observé par la technique de RT-PCR chez la souche DCB-2, qu'elle ait été cultivée avec du 2,4,6-TCP, du 3,5-DCP ou en absence de chlorophénol. Il a également été démontré que ce gène n'est pas transcrit chez *Desulfitobacterium* sp. PCE1 ainsi que chez *D. dehalogenans* lorsque ces cultures n'avaient pas été induites par des chlorophénols.


Étudiante


Directeur de recherche

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche, Richard Villemur Ph.D de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir conseillée tout au long de mes travaux de maîtrise. Son savoir, ses précieux conseils, sa très grande disponibilité ainsi que son soutien financier m'ont grandement aidée à mener ce projet de maîtrise à terme.

Je voudrais également remercier les autres étudiants du laboratoire, plus particulièrement Martin Lanthier ainsi que Normand Labbé de m'avoir enseignée certaines techniques et avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler. Un gros merci à Rita Alary, technicienne de laboratoire, qui répondait à mes questions et qui m'a souvent fait rire.

Je tiens également à remercier tout le groupe de l'environnement. Les réunions que nous avions étaient des plus enrichissantes et j'y ai également beaucoup appris.

Un gros merci à mes parents qui ont toujours cru en moi.

Eric, merci pour tout. Je t'aime.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
REMERCIEMENTS	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	xi
INTRODUCTION	1
1. REVUE DE LITTÉRATURE.....	4
1.1 Le pentachlorophénol	5
1.1.1 Historique et source dans l'environnement.....	5
1.1.2 Impact environnemental.....	6
1.1.3 Toxicité des chlorophénols.....	7
1.1.4 Effets négatifs, cancérigènes et mutagènes	7
1.2 Autres polluants chlorés	8
1.3 Les organohalogènes d'origine naturelle.....	9
1.4 La déshalogénéation	9
1.4.1 Généralités.....	9
1.4.2 Mécanismes	10
1.4.3 La déshalogénéation réductrice.....	13
1.5 Bioremédiation	14
1.6 Souches bactériennes anaérobies utilisant la déshalogénéation réductrice et descriptions des gènes et enzymes impliqués.....	15
1.6.1 <i>Desulfomonile tiedjei</i> DCB-1	15
1.6.2 <i>Dehalobacter restrictus</i> PER-K23	18
1.6.3 <i>Desulfitobacterium dehalogenans</i> JW/IU-DC1	20
1.6.4 <i>Dehalospirillum multivorans</i>	23
1.6.5 <i>Desulfitobacterium hafniense</i> DCB-2	26
1.6.6 <i>Desulfitobacterium frappieri</i> PCP-1	26
1.6.7 <i>Desulfitobacterium</i> sp. PCE1	29
1.6.8 <i>Desulfitobacterium chlororespirans</i> Co23.....	30
1.6.9 <i>Dehalococcoides ethenogenes</i> 195.....	31
1.6.10 <i>Desulfitobacterium</i> sp. PCE-S.....	32
1.6.11 <i>Desulfitobacterium frappieri</i> TCE1	32
1.6.12 <i>Desulfitobacterium frappieri</i> TCP-A	33

1.6.13 <i>Desulfitobacterium</i> sp. Y51.....	33
1.6.14 <i>Desulfitobacterium frappieri</i> DP7.....	35
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	36
2.1 Provenance des souches de <i>Desulfitobacterium</i>	37
2.2 Culture des souches de <i>Desulfitobacterium</i>	37
2.2.1 Milieu liquide minimal anaérobie.....	37
2.2.2 Culture de <i>D. frappieri</i> PCP-1 et de <i>D. dehalogenans</i> JW/IU-DC1.....	38
2.2.3 Culture des souches <i>D. frappieri</i> DP7, TCP-A et TCE1, <i>D. hafniense</i> DCB-2, <i>Desulfitobacterium</i> sp. PCE1 et de <i>D. chlororespirans</i> Co23.....	39
2.3 Extraction de l'ADN génomique des souches de <i>Desulfitobacterium</i>	40
2.4 Extraction d'ARN des souches de <i>Desulfitobacterium</i>	41
2.5 DNase sur les préparations d'ARN.....	42
2.6 Quantification des acides nucléiques (ADN et ARN).....	43
2.7 Digestion par les enzymes de restriction.....	44
2.8 Visualisation des acides nucléiques par électrophorèse sur gel d'agarose.....	44
2.8.1 ADN: Electrophorèse sur gel d'agarose.....	44
2.8.2 ARN: Electrophorèse sur gels d'agarose-glyoxal.....	45
2.9 Transfert de l'ADN du gel sur une membrane de nylon.....	46
2.10 Transfert de l'ARN du gel sur une membrane de nylon.....	46
2.11 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	47
2.12 Réaction de transcription inverse et PCR (RT-PCR).....	48
2.13 Préparation des sondes.....	49
2.14 Marquage des sondes à la digoxigenin.....	49
2.15 Hybridation de la membrane avec une sonde marquée à la DIG.....	50
2.16 Révélation de l'hybridation avec l'anticorps Anti-DIG.....	51
2.17 Régénération des membranes.....	53
2.18 Clonage du fragment <i>frdA1-frdB1</i>	53
2.18.1 Précipitation du produit de PCR <i>frdA1-frdB1</i>	53
2.18.2 Ligation du fragment <i>frdA1-frdB1</i> dans le vecteur pGEM [®] T-easy.....	54
2.18.3 Préparation des bactéries compétentes <i>Escherichia coli</i> DH5 α	54
2.18.4 Transformation du plasmide pGEM [®] -T Easy/ <i>frdA1-frdB1</i> dans les bactéries compétentes <i>Escherichia coli</i> DH5 α	55
2.18.5 Criblage des colonies possédant le plasmide et l'insert.....	56
2.18.6 Purification de l'ADN plasmidique pGEM [®] -T Easy / <i>frdA1-frdB1</i>	56
2.19 Séquençage du fragment <i>frdA1-frdB1</i>	57
2.20 Analyse de la séquence des gènes <i>frdA1</i> et <i>frdB1</i>	58
3. RÉSULTATS.....	65
3.1 Amplification du fragment <i>frdA1-frdB1</i> chez <i>Desulfitobacterium frappieri</i> PCP-1.....	66
3.2 Clonage du fragment <i>frdA1-frdB1</i>	67
3.3 Séquençage du fragment <i>frdA1-frdB1</i>	69
3.4 Analyse du contig 2977 de <i>D. hafniense</i> DCB-2.....	74
3.5 Analyse de séquences des gènes <i>cprA1</i> , <i>cprA2</i> , <i>cprA3</i> et <i>cprA4</i>	75
3.6 Analyse de séquences du gène <i>crdA1</i>	75
3.7 Présence des gènes <i>frdA1</i> , <i>crdA1</i> , <i>cprA1</i> , <i>cprA2</i> , <i>cprA3</i> et <i>cprA4</i> chez <i>D. frappieri</i> PCP-1 et chez sept autre souches de <i>Desulfitobacterium</i>	78

3.7.1 Par méthode de PCR	78
3.7.1.1 Vérification de l'authenticité des gènes <i>cprA1</i> , <i>cprA2</i> , <i>cprA3</i> , <i>cprA4</i> , <i>crdA1</i> et <i>frdA1</i> par digestion de chacun des gènes par des enzymes de restriction.....	80
3.7.2 Par buvardage de type Southern.....	82
3.8 Expression du gène <i>crdA1</i> chez la souche <i>D. frappieri</i> PCP-1	86
3.9 Expression du gène <i>crdA1</i> chez huit souches de <i>Desulfitobacterium</i>	87
3.10 Expression des gènes <i>frdA1</i> , <i>cprA2</i> , <i>cprA3</i> et <i>cprA4</i>	90
4. DISCUSSION	92
4.1 Séquence des gènes <i>frdA1</i> et <i>frdB1</i> chez <i>Desulfitobacterium frappieri</i> PCP-1.....	93
4.2 Le gène <i>frdA1</i> -déshalogénase II	96
4.3 Le gène <i>crdA1</i> -déshalogénase I.....	97
4.4 Les gènes <i>cprA1</i> , <i>cprA2</i> , <i>cprA3</i> et <i>cprA4</i>	100
5. CONCLUSION.....	103
6. BIBLIOGRAPHIE.....	107

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Différents mécanismes de déshalogénéation.....	12
Figure 2. Schéma représentant le mécanisme de déhalorespiration impliquant la 3-chlorobenzoate déshalogénase réductrice chez <i>Desulfomonile tiedjei</i> DCB-1.	17
Figure 3. Modèle de la chaîne respiratoire chez <i>Dehalobacter restrictus</i>	19
Figure 4. Schéma représentant le mécanisme proposé pour le fonctionnement de la <i>ortho</i> -déshalogénase réductrice chez <i>Desulfitobacterium dehalogenans</i>	21
Figure 5. Cartographie du locus des gènes <i>cpr</i> chez <i>Desulfitobacterium dehalogenans</i> .	23
Figure 6. Schéma expliquant le transfert d'électrons au cours de la déshalogénéation réductrice du PCE chez <i>Dehalospirillum multivorans</i>	24
Figure 7. Arrangement des gènes du contig 3277 (A), contig 3246 (B) et du contig 3185 (C) du génome de <i>Desulfitobacterium hafniense</i> DCB-2	29
Figure 8. Schéma représentatif du vecteur circularisé pGEM®-T Easy (tel qu'illustré dans le catalogue de Promega, Madison, Wis, USA).....	59
Figure 9. Schéma démontrant les amorces utilisées afin d'amplifier les gènes <i>frdA1</i> et <i>frdB1</i> chez la souche <i>D. frappieri</i> PCP-1	60
Figure 10. Schéma démontrant les amorces utilisées afin d'amplifier le gène <i>cprA1</i>	61
Figure 11. Schéma démontrant les amorces utilisées afin d'amplifier le gène <i>cprA2</i>	61
Figure 12. Schéma démontrant les amorces utilisées afin d'amplifier le gène <i>cprA3</i>	62
Figure 13. Schéma démontrant les amorces utilisées afin d'amplifier le gène <i>cprA4</i>	62
Figure 14. Schéma démontrant les amorces utilisées afin d'amplifier le gène <i>crdA1</i>	63
Figure 15. Amplification par PCR du fragment <i>frdA1-frdB1</i> chez <i>Desulfitobacterium frappieri</i> PCP-1	67
Figure 16. Profil d'électrophorèse de l'ADN plasmidique purifié de 9 colonies blanches	68
Figure 17. Profil d'électrophorèse de l'ADN plasmidique purifié du clone 1 suite à une digestion par l'enzyme de restriction <i>EcoR1</i>	68
Figure 18. Séquence nucléotidique du fragment <i>frdA1-frdB1</i>	71

Figure 19. Séquence déduite en acides aminés de <i>frdA1</i> et <i>frdB1</i>	72
Figure 21. Schéma représentant les cadres de lecture du contig 2977 chez <i>Desulfitobacterium hafniense</i> DCB-2	74
Figure 22. Séquence déduite en acides aminés du gène <i>crdA1</i>	76
Figure 23. Résultats des amplifications par PCR des 6 différents gènes chez huit souches de <i>Desulfitobacterium</i>	79
Figure 24. Digestion des gènes <i>cprA1</i> , <i>cprA2</i> , <i>cprA3</i> , <i>cprA4</i> , <i>crdA1</i> et <i>frdA1</i> par des enzymes de restriction	81
Figure 25. Présence des gènes <i>crdA1</i> et <i>frdA1</i> chez huit souches de <i>Desulfitobacterium</i> par technique de buvardage de type Southern.....	84
Figure 26. Présence des gènes <i>cprA1</i> , <i>cprA2</i> , <i>cprA3</i> et <i>cprA4</i> chez huit souches de <i>Desulfitobacterium</i> par technique de buvardage de type Southern.....	85
Figure 27. Expression du gène <i>crdA1</i> chez la souche PCP-1 lorsque celle-ci a été cultivée en présence de différents chlorophénols et en absence de chlorophénol (par buvardage de type Northern).....	86
Figure 28. Expression du gène <i>crdA1</i> chez huit souches de <i>Desulfitobacterium</i> par technique de buvardage de type Northern.....	88
Figure 29. Détection de la présence de transcrits du gène <i>crdA1</i> chez quatre souches de <i>Desulfitobacterium</i> par technique de RT-PCR.....	89
Figure 30. Expression du gène <i>crdA1</i> suite à une induction de deux chlorophénols chez deux souches de <i>Desulfitobacterium</i> par la technique de RT-PCR	89
Figure 31. Expression des gènes <i>cprA1</i> , <i>cprA2</i> , <i>cprA3</i> , <i>cprA4</i> et <i>frdA1</i> chez 3 souches de <i>Desulfitobacterium</i>	91

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Liste des différentes amorces utilisées pour effectuer les réactions de PCR et de RT-PCR.....	64
Tableau 2. Résultats des analyses de séquences des gènes <i>cprA1</i> , <i>cprA2</i> , <i>cprA3</i> et <i>cprA4</i> retrouvés dans les contigs de la souche <i>D. hafniense</i> DCB-2 ainsi que des gènes <i>crdA1</i> et <i>frdA1</i> chez <i>D. frappieri</i> PCP-1	77
Tableau 3. Pourcentage d'identité des 4 CprA retrouvées dans les contigs 3277, 3246 et 3185 de la souche <i>D. hafniense</i> DCB-2 suite à un alignement de chacun des gènes entres eux.....	77

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ARN :	Acide ribonucléique
BPC :	Biphényles polychlorés
°C :	Degré Celsius
3-Cl-4-OHPA	3-chloro-4-hydroxyphényle acétate
DDT :	1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane
DEPC :	Diethyl pyrocarbonate
DCP :	Dichlorophénol
D.O :	Densité optique
EDTA :	Acide éthylène diamine tétraacétique
g :	Gramme
g :	Force gravitationnelle
HPLC :	High Performance Liquid Chromatography
IPTG :	Isopropyl β -D-thiogalactoside
M :	Mole (concentration molaire)
μ l :	Microlitre
μ g :	Microgramme
MLA :	Milieu minimal liquide anaérobie
mg :	Milligramme
ml :	Millilitre
mM :	Millimole
M :	Mole
mV :	Milivolt
ng :	Nanogramme
nm :	Nanomètre
PCE :	Tétrachloroéthylène
PCP :	Pentachlorophénol
PCR :	Réaction de polymérisation en chaîne
pb :	Paire de bases
p/v :	Poids par volume
RT-PCR :	Réaction de transcription inverse suivi d'un PCR
SDS :	Sodium dodécyl sulfate
TAT :	Twin arginine translocation
TCE :	Trichloroéthylène
TCP :	Trichlorophénol
UV :	Lumière ultraviolet
v/v :	Volume par volume

INTRODUCTION

La pollution est un problème qui touche pratiquement tous les pays du monde. Il en résulte une détérioration de la qualité de l'air, des sols, de l'eau et de la santé des organismes vivants. Certains produits toxiques ont largement été utilisés dans le passé tels que les biphényles polychlorés (BPC), le 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)éthane (DDT), le tétrachloroéthylène (PCE) et le pentachlorophénol (PCP). Ces produits ont la particularité d'être très néfastes pour les organismes vivants, de s'accumuler dans l'environnement et d'être difficilement biodégradable. La déshalogénéation réductrice est un des mécanismes connus par lequel des microorganismes catalysent la réduction de composés halogénés présents dans l'environnement. Ce mécanisme naturel est une avenue très intéressante afin de traiter certains sols contaminés.

Le PCP figure parmi les composés les plus toxiques retrouvés dans l'environnement. Celui-ci a longtemps été utilisé pour ses propriétés d'herbicide, d'insecticide et de fongicide. Son utilisation en tant qu'agent de préservation du bois a mené à la contamination de nombreux sites dont plusieurs terrains avoisinants les industries de traitement de bois. Il a été démontré que le PCP peut traverser la peau, il est cancérigène, tératogène et est maintenant inclus au niveau de la chaîne alimentaire. Plusieurs personnes ayant été mises en contact avec le PCP détiennent des quantités anormalement élevées de ce dernier au niveau des matrices biologiques, tels que le plasma, l'urine, les tissus adipeux et également au niveau du liquide cébrospinal. Au cours des deux dernières décennies, plusieurs découvertes intéressantes ont été réalisées afin de pouvoir diminuer la concentration de ce polluant au niveau de l'environnement. En effet, la déshalogénéation réductrice est le mécanisme par lequel les microorganismes réduisent les composés halogénés comme le PCP, les rendant alors moins toxiques.

La déshalogénéation réductrice peut se produire en anaérobiose de même qu'en aérobie. Cependant, la déshalogénéation réductrice en condition anaérobie offre un meilleur rendement que celle en milieu aérobie pour les composés fortement chlorés comme le PCP. Durant la dernière décennie, plusieurs microorganismes anaérobies pouvant effectuer la déshalogénéation réductrice ont été isolés. Cependant, seule la bactérie *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 a la capacité de réduire le PCP jusqu'au 3-chlorophénol. Afin d'y parvenir, celle-ci utilise deux systèmes enzymatiques. Le premier système, la déshalogénase I, favorise principalement la déshalogénéation en position *ortho* du cycle aromatique. Ce système est codé par le gène *crdA1*. La déshalogénase II réalise la déshalogénéation en position *meta* et *para* et le gène responsable de celle-ci n'avait pas encore été découvert jusqu'à ce moment. De plus, *D. frappieri* PCP-1 peut également déshalogéner un grand nombre de composés halogénés. Cette dernière représente une avenue très intéressante au niveau de procédés de biodégradation du PCP et de d'autres composés chlorés.

Les objectifs de ce projet de maîtrise étaient (I) de cloner et de séquencer le gène responsable du deuxième système de déshalogénéation chez la souche PCP-1, soit le gène *frdA1*, (II) de déterminer la présence de quatre gènes *cprA* hypothétiques chez la souche PCP-1 (*cprA1*, *cprA2*, *cprA3* et *cprA4*), (III) de déterminer la présence des gènes *crdA1*, *frdA1*, *cprA1*, *cprA2*, *cprA3* et *cprA4* chez sept autres souches de *Desulfitobacterium* et (IV) de déterminer le profil d'expression de ces gènes en absence et en présence de chlorophénols chez la souche PCP-1 et également chez sept autres souches de *Desulfitobacterium*. Il nous a semblé intéressant de caractériser tous ces gènes chez les sept autres souches du genre *Desulfitobacterium* afin de mieux comprendre les différences existantes entre ces souches.

1. REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Le pentachlorophénol

1.1.1 Historique et source dans l'environnement

Le pentachlorophénol (PCP) est un composé aromatique polychloré qui a été largement utilisé dans l'industrie du bois en Amérique du Nord depuis les années 1930 (Ahlborg et Thunberg, 1980) et introduit sur le marché par Dow Chemical Company et par Mosanto Chemical Company (Fisher, 1991). Ce dernier a des propriétés d'herbicide, d'insecticide et de fongicide. En effet, il a été utilisé comme herbicide sur les pelouses, comme anti-microbien dans les peintures au latex et comme désinfectant dans les usines de pâtes et papiers. Les marques de commerce utilisant le PCP étaient principalement Santophen, Penchlorol, Chlorophen, Pentacon, Penwar, Sinituho et Penta.

Le PCP peut augmenter de huit fois la durée de vie du bois, ce qui signifie jusqu'à une quarantaine d'années. Celui-ci était alors largement utilisé pour le bois devant résister à de longue période de temps, comme par exemple le bois destiné à construire les poteaux servant au soutien des lignes électriques et téléphoniques, de même que le bois servant à la construction des chemins de fer (Hoos, 1978).

Le pentachlorophénol a été listé comme un polluant prioritaire par l'agence de protection environnementale des États-Unis (Megharaj *et al.*, 1998). Cependant, celui-ci est toujours utilisé pour la préservation du bois dans certains pays et plusieurs poteaux traités au pentachlorophénol sont toujours présents.

1.1.2 Impact environnemental

En 1980, la production totale mondiale de PCP était de 200 000 tonnes (Ahlborg et Thunberg, 1980). Les techniques d'analyse moderne ont révélé que les chlorophénols étaient maintenant des composés ubiquitaires dans l'environnement. Les principaux modes de transport et de distribution du PCP entre les différents environnements sont l'évaporation, la lixivitation et l'adsorption (World Health Organization, 1987). L'humain et son environnement y sont alors continuellement exposés. Effectivement, des niveaux basaux de PCP ont été mesurés dans l'air, l'eau, le sol, les sédiments et les sédiments en suspension (Hattemer-Frey et Travis, 1989). Selon ces derniers auteurs, le PCP entre dans la chaîne alimentaire au niveau des fruits, des légumes et des graines, augmentant ainsi l'exposition des humains et des organismes vivants au PCP. Une étude réalisée au Canada a révélé que les pêcheurs absorbent deux fois plus de PCP que la population en générale dû à leur consommation accrue de poissons (Coad et Newhook, 1992). Des traces de PCP ont également été retrouvées dans le lait maternel (Veningerova *et al.*, 1996), au niveau du plasma, de l'urine, des tissus adipeux et également au niveau du liquide cébrospinal (Jorens *et al.*, 1991). Plus précisément, il a été démontré qu'une concentration de 0,3 mg/l de PCP a été retrouvée dans l'urine de la population en générale alors que chez les travailleurs du bois, celle-ci était plutôt de 30 mg/l (Maroni *et al.*, 2000). Au niveau du plasma, une concentration de moins de 0,5 mg/l y est normalement retrouvée comparativement à des concentrations variant de 0,2 à 1,8 mg/l chez les travailleurs de l'industrie du bois.

Un changement de la microflore bactérienne dans le sol a été observé suite à la présence de PCP dans celui-ci (Kato *et al.*, 1981). La présence de PCP dans le sol exerce une influence négative sur les propriétés biologiques du sol se manifestant par une décroissance de la microflore présente à cet endroit et par la diminution des activités

enzymatiques des microorganismes (Megharaj *et al.*, 1998). L'activité de recyclage des nutriments s'y trouve alors affectée.

1.1.3 Toxicité des chlorophénols

Il semble que plusieurs facteurs soient à l'origine de la toxicité du PCP. Il a été démontré que le PCP est un composé lipophile (Smejtek *et al.*, 1987). La toxicité des composés lipophiles est directement liée à la perturbation des lipides membranaires (Cascorbi et Foret, 1991) puisque les composés lipophiles ont un potentiel de découpleur de l'énergie transmise au niveau des membranes des mitochondries et également des chloroplastes (Smejtek *et al.*, 1987). En effet, celui-ci découple la réaction de phosphorylation oxydative au niveau de la chaîne de transport des électrons (Exon, 1984). Il a également été observé que le PCP avait un effet inhibiteur sur l'oxydation du succinate au niveau de la chaîne respiratoire (Afanas'eva et Kostyrko, 1986). De plus, le nombre de chlores présents sur les chlorophénols est directement lié à la toxicité de ceux-ci. Ainsi, plus un composé est chloré, plus celui-ci est toxique pour son environnement (Exon, 1984). Il semble également que le groupement hydroxyle présent au niveau des chlorophénols soit responsable d'un effet toxique sur les poissons (Kishino et Kobayashii, 1996).

1.1.4 Effets négatifs, cancérigènes et mutagènes

Plusieurs études ont démontré qu'une exposition prolongée au PCP a des effets néfastes et parfois irrémédiables sur la santé. En effet, suite à une exposition au PCP, certaines personnes ont développé une anémie aplasique, un lymphome, une leucémie et d'autres problèmes hématologiques (Roberts, 1990). Également, en Allemagne, une étude fut réalisée sur un groupe de femmes ayant des problèmes de fertilité ou ayant des problèmes d'ordre génécologique ou endocrinologique (Gerhard *et al.*, 1999). Dans 65 cas sur 171, un taux de plus de 20 µg par litre de PCP a été retrouvé dans le sérum de ces patientes. Il a été établi que ces personnes avaient été exposées au PCP se trouvant dans

l'environnement. De ces 65 femmes, 63 % d'entre elles présentaient un problème d'insuffisance lutéale et 42 % avaient un taux d'oestradiol folliculaire relativement bas. De plus, les résultats ont démontré que le PCP agit directement au niveau hypothalamique ou suprahypothalamique et affecte ainsi la sécrétion d'hormones (Gerhard *et al.*, 1999). Il a également été démontré que les femmes enceintes exposées au PCP donnent naissance à des nouveaux nés de taille et de poids plus petit que les femmes n'ayant pas été exposées au PCP (Karmaus et Wolf, 1995). De plus, du PCP a également été retrouvé dans le plasma de cordon ombilical (Sandau *et al.*, 2002).

Les effets du PCP et du lindane (insecticide à large spectre) ont été étudiés sur l'épithélium nasal de travailleurs ayant été exposés à ces pesticides (Tisch *et al.*, 2001). Les résultats ont démontré que ces produits avaient un effet mutagène et qu'ils pourraient être en cause dans le cancer du tractus aérodigestif. En Allemagne et dans certains pays d'Europe, les travailleurs qui ont été en contact avec des poussières de bois traité au PCP et qui ont développé un adénocarcinome au niveau nasal ont reçu une compensation financière (Wolf *et al.*, 1998). De plus, le stress oxydatif occasionné par le PCP pourrait être impliqué au niveau du cancer hépatique (Umemura *et al.*, 1999).

1.2 Autres polluants chlorés

Outre les chlorophénols, d'autres produits chimiques chlorés ont été utilisés dans le passé et ont été rejetés dans l'environnement. Les biphényles polychlorés (BPC) ont été utilisés dans les fluides hydrauliques, les transformateurs et les condensateurs électriques et sont parmi les polluants les plus persistants dans l'environnement dus à leur faible potentiel de biodégradation (Jacobson et Jacobson, 1997). Les chlorodioxines et les chlorofurannes sont deux types d'hydrocarbures polychlorés largement distribués dans l'environnement et sont tous deux très toxiques et persistants (Pollitt, 1999). Le lindane est un pesticide très toxique et cancérigène qui fut utilisé dans l'agriculture auquel l'humain a largement été exposé (National Toxicology Program, 1977). Le DDT, un

agent très liposoluble, a pour sa part été utilisé comme insecticide. Bien que son utilisation soit maintenant interdite, plusieurs sites demeurent contaminés par le DDT et par d'autres composés xénobiotiques (Jaga et Brosius, 1999).

1.3 Les organohalogènes d'origine naturelle

Plus de 3800 composés organohalogénés, contenant majoritairement du chlore ou du brome mais également parfois de l'iode ou du fluor, sont produits par les organismes vivants ou par des processus naturels comme les volcans, les feux de forêt et d'autres processus géothermiques (Gribble, 2003). Les océans sont la plus grande source de ces composés qui sont synthétisés entre autres par les algues, les éponges marines, les insectes de mer, les coraux ainsi que par d'autres organismes marins. Il semble que les organismes marins, en particulier les plantes marines produisent des composés halogénés pour leur propre survie. Certaines bactéries marines peuvent également produire des composés halogénés. Cette grande variété d'organisme produisant des halogènes Les organismes terrestres comme les mycètes, les plantes, les bactéries et les insectes contribuent également à la diversité des organohalogénés d'origine naturelle (Gribble, 2003).

1.4 La déshalogénéation

1.4.1 Généralités

Au cours des deux dernières décennies, le processus de déshalogénéation a été largement étudié chez un grand nombre de bactéries, tant au niveau aérobie qu'au niveau anaérobie. Une variété de mécanismes de déshalogénéation a été étudiée en microcosmes, en cultures pures ainsi que dans l'environnement. Depuis 1994, la communauté scientifique a acquis de nombreuses connaissances en ce qui a trait à l'atténuation

naturelle de composés organochlorés (Lee *et al.*, 1998). Le fait de mieux comprendre les mécanismes de déshalogénéation permettra d'améliorer considérablement les processus de bioremédiation.

La déshalogénéation implique l'enlèvement d'un ou de plusieurs atomes halogénés sur un composé halogéné, rendant alors ce composé plus facilement dégradé par les autres microorganismes présents dans l'environnement. Ceci permet donc la réduction de composés xénobiotiques normalement récalcitrants à la biodégradation dans l'environnement (Janssen *et al.*, 2001). En effet, plusieurs composés comme les haloaromatiques, les haloalcanes et les haloacides ont pu être déshalogénés par les microorganismes (Hardman, 1991). Contrairement à l'incinération et à d'autres procédés chimiques, la déshalogénéation réduit le risque de formation de composés intermédiaires toxiques. De plus, les intermédiaires formés au cours de la déshalogénéation sont alors plus facilement dégradés par les autres microorganismes présents dans l'environnement.

1.4.2 Mécanismes

Il existe sept mécanismes connus pouvant effectuer le clivage du lien carbone-halogène chez un composé xénobiotique halogéné (Fetzner et Lingens, 1994). La déshalogénéation réductrice est responsable de l'enlèvement de l'atome halogéné et de remplacer celui-ci par un atome d'hydrogène (figure 1A). La déshalogénéation oxygénolytique implique la présence de monooxygénases ou de dioxygénases qui vont ajouter un ou deux atomes d'oxygène sur le substrat, enlevant ainsi l'halogène de la molécule (figure 1B). La déshalogénéation hydrolytique implique une molécule d'eau et au cours de celle-ci, une attaque nucléophile est nécessaire au relâchement de l'halogène, qui est remplacé par un groupement hydroxyle dérivé de l'eau (figure 1C). La déshalogénéation thiolytique, quant à elle, survient chez les bactéries méthylophiles facultatives et est catalysée par une glutathione S-transférase, formant ainsi un complexe

S-chlorométhylglutathione (figure 1D). Cet intermédiaire instable est rapidement hydrolysé, relarguant ainsi l'atome halogéné. La substitution intramoléculaire se produit chez les alcools halogénés et est catalysée par une réaction de substitution intramoléculaire, formant alors des époxydes (figure 1E). La déshydrohalogénéation élimine un atome halogéné et un atome d'hydrogène, produisant alors une double liaison du composé halogéné (figure 1F). Finalement, l'hydratation est le dernier mécanisme de déshalogénéation. Au cours de celle-ci, une hydratase ajoute une molécule d'eau à une double liaison puis par la suite, l'atome halogéné ainsi qu'un atome d'hydrogène sont alors enlevés, complétant ainsi la réaction de déshalogénéation (figure 1G) (Fetzner et Lingens, 1994).

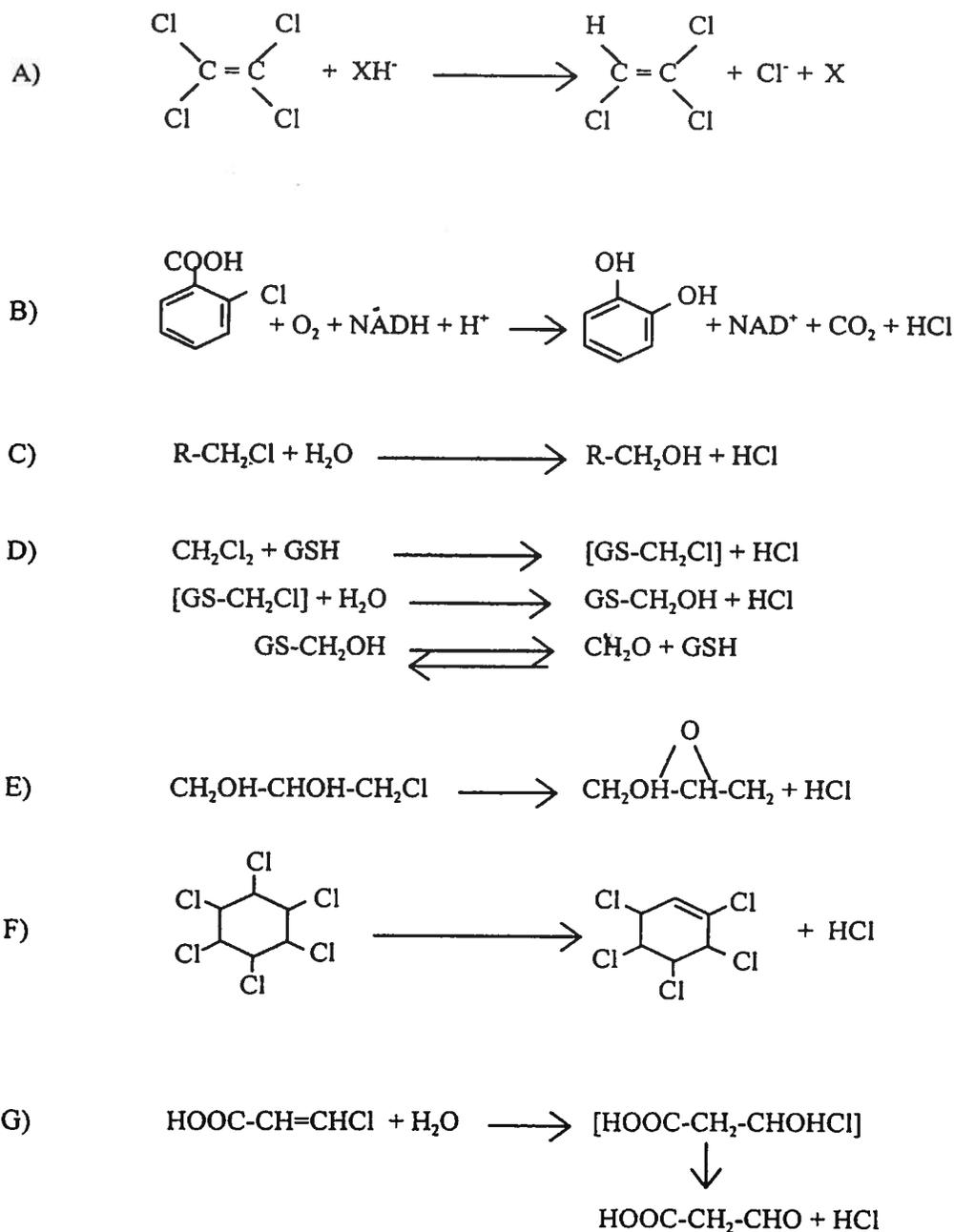


Figure 1. Différents mécanismes de déshalogénéation. Déshalogénéation réductrice (A), déshalogénéation oxygénolytique (B), déshalogénéation hydrolytique (C), déshalogénéation thiolitique (D), substitution intramoléculaire (E), déshydrohalogénéation (F) et hydratation (G). Modifié de Fetzner et Lingens (1994).

1.4.3 La déshalogénéation réductrice

Tel que mentionnée précédemment, la déshalogénéation réductrice catalyse la réaction d'enlèvement d'un atome halogène en le remplaçant par un atome d'hydrogène. Plusieurs composés peuvent être déshalogénés selon cette voie tels les chlorophénols hautement chlorés comme le PCP, les BPC, les hexachlorobenzènes et les tétrachlorophénols (PCE) (Fetzner, 1998). Le processus de déshalogénéation réductrice est possible pour les organismes qui croissent en présence et en absence d'oxygène. Cependant, la plupart de la déshalogénéation réductrice qui se produit dans l'environnement est catalysée par des microorganismes anaérobies qui croissent en présence de composés aromatiques ou aliphatiques chlorés comme accepteur d'électron (Fetzner, 1998).

Il existe deux systèmes de déshalogénéation réductrice chez les bactéries anaérobies dont le co-métabolisme et la respiration cellulaire (Holliger et Schraa, 1994). La voie co-métabolique est une réaction non-spécifique et est catalysée par une multitude de systèmes enzymatiques ou de cofacteurs catalysant normalement d'autres réactions. Il s'agit donc d'une réaction fortuite et les organismes qui utilisent cette voie pour déshalogéner des composés chlorés n'en retirent aucun avantage énergétique. La deuxième voie de déshalogénéation réductrice, la respiration cellulaire, est le processus par lequel les bactéries utilisent l'énergie générée au cours de la réaction de déshalogénéation pour leur propre synthèse d'ATP (Holliger *et al.*, 1999). Ce processus est également appelé halo-respiration ou chloro-respiration et suggère que le composé halogéné est thermo-dynamiquement favorable en tant qu'accepteur d'électron en conditions anaérobies (Holliger *et al.*, 1999).

1.5 Bioremédiation

Plusieurs traitements chimiques ou chimiques-biologiques ont été étudiés pour la dégradation de composés aromatiques chlorés (Karamanev *et al.*, 1998). Cependant, le processus d'atténuation naturelle couplé à des processus d'ingénierie de bioremédiation constituent un traitement beaucoup moins dispendieux et plus naturel afin de décontaminer des sols présentant des composés xénobiotiques (Tiedje et Löffler, 1999). La bioremédiation *in situ* implique que la remédiation a lieu sur le site contaminé et qu'elle utilise les bactéries présentes dans l'environnement afin de dégrader les polluants s'y trouvant (B. Walsh, 1999). Dépendamment du type de microorganismes présents dans l'environnement contaminé, un traitement de biostimulation de ceux-ci ou de bioaugmentation est appliqué (Tiedje et Löffler, 1999).

Cependant, le facteur limitant de la bioremédiation des sites contaminés est la vitesse à laquelle les polluants sont dégradés. En effet, la longue période de temps que nécessite un biotraitement par les microorganismes remet en cause l'application des ces types de traitement (Dua *et al.*, 2002). Une approche intéressante dans le développement des technologies de bioremédiation est celle de la génétique microbienne (Fetzner, 1998). En effet, le fait de mieux connaître les gènes impliqués dans les processus de dégradation des polluants ainsi que la régulation de ceux-ci, de même que la vérification des conséquences dues à la mutagenèse de ces gènes sur les enzymes qu'ils produisent (stabilité, activité catalytique, affinité du substrat, spécificité du substrat) permettra sans aucun doute d'améliorer l'efficacité des traitements actuels de bioremédiation au niveau des sites contaminés (Fetzner, 1998).

1.6 Souches bactériennes anaérobies utilisant la déshalogénéation réductrice et descriptions des gènes et enzymes impliqués

Au cours de cette section, les souches bactériennes utilisant la déshalogénéation réductrice ont été énumérées et décrites. Les gènes et enzymes impliqués dans le processus de déshalogénéation ont également été expliqués pour chacune de ces souches.

1.6.1 *Desulfomonile tiedjei* DCB-1

La souche DCB-1 a été isolée à partir d'un consortium méthanogène contenant du 3-chlorobenzoate (3-CB) comme source de carbone et d'énergie (Shelton et Tiedje, 1984). Il a également été démontré que cette souche obtient de l'énergie pour sa croissance lors de l'oxydation du formate et du H₂ au cours de la déshalogénéation réductrice (Mohn et Tiedje, 1990). Cette souche réduisant le sulfate a d'ailleurs été la première bactérie isolée pouvant effectuer la déshalogénéation réductrice en condition anaérobie (Mohn et Kennedy, 1992). Le 3-CB est un inducteur nécessaire à la déshalogénéation du PCP. Cependant, cette déshalogénéation est limitée à la position *meta* du cycle aromatique, réduisant alors le PCP jusqu'au 2,4,6-trichlorophénol (2,4,6-TCP). Aucune déshalogénéation n'est possible pour cette souche en position *ortho* et *para*. La déshalogénéation du tétrachloroéthylène (PCE) et du trichloroéthylène (TCE) a été observée jusqu'au dichloroéthylène (DCE) et celle du 3-CB jusqu'au benzoate (toujours en présence de 3-CB comme inducteur) (Fathepure *et al.*, 1987). Les activités de déshalogénéation du 3-CB et du PCE sont co-induits mais il n'est pas connu si ces activités sont catalysées par le même système enzymatique (Cole *et al.*, 1995).

Une enzyme, la 3-CB réductrice déshalogénase, a été purifiée de la membrane cytoplasmique de ce microorganisme (Ni *et al.*, 1995). Cette enzyme est la première à

avoir été purifiée à partir d'une bactérie pouvant faire la déshalogénéation réductrice en condition anaérobie. La 3-CB réductrice déshalogénase serait impliquée dans le métabolisme énergétique de la bactérie et serait une composante de la chaîne de transport des électrons. Après purification de celle-ci, deux protéines d'environ 64 kDa et de 37 kDa ont été observées par électrophorèse sur gel d'acrylamide contenant du SDS (SDS-PAGE). Selon les auteurs, ces deux protéines pourraient correspondre à deux sous-unités de l'enzyme. Un cytochrome de type c a également été purifié à partir de la membrane cytoplasmique (Louie *et al.*, 1997). Celui-ci est co-induit avec la réaction de déshalogénéation réductrice au niveau de la membrane.

Un modèle a été proposé afin d'expliquer le fonctionnement de la 3-CB réductrice déshalogénase (figure 2). Celle-ci est liée à la membrane, orientée du côté cytoplasmique et est l'accepteur final d'électron. Durant l'oxydation du formate et de l'hydrogène, des protons sont produits dans le périplasme et la réduction du 3-CB exige la consommation de protons du cytoplasme. Les électrons produits par les déshydrogénases sont transportés à travers la membrane par le biais du cytochrome c. Il en résulte ainsi une force proton-motrice nécessaire à la formation d'ATP (Louie et Mohn, 1999).

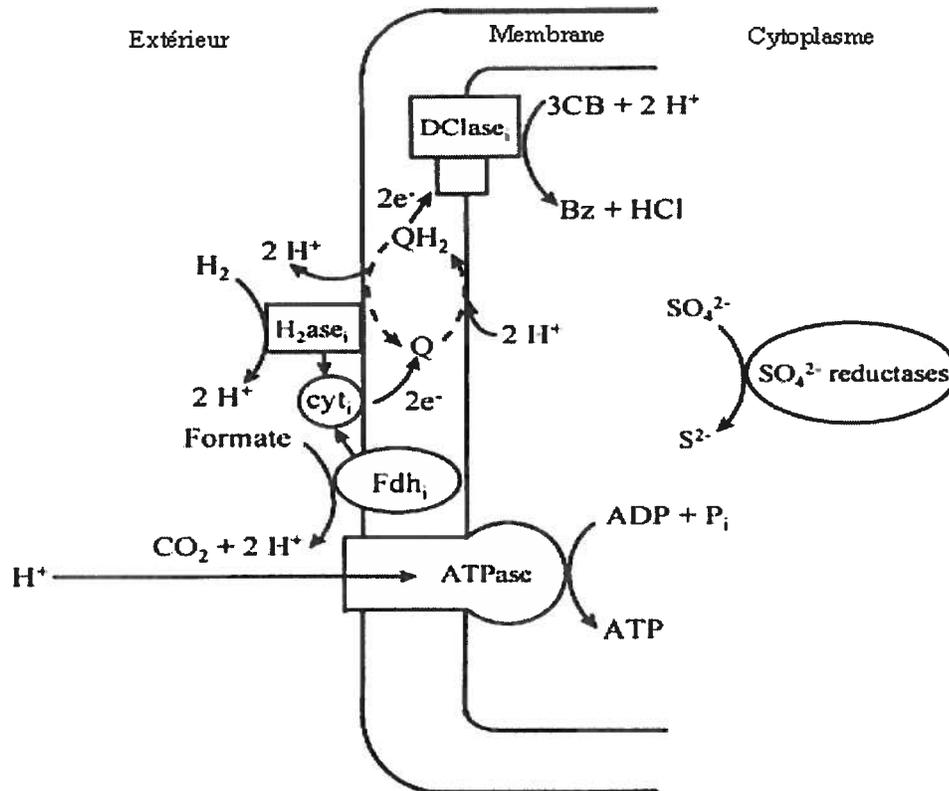


Figure 2. Schéma représentant le mécanisme de déhalorespiration impliquant la 3-chlorobenzoate déshalogénase réductrice chez *Desulfomonile tiedjei* DCB-1. H_2ase_i : hydrogénase inductible, Fdh_i : formate déshydrogénase inductible, cyt_i : cytochrome c inductible, Q : quinone, $Dclase_i$: 3-CB-déshalogénase réductrice, 3CB : 3-chlorobenzoate, Bz : benzoate. Modifié de Louie et Mohn (1999).

1.6.2 *Dehalobacter restrictus* PER-K23

Autrefois nommée PER-K23, *Dehalobacter restrictus* a été isolée à partir d'un inoculum provenant d'un réacteur contenant des sédiments anaérobies de la rivière Rhin, aux Pays-Bas, et contenant également des boues granulaires anaérobies d'une raffinerie de sucre, des Pays-Bas (Holliger *et al.*, 1993). Cette bactérie utilise, pour sa respiration, le PCE et le TCE comme accepteur d'électron et le H₂ comme donneur d'électron (Holliger *et al.*, 1998). Schumacher et Hollinger (1996) ont établi un modèle expliquant la chaîne respiratoire chez cette souche (figure 3). Ce système fonctionne à l'aide de deux enzymes s'accolant à la membrane cytoplasmique; une hydrogénase périplasmique et une PCE réductase cytoplasmique. L'hydrogénase catalyse l'oxydation du H₂ et relâche deux protons dans le périplasma alors que deux électrons sont transférés au niveau de la membrane cytoplasmique par une ménaquinone à la PCE réductase. La réduction du composé chloré implique la consommation d'un proton du cytoplasme. La présence d'un cytochrome de type b a été observée dans la membrane cytoplasmique mais son implication au niveau de la chaîne respiratoire n'est pas connue (Schumacher et Hollinger, 1996)

Une PceA réductase a été extraite de la membrane cytoplasmique de *D. restrictus* puis purifiée (Schumacher *et al.*, 1997). Celle-ci possède une masse d'environ 60 kDa, une cobalamine (vitamine B₁₂) ainsi que deux centres fer-soufre (Schumacher *et al.*, 1997).

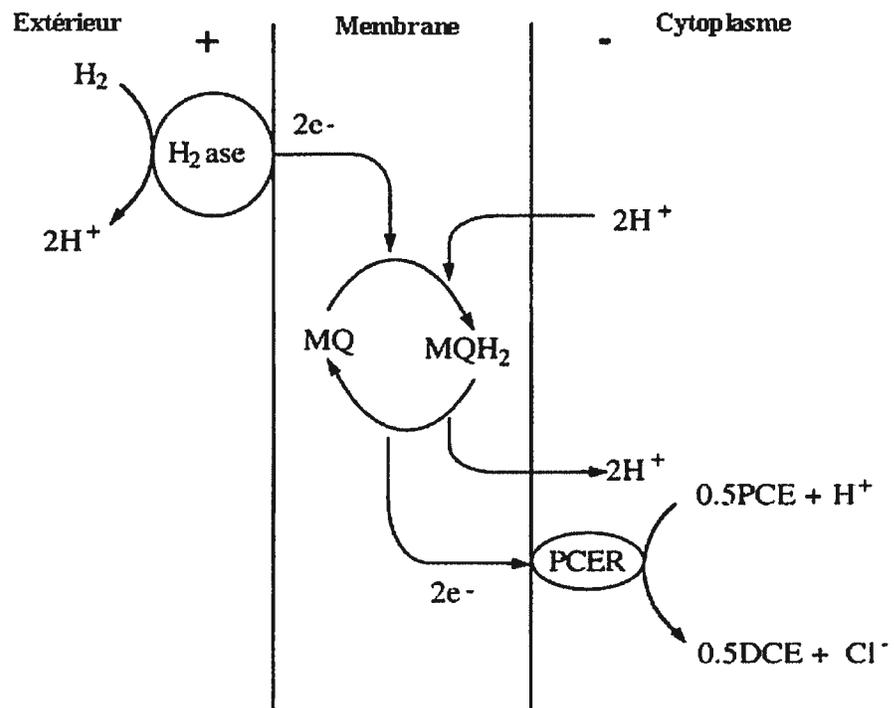


Figure 3. Modèle de la chaîne respiratoire chez *Dehalobacter restrictus*. H_2 ase : hydrogénase, MQ : ménaquinone, PCER : tétrachloroéthylène déshalogénase, PCE : tétrachloroéthylène, DCE : dichloroéthylène. Modifié de Schumacher et Holliger (1996).

1.6.3 *Desulfitobacterium dehalogenans* JW/IU-DC1

Desulfitobacterium dehalogenans JW/IU-DC1 est la première bactérie du genre *Desulfitobacterium* à avoir été identifiée. Elle a été isolée à partir de sédiments provenant d'un étang situé à Athènes, en Georgie (EU) (Utkin *et al.*, 1994). La souche JW/IU-DC1 peut déshalogéner, en position *ortho*, les chlorophénols suivants : 3-Cl-4-OHPA, 2,3-DCP, 2,4-DCP, 2,3,4-TCP, 2,3,6-TCP, 2,4,6-TCP, 2,3,4,6-TeCP, 2,3,4,5 TeCP, 2,3,5,6-TeCP, et le PCP. Aucune déshalogénéation n'a pu être observée chez le 2-CP, le 3-CP, le 4-CP, le 2,5-DCP, le 3,4-DCP, le 3,5-DCP et le 3,4,5-TCP.

Une *ortho*-chlorophénol réductrice déshalogénase a été isolée de la fraction membranaire chez la souche JW/IU-DC1 lorsque celle-ci était mise en présence de lactate et de 3-chloro-4-hydroxyphényle acétate (3-Cl-4-OHPA) (van de Pas *et al.*, 1999a). Une activité de déshalogénéation en position *ortho* a été observée pour le 2-CP, le 2,3-DCP, le 2,4-DCP, le 2,6-DCP et pour le PCP pour cette enzyme. Aucune déshalogénéation n'a eu lieu pour le 3-CP, le 4-CP, le 2,5-DCP, le PCE et le TCE. Cette protéine a une masse d'environ 48 kDa. Un fragment d'ADN contenant le gène (*cprA*) codant pour cette protéine a été cloné et séquencé. L'analyse de la séquence a permis de déterminer que le gène *cprA* code pour une protéine de 447 acides aminés et dont la masse théorique est de 49,7 kDa. La séquence protéique de ce gène possède le motif TAT, indiquant la présence d'un peptide signal et la perte des 42 premiers acides aminés. Les 405 acides aminés restant forment alors la protéine mature qui possède alors une masse théorique de 45,3 kDa. Cette séquence prédit également la présence de deux sites de fixation à un centre fer-soufre. Un autre gène (*cprB*) a été retrouvé en amont du gène *cprA*. Ce gène code pour une protéine de 103 acides aminés et possède une masse théorique de 11,5 kDa. Le profil d'hydrophobicité de la séquence protéique du gène *cprB* suggère que cette protéine soit d'origine membranaire. Les gènes *cprB* et *cprA* sont séparés par 12 nucléotides et seraient probablement co-transcrits (van de Pas *et al.*, 1999a).

Un modèle a été suggéré afin d'illustrer le fonctionnement de la *ortho*-déshalogénase réductrice chez *D. dehalogenans* (figure 4) (van de Pas *et al.*, 1999b). Ce modèle veut que la CprB membranaire soit nécessaire à l'ancrage de la CprA à la membrane cytoplasmique. Ainsi, deux électrons de la membrane sont transmis à la CprA où chacun des deux centres fer-soufre reçoit un électron. Le premier centre fer-soufre transmet son électron à une cob(II)alamine qui est ainsi réduite en cob(I)alamine pour ensuite enlever un atome de chlore de la molécule halogénée, laissant alors un radical libre sur celle-ci. Cette molécule instable réagit alors avec le deuxième électron transféré du deuxième centre fer-soufre, permettant ainsi l'importation d'un atome d'hydrogène qui est alors transféré à la molécule halogénée.

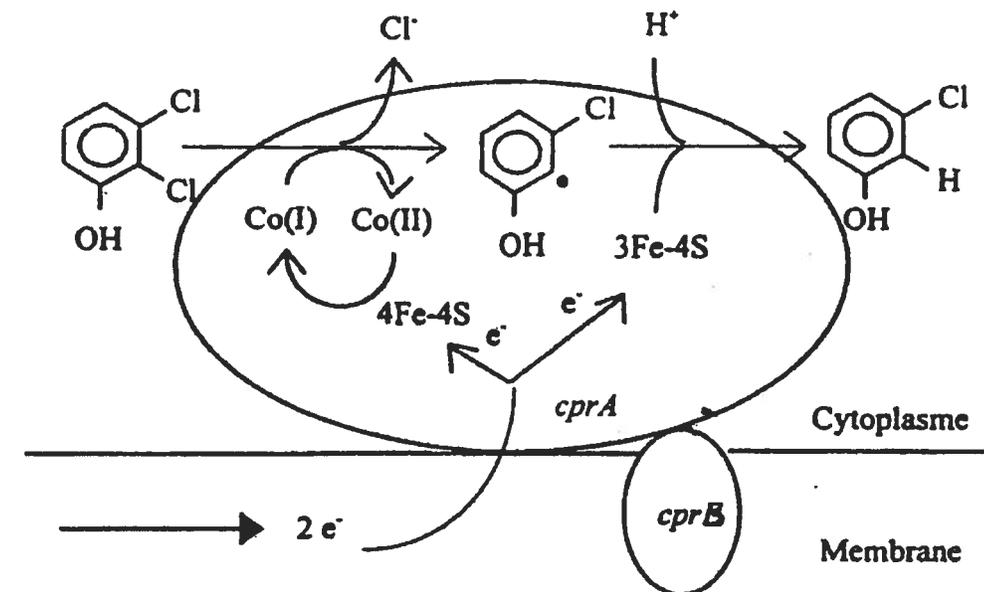


Figure 4. Schéma représentant le mécanisme proposé pour le fonctionnement de la *ortho*-déshalogénase réductrice chez *Desulfitobacterium dehalogenans*. 3Fe-4S et 4Fe-4S : centres fer-soufre, Co(I) et Co(II) : cobalamine I et II. Modifié de van de Pas *et al.*, (1999b).

Afin de mieux comprendre l'expression et la régulation de la déshalogénéation réductrice au niveau de l'halorespiration chez *D. dehalogenans*, Smidt et ses collaborateurs (2000) ont caractérisé un fragment d'ADN génomique de 11.5 kb contenant les gènes *cprA* et *cprB*. Ainsi, huit cadres de lecture ont été retrouvés et les gènes correspondant ont été désignés, dans l'ordre, par *cprTKZEBACD*, dont l'orientation est la même pour tous les gènes, à l'exception du gène *cprT* (figure 5). Après analyse dans les banques de données, les protéines CprC et CprK seraient impliquées dans la régulation de la transcription alors que les protéines CprD et CprE appartiennent à la famille des GroEL chaperonnes. Ces dernières sont des protéines qui préviennent l'agrégation de protéines, facilitant le repliement de la protéine d'intérêt de même que son assemblage. La CprT possède une similarité significative avec un facteur déclencheur, une propyle peptidyle isomérase, catalysant le repliement des protéines (Smidt *et al.*, 2000). La CprZ a démontré une identité avec une protéine de *Synechocystis* sp. et la carte de lecture ORFU n'a démontré aucune homologie dans les banques de données. Aucune fonction n'a pu être attribuée à ces deux cadres de lecture. Une étude de la transcription de ces différents gènes a révélé que ceux-ci étaient tous induits dans des conditions d'halorespiration alors qu'aucune transcription significative n'a été observée lors de la fermentation du pyruvate et de la respiration en présence de fumarate et de nitrate. Deux opérons bicistroniques ont pu être observés, soit *cprZE* et *cprAB*, avec occasionnellement la présence d'un opéron polycistronique constitué des gènes *cprBACD* (figure 5). Le promoteur du bicistron *cprBA* est fortement induit dans les trente minutes suivant l'ajout de 3-Cl-4-OHPA. Un troisième opéron bicistronique a également pu être observé, soit le *cprCD*. Le gène *cprT* est transcrit sous un seul ARN messager (ARNm) et un faible niveau de transcription a pu être observé pour le tricistron *cprKZE*, et ce, pour toutes les conditions testées.

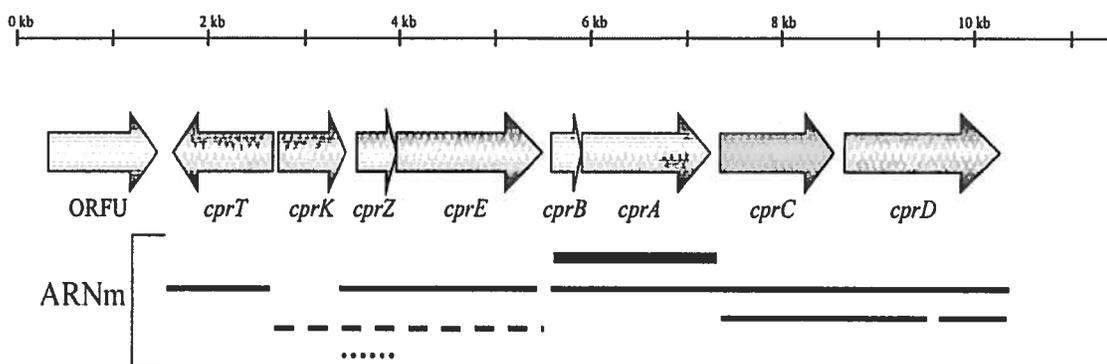


Figure 5. Cartographie du locus des gènes *cpr* chez *Desulfitobacterium dehalogenans*. Les flèches horizontales représentent les cadres de lecture; les lignes horizontales représentent les différents ARNm induits au cours de l'halorespiration; les lignes rompues et pointillées correspondent respectivement aux transcrits constitutifs ainsi qu'aux transcrits réprimés lors de l'halorespiration. Figure modifiée de Smidt *et al.*, (2000).

1.6.4 *Dehalospirillum multivorans*

La souche *D. multivorans* a été isolée à partir d'un inoculum de boues activées n'étant pas exposé à des chloroéthènes mais qui a par la suite été cultivé en présence de pyruvate et de PCE comme source d'énergie (Scholz-Muramatsu *et al.*, 1995). Durant la croissance de celle-ci, le PCE était réduit via le TCE jusqu'au *cis*-1,2-DCP.

Une PCE déshalogénase réductrice de 58 kDa a été isolée de cette souche à partir de la fraction cytoplasmique, catalysant ainsi la réaction de déshalogénation du PCE jusqu'au *cis*-1,2-DCP (Neumann *et al.*, 1996). De plus, un cofacteur corrinnoïde a pu être extrait de cette enzyme et la présence de deux centres fer-soufre a pu être observée. Un modèle a été proposé par Neumann et ses collaborateurs (1996) afin d'expliquer le

fonctionnement de cette enzyme (figure 6). Deux électrons provenant de la membrane sont acheminés à deux centres fer-soufre. Ainsi, les centres fer-soufre transfèrent leur électron aux deux cobalamines présentes, réduisant alors une cob(II)alamine en cob(I)alamine et une cob(III) en cob(II)alamine. Ces deux étapes sont nécessaires afin de permettre la déshalogénéation réductrice du PCE.

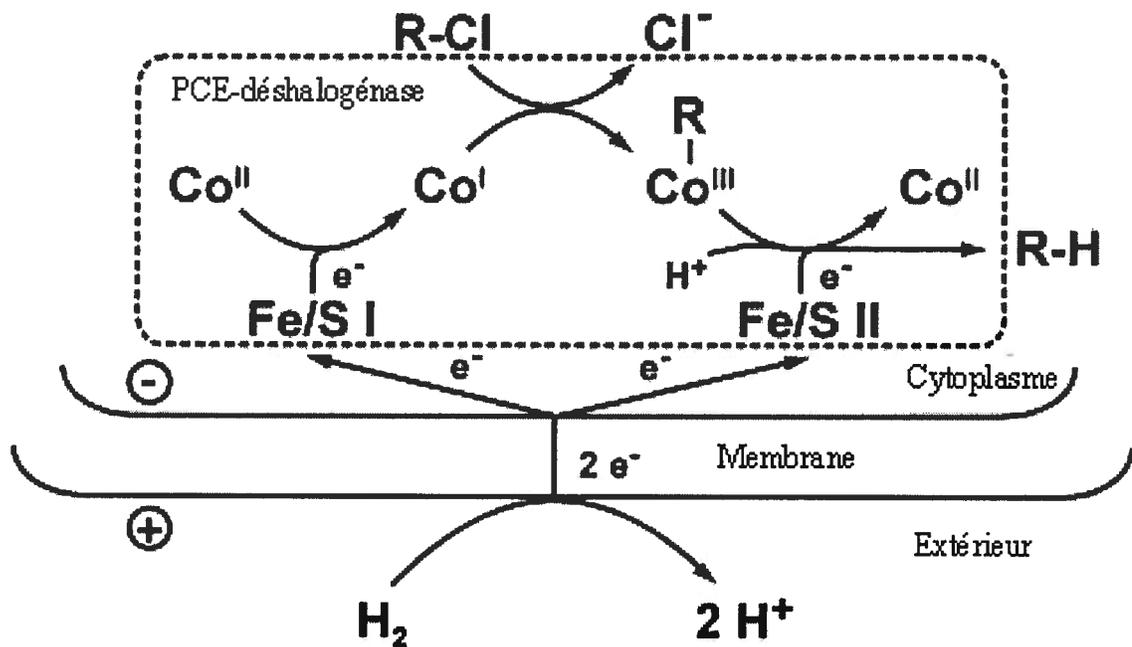


Figure 6. Schéma expliquant le transfert d'électrons au cours de la déshalogénéation réductrice du PCE chez *Dehalospirillum multivorans*. Fe/S I et Fe/S II : centres fer-soufre, Co^I, Co^{II} et Co^{III} : cobalamines, R-Cl : composé halogéné, R-H : composé déshalogéné. Modifié de Neumann *et al.*, (1996).

Un fragment d'environ 6 kb contenant le gène codant pour la PCE réductrice déshalogénase (*pceA*) a été amplifié, cloné et séquencé (Neumann *et al.*, 1998). Une séquence de 501 acides aminés a été déduite pour ce gène. Cette séquence possède un peptide signal, laissant une protéine mature de 471 acides aminés, correspondant à une masse moléculaire de 52,5 kDa. La séquence protéique de ce gène contient également des séquences de fixation à un centre fer-soufre (CXXCXXCXXXCP et GXXCXXCXXXCP). Aucune séquence de fixation à un cofacteur cobalamine n'a été retrouvée. Un autre gène, le gène *cprB* (codant pour une protéine de 74 acides aminés ayant une masse théorique moléculaire de 8,3 kDa), a été retrouvé dans le fragment cloné. Suite à une étude plus approfondie du fragment cloné et à une étude de son profil d'hydrophobicité, Neumann et ses collaborateurs (1998) ont supposé que cette protéine soit membranaire et nécessaire à l'ancrage de la PceA à la membrane cytoplasmique, bien que la PceA réductase ait été retrouvée uniquement dans la fraction cytoplasmique. Ces deux gènes formeraient également un seul opéron. Le gène *pceA* a ensuite été cloné puis exprimé dans une souche de *E. coli* en présence de pUBS 520 (nécessaire afin d'augmenter la fréquence du codon arginine, essentiel à la production de cette enzyme chez *E. coli*). La protéine a pu être exprimée chez *E. coli* mais aucune activité de déshalogénéation n'a pu être observée (Neumann *et al.*, 1998). Afin d'expliquer cet échec, les auteurs ont évoqué la possibilité d'un cofacteur manquant chez *E. coli* nécessaire à l'activité de la PceA chez *D. multivorans*.

Plus récemment, une nouvelle souche de *D. multivorans* (souche N) a été isolée du même endroit que sa précédente (souche K) (Siebert *et al.*, 2002). Bien que la souche N possède les mêmes gènes que la souche K, celle-ci ne peut déshalogéner le PCE. Des expériences ont démontré que la souche N est dépourvue d'un cofacteur corrinoïde présent chez la souche K, expliquant le fait qu'elle ne puisse déshalogéner le PCE (Siebert *et al.*, 2002).

1.6.5 *Desulfitobacterium hafniense* DCB-2

La souche DCB-2 a été isolée à partir d'un consortium dégradant le TCP, le tout provenant de boues municipales (Madsen et Aamand, 1992). Cette souche a d'abord été associée au genre *Clostridium* (Madsen et Licht, 1992) puis a par la suite été classifiée comme étant une nouvelle souche (DCB-2) du genre *Desulfitobacterium* (Christiansen et Ahring, 1996). Cette souche peut déshalogéner plusieurs composés chlorés en position *ortho* comme le 2,4-CDP, le 2,4,5-TCP, le 2,4,6-TCP et le PCP. Une déshalogénéation du 3,5-DCP en position *meta* a également été observée et le 3-Cl-4-OHPA peut également être déchloruré par la souche DCB-2. Aucune déshalogénéation n'a pu être effectuée pour le 3,4,5-TCP, le 3,4-DCP, le 2-CP, le 3-CP et pour le 4-CP (Christiansen et Ahring, 1996).

L'enzyme (47 kDa) déshalogénant le 3-Cl-4-OHPA chez la souche DCB-2 a été isolée de la fraction membranaire de celle-ci (Christiansen *et al.*, 1998). La séquence du N-terminale de cette enzyme indique la présence d'une modification post-traductionnelle, suggérant alors la présence d'un peptide signal et celle-ci possède également un cofacteur corrinnoïde. Cette enzyme ne semble pas déshalogéner le PCE de façon significative (Christiansen *et al.*, 1998).

1.6.6 *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1

La souche *D. frappieri* PCP-1 a été isolée à partir d'un consortium méthanogène déshalogénant le PCP (Bouchard *et al.*, 1996). Cette souche semble ubiquitaire du sol puisqu'elle a été retrouvée dans 31 des 44 sols testés au Québec, qu'ils soient contaminés par des composés chlorés ou non contaminés (Lanthier *et al.*, 2001). Un test de réassociation chromosomique de celle-ci avec *Desulfitobacterium hafniense* DCB-2 a

montré 88,6% de réassociation, démontrant que ces deux souches sont en fait de la même espèce (Niggemyer *et al.*, 2001). Suite à cette découverte, le catalogue internet du DSM indique maintenant toutes les souches de *D. frappieri* (PCP-1, DP7, TCP-A et TCE1) comme étant des souches diverses de l'espèce *D. hafniense*.

La souche PCP-1 est la seule bactérie connue pouvant déshalogéner le PCP jusqu'au 3-CP et à déshalogéner les chlorophénols en position *ortho*, *meta* et *para* du cycle aromatique (Bouchard *et al.*, 1996). La voie principale de déshalogénéation du PCP est la suivante : PCP → 2,3,4,5-TeCP → 3,4,5-TCP → 3,5-DCP → 3-CP (Juteau *et al.*, 1995). En effet, le PCP, le 2,3,4-TCP, le 2,3,5-TCP, le 2,3,6-TCP, le 2,4,6-TCP, le 2,4-DCP, et le 2,6-DCP sont déshalogénés en position *ortho*, le 2,3,4-TCP, le 2,3,5-TCP et le 3,5-DCP sont déchlorurés en position *meta* et le 3,4,5-DCP ainsi que le 2,4-DCP sont réduits en position *para* (Dennie *et al.*, 1998). Le PCE est déshalogéné jusqu'au TCE et le 3-Cl-4OHPA n'est pas déchloruré par la souche PCP-1.

Deux systèmes enzymatiques inductibles sont impliqués dans la déshalogénéation des composés chlorés chez cette souche (Dennie *et al.*, 1998). Le premier est responsable de la déshalogénéation des composés chlorés en position *ortho* (déshalogénase I) et le second en position *para* et *meta* (déshalogénase II). L'enzyme codant pour le premier système a été extraite à partir de la membrane cytoplasmique lorsque celle-ci était induite par le 2,4,6-TCP (Boyer *et al.*, 2003). Sur SDS-PAGE, cette enzyme possède une masse moléculaire d'environ 37 kDa alors que par spectrométrie de masse, celle-ci était plutôt de 33.8 kDa. La caractérisation enzymatique de la déshalogénase I a permis de déterminer que celle-ci possède un cofacteur corrinnoïde et aucun centre fer-soufre. Le gène codant pour cette enzyme, le gène *crdA1*, a été cloné puis séquencé (Boyer *et al.*, 2003). Celui-ci code pour une protéine de 327 acides aminés et possède un peptide signal. La masse théorique des 303 acides aminés constituant la protéine mature est de 32,927 Da. La différence de 873 Da entre la masse moléculaire déterminée par spectrométrie de masse et celle prédite par la séquence du gène est probablement

attribuable à la présence d'un cofacteur corrinoïde. Un domaine LysM a été retrouvé chez la déshalogénase I qui est également présent chez d'autres protéines impliquées dans la fixation aux peptidoglycans de la membrane. Un domaine PAX a pu être identifié chez cette protéine mais aucune fonction n'a pu être attribuée à ce domaine. La séquence protéique du gène *crdA1* ne montre aucune homologie de séquence avec d'autres protéines répertoriées dans les banques de données jusqu'à ce jour.

Un fragment de 1,9 kpb a été amplifié chez *D. frappieri* PCP-1 et séquencé (Villemur *et al.*, 2002). La séquence déduite en acides aminés a démontré la présence d'un cadre de lecture de 101 acides aminés possédant 60% d'identité (82% de similarité) avec le produit du gène *cprB* chez *D. dehalogenans*. Un second cadre de lecture incomplet a été localisé 14 nucléotides en aval du gène *cprB* et ce dernier a démontré 54% d'identité (65% de similarité) avec une CprA retrouvée chez *D. dehalogenans* également. De plus, la fin d'un cadre de lecture situé 219 nucléotides en amont du gène *cprB* correspond au C-terminale d'une autre CprA (60% d'identité et 71% de similarité) chez *D. dehalogenans*. Ce fragment de 1,9 kpb a été comparé dans le génome partiel de *D. hafniense* (site internet JGI) et 100% d'identité y a été retrouvée dans le contig 3277. L'arrangement de ces gènes dans ce contig suggère une duplication partielle de ceux-ci dans cette partie du chromosome. En effet, deux copies des gènes *cprA*, *cprB*, *cprC*, *cprD*, *cprK* ainsi que *cprT* y ont été retrouvées et la similarité entre ces gènes est de 43% à 81%. Une duplication similaire a également été retrouvée dans le génome de *D. chlororespirans* où deux gènes *cprA*, *cprB* et *cprK* ont été retrouvés (Villemur *et al.*, 2002). Dans le contig 3246 de *D. hafniense* DCB-2, un gène *cprK* a été retrouvé et devancé par un locus *cprBA* alors que dans le contig 3185, ces gènes sont également présents en plus que des gènes *cprE*, *cprC*, *cprK*, *cprZ* et *cprT*.

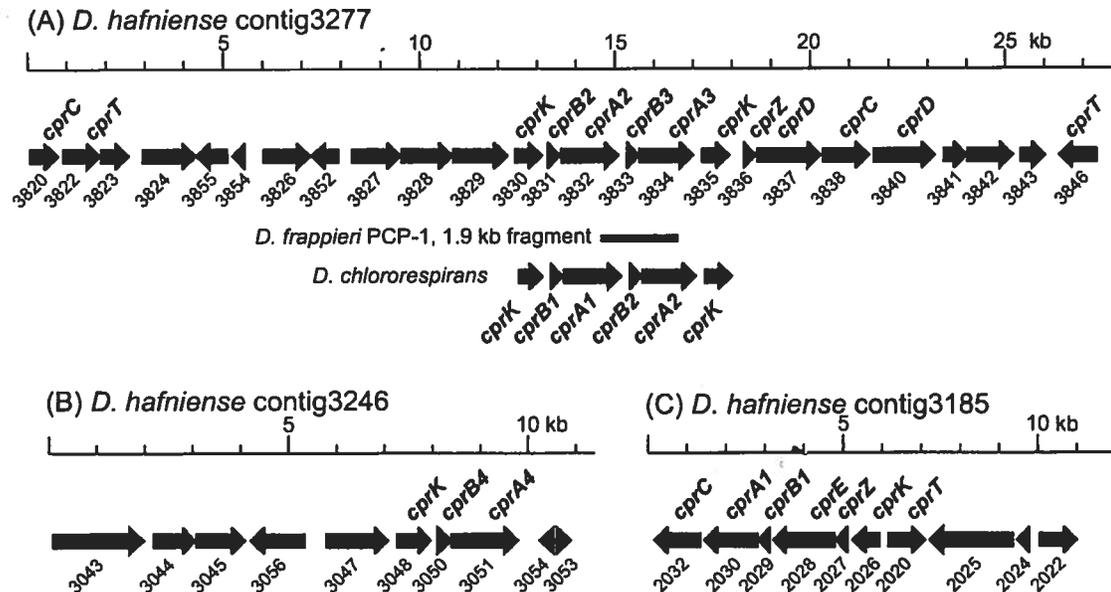


Figure 7. Arrangement des gènes du contig 3277 (A), contig 3246 (B) et du contig 3185 (C) du génome de *Desulfitobacterium hafniense* DCB-2. Au centre, une section d'ADN génomique retrouvée chez *D. chlororespirans* Co23. Les flèches horizontales représentent les cadres de lecture et les chiffres sous celles-ci correspondent au numéro des gènes attribués au site internet de « Joint Genome Institute » (JGI). Modifié de Villemur *et al.*, (2002).

1.6.7 *Desulfitobacterium* sp. PCE1

La souche PCE1 a été isolée à partir d'une culture enrichie au PCE provenant d'un inoculum de sol pollué par des chloroéthènes (Gerritse *et al.*, 1995;1996). La souche PCE1 a la capacité de déshalogéner le PCE jusqu'en éthylène et peut également déshalogéner le 2,4,6-TCP en position *ortho*. Le 3-Cl-4-OHPA est déshalogéné en présence de cette souche mais aucune croissance n'a pu être observée en présence de PCP (Gerritse *et al.*, 1996). Le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S de la souche PCE1 présente 99,3% de similarité avec *D. dehalogenans* JW/IU-DC1. Une étude de réassociation de l'ADN chromosomique de ces deux souches serait toutefois nécessaire afin de déterminer si la souche PCE1 est une nouvelle souche de l'espèce *dehalogenans*.

Deux enzymes distincts, toutes deux de 48 kDa, sont responsables respectivement de la déshalogénéation du 3-Cl-4-OHPA et du PCE chez la souche PCE1 (van de Pas *et al.*, 2001a). L'enzyme déshalogénant les chlorophénols possède des caractéristiques semblables à la *ortho*-chlorophénol déshalogénase de *D. dehalogenans*. L'enzyme réduisant le PCE ne possède pas la même séquence N-terminale que l'enzyme déshalogénant le PCE chez *D. frappieri* TCE1 (voir plus loin). Ces deux enzymes ne sont pas non plus du même poids moléculaire.

1.6.8 *Desulfitobacterium chlororespirans* Co23

D. chlororespirans Co23 a été isolée à partir d'un compost pouvant déshalogéner le 2,3-DCP (Sanford *et al.*, 1996). Cette souche peut déshalogéner des composés chlorés en position *ortho* dont le 2,3-DCP, le 2,6-DCP, le 2,4,6-TCP et le 2,4,6-tribromophénol mais elle ne peut déchlorurer le 2,4-DCP, le 2,5-DCP, le 2,3,5-TCP et le PCP. Il a également été observé que cette souche obtient de l'énergie de la déshalogénéation du 3-chloro-4-hydroxybenzoate et qu'elle peut déshalogéner le 3-Cl-4-OHPA. Cette souche ne peut déshalogéner le PCE (Löffler *et al.*, 1996).

Une déshalogénase réductrice (CprA) a été purifiée de la fraction membranaire de la souche Co23 (Löffler *et al.*, 1996). Cette enzyme peut déshalogéner des composés chlorés en position *ortho* seulement mais peut déchlorurer les biphényles polychlorés hydroxylés (Krasotkina *et al.*, 2001). Cette enzyme possède un cofacteur corrinnoïde ainsi que deux centres fer-soufre. La séquence N-terminale obtenue indique que cette enzyme est modifiée suite à la traduction (présence d'un peptide signal) et que cette séquence possède 55%, 45% et 45% de similarité avec des séquences présentes chez *D. hafniense* et *D. dehalogenans* et *Desulfitobacterium* sp. PCE1 (Krasotkina *et al.*, 2001).

1.6.9 *Dehalococcoides ethenogenes* 195

La souche 195 a été isolée à partir de cultures microbiennes mixtes déshalogénant le PCE jusqu'à l'éthylène (Maymo-Gatell *et al.*, 1997). Contrairement aux autres bactéries effectuant la déshalogénéation réductrice qui sont des bâtonnets, *D. ethenogenes* est plutôt en forme de coque. Cette souche est la seule à pouvoir déshalogéner le PCE jusqu'à l'éthylène. Deux systèmes enzymatiques ont été identifiés afin d'effectuer cette déshalogénéation (Magnuson *et al.*, 1998). Une PCE déshalogénase réductrice catalyse la réaction de déshalogénéation du PCE au TCE et une TCE déshalogénase réductrice permet la déchloruration du TCE jusqu'à l'éthylène. Ces deux enzymes ont été purifiées de la membrane cytoplasmique et possèdent respectivement une masse moléculaire de 51 kDa et 61 kDa. Dans les deux cas, un cofacteur corrinnoïde est impliqué (Magnuson *et al.*, 1998).

Le gène codant pour la TCE déshalogénase de la souche 195 (*tceA*) a été séquencé (Magnuson *et al.*, 2000). Celui-ci possède une séquence protéique de 554 acides aminés et une masse moléculaire théorique de 62 kDa. Cette protéine détient un peptide signal de 42 acides aminés, laissant ainsi une protéine mature ayant une masse théorique de 57,6 kDa. Celle-ci possède également deux séquences consensus indiquant la fixation d'un centre fer-soufre. La séquence protéique du gène *tceA* de *D. ethenogenes* démontre un faible taux d'identité avec les séquences de la *pceA* de *D. multivorans* et de la *cprA* de *D. dehalogenans*, soit 24% et 22% respectivement. Un autre gène situé en aval du gène *tceA*, le gène *tceB*, a été identifié et la séquence de celui-ci code pour une protéine de 94 acides aminés. La protéine résultante possède une masse théorique de 10,9 kDa et serait située au niveau de la membrane cytoplasmique. Aucune homologie de séquence n'a été retrouvée pour le gène *tceB* dans les banques de données. Les gènes *tceA* et *tceB* seraient probablement co-transcrits (Magnuson *et al.*, 2000).

Villemur *et al* (2002) ont démontré la présence de 19 cadres de lecture hypothétiques (dont 2 chez *D. hafniense* et 17 chez *Dehalococcoides ethenogenes*) dans lesquels des gènes *cprA/tceA* seraient co-transcrits avec des gènes *cprB/tceB*. Ces derniers auteurs ont également démontré que le profil d'hydrophobicité du gène *tceB* est similaire à ceux obtenus pour le gène *pceB* de *Dehalospirillum multivorans*, pour le gène *cprB* de *D. dehalogenans* de même que pour les 19 cadres de lecture adjacents aux déshalogénases réductrices hypothétiques.

1.6.10 *Desulfitobacterium* sp. PCE-S

Isolée à partir d'un sol contaminé au PCE, la souche PCE-S peut déshalogéner le PCE jusqu'au *cis*-1,2-DCE mais ne peut déchlorurer les chlorophénols (Miller *et al.*, 1997). La déshalogénéation du PCE et du TCE est catalysée par le même système enzymatique. Une enzyme membranaire a été purifiée de cette souche puis caractérisée. Cette enzyme, une PceA, catalyse la réaction de déshalogénéation réductrice du PCE jusqu'au *cis*-1,2-DCE (Miller *et al.*, 1998). Cette enzyme possède une masse moléculaire d'environ 65 kDa et contient un cofacteur corrinnoïde ainsi que deux centres fer-soufre. Cette PceA réductase possède un peptide signal et la séquence obtenue en N-terminale ne présente aucune homologie de séquence avec la PceA présente chez *D. multivorans* (Miller *et al.*, 1998).

1.6.11 *Desulfitobacterium frappieri* TCE1

La souche *D. frappieri* TCE1 (ou *D. hafniense* TCE1) a été isolée à partir d'un bioréacteur anoxique déchlorurant le PCE (Gerritse *et al.*, 1999). L'analyse du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S a révélée 99,7% d'homologie avec *D. frappieri* PCP-1 et 96,7% avec *D. hafniense* souche DCB-2. Cette bactérie peut déshalogéner le PCE

jusqu'au *cis*-DCE mais ne peut utiliser les chlorophénols comme accepteur d'électron. Le 3-Cl-4-OHPA ne peut être déshalogéné par la souche TCE1.

Une PCE déshalogénase réductrice de 59 kDa a été isolée de la souche TCE1 (van de Pas *et al.*, 2001a). Cette enzyme peut également réduire le TCE. La séquence N-terminale obtenue est semblable à celle obtenue pour la PceA déshalogénase de la souche PCE-S. Suite à ce résultat, les auteurs ont alors suggéré que cette PCE déshalogénase pourrait posséder le même type de cofacteur corrinnoïde que la souche PCE-S.

1.6.12 *Desulfitobacterium frappieri* TCP-A

La souche *D. frappieri* TCP-A (ou *D. hafniense* TCP-A) a été isolée à partir d'une culture anaérobie mixte provenant de sédiments de la rivière Saale en Allemagne (Breitenstein *et al.*, 2001). Cette culture a la particularité de déshalogéner le 2,4,6-TCP en position *ortho*, réduisant ainsi cette molécule jusqu'au 3-CP. La séquence du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S est très similaire à celle retrouvée chez le genre *Desulfitobacterium*. En effet, la séquence de ce gène montre 99,2% d'homologie avec les *D. frappieri* PCP-1 et TCE1 ainsi que 98,8% et 95,2% avec *D. hafniense* DCB-2 et *D. dehalogenans* JW/IU-DC1, respectivement. Contrairement à la souche PCP-1 qui peut déshalogéner le PCP jusqu'au 3-chlorophénol, la souche TCP-A ne peut le déchlorurer complètement, le réduisant alors jusqu'au 2,3,4,5-TeCP. De plus, la souche TCP-A peut déshalogéner le PCE jusqu'au TCE mais ne peut déshalogéner le 3-Cl-4-OHPA.

1.6.13 *Desulfitobacterium* sp. Y51

Isolée à partir d'un sol contaminé au PCE, la souche Y51 a été identifiée comme étant une nouvelle espèce du genre *Desulfitobacterium* (Suyama *et al.*, 2001). Celle-ci

peut déshalogéner le PCE jusqu'au *cis*-DCE via le TCE et peut également déchlorurer des polychloroéthanes jusqu'au DCE.

Une PCE déshalogénase réductrice a été purifiée de la souche Y51. L'expression de cette protéine est grandement induite par la présence de PCE et TCE, qui, selon les auteurs (Suyama *et al.*, 2001), servent d'accepteur final d'électron pour l'halorespiration. Cette enzyme catalyse la réaction de déchloruration de plusieurs chloroéthanes jusqu'au *cis*-DCE via le PCE. L'analyse de la protéine purifiée a révélé la présence d'une seule bande sur SDS-PAGE, correspondant à une masse moléculaire d'environ 58 kDa. Celle-ci semble également posséder un cofacteur corrinnoïde.

Un fragment de 2,8 kb contenant le gène codant pour cette protéine (*pceA*) a été cloné et séquencé. La séquence protéique de ce gène est de 551 acides aminés, correspondant à une masse théorique de 61,2 kDa. La séquence N-terminale de cette enzyme a révélé que celle-ci possède un peptide signal de 39 acides aminés. De plus, cette séquence possède la séquence consensus TAT. Ainsi, la séquence résultante de 512 acides aminés correspondrait à une masse de 57,4 kDa. Des séquences consensus pour la fixation d'un centre fer-soufre ont été retrouvées. Cette PceA possède des identités de 28,0, 26,3 et 23,3% avec la PceA de *D. multivorans*, la CprA de *D. dehalogenans* et la TceA de *D. ethenogenes*, respectivement. En aval du gène *pceA*, un cadre de lecture à été identifié et nommé *pceB*. Celui-ci code pour une protéine de 105 acides aminés, ce qui correspond à une masse théorique de 11,8 kDa. À ce moment, aucune homologie n'avait été observée dans les banques de données (Suyama *et al.*, 2001). Les gènes *pceA* et *pceB* ont été clonés dans la souche *E. coli* BL21(DE3)/pLysS mais aucune activité de PCE déshalogénase n'a pu être observée. Les auteurs attribuent cette perte d'activité par le fait que l'enzyme n'ait pas réussi à adopter la conformation adéquate pour être active. Des expériences d'immunobuvardage ont été réalisées avec des anticorps anti-PceA. Les résultats ont indiqué que la protéine de 58 kDa correspondait à la forme mature de la protéine et que celle-ci était présente dans la fraction cytoplasmique et que la forme non-

clivée de la protéine (61 kDa) se retrouve également dans le cytoplasme (Suyama *et al.*, 2001).

1.6.14 *Desulfitobacterium frappieri* DP7

La souche *D. frappieri* DP7 (ou *D. hafniense* DP7) est une bactérie anaérobie qui a été extraite à partir de fèces humaines (van de Pas *et al.*, 2001b). La souche DP7 est d'ailleurs la première souche de genre *Desulfitobacterium* à ne pas avoir été isolée à partir d'un environnement pollué. Son rôle dans le tractus intestinal n'est pas connu. Cette souche ne peut déshalogéner de composés chlorés, contrairement à toutes les autres souches du genre *Desulfitobacterium* connues jusqu'à ce jour. La souche DP7 appartient à l'espèce *D. frappieri* puisque l'analyse du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S a révélé 99% de similarité avec celui de la souche *D. frappieri* TCE1. De plus, le taux de réassociation ADN-ADN avec cette dernière est de 83% (van de Pas *et al.*, 2001b).

Le fait que la souche DP7 n'a pas de pouvoir de déshalogénéation est une découverte importante parce que cela indique que la détection d'une souche grâce aux séquences du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S des souches de *Desulfitobacterium* n'est pas nécessairement un indicateur du potentiel de déchloration dans cet environnement par ces bactéries (van de Pas *et al.*, 2001b).

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Provenance des souches de *Desulfitobacterium*

La souche *D. frappieri* PCP-1 (ATCC 700357) a été isolée à partir d'un consortium anaérobie pouvant effectuer la déshalogénéation du PCP (Bouchard *et al.*, 1996). Cette souche a par la suite été conservée sous forme lyophilisée et également par repiquages périodiques dans un milieu anaérobie liquide dans des bouteilles de sérum.

La souche *D. dehalogenans* JW/IU-DC1 a été obtenue de l'American Type Culture Collection (ATCC 700041). Expédiée sous forme lyophilisée, cette souche a par la suite été conservée par repiquages périodiques.

Les souches *D. frappieri* DP7 (DSM 13498), *D. frappieri* TCP-A (DSM 13557), *D. frappieri* TCE1 (DSM 12704), *D. hafniense* DCB-2 (DSM 10664), *Desulfitobacterium* sp. PCE1 (DSM 10664) ainsi que *D. chlororespirans* Co23 (DSM 11544) ont été obtenues de la DSMZ (Collection Allemande de Microorganismes et de Cultures Cellulaires). La souche DP7 a été expédiée sous forme de culture liquide alors que les 5 autres souches sont parvenues sous formes lyophilisées. Ces souches ont été lyophilisées et conservées par repiquages périodiques.

2.2 Culture des souches de *Desulfitobacterium*

2.2.1 Milieu liquide minimal anaérobie

Le milieu de culture liquide minimal anaérobie (MLA) qui a été utilisé pour la culture des souches de *Desulfitobacterium* est semblable à celui décrit par Boyd *et al.* (1983). Afin de préparer ce milieu, une solution de 1 litre a été tout d'abord préparée avec les produits suivants : 0,27 g de KH_2PO_4 (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, É-U), 0,35 g de K_2HPO_4 (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, É-U), 0,53 g de NH_4Cl (J.T. Baker,

Phillipsburg, NJ, É-U), 0,10 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, É-U), 0,005 g de $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ (Anachemia, Montréal, Qc, Canada) et 0,073 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (ICN Biochemicals, Cleveland, Ohio, É-U). Ensuite, 10 ml d'une solution de minéraux constituée de 0,1 g/l de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $ZnCl_2$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, H_3BO_3 (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, É-U) et de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (Anachemia, Montréal, Qc, Canada) ont été ajoutés de même que 0,001 g de resazurin (Sigma, St-Louis, MO, É-U), qui est un indicateur du potentiel redox. Le pH de ce milieu a été ajusté à 7,5 avec du $NaHCO_3$ (BDH inc., Toronto, Ont., Canada) et le volume a été complété à 1 litre avec de l'eau filtrée (MilliQ).

Le milieu de culture a ensuite été bouilli (300 ml dans un ballon de 500 ml) pendant une heure avec une colonne réfrigérante, limitant ainsi l'évaporation du milieu. Ensuite, un volume de 35 ml de ce milieu a été placé dans des vials sérologiques de 70 ml sans être d'abord refroidis (Canlab, Pointe-Claire, Qc, Canada) puis barboté pendant 5 minutes avec un mélange gazeux de 10% d'hydrogène, 10% de gaz carbonique et 80% d'azote (Médigas, St-Laurent, Qc, Canada). Ces dernières manipulations ont servi à éliminer l'oxygène présent dans le milieu. Les vials ont été fermés hermétiquement avec des bouchons de butyle (Geo-Microbial Technologies, Ochelata, NJ, É-U) puis maintenus à l'aide d'anneaux métalliques (Wheaton, NJ, É-U). Ces vials ont finalement été stérilisés à l'autoclave pendant 30 minutes à 121°C. Le pH du milieu était alors entre 7,40 et 7,45. Les dernières traces d'oxygène présent dans le milieu refroidi ont été ensuite éliminées avec l'ajout d'une solution de $Na_2S \cdot 9H_2O$ (BDH inc., Toronto, Ont., Canada) pour une concentration finale de 0,05 g/l.

2.2.2 Culture de *D. frappieri* PCP-1 et de *D. dehalogenans* JW/IU-DC1

Les souches PCP-1 et JW/IU-DC1 ont été cultivées dans des bouteilles sérologiques de 70 ml contenant 35 ml de milieu MLA supplémenté de 0,1% d'extrait de levure (Difco laboratories, Détroit, MI, É-U) et 55 mM de pyruvate (Sigma, St-Louis, MO, É-U). Certaines cultures ont été cultivées en présence de chlorophénols (tous de

Aldrich, Milwaukee, Wis, É-U), à raison de 10 mg/l pour le 2,4,6-TCP, le 3,5-DCP et le PCE, et de 0,2 mg/l pour le PCP. Toutes ces solutions (extrait de levure, pyruvate et chlorophénols) ont été préparées de façon anaérobie après avoir été stérilisées avec un filtre de porosité 0,2 µm (Starstedt, Montréal, Canada) puis ajoutées stérilement sous une hotte laminaire. Ces solutions ont été conservées à 4°C enveloppées d'un papier d'aluminium afin de les protéger de la lumière. Un inoculum de 1 ml (2,5% (v/v)) provenant d'une culture en phase stationnaire a été ajouté et les bouteilles ont été ensuite incubées à 30°C à l'obscurité.

2.2.3 Culture des souches *D. frappieri* DP7, TCP-A et TCE1, *D. hafniense* DCB-2, *Desulfitobacterium* sp. PCE1 et de *D. chlororespirans* Co23

Ces souches ont été cultivées de la même façon que pour *D. frappieri* PCP-1 et *D. dehalogenans* JW/IU-DC1, mais certains produits supplémentaires ont été ajoutés avant l'inoculation des souches. Un volume de 1 ml/l d'une solution de sélénite-tungstate a été ajouté. Cette solution contenait 3 mg/l de Na₂SeO₃ (Anachemia, Montréal, Qc, Canada), 4 mg/l de Na₂WO₄·2H₂O (Sigma, St-Louis, MO, É-U) et 0,5 g/l de NaOH (Fisher, Fair Lawn, NJ, É-U). Un volume d'une solution vitaminée de 5 ml/l a également été ajouté au milieu. Cette solution vitaminée contenait 2 mg/l de biotine, 2 mg/l d'acide folique, 10 mg/l de pyridoxine·HCl, 5 mg/l de thiamine·HCl, 5 mg/l de riboflavine, 5 mg/l d'acide nicotinique, 5 mg/l de calcium D-(+)-pantothénate, 0,2 mg/l de cyanocobalamine, 5 mg/l d'acide *p*-aminobenzoïque et 5 mg/l d'acide thioctique (tous de chez Sigma, St-Louis, MO, É-U). Le pH de cette solution a été ajusté à 7,5 avec une solution de K₂HPO₄. Ces deux solutions ont été conservées dans des vials anaérobies après avoir été stérilisées avec un filtre de porosité 0,2 µm.

2.3 Extraction de l'ADN génomique des souches de *Desulfitobacterium*

La méthode d'extraction d'ADN qui a été utilisée pour extraire l'ADN génomique des souches de *Desulfitobacterium* est celle de broyage des bactéries par des billes de verres. À partir d'une culture en vial anaérobie d'environ 38 ml et dont la densité optique (D.O) à 600 nm était d'environ 0,4, 10 ml de chaque culture ont été prélevés et centrifugés à 7700 x g pendant 10 minutes à la température de la pièce. Les culots ont été dispersés dans 1 ml de tampon TEN et transférés dans un tube de 1,5 ml. Le tampon TEN était constitué de 10 mM EDTA•2Na (Gibco, Grand Island, NY, É-U), 150 mM NaCl (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, É-U) et de 50 mM de Tris-HCl (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, É-U) (Merck, Darmstadt, Allemagne) pH 8,0. Le tout a été centrifugé pendant une minute à 16 000 x g. Les culots ont été dispersés dans 250 µl de tampon TEN. Les tubes ont alors été placés immédiatement sur glace. Les suspensions ont été transférées dans un tube vissé stérile de 1,5 ml contenant 250 mg de billes de verre ayant un diamètre variant de 0,45 mm à 0,50 mm (B.Braun Biotech, Allemagne). Du SDS (1% concentration finale) a été ajouté à chacun des tubes. Les tubes ont été placés dans un homogénéisateur (FastPrep, Thermo Savant, NY, É-U) et homogénéisés à une vitesse de 4,0 pendant 30 secondes, avec une pause après 15 secondes. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 16 000 x g pendant 15 minutes. Le surnageant de chaque culture a été recueilli, transféré à un autre tube de 1,5 ml et 1 µl d'une solution de RNase A (Sigma) d'une concentration de 10 mg/ml a été ajouté. Ces tubes ont été laissés à la température de la pièce pendant 15 minutes et par la suite, un volume égal de phénol (équilibré, Tris-HCl pH 8.0) (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, É-U) a été ajouté. Le tout a ensuite été mélangé par inversion pendant 2 minutes et centrifugé 5 minutes à 16 000 x g. La phase aqueuse a été récupérée, transférée à un autre tube puis un volume égal d'une solution de phénol/chloroforme (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, É-U)/alcool isoamylique (A & C Produits Chimiques Américains, Montréal, Qc, Canada) (25 :24 :1) a été ajouté. Le tout a été mélangé par inversion pendant 2 minutes puis centrifugé pendant 5 minutes à 16 000 x g. La phase aqueuse a de nouveau été transférée à un autre tube et un volume égal d'une solution de chloroforme/alcool isoamylique (24 :1) a été ajouté, mélangé par inversion pendant 1 minute et centrifugé pendant 1 minute à 16 000 x g. La phase

aqueuse a été récupérée et transférée à un autre tube de 1,5 ml et 2 volumes d'alcool dénaturé 100% (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, É-U) ont été ajoutés afin de précipiter les acides nucléiques pendant une heure à -20°C. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 16 000 x g pendant 15 minutes. Les culots obtenus ont été lavés avec de l'éthanol 70% (v/v), centrifugés pendant 2 minutes et dissous dans un volume de 200 µl d'eau stérile (eau filtrée et autoclavée 30 minutes).

2.4 Extraction d'ARN des souches de *Desulfitobacterium*

La méthode décrite ci-dessous a permis d'extraire les ARN bactériens totaux. Tout le matériel utilisé pour effectuer les extractions d'ARN (tubes Corex, tubes Oakridge, tubes de 0,5 ml et 1,5 ml, tips et pipettes Pasteur) a préalablement été autoclavé pendant une heure. L'eau traitée au diethyl pyrocarbonate (DEPC) a été préparée avec 1 ml de DEPC (Sigma, St-Louis, MO, É-U) dans un litre d'eau filtrée (MilliQ). Ce mélange a ensuite été agité fortement puis bouilli pendant 15 minutes avant d'être autoclavé pour une période d'une heure afin d'éliminer toutes traces de DEPC. La plupart des solutions ont été préparées avec de l'eau DEPC et autoclavées pendant 1 heure.

Les ARN totaux ont été extraits à partir de cultures ayant été inoculées 24 ou 48 heures auparavant. Chacune des extractions des souches de *Desulfitobacterium* a été réalisée à partir d'un vial contenant environ 38 ml de culture. La D.O. à 600 nm de chaque culture devait être de 0,3 à 0,6. La culture a été prélevée et séparée également dans 3 tubes Oakridge. Dans chacun des tubes, 1 ml de tampon de lyse constitué de 50 mM de EDTA•2Na et de SDS 5% (p/v) a été ajouté puis les tubes ont été agités fortement à l'aide d'un vortex pendant 30 secondes. Ensuite, 1 ml d'une solution d'acétate de sodium (A & C Produits Chimiques Américains, Montréal, Qc, Canada) 2 M pH 4,0 (avec acide acétique glacial) a été ajouté au mélange et celui-ci a été agité fortement à l'aide d'un vortex pendant 30 secondes. Par la suite, 10 ml de phénol ont été ajoutés dans chacun des tubes et ceux-ci ont de nouveau été agités fortement pendant 1 minute.

Ensuite, 2 ml de chloroforme/alcool isoamylique (24 :1) ont été ajoutés dans chacun des tubes et ceux-ci ont été agités fortement pendant 1 minute. Chacun de ces tubes a été centrifugé à 3 000 x g pendant 5 minutes à la température de la pièce. La phase aqueuse de chaque tube a été prélevée puis placée dans un autre tube Oakridge. Un volume égal de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25f :24 :1) a été ajouté puis le tout a été agité fortement avec un vortex pendant 30 secondes avant d'être centrifugé à 3 000 x g pendant 5 minutes à la température de pièce. Après la centrifugation, la phase aqueuse a été prélevée puis séparée également dans 2 tubes Corex (Corex[®], É-U). À ce tube, 14 ml d'alcools (Fisher) 100% ont été ajoutés puis les tubes ont été placés une heure à -20°C afin de précipiter les acides nucléiques. Ensuite, les tubes ont été centrifugés à 6 800 x g pendant 10 minutes à 4°C. Les culots ont été dissous dans 10 ml au total d'une solution de TE-SDS (Tris-HCl pH 7,5, 1 mM de EDTA•2Na et de 0,5% (p/v) SDS). À chacun des tubes, 500 µl d'une solution d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 ainsi que 14 ml d'alcool (Fisher) 100% et ceux-ci ont été placés à -20°C pendant une heure puis centrifugés à 6 800 x g pendant 10 minutes à 4°C. Chacun des culots a été dissous dans 300 µl d'eau traitée au DEPC puis transféré dans un tube de 1,5 ml. Dans chacun des tubes, 30 µl d'une solution d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 ainsi que 825 µl d'alcool (Fisher) 100% ont été ajoutés puis ces tubes ont de nouveau été placés à -20°C pendant une heure. Par la suite, ceux-ci ont été centrifugés à 16 000 x g pendant 5 minutes. Les culots ont été lavés avec 200 µl d'éthanol 70% (v/v) et les tubes ont été centrifugés à 16 000 x g pendant 2 minutes. Les culots bien asséchés et dissous dans 175 µl d'eau traitée au DEPC.

2.5 DNase sur les préparations d'ARN

Suite à l'extraction d'ARN, tous les échantillons ont subi un traitement à la DNase. À chacun des tubes (contenant 175 µl d'ARN), 8 µl d'une solution de Tris-HCl 1 M pH 7,5 ainsi que 12 µl d'une solution de MgCl₂ 100 mM ont été ajoutés pour une concentration finale de Tris-HCl 40 mM pH 7,5 et de 6 mM de MgCl₂. À ces tubes, 5 µl de DNaseI sans présence de RNase (Roche Diagnostics, Laval, Canada) (10 U/µl) ont été ajoutés puis les tubes ont été incubés dans un bain-marie à 37°C pendant une heure.

Par la suite, 100 µl d'eau traitée au DEPC ont été ajoutés puis le tout a été extrait avec 300 µl de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25 :24 :1). Les tubes ont été agités fortement puis centrifugés à 16 000 x g pendant 5 minutes. La phase aqueuse a été prélevée et ajoutée à un volume de 300 µl de chloroforme/alcool isoamylique (24 :1) puis le tout a été mélangé par inversion avant d'être centrifugé à 16 000 x g pendant 1 minute. La phase aqueuse a de nouveau été prélevée et 30 µl d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 et 825 µl d'alcool 100% ont été ajoutés. Ces tubes ont été placés à -20°C pendant une heure puis centrifugés à 16 000 x g pendant 5 minutes. Les culots obtenus ont été lavés dans 200 µl d'éthanol 70% (v/v) puis centrifugés de nouveau à 16 000 x g pendant 2 minutes. Ceux-ci ont été asséchés puis dissous dans 50 µl d'eau traitée au DEPC.

2.6 Quantification des acides nucléiques (ADN et ARN)

Afin de quantifier l'ADN génomique obtenu suite à une extraction d'ADN, 8 µl de cet ADN ont été ajoutés à un volume de 792 µl d'eau, puis disposé dans une cuvette de quartz. Pour l'ARN, 5 µl ont été utilisés. Des mesures de la D.O à 260 et 280 nm ont été effectuées. La concentration des échantillons a été calculée à l'aide de la formule suivante :

Pour l'ADN:

$$[(D.O_{260}-D.O_{280}) \times 100] \times 100 \text{ (facteur de dilution)} = [\quad] \text{ ng/}\mu\text{l}$$

Pour l'ARN:

$$[(D.O_{260}-D.O_{280}) \times 80] \times 160 \text{ (facteur de dilution)} = [\quad] \text{ ng/}\mu\text{l}$$

2.7 Digestion par les enzymes de restriction

Les ADN ont été mis en présence d'un tampon approprié pour chaque enzyme de restriction utilisé selon les spécifications de la compagnie. En général, les ADNs ont été digérés à 37°C pendant 1 heure à 16 heures avec 1 à 100 unités d'enzyme dans un volume de 10 à 200 µl selon la quantité digérée.

2.8 Visualisation des acides nucléiques par électrophorèse sur gel d'agarose

2.8.1 ADN: Electrophorèse sur gel d'agarose

Les échantillons d'ADN ont été séparés après migration par électrophorèse sur gels d'agarose. Les gels étaient constitués de 0,8% à 2% (p/v) d'agarose (Gibco BRL, Grand Island, NY, É-U) dissous dans du tampon TAE (40 mM Tris-acétate, 1 mM EDTA pH 8.0). Un tampon de charge 6X (30% (v/v) glycérol (Fisher Scientific, Fair Lawn, JY, É-U), 0,25% (p/v) de xylène cyanol (Sigma, St-Louis, MO, É-U) et de 0,25% (p/v) de bleu de bromophénol (Sigma, St-Louis, MO, É-U) a été ajouté aux ADNs avant la migration. Pour chacune des électrophorèses, le marqueur de poids moléculaire *Lambda StyI* a été également chargé (500 ng) sur gel afin de pouvoir estimer la longueur des fragments obtenus. Ce marqueur a été obtenu à partir d'une digestion de l'ADN du phage *Lambda* (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, É-U) effectuée à l'aide de l'enzyme de restriction *StyI* (Gibco BRL, Grand Island, NY, É-U). Le marqueur Gene Ruler™ 50bp DNA ladder (MBI Fermentas, St.Leon-Rot, Allemagne) a été utilisé afin de visualiser les acides nucléiques suite aux réactions de RT-PCR.

Les gels d'agarose ont été déposés dans une cuve à électrophorèse (Bio-Rad mini sub™ DNA cell, Bio-Rad, Hercules, CA, É-U) rempli de tampon TAE et chargés avec les

ADNs. Les gels ont été ensuite soumis à un courant variant de 40-80 V durant une période variant de 60-240 minutes selon le type d'expériences. Ceux-ci ont été par la suite submergés dans une solution de bromure d'éthidium 0,5 µg/ml (Sigma, St-Louis, MO, É-U) pendant 15 minutes sous agitation puis transférés dans un bain rempli d'eau et agités pour 15 minutes. Les ADNs ont été ensuite visualisés par rayonnement ultraviolet (UV) à l'aide du « Bio-RAD gelDoc » (Bio-Rad, Hercules, CA, É-U) et analysés à l'aide du logiciel « Molecular Analyst » version 1.3 (Bio-Rad, Hercules, É-U).

2.8.2 ARN: Electrophorèse sur gels d'agarose-glyoxal

De 1 à 10 µl (environ 20 µg) de chacun des échantillons d'ARN ont été placés dans un tube de 1,5 ml contenant 10 µl d'une solution de glyoxal. Cette solution était conservée à -20°C et était constituée de 6 ml de diméthyl sulfoxyde (Sigma, St-Louis, MO, É-U), 2 ml de glyoxal (Sigma, St-Louis, MO, É-U), 0,6 ml de glycérol 80% (v/v) ainsi que de 1,2 ml de tampon BPTE 10X (1 mM PIPES (Sigma, St-Louis, MO, É-U), 3 mM Bis-Tris (Sigma, St-Louis, MO, É-U), 10 mM de EDTA•2Na, pH final de 6,5 dans de l'eau DEPC). Le tout a été incubé à une température de 55°C pendant une heure puis mis sur glace pendant 10 minutes. Par la suite, les échantillons ont été centrifugés à 16 000 x g pendant 5 secondes et 2 µl de tampon de chargement ont été ajoutés. Ce tampon de chargement était constitué de 500 µl de glycérol, 400 µl d'eau traitée au DEPC, 100 µl de tampon BPTE 1X et de bleu de bromophénol 0,25% (p/v). Ces échantillons ont été chargés sur gels d'agarose 1,4% (p/v) dans le tampon BPTE 1X. Un marqueur de poids moléculaire a été utilisé afin d'estimer la longueur des bandes obtenues (RNA Markers, Promega, Madison, WI, É-U). Les ARNs ont migré dans un champ électrique de 45 V pendant environ 4 heures. Afin de visualiser les ARN, les gels ont été immergés dans une solution de bromure d'éthidium 10 µg/ml et de 100 mM de d'acétate d'ammonium sous agitation pendant 30 minutes puis décolorés dans de l'eau filtrée (MilliQ) durant 30 minutes. Les ARNs ont été observés à l'aide du Bio-RAD gelDoc tel que décrit auparavant.

2.9 Transfert de l'ADN du gel sur une membrane de nylon

Chacun des gels d'agarose contenant de l'ADN génomique digéré (*EcoR1*) des souches de *Desulfitobacterium* a été traité 2 fois dans 250 ml de HCl 250 mM pendant 15 minutes sous agitation, puis lavé 2 fois à l'eau filtrée (MilliQ). Celui-ci a ensuite été traité 2 fois avec une solution de 250 ml de 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl sous agitation pendant 30 minutes, puis avec 250 ml de 1 M acétate d'ammonium (A & C Produits Chimiques Américains, Montréal, Qc, Canada), 0,02 M NaOH sous agitation pendant 30 minutes. Dans un récipient rempli d'acétate d'ammonium 1 M, 0,02 M NaOH, un support a été placé et 3 couches de papier « Whatman » (Whatman International, Maidstone, Angleterre) préalablement trempées dans cette solution ont été déposées sur celui-ci. Le gel d'agarose a ensuite été déposé sur les couches de papier Whatman. Sur le gel, une membrane de nylon (Roche Diagnostics GmbH, Indianapolis, IN, É-U) ainsi qu'une couche de papier Whatman préalablement trempées dans cette même solution ont respectivement été déposées sur le gel en évitant toute formation de bulle d'air. Sur la couche de papier Whatman, 12 couches de papier buvard (Blotting Pad, VWR Scientific Products, West Chester, PA, É-U) ont été placées, puis un poids a été ajouté, favorisant ainsi, par capillarité, le transfert de l'ADN présent dans le gel d'agarose à la membrane de nylon. Le transfert a été effectué durant une période de 16 heures à la température de la pièce. La membrane a été ensuite retirée en prenant soin de marquer sur celle-ci, à l'aide d'un stylo à encre, les bandes correspondant au marqueur de poids moléculaire qui avaient préalablement été poinçonnées sur le gel. Les acides nucléiques présents sur la membrane ont ensuite été fixés aux UV à l'aide d'un transilluminateur (GS Gene Linker UV Chamber, Bio-Rad, Hercules, CA, É-U) avec le programme C3 à 125 milli-joules.

2.10 Transfert de l'ARN du gel sur une membrane de nylon

Deux électrophorèses contenant les mêmes échantillons d'ARN ont été effectuées simultanément. Les ARNs d'un seul des gels ont été colorés au bromure d'éthidium afin d'y être visualisés; les ARNs du second gel ont été transférés sur membrane de nylon. Un

montage identique à la section 2.9 a été effectué. Le tampon utilisé pour le transfert était du 5X SSPE. Cette solution de 5X SSPE provenait d'une solution mère de 20X SSPE qui était constituée de NaCl 3 M, Na₂HPO₄•7H₂O 200 mM (Fisher Biotech, Fair Lawn, NJ, É-U) et de 30 mM EDTA•2Na. Cette solution a été ajustée à pH 7,4 avec une solution de NaOH 10 N, autoclavée pendant 30 minutes puis conservée à la température de la pièce. Les transferts ont été effectués sur une période de 16 heures à la température de la pièce et les ARNs ont été fixés aux UV à l'aide d'un transilluminateur avec le programme CL à 125 milli-joules.

2.11 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Les différentes amorces utilisées sont listées au tableau 1 et ont été synthétisées à l'aide de l'appareil « Gene Assembler » (Amersham Pharmacia Biotech) par le service de synthèse d'oligonucléotides de l'INRS-Institut Armand-Frappier. Les figures 9 à 14 représentent les différents gènes étudiés, les amorces utilisées ainsi que la longueur des fragments générés par celles-ci. Les réactions de PCR contenaient environ 10 ng d'ADN génomique, des déoxynucléosides triphosphates (200 µM chacun) (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, É-U), un tampon d'ADN *Taq* polymérase (10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂), 10 pmol de chacune des paires d'amorces appropriées, ainsi que 2,5 U d'enzyme ADN *Taq* polymérase (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, É-U) pour un volume total de 50 µl. Ce volume a été complété avec de l'eau filtrée MilliQ. Un volume de 30 µl d'huile minérale stérile (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, É-U) a été ajouté au tube afin d'éviter l'évaporation des réactifs au cours de la réaction de PCR. Le tube a été ensuite transféré de la glace à un appareil « DNA Thermal Cycler 480 » (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn, É-U) lorsque la température de celui-ci avait atteint 94°C. L'échantillon a été soumis à cette température de dénaturation durant 5 minutes suivi d'une autre période de 5 minutes à 55°C, correspondant à l'étape d'hybridation. La réaction de PCR a ensuite subi 30 cycles d'amplification constitués de 2 minutes à 72°C (étape d'élongation), 40 secondes à 94°C

et de 1 minute à 55°C. Après ces cycles, l'échantillon a été soumis à une température de 72°C pour une période de 10 minutes.

2.12 Réaction de transcription inverse et PCR (RT-PCR)

Les amorces qui ont été utilisées pour faire les réactions de RT-PCR sont listées au tableau 1 et des schémas des différents fragments amplifiés sont représentés aux figures 9 à 14. Avant la réaction de RT-PCR, chacun des échantillons d'ARN a subi un deuxième traitement à la DNase afin d'éliminer le plus que possible le risque de contamination par de l'ADN. Pour ce faire, 10 µg d'ARN (environ 2 µl) ont été placés dans un tube de 0,5 ml auquel a été ajouté 1 µl d'un tampon de DNase (40 mM de Tris-HCl pH 7,5 et de 6 mM de MgCl₂). Un volume de 7 µl d'eau traitée au DEPC ainsi que 0,5 µl de DNaseI (10 U/µl) ont été ajoutés pour un volume final de 10 µl et chacun des tubes a été incubé à 37°C pendant 30 minutes. Afin d'inactiver la DNaseI, les tubes ont été incubés à 75°C pendant 5 minutes dans le Thermal Cycler. À ce point, les contrôles négatifs ont subi une RNase. Un volume de 1 µl de RNase A (10 µg/ml) a été ajouté aux contrôles négatifs et ceux-ci ont été incubés à la température de la pièce pendant 15 minutes. Toutes ces prochaines étapes ont été effectuées dans le Thermal Cycler. Par la suite, 1 µl d'amorce spécifique (amorce reverse, voir tableau 1), 31 µl d'eau traitée au DEPC, 5 µl de tampon Stratascript 10X (500 mM Tris-HCl pH 8,0, 750 mM KCl et 30 mM MgCl₂) (Stratagene, É-U), 1 µl de dNTP ainsi que 1 µl de transcriptase inverse (StrataScript™RT, Stratagene, É-U) (50 U/ml) ont été ajoutés aux tubes. Chaque mélange a été recouvert de 30 µl d'huile minérale stérile et les tubes ont été incubés à 65°C pendant 5 minutes afin de favoriser l'appariement des amorces (tel que suggéré par le fabricant). Ensuite, les tubes ont été incubés à 42°C pendant une heure puis la transcriptase inverse a ensuite été inactivée à 94°C pendant 5 minutes. Après la réaction de transcription inverse, tous les tubes ont été mis sur glace et 5 µl de ce mélange a été utilisé pour faire un PCR comme décrit dans la section 2.11 avec les amorces appropriées (35 cycles ont été réalisés pour ces PCR au lieu de 30 décrit à la section 2.11)

2.13 Préparation des sondes

Les sondes utilisées pour les expériences d'hybridation ADN/ADN et ADN/ARN ont été conçues à partir de réactions de PCR correspondant aux différents gènes. Pour chaque sonde, 3 réactions de PCR dans un volume de 50 µl ont été effectuées avec les amorces et les ADNs appropriés (voir figures 9 à 14 pour les amorces utilisées pour produire chacune des sondes). Ces 3 réactions (150 µl) ont été soumises à une électrophorèse dans un seul puit d'un gel d'agarose et la bande résultante a été visualisée par coloration au bromure d'éthidium à l'aide d'une lampe aux UV (section 2.8.1). Cette bande a été excisée du gel et purifiée à partir du gel à l'aide de la trousse «QIAEX II» (QIAGEN Inc., Mississauga, Ont., Canada) selon les directives du manufacturier. Pour ce faire, 3 volumes de tampon QX1 ont été ajoutés pour chaque volume de gel excisé. Le contenu des tubes a été mélangé fortement à l'aide d'un vortex puis 10 µl de QIAEX II ont été ajoutés. Les tubes ont été incubés à 50°C pendant 10 minutes avec agitation de ceux-ci à toutes les 2 minutes. Les tubes ont par la suite été centrifugés à 16 000 x g pendant 30 secondes. Les culots ont été lavés avec le tampon QX1 puis ont par la suite été lavés 2 fois avec 500 µl de tampon PE, puis séchés à l'air ambiant pendant 15 minutes. Le culot a ensuite été dispersé dans 20 µl de tampon Tris-HCl pH 8,5 puis le tube a été agité fortement à l'aide d'un vortex et incubé à 50°C pendant 5 minutes. Le tube a été centrifugé à 16 000 x g pendant 30 secondes et le surnageant contenant l'ADN purifié a été récolté et transféré dans un nouveau tube.

2.14 Marquage des sondes à la digoxigenin

Les sondes ont été produites par PCR comme décrit à la section 2.11 en utilisant comme matrice 1 µl de produit de PCR purifié (section 2.13) ainsi que les mêmes amorces qui avaient été utilisées pour effectuer chacune de ces réactions de PCR. Toutefois, les nouvelles réactions de PCR ont été effectuées en utilisant 1 µl de dNTPs marqués au DIG-11-dUTP provenant de la trousse «DIG DNA Labeling Kit»

(Boehringer Mannheim, Mannheim, Allemagne). Le produit de PCR a ensuite été visualisé par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (p/v) (section 2.8.1) et le marquage des sondes a été vérifié par la technique du «dot blot». Pour cette dernière méthode, une série de 10 dilutions du produit de PCR (1/20, 1/200, 1/2 000, 1/20 000, 1/200 000 et 1/2 000 000) dans du tampon TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0 et 1 mM EDTA•2Na) a été effectuée et 1 µl de chacune de ces dilutions a été déposé sur une membrane de nylon. La même procédure a été effectuée pour l'ADN contrôle marqué à la DIG provenant de la même trousse. L'ADN présent sur la membrane a été fixé aux U.V à l'aide d'un transilluminateur en utilisant le programme CL à 125 mj. La membrane a ensuite été hybridée et révélée comme décrit aux sections 2.15 et 2.16.

2.15 Hybridation de la membrane avec une sonde marquée à la DIG

Les étapes suivantes ont été réalisées dans un four à hybridation (Turbo-Speed™Hybridization Incubator, Bio/Can Scientific, Mississauga, Ont., Canada) sous rotation continue.

Le four à hybridation a été préchauffé pendant 15 minutes à 50°C avec des tubes contenant 10 ml de solution de pré-hybridation. Cette solution était constituée de 5X SSPE, d'une solution de blocage 1% (p/v) (Blocking Reagent, Roche, Mannheim, Allemagne), de N-Lauryl sarcosine 1% (p/v) (A & C Produits Chimiques Américains, Montréal, Qc, Canada) et 0,02% (p/v) de SDS. La solution de blocage provenait d'une solution mère de 10% dissous dans le tampon 1. Le tampon 1 était constitué de 100 mM acide maléique (A & C Produits Chimiques Américains, Montréal, Qc, Canada) et de 150 mM NaCl et dont le pH avait été ajusté à 7,5 avec du NaOH 10 N. Ce tampon a été autoclavé pendant 30 minutes puis conservé à 4°C. Les solutions mères de blocage et de N-Lauryl sarcosine avaient été autoclavées pendant 30 minutes puis conservées à 4°C. Les membranes ont par la suite été trempées dans du 5X SSPE puis placées dans les tubes

à hybridation (contenant la solution de pré-hybridation) pour une période de 3 heures sous rotation constante et à 50°C (conditions de stringence moyenne).

Un volume de 5 µl de sondes marquées (section 2.14) a été placé dans des tubes de 500 µl puis chauffé à 100°C pendant 10 minutes. Ensuite, les sondes ont été mises sur glace pendant 2 minutes puis centrifugées à 16 000 x g pendant 5 secondes. Les 5 µl de sondes ont ensuite été ajoutés à 6 ml de solution de pré-hybridation et le tout a été versé dans les tubes à hybridation (la solution de pré-hybridation qui était présente dans les tubes avait été enlevée). Les tubes ont de nouveau été placés dans le four à hybridation sous rotation à 50°C pour une période d'environ 16 heures. Après l'hybridation des membranes avec les sondes, celles-ci ont été récupérées puis congelées à -20°C afin d'être réutilisées. Les membranes ont été lavées une première fois pendant 30 minutes dans les tubes à hybridation avec du 5X SSPE sous rotation et à la température de la pièce. Par la suite, les membranes ont été lavées 2 fois pendant 15 minutes sous rotation avec une solution de 1X SSPE et 0,1% (p/v) SDS à 50°C.

Dans le cas de certaines hybridations ADN/ARN, des conditions de stringence élevées ont été utilisées. La température d'hybridation et de lavage était de 65°C et les lavages de la membrane ont été effectués avec du 0,2X SSPE et 0,1% (p/v) SDS.

2.16 Révélation de l'hybridation avec l'anticorps Anti-DIG

Les étapes suivantes ont été réalisées dans 20 ml de solution et à la température de la pièce. À l'aide d'une pince, les membranes ont été retirées des tubes et placées dans le même récipient. Les membranes ont tout d'abord été brièvement lavées dans le tampon 1 auquel a été ajouté 0,3% (v/v) de Tween 20 (Produits Chimiques Américains, Montréal, Qc, Canada). Ensuite, les membranes ont été incubées sous agitation pendant 30 minutes dans le tampon 2 qui était constitué de 10% (v/v) de la solution mère de blocage dans le

tampon 1. Les membranes ont par la suite été incubées pendant 30 minutes sous agitation dans une solution d'anticorps anti-DIG qui était constituée d'une dilution de 10 000 de l'anticorps (Anti-Digoxigenin-AP Fab fragment, Boehringer Mannheim, Mannheim, Allemagne) (0,75 U/ μ l) dans le tampon 2. Cette solution a été ensuite récupérée et conservée à 4°C pour des hybridations ultérieures.

Les membranes ont été ensuite lavées 2 fois pendant 5 minutes sous agitation dans le tampon 1 additionné de 0,3% (v/v) de Tween 20. Les membranes ont ensuite été incubées 2 fois pendant 5 minutes sous agitation dans le tampon 3 qui était constitué de 100 mM de NaCl, 50 mM de MgCl₂•6H₂O et de Tris-HCl pH 9,5. Cette solution avait été autoclavée pendant 30 minutes puis conservée à la température de la pièce. Les membranes ont ensuite été incubées pendant 5 minutes sans agitation dans une solution de CSDP qui était constituée de CSPD (Chemiluminescence Substrate, Roche, Mannheim, Allemagne) dilué 100 fois dans le tampon 3. Après incubation, cette solution a été récupérée et conservée à 4°C pour des hybridations ultérieures.

À l'aide d'une pince, les membranes ont été égouttées et éponnées sur une feuille de papier Whatman. Elles ont ensuite été déposées individuellement sur une grande feuille de papier Saran qui a par la suite été rabattue afin de recouvrir les membranes et en prenant soin de ne pas laisser de bulles d'air. Le papier Saran a ensuite été scellé afin que les membranes ne puissent pas sécher et le tout a été déposé dans une étuve à 37°C pendant 30 minutes. Par la suite, les membranes ont de nouveau été transférées sur une feuille de papier Saran comme décrit précédemment. Les membranes ont alors été déposées dans une cassette à autoradiographie (Fisher Biotech, Pittsburg, PA, É-U), puis un film à autoradiographie (Kodak Scientific Imaging film, Rochester, NY, É-U) y a été déposé à la chambre noire. Les membranes ont ainsi été exposées au film pour une période variant de 30 minutes à 2 heures. Après l'exposition, toujours dans la chambre noire, le film a été retiré de la cassette puis placé dans un développeur (AFP Imaging Type mini-med190, Elmsford, NY, É-U).

2.17 Régénération des membranes

Après la révélation, les membranes de nylon contenant les ADNs ont été régénérées afin de pouvoir être ré-hybridées avec des sondes différentes. Tout d'abord, les membranes ont été lavées pendant quelques secondes avec de l'eau filtrée (MilliQ). Elles ont ensuite été lavées 2 fois pendant 15 minutes sous agitation avec une solution de NaOH 0,2 M et de SDS 1% (p/v). Elles ont par la suite été lavées pendant quelques secondes avec du SSPE 2X puis la présence de bruit de fond a été vérifiée par autoradiographie afin d'éviter que les sondes soient toujours présentes sur les membranes. Les membranes ont par la suite été séchées à l'air ambiant puis conservées pour des hybridations ultérieures.

2.18 Clonage du fragment *frdA1-frdB1*

Le fragment d'ADN *frdA1-frdB1* a été cloné dans le vecteur pGem[®]-T Easy puis transformé dans les bactéries compétentes *Escherichia coli* DH5 α .

2.18.1 Précipitation du produit de PCR *frdA1-frdB1*

Afin d'éliminer certaines impuretés présentes dans l'amplicon comme les amorces, une précipitation de celui-ci a été effectuée avant la ligation. Pour ce faire, 3 réactions de PCR ont été effectuées comme décrites à la section 2.11 et les 150 μ l résultants ont été combinés dans le même tube. Ce volume a été complété à 200 μ l avec de l'eau distillée stérile et 0,25 volume d'acétate d'ammonium 10 M ainsi que 2,5 volumes d'alcools 100% (v/v) ont été ajoutés. Le contenu de ce tube a été mélangé par inversion et l'ADN présent a été précipité à -20°C pendant une heure. Le tube a ensuite été centrifugé à 16 000 x g pendant 15 minutes. Le culot obtenu a été séché et dissous dans 20 μ l d'eau distillée filtrée (MilliQ).

2.18.2 Ligation du fragment *frdA1-frdB1* dans le vecteur pGEM[®]-T-easy

Le fragment d'ADN *frdA1-frdB1* a ensuite été ligué dans le vecteur pGEM[®]-T Easy (figure 8) à l'aide de la trousse « pGEM[®]-T Easy Vector System » (Promega, Madison, WI, É-U). La ligation a pu peut être réalisée directement à partir du produit de PCR précipité puisque ce vecteur linéarisé présente, à ces extrémités 3', une base thymine libre, ce qui permet le clonage puisque le produit d'amplification contient une adénosine supplémentaire à chacune de ses extrémités 5' qui ont été ajoutées par l'ADN *Taq* polymérase. La ligation a été effectuée en ajoutant, dans un tube de 1,5 ml, 10 µl d'ADN précipité (tel que décrit à la section 2.18.1), 1 µl du vecteur pGEM[®]-T Easy, 1,5 µl de tampon 2X T₄ DNA ligase (60 mM Tris-HCl pH 7,8, 20 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 2 mM ATP, 10% PEG), 1 µl de l'enzyme T₄ DNA ligase (3 U/µl) et 1,5 µl d'eau stérile. Le produit de ligation a été mélangé puis incubé à 4°C pendant 24 heures.

2.18.3 Préparation des bactéries compétentes *Escherichia coli* DH5α

La souche *Escherichia coli* DH5α (congelée à -80°C dans 15% (v/v) glycérol) a étéensemencée par étalement sur un milieu solide SOB. Cette souche est utilisée pour sa caractéristique de former des colonies blanches ou bleues en utilisant l'activité de β-galactosidase et dont le génotype est : F⁻, ø80*dlacZ*ΔM15, Δ(*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk⁻, mk⁺), *phoA*, *supE44*, λ⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*. Le milieu SOB liquide était constitué de 2% (p/v) de bacto tryptone (Difco laboratories, Détroit, MI, É-U), 0,5% (p/v) d'extrait de levure, 17 mM de NaCl (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, É-U) et de 2,5 mM de KCl (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, É-U). Le pH de ce milieu a été ajusté à 7,0 avec du NaOH 10 N. Le milieu SOB solide était constitué de milieu liquide SOB supplémenté de 1,5% (p/v) de bacto-agar (Difco laboratories, Détroit, MI, É-U). Ce milieu avait été stérilisé à l'autoclave pendant 30 minutes et ajusté à 10 mM de MgCl₂•6H₂O lorsque la température de celui-ci avait atteint environ 65°C. Après

ensemencement de la souche *Escherichia coli* DH5 α sur le milieu solide SOB, celui-ci a été incubé à 37°C pendant une période de 16 heures. Une colonie isolée a été repiquée à l'aide d'un cure-dent puis déposée dans une éprouvette contenant 4 ml de milieu liquide SOB. Cette culture a été placée à 37°C sous agitation continue pendant 24 heures. Par la suite, 1 ml de cette culture a été transféré dans un flasque de 500 ml contenant déjà 100 ml de milieu liquide SOB. Ce flasque a été incubé à 37°C sous agitation jusqu'à ce que la D.O à 600 nm de la culture atteigne de 0,25 à 0,5.

Les manipulations suivantes ont été effectuées à la chambre froide (4°C) et tout le matériel ainsi que les solutions nécessaires à cette expérience avaient été placés à 4°C. La culture bactérienne a été transférée dans 4 tubes Oakridge (environ 25 ml par tube) puis ces tubes ont été incubés sur glace pendant 15 minutes. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 800 g pendant 15 minutes, à 4°C. Le culot ainsi obtenu a été dispersé dans 0,33 volume de tampon 1. Le tampon 1 contenait 100 mM de KCl, 30 mM de KOAc (A & C Produits Chimiques Américains, Montréal, Qc, Canada), 60 mM de CaCl₂•2H₂O et 15% (v/v) de glycérol (Fisher, Fair Lawn, NJ, É-U). Le pH de cette solution avait été ajusté à 5,8 avec une solution d'acide acétique glacial 0,2 M et le tout avait été filtré sur un filtre de porosité 0,2 μ m. La suspension bactérienne a été incubée sur glace pendant une heure. Celle-ci a ensuite été centrifugée à 1 100 x g, à 4°C pendant 15 minutes. Le culot a été dispersé dans 0,25 volume de tampon 2. Le tampon 2 était constitué de 10 mM de MOPS (BDH Limited, Poole, Angleterre), 10 mM de KCl, 75 mM de CaCl₂•2H₂O et de 15% (v/v) de glycérol. Ce tampon a également été filtré sur un filtre de porosité 0,2 μ m. Ce mélange a été incubé sur glace pendant 15 minutes puis des volumes de 100 μ l ont été aliquotés dans des tubes de 0,5 ml. Ceux-ci ont été congelés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

2.18.4 Transformation du plasmide pGEM[®]-T Easy/*frdA1-frdB1* dans les bactéries compétentes *Escherichia coli* DH5 α

Pour ce faire, un tube de 100 μ l de cellules compétentes *Escherichia coli* DH5 α (section 2.18.3) a été décongelé sur glace. Un volume de 5 μ l du produit de ligation

(section 2.18.2) a été ajouté à ces bactéries et ce mélange a été incubé sur glace pendant 30 minutes. Les bactéries ont ensuite été soumises à un choc thermique qui consistait à une incubation de 45 secondes dans un bain-marie à 42°C, puis de 2 minutes sur glace. Ce mélange a ensuite été transféré à un tube de 1,5 ml contenant 400 µl de milieu SOC. Le milieu SOC était constitué de milieu liquide SOB stérile supplémenté de 20 mM de glucose (ICN Biochemicals, Cleveland, Ohio, É-U). Les tubes ont ensuite été incubés sous agitation constante pendant une période d'une heure. Suite à cette incubation, des volumes de 50 µl ont été étalés sur des boîtes de Pétri contenant 25 ml de milieu solide SOB supplémenté de 100 mg/l d'ampicilline (ICN Biochemicals, Cleveland, Ohio, É-U), 120 mg/l d'IPTG (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, É-U) et de 40 mg/l de X-Gal (Roche Diagnostics, Laval, Canada). Ces boîtes ont ensuite été incubées pendant 16 heures à 37°C.

2.18.5 Criblage des colonies possédant le plasmide et l'insert

Les colonies bleues qui ont été obtenues sur milieu solide SOB supplémenté d'ampicilline, d'IPTG et de X-Gal sont des clones ayant incorporé le plasmide seul alors que les colonies blanches sont des clones ayant possiblement incorporé le plasmide contenant l'insert.

2.18.6 Purification de l'ADN plasmidique pGEM[®]-T Easy / *frdA1-frdB1*

Quelques colonies blanches ainsi qu'une colonie bleue (contrôle négatif) ayant résisté à l'ampicilline ont été sélectionnées et repiquées à l'aide d'un cure-dent dans 4 ml de milieu liquide SOB contenant 100 mg/l d'ampicilline. Ces tubes ont été incubés pendant 16 heures sous agitation continue à 37°C. Par la suite, 1,5 ml de chacune de ces cultures a été prélevé, transféré dans un tube de 1,5 ml et centrifugé à 16 000 x g pendant 1 minute. Le culot a été dispersé dans 500 µl de tampon TEN pour mini préparation

d'ADN plasmidique. Ce tampon était constitué de 1 mM de EDTA•2Na, 100 mM de NaCl et de 10 mM de Tris-HCl pH 8,0. Les tubes ont de nouveau été centrifugés à 16 000 x g pendant 1 minute et les culots obtenus ont été dispersés dans 200 µl de tampon TEN. Un volume d'une solution de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25 :24 :1) a été ajouté à chacun des tubes et ceux-ci ont été mélangés fortement à l'aide d'un vortex pendant 30 secondes. Les tubes ont ensuite été centrifugés pendant 5 minutes à 16 000 x g et la phase aqueuse a été prélevée puis transférée à un tube de 1,5 ml contenant déjà 50 µl d'une solution d'acétate d'ammonium 10 M. À ce mélange, 2 volumes d'alcool 100% ont été ajoutés et le contenu du tube a été mélangé par inversion. L'ADN plasmidique a été précipité pendant 30 minutes à -20°C. Les tubes ont alors été centrifugés pendant 10 minutes à 16 000 x g et les culots obtenus ont été lavés avec 500 µl d'éthanol 70% (v/v). Les tubes ont ensuite été centrifugés pendant 2 minutes à 16 000 x g. Les culots ont été dissous dans 50 µl de RNase A 10 µg/ml. La présence de l'insert dans le plasmide a pu être vérifiée par une digestion avec l'enzyme de restriction *EcoR1* suivi d'une électrophorèse sur gel d'agarose 1% (p/v), tel que décrit aux sections 2.7 et 2.8.1.

2.19 Séquençage du fragment *frdA1-frdB1*

Afin de vérifier si la séquence des gènes *frdA1* et *frdB1* retrouvée chez *D. frappieri* PCP-1 est identique à celle retrouvée dans le génome de *D. hafniense* DCB-2, le clone obtenu a été envoyé sous forme congelé dans 15% (v/v) de glycérol afin d'être séquencé par la compagnie DNA LandMarks Inc. (St-Jean-sur-le-Richelieu, Qc, Canada). Plusieurs amorces ont été utilisées pour séquencer ce fragment d'ADN afin que les 2 brins d'ADN soient séquencés. Les amorces T7 et SP6, situées en amont et en aval du fragment d'ADN cloné dans le vecteur pGEM[®]-T Easy, ont été utilisées ainsi que les amorces DII.int-1, DII.int-2, DII.int-3 et DII.int-4 (tableau 1, figure 9B).

2.20 Analyse de la séquence des gènes *frdA1* et *frdB1*

Par la suite, les séquences obtenues ont été corrigées à l'aide du logiciel Chromas version 1.45 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) puis analysées avec le logiciel BioEdit version 5.0.9.1 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>) ainsi qu'avec le logiciel Clone Manager 6 (http://www.scied.com/ses_cm5.htm). La comparaison des séquences déduites en acides aminés des gènes *frdA1* et *frdB1* avec celles obtenues dans les banques de données a été effectuée à l'aide du programme BLASTP, (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Les séquences ainsi obtenues ont été alignées avec celle obtenue du séquençage des gènes *frdA1* et *frdB1* par le programme CLUSTALW inclus dans le logiciel BioEdit. Le profil d'hydrophobicité de Kyte et Doolittle a également été étudié pour FrdB1 et ses homologues à l'aide du logiciel BioEdit. La présence d'un peptide signal de FrdA1 a été vérifiée à l'aide du logiciel de prédiction SignalP version 1.1 (Center for Biological Sequence Analysis, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/index.html>).

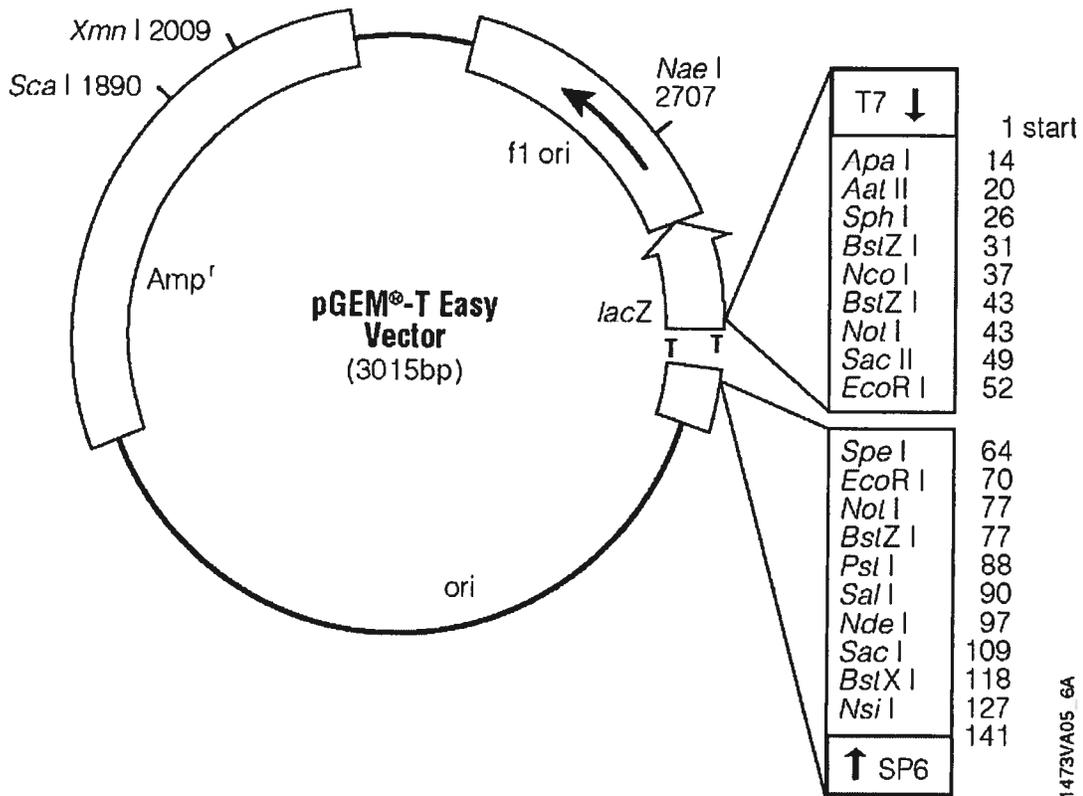


Figure 8. Schéma représentatif du vecteur circularisé pGEM®-T Easy (tel qu'illustré dans le catalogue de Promega, Madison, Wis, USA). Le vecteur pGEM®-T Easy possède une origine de réplication ainsi qu'un gène de résistance à l'ampicilline. Il se compose également d'un site de poly-insertion qui est situé de part et d'autre des promoteurs T7 et SP6 de l'ARN polymérase et qui est aussi situé à l'intérieur du gène *lacZ* codant pour une partie β -galactosidase, ce qui permet la sélection des clones recombinants par la caractéristique des colonies blanches et bleues sur milieu solide approprié contenant du X-Gal ainsi que de l'IPTG.

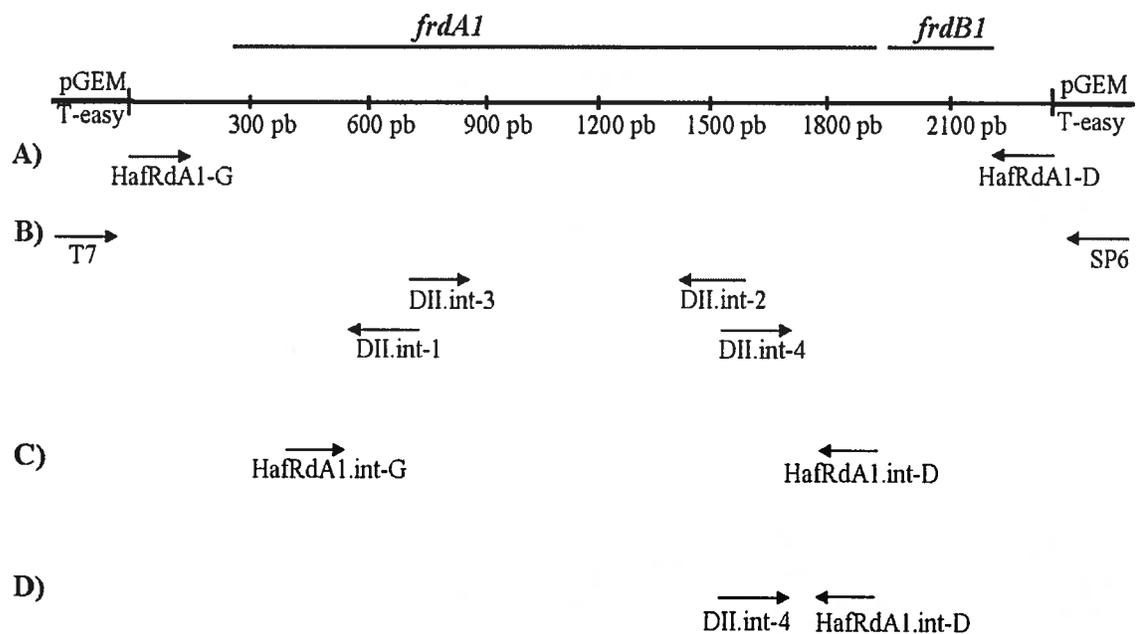


Figure 9. Schéma démontrant les amorces utilisées afin d'amplifier les gènes *frdA1* et *frdB1* chez la souche *D. frappieri* PCP-1. Amorces amplifiant un fragment de 2316 pb (A). Amorces ayant été utilisées pour le séquençage du fragment *frdA1-frdB1* (B). Amorces amplifiant le gène *frdA1* (sans la séquence codant pour le peptide signal) et dont le fragment généré est de 1574 pb pour le marquage de la sonde *frdA1-frdB1* (C). Amorces utilisées pour effectuer des RT-PCR sur le gène *frdA1*, produisant un fragment de 389 pb (D).

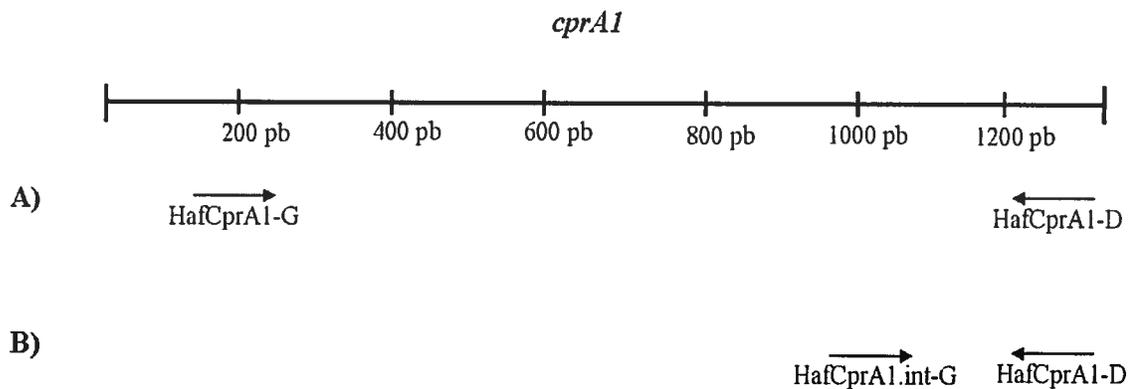


Figure 10. Schéma démontrant les amorces utilisées afin d'amplifier le gène *cprA1*. Amorces amplifiant un fragment de 1200 pb (sans la séquence codant pour le peptide signal) (A). Ces amorces ont également été utilisées pour le marquage de la sonde *cprA1*. Amorces utilisées pour effectuer des RT-PCR, produisant un fragment de 391 pb (B).

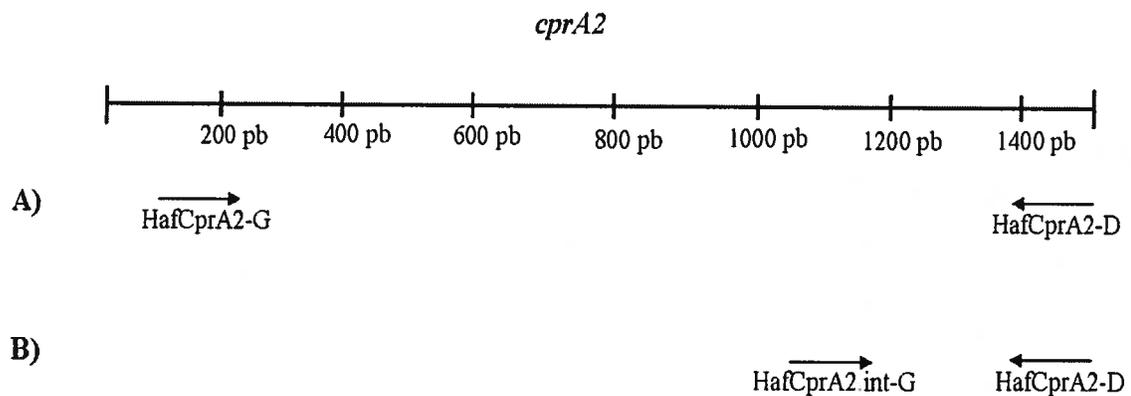


Figure 11. Schéma démontrant les amorces utilisées afin d'amplifier le gène *cprA2*. Amorces amplifiant un fragment de 1278 pb (sans la séquence codant pour le peptide signal) (A). Ces amorces ont également été utilisées pour le marquage de la sonde *cprA2*. Amorces utilisées pour effectuer des RT-PCR, produisant un fragment de 438 pb (B).

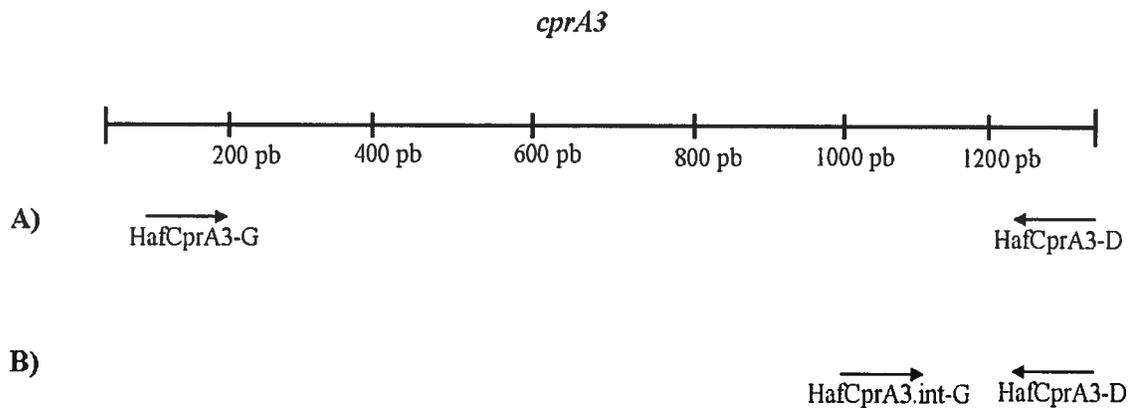


Figure 12. Schéma démontrant les amorces utilisées afin d'amplifier le gène *cprA3*. Amorces amplifiant un fragment de 1242 pb (sans la séquence codant pour le peptide signal) (A). Ces amorces ont également été utilisées pour le marquage de la sonde *cprA3*. Amorces utilisées pour effectuer des RT-PCR, produisant un fragment de 388 pb (B).

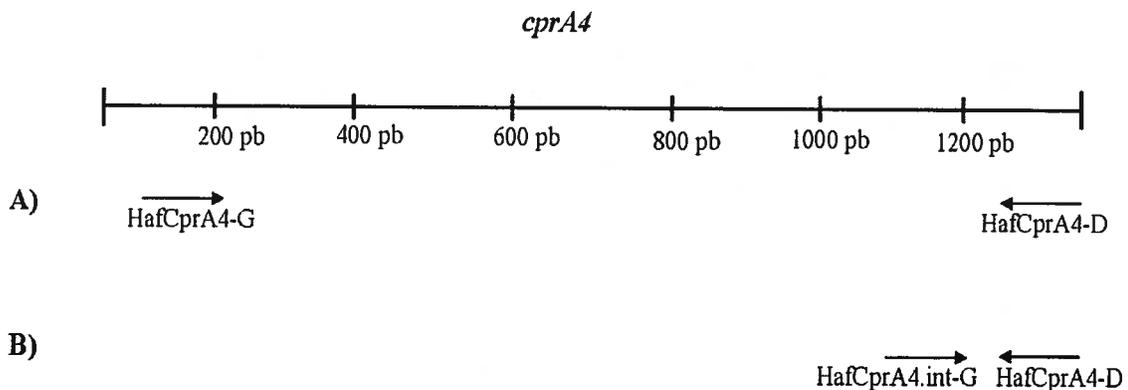


Figure 13. Schéma démontrant les amorces utilisées afin d'amplifier le gène *cprA4*. Amorces amplifiant un fragment de 1242 pb (sans la séquence codant pour le peptide signal) (A). Ces amorces ont également été utilisées pour le marquage de la sonde *cprA4*. Amorces utilisées pour effectuer des RT-PCR, produisant un fragment de 312 pb (B).

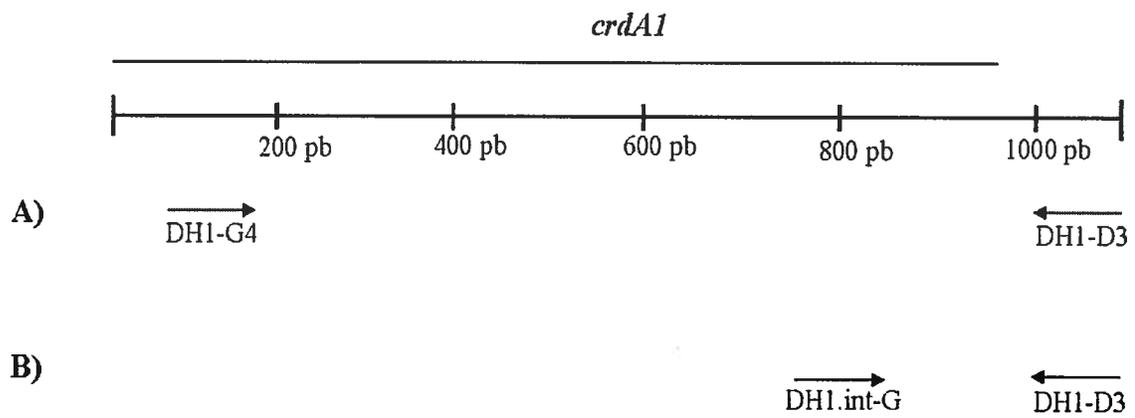


Figure 14. Schéma démontrant les amorces utilisées afin d'amplifier le gène *crdA1*. Amorces amplifiant un fragment de 1040 pb (sans la séquence codant pour le peptide signal) (A). Ces amorces ont également été utilisées pour le marquage de la sonde *crdA1*. Amorces utilisées pour effectuer des RT-PCR, produisant un fragment de 343 pb (B).

Amorces	Séquences (5' → 3')	Gène visé	Matrice	Longueur du fragment généré (pb)
HafRdA1-G	TGCGGCACTTTTCTTGATCGC	<i>rdA1- rdB1</i>	ADN	2316
HafRdA1-D	GTCTTAAGCAAATGACGCAGC			
HafRdA1.int-G	AAGGAAAACCTTTGCCCAATTG	<i>rdA1</i>	ADN	1574
HafRdA1.int-D	GATCTGCAGTTACTTTGTGGGCTCGGTGTC			
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	<i>rdA1- rdB1</i>	ADN	N/A
SP6	ATTTAGGTGACACTATAGAA		ADN	N/A
DII.int-1	TAAGACGCTGCCGTCATGATG		ADN	N/A
DII.int-2	GGCAGACGTCCGCACATTCA		ADN	N/A
DII.int-3	TTCTTCTCCCATCATGACGGC		ADN	N/A
DII.int-4	CTCTGCCTGAAAATGTGCCGAC		ADN	N/A
HafRdA1.int-D (réverse)	GATCTGCAGTTACTTTGTGGGCTCGGTGTC	<i>rdA1</i>	ARN	389
DII.int-4	CTCTGCCTGAAAATGTGCCGAC			
HafCprA1-G	GCTGAAAACCTTGAATTATG	<i>cprA1</i>	ADN	1200
HafCprA1-D	GATCTGCAGGGCCAYTCCAGCCACCAAYTT			
HafCprA1.int-G	YTTGGGATWCCGCCATAAAGT		ARN	391
HafCprA1-D (réverse)	GATCTGCAGGGCCAYTCCAGCCACCAAYTT			
HafCprA2-G	GTGATCGATCTGGGTTACC	<i>cprA2</i>	ADN	1278
HafCprA2-D	GATCTGCAGTTATTGTCCGGGCACTCTG			
HafCprA2.int-G	AATAAGGTGGCCGCTGTGACT		ARN	438
HafCprA2-D (réverse)	GATCTGCAGTTATTGTCCGGGCACTCTG			
HafCprA3-G	GAGGCGGTGGCAAGCACAGGTT	<i>cprA3</i>	ADN	1242
HafCprA3-D	GATCTGCAGTTATAAATGCTTGGGAAGGG			
HafCprA3.int-G	ACCCATTGACTTTGGATTGCA		ARN	388
HafCprA3-D (réverse)	GATCTGCAGTTATAAATGCTTGGGAAGGG			
HafCprA4-G	GCGGTAACAACACTATGAGTA	<i>cprA4</i>	ADN	1242
HafCprA4-D	GAAGTGCAGTCAATAATCGAATTTATACAATTCCGG			
HafCprA4.int-G	GCGATCACCCATGACAAAGAC		ARN	312
HafCprA4-D (réverse)	GAAGTGCAGTCAATAATCGAATTTATACAATTCCGG			
DHI-G4	GACTGGCGGTACCGATTTTGTCTGCA	<i>crdA1</i>	ADN	1040
DHI-D3	ATCTTCTAGATCACTGCGGAAA			
DHI.int-G	AAGACTGTGCGTGAAGTTCAG		ARN	343

Tableau 1. Liste des différentes amorces utilisées pour effectuer les réactions de PCR et de RT-PCR.

3. RÉSULTATS

3.1 Amplification du fragment *frdA1-frdB1* chez *Desulfotobacterium frappieri* PCP-1

La déshalogénase II avait déjà été purifiée dans le laboratoire du Dr Réjean Beaudet, et suite à une analyse protéomique faite dans ce même laboratoire, une analyse en spectrométrie de masse a été réalisée dans le laboratoire du Dr François Lépine. Cette analyse a permis de révéler la présence de plusieurs peptides qui ont été analysés dans le génome (partiellement séquencé) de *D. hafniense* DCB-2 (Joint Genome Institute (JGI), <http://www.jgi.doe.gov>) (projet réalisé par Marie Duguay, étudiante à la maîtrise chez le Dr Réjean Beaudet). Ainsi, un cadre de lecture correspondant au gène *rdA1* (tel que désigné par le laboratoire de Richard Villemur, Villemur *et al.*, 2002) ainsi qu'un second, situés quelques nucléotides plus loin, nommé *rdB1*, ont pu être identifiés dans un des contigs représentant une partie du génome de la souche DCB-2. À partir de la séquence de ce contig, des amorces spécifiques ont pu être conçues (voir tableau 1, figure 9).

Après avoir cultivé la souche *D. frappieri* PCP-1, l'ADN génomique de celle-ci a été extraite puis le fragment *rdA1-rdB1* a été amplifié par PCR avec les amorces HafRdA1-G et HafRdA1-D. Un fragment de 2316 pb a été amplifié (figure 15) incluant la région en amont du gène *rdA1* qui pourrait inclure le promoteur ainsi que la région terminale de la transcription du gène *rdB1*. Pour distinguer les gènes *rdA1* et *rdB1* de *D. hafniense* DCB-2 et *D. frappieri* PCP-1, les gènes *rdA1* et *rdB1* chez la souche DCB-2 ont été désignés *hrdA1* et *hdb1* hafniense reductive déshalogénase (*hrd*), et *frdA1* et *frdB1* chez la souche PCP-1 pour frappieri reductive déshalogénase (*frd*).

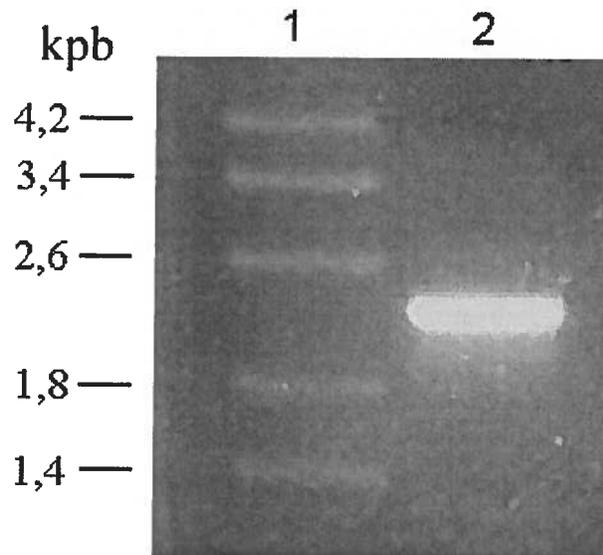


Figure 15. Amplification par PCR du fragment *frdA1-frdB1* chez *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. Le fragment *frdA1-frdB1* amplifié à partir de la souche PCP-1 avec les amorces HafRdA1-G et HafRdA1-D a été fractionné par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % (2). Marqueur de poids moléculaire *Lambda StyI* (1).

3.2 Clonage du fragment *frdA1-frdB1*

Le fragment de 2316 pb obtenu par PCR a été ligué dans le plasmide pGEM[®]-T Easy puis transformé dans les cellules compétentes *Escherichia coli* DH5 α . L'ADN plasmidique de 9 colonies blanches a été purifié et vérifié par électrophorèse sur gel d'agarose (figure 16). Sur ces 9 colonies, seul le clone 1 semblait contenir le plasmide et l'insert voulu (puit 2). Ce clone a été digéré avec l'enzyme de restriction *EcoR*I, produisant ainsi un insert d'environ 2300 pb, ce qui correspondait au fragment d'ADN attendu (figure 17, puit 2).

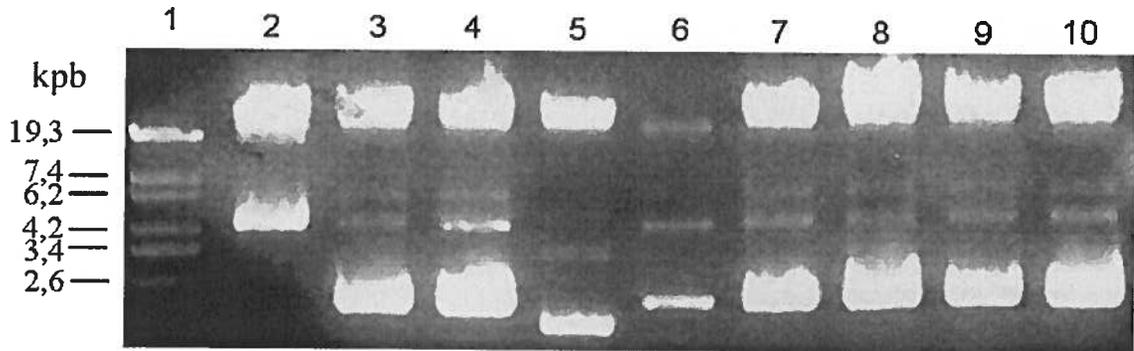


Figure 16. Profil d'électrophorèse de l'ADN plasmidique purifié de 9 colonies blanches. L'ADN plasmidique non-digéré des clones 1 à 9 ont été fractionnés par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % (2 à 10). Marqueur de poids moléculaire *Lambda StyI* (1). L'ADN de haut poids moléculaire correspond à l'ADN génomique de *E. coli* DH5 α .

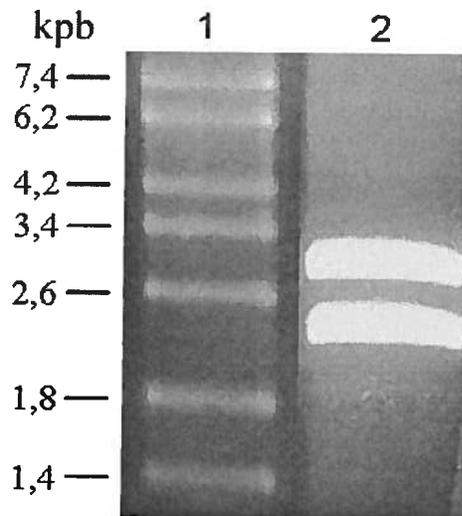


Figure 17. Profil d'électrophorèse de l'ADN plasmidique purifié du clone 1 suite à une digestion par l'enzyme de restriction *EcoR1*. L'ADN plasmidique du clone 1 digéré par *EcoR1* a été fractionné par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (2). Marqueur de poids moléculaire *Lambda StyI* (1).

3.3 Séquençage du fragment *frdA1-frdB1*

L'ADN plasmidique du clone 1 a été séquençé avec les amorces T7 et SP6 ciblant des séquences adjacentes au site de clonage du vecteur en plus des amorces internes aux gènes (voir figure 9). La séquence nucléotidique de 2316 pb du fragment d'ADN *frdA1-frdB1* obtenue du séquençage est présentée à la figure 18. Un site de fixation des ribosomes situé en amont du gène *frdA1* ainsi qu'un site de terminaison de la transcription possible situé en aval du gène *frdB1* ont été retrouvés (figure 18). Les séquences déduites en acides aminés de *frdA1* et *frdB1* sont présentées à la figure 19 (A et B respectivement). La seule différence observée entre la séquence de *frdA1* et *frdB1* et la séquence équivalente trouvée dans le contig 2977 du génome de *D. hafniense* DCB-2 est une thymine en position 1100 à la place d'une cytosine (figure 18). Ce changement produit une modification de l'acide aminé dans la protéine produite. Ainsi, chez la souche PCP-1, une leucine est observée en position 273 à la place d'une proline chez la souche DCB-2 (figure 19A).

Le gène *frdA1* est constitué de 1 647 nucléotides et code pour une protéine de 548 acides aminés. Une analyse de la séquence déduite en acides aminés de ce gène dans les banques de données (logiciel BLASTP, site internet NCBI) a permis de déterminer que la déshalogénase II (FrdA1) démontre 63% d'identité (72% de similarité) avec des tétrachloroéthylènes déshalogénases réductrices (PceA) chez les souches *D. frappieri* TCE1, *Desulfitobacterium* sp. Y51, *Desulfitobacterium* sp. PCE-S et *Dehalobacter restrictus*. Cette séquence possède le motif TAT (RRXFLK) (Berks, 1996), indiquant la présence d'un peptide signal caractéristique du système de sécrétion de type TAT (Twin Arginine Translocation) (figure 19A). On y retrouve également un motif EYHYNG, qui pourrait correspondre à un site de fixation d'un cofacteur cobalamine. De plus, FrdA1 contient les motifs CXXCXXCXXXCP (Bruschi et Guerlesquin, 1988) et GXXCXXCXXXCS (Suyama *et al.*, 2002), qui indiquent la fixation de centres fer-soufre. Incluant le peptide signal, la masse moléculaire et le point isoélectrique théoriques de la

déshalogénase II sont respectivement de 60,9 kDa et 5,63 alors que sans le peptide signal, ceux-ci sont plutôt de 58,3 kDa et 5,40 respectivement (tableau 2).

Le gène *frdB1* est situé 16 nucléotides en aval du gène *frdA1*. Ce gène est constitué de 306 nucléotides et code pour une protéine de 101 acides aminés (FrdB1, figure 19B). La masse moléculaire théorique de FrdB1 est de 11,6 kDa et son point isoélectrique est de 9,48. FrdB1 révèle 65% d'identité (77% de similarité) avec des protéines membranaires servant d'ancrage à des déshalogénases réductrices du PCE (PceB) chez les souches *D. frappieri* TCE1, *Desulfitobacterium* sp. Y51, *Desulfitobacterium* sp. PCE-S et *Dehalobacter restrictus*. Après avoir aligné les séquences déduites en acides aminés de toutes ces protéines d'ancrage membranaire à l'aide du logiciel BioEdit (y compris celle de la souche PCP-1), le profil d'hydrophobicité de Kyle et Doolittle en a été déduit et est présenté à la figure 20. Ce profil est pratiquement identique pour chacune des protéines et la présence de 3 domaines hydrophobes est observée dans tous les cas. Ces résultats suggèrent une structure tridimensionnelle très similaire entre ces protéines.

1	TGCGGCACCTT TTCTTGATCG CTTTGATCAT TGGGCAGAAC ATAGAGTCCA ACATCACTAT GGATTTAAGT TCCGAGAAAA	80
81	TCATCATGGA ATCTCCCGCC CCTCCAGAAC CTGMAACGCC GATAGATATG CATAACTTTA CCGTGGARTG AACCAATRCG	160
161	TGTATGCCTT CACAAAATTA GCGGAAGTGT ATCACTGGAT ATAGGGGCAA TAGCTCTGAA TAATTTACAA TAAAGCAAAA	240
241	CCGTAATATG TGCAGATAA AGGGAGGTTA GACTGCGTGA AGATGAATTT AGACAGGAGA TCTTTCTTA <u>AGCATCTCT</u>	320
	<i>rdA1</i> *****	
321	GGTGAGCGTC GCGGCTGTTG CCGCTGCTTC GGCTGCGGCG GCCAAGGAAA CCTTTGCCCC ATTGACAGCT GAGGCCGCGG	400
401	AGATAATCGC GCCGATCAGG GAGACCGCGG ARTTTCCTTA CCAAGTCGAT CCCAATACC AACGCCTGCC GCGGAAAAAG	480
481	CTTGCCTACC TAAGAATGTT TGATCCGGAA GAGAACAAG GCCCGATCAA GTTTCATTT GACGATGTT CCAAGATCAC	560
561	CGGTAAGAAG GATACGGCA AGGACCTGCC CCTGCTTAA GCGAATCTC TCGGCATTAA AGGGCCTCCG GCGACCTTA	640
641	GTGAACAGG AGCCATTTT TTCTCCATC ATGACGGCAG CGTCTTACC CTGCGGAAA AGGAATGGG GTGGCGCGCC	720
721	CTGGATATGG CCTGCTGGT AGCCTCCTGG TCGGTGGAAT ATCACTACAA CCGATTACC GCCCCCGCA GCGTCCGGG	800
801	CGGGGTGATT GCCCATTATC CGTTCATCC CATGACCAAT GAAACGGGAA CCGAACCGGT GTTCTGGCG GGAATGTATA	880
881	GCTGGGATAA TACCAAGCC CGGGAAAGC GGGAGCAAG ACGGCAATGG AAGTTCGAGT CCGTGGAGA GCGCAGCCGG	960
961	ATTGTGAAA AAGCCGCCG CTTTTGGGA GCGGATATGG CCGGCATTGC CCTTATGAC GATCGCTGA CTTTTTCAC	1040
1041	CTGGTGAGA CCAATCTGA AACCCTTAA ACTGCTAAT GGCAGAACGG AATATTTCT T GACTGATCCT TTCAACTGA	1120
1121	TGAAGGAGA GGTGGAAGTT TACGGATCGA CATCTGTGA AGCGATTGG GAAAAATAG CCGGCTTAC GCCCAATCC	1200
1201	GTCATTGCCA TGACCTTGA GATGGATTAC GAAGCCTACC GCACAGCGCC GTCCGTTCTG CAAGGCGCGG CACCGGGCAA	1280
1281	GTCCTACTCG AACATGGAG AAGTGGCCTA TAAGTTGCC TCTTTTTGA GAGAGATTGG CTACAATGCC GTTCTTCTG	1360
1361	GAAATGACAC CGGGATGAGC GTGCCATTG CCGTTCAGGC CCGTCTCGGC GAGGCCGGA GATCAGGCA GCTCATCACG	1440
1441	CAAAAGTACG GGCCAGAGT GCGGATCGCC AAAGTTTATA CCGATTGGA ACTTGTCCG GACAAGCCGA TCAACATCGG	1520
1521	CGCCCGGAG TTCTGCCGCC TCTGCCTGAA ATGTGCGGAC GTCTGCCCG CTCAGCGGAT CTCCATGAG AAAGACCCT	1600
1601	GGTTTTGCA GCCTGAAGAT TGCACCCCTT CCGAAAATCC CTATACGGA AAATGGCAAT TCGACTCCA GCGCTGCCTC	1680
1681	TCTTCTTCTG CTTATAACG CCGGACTGC GGGAGCTGA TCGCGTCTG CTCCGGAAC AAAATCGATG CCTGGCAGCA	1760
1761	TGATGTGGCC AGAATTGCCA CCCAATTCC CTTGGTTCAA GATGCGGCC GTAAGTTCGA TGAGTGGTT GTTTACAATG	1840
1841	GCCCGTTAA TCCTGAAGAA CCGATCGAAT CCGCTACAT TGCCAACATG GTCAAAGATT TCTGGAAAGA CACCGAGCC	1920
1921	ACAAAGTAAA GGAGGAAGC GGAATGGAA ATTGCTTTA TGTTCTTGG TATGCTGATG CTTCTGATC AATACGGCAT	2000
	<i>rdB1</i>	
2001	TTGGCATTAT TCGAAAAGCA AGGAAAAGA CACRAATCCG ATTCAGATT GCGGTTTTT AGCCAATTC TTATTGATAT	2080
2081	TTACTTTGGC CTGGGGTAT GCCAGCTGC TGAACATGA ATATCAGGCC GTGGCGATGG GGTGTTCTT TTTTGGCGGA	2160
2161	TTGACTTGA TTCCACCAT CATCACCTAC AGGCTATTGA ATCCCTGTT AAAAAAGACT AAAGATCGTT CTGAARACCT	2240
2241	CTCCAGTGA CCAGGACTTG GCTAACTGG AGAATAACA ATTTACTCAA TAGGTACAGT CACTTGTCCG CTTGGCTATA	2320
2321	AGTGGCTGAC GTTCTTGTCT GCGTCATTG CTTAAGAC 2358	

Figure 18. Séquence nucléotidique du fragment *frdA1-frdB1*. Cette séquence représente le fragment cloné de 2316 pb incluant les gènes *frdA1* et *frdB1* ainsi que les régions adjacentes. Les séquences soulignées correspondent respectivement aux gènes *frdA1* et *frdB1*. Le nucléotide encadré correspond à la seule différence trouvée entre cette séquence et celle trouvée dans le contig 2977 du génome de *D. hafniense* DCB-2. Un site de fixation du ribosome possible est marqué par des astérisques et les flèches en pointillées représentent une répétition inversée, site potentiel de terminaison de la transcription.

(A)

TAT **Peptide signal** |
MNLDRRSFLKASLVSVAAVAASAAAA↓KETFAPLTAEEAEI IAPIRETAEF PYQVDPKYQ
RLPAEKLAYLRMFDPEENKGPIKFHEDDVSKITGKKDTGKDLPLLNAESLGIKGRPATLS
ETGAIFFSHHDGSQLPLREKEMGWRALDMALVVASWSV**EYHYNG**FTAPGSGPGGVIAHYP
FNPMTNETGTEPVFLAGMYSWDNTKARERREQGRQWKFEVVEASRIVKKAARFLGADMA
GIAPYDDRWTFTWCRPNLKPFKLPNGRTEY**E**LDPFKLMKGEVEVYGSTVEADWEKYA
GFTPKSVIAMTFEMDY EAYRTAPSVLQGAAPGKSYSNMGEVAYKVASFLREIGYNAVPSG
NDTGMSVPIAVQAGLGEAGRSGLITQKYGPRVRIAKVYTDLELVPDKPINIGAREF**CRL**
CLKCADVCPAQAISHVKDPWVLQPEDCTPSENPYTEKWQFDSQRCLSFFAYNG**GGDCGSCI**
AVCSWNKIDAWQHDVARIATQIPLVQDAARKFDEWFGYNGPVNPEERIESGYIANMVKDF
WKDTEPTK

(B)

MEIVFMFFGMLMLLIQYGIWRYSKSKGKDTIPIQICGFLANFLLIFTLAWGYASLLE
HEYQAVAMGFVFFGGTLTIPTIITYRLLNPSLKKTKDRSETLST

Figure 19. Séquence déduite en acides aminés de *frdA1* et *frdB1*. Séquence protéique de *frdA1* (A). La séquence en caractère gras représente la séquence consensus TAT. Les acides aminés situés à l'extrémité N-terminale jusqu'à la flèche verticale constitueraient la limite du peptide signal et son site potentiel de clivage. La séquence encadrée pourrait correspondre à un site de fixation à un cofacteur cobalamine et les deux séquences soulignées représentent des séquences consensus pour des sites de liaison d'un centre fer-soufre. L'acide aminé encadré correspond à la seule différence observée entre HrdA1 et FrdA1. Séquence protéique de *frdB1* (B).

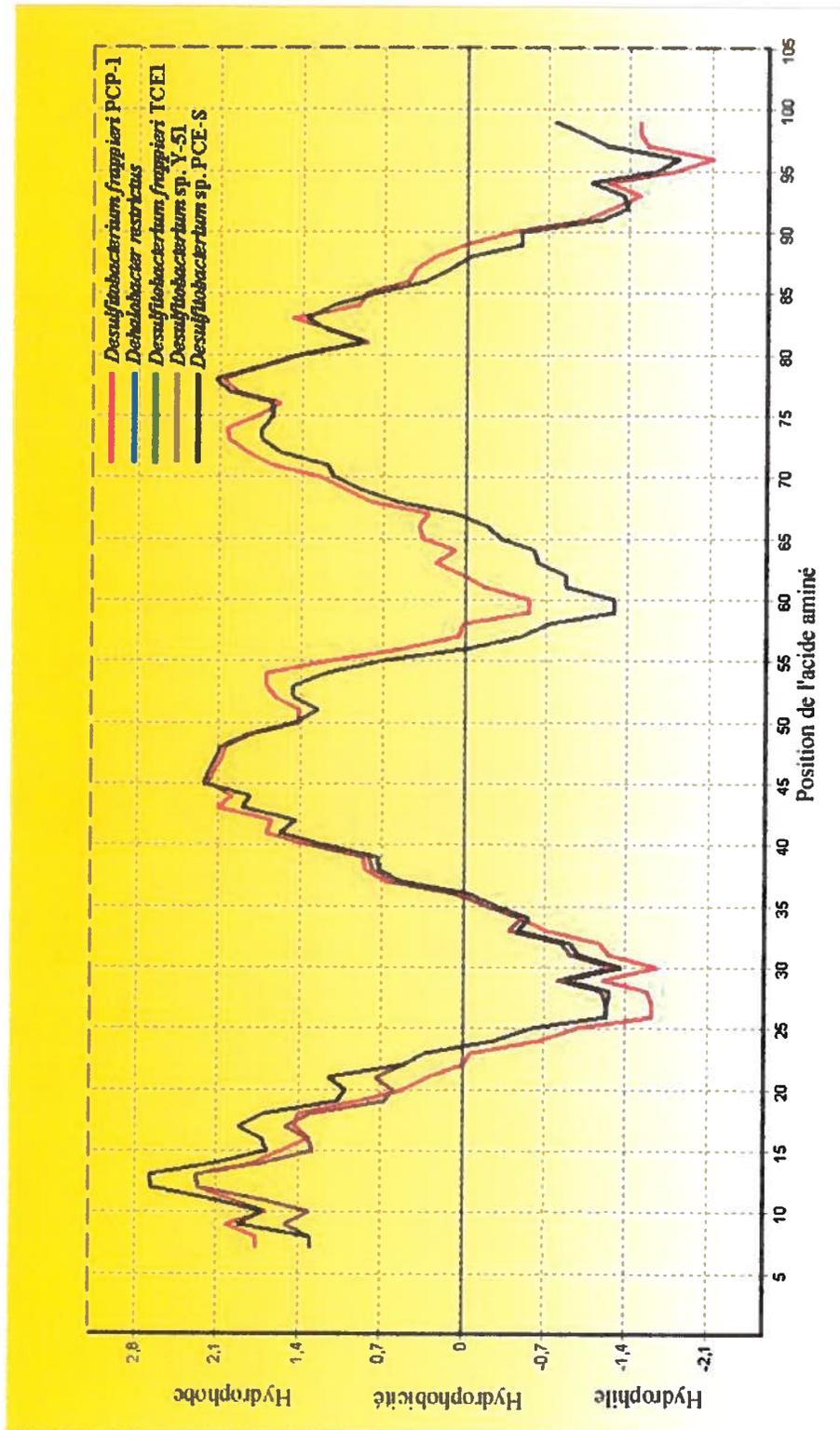


Figure 20. Profil d'hydrophobicité de Kyle et Doolittle des différents PceB. La séquence en acides aminés des PceB de *D. frappieri* TCE1, *Desulfotobacterium* sp. Y51, *Desulfotobacterium* sp. PCE-S, *Dehalobacter restrictus* et *D. frappieri* PCP-1 ont été alignées avec le programme CLUSTALW et le profil superposé d'hydrophobicité de Kyle et Doolittle a été produit.

3.4 Analyse du contig 2977 de *D. hafniense* DCB-2

Une analyse supplémentaire des cadres de lecture se trouvant dans le contig 2977 de la souche DCB-2 a été réalisée (figure 21). En plus des cadres de lecture correspondant aux gènes *hrdA1* et *hrdB1*, un troisième cadre de lecture a été retrouvé dans ce contig. En effet, un cadre de lecture (désigné ici *hrdC1*) constitué de 666 nucléotides est situé en amont du gène *hrdA1*. Le gène *hrdC1* code pour une protéine de 221 acides aminés et dont le poids moléculaire et le point isoélectrique sont respectivement de 24,9 kDa et 9,49. Une analyse de la composition en acides aminés de la protéine hypothétique HrdC1 dans les banques de données (logiciel BLASTP, site internet NCBI) a démontré que celle-ci possède 54% de similarité (37% d'identité) avec une protéine hypothétique de régulation de l'ancrage membranaire (CprC) chez *D. dehalogenans*.

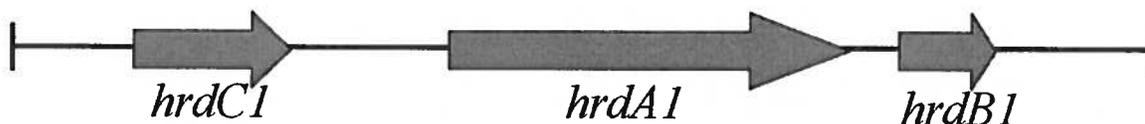


Figure 21. Schéma représentant les cadres de lecture du contig 2977 chez *Desulfitobacterium hafniense* DCB-2. Chacune des flèches représentent les 3 cadres de lecture retrouvés dans ce contig, soit *hrdC1*, *hrdA1* et *hrdB1*.

3.5 Analyse de séquences des gènes *cprA1*, *cprA2*, *cprA3* et *cprA4*

Des gènes hypothétiques codant pour des protéines de type CprA ont été retrouvés dans 3 contigs de la souche *D. hafniense* DCB-2 (Villemur *et al.*, 2002). Après analyse théorique des séquences protéiques, nous avons pu observer que chacune d'elles contient la séquence RRXFLK, indiquant la présence d'un peptide signal du système TAT. À l'aide d'un logiciel de prédiction (SignalP), il a été établi que, en effet, chacune de ces protéines posséderait un peptide signal. Les gènes *cprA1*, *cprA2*, *cprA3* et *cprA4* codent pour des protéines matures (sans le peptide signal) de 404 à 422 acides aminés ayant comme masse moléculaire de 45,0 à 47,7 kDa (tableau 2). Le point isoélectrique de ces protéines varient de 5,57 à 6,05. Ces calculs ont également été réalisés pour les protéines complètes, c'est-à-dire avec leur peptide signal respectif et sont présentés dans le tableau 2.

Le pourcentage d'identité de chacun des quatre CprA (incluant le peptide signal) a été calculé et les résultats obtenus ont été compilés dans le tableau 3. Ainsi, CprA1 possède respectivement 56, 62 et 60% d'identité avec CprA2, CprA3 et CprA4, CprA2 a démontré respectivement 60% et 63% avec CprA3, et CprA4 et finalement, CprA3 a présenté 63% d'identité avec CprA4.

3.6 Analyse de séquences du gène *crdA1*

Le gène *crdA1* avait déjà été isolé dans le laboratoire du Dr Richard Villemur et sa séquence protéique est présentée à la figure 22. Ce gène code pour une protéine de 327 acides aminés. La séquence en caractère gras de la figure 22 représente la séquence N-terminale obtenue, ce qui laisse supposer la présence d'un peptide signal (Boyer *et al.*, 2003). De plus, le logiciel de prédiction de la présence de peptide signal (SignalP) propose également un clivage de la protéine à ce niveau. Sans ce peptide signal, CrdA1 possède une séquence de 303 acides aminés ayant une masse moléculaire de 32,9 kDa et un point isoélectrique de 5,10 (tableau 2). Récemment, des analyses de séquence de

CrdA1 (domaine Lys M surtout) ont démontré une certaine similarité avec une muramidase hypothétique (flagelle spécifique) chez la souche DCB-2.

Peptide signal
Domaine PAX

MKKTLGI ILSISLAFSVLALPIFA**AVD**TTT**SATVEAAT**PAAPATPAATAPAAAPSVDTSK
Domaine Lys M

IAAGTYYYTVVSGDFFWQIAAKHGLTIDALAKLNPQIKNVNLIFPGQKILVKAEEAAAAS
 STSTA AVAPAAKKLYQGIGMAANYRDNTARQKDHDNLNITVAALFDDAGKIVKLQFDVV
 EILPDMFPGWMDPEAADKSFYKDAQANGFNWETKKEEGDAYGMKASAVSGKEWWEQMNFY
 EEFKGGKTVAEVQDWFAYKCDANGRPYK MAYPEKLT DADKAKVATFTEAEKMLVDVTTG
 ATMSLQDPHSRFIDALVKAYEVRKEVK

Figure 22. Séquence déduite en acides aminés du gène *crdA1*. La séquence en caractère gras représente la séquence obtenue en N-terminale. Les acides aminés situés à l'extrémité N-terminale jusqu'à la flèche verticale constitueraient la limite du peptide signal et son site potentiel de clivage. Figure modifiée de Boyer *et al* (2003).

Gènes	Nombre de nucléotides	Nombre d'acides amines	Poids moléculaire (kDa)	Point isoélectrique
	Avec P / Sans P	Avec P / Sans P	Avec P / Sans P	Avec P / Sans P
<i>crdA1</i>	1137 / 912	327 / 303	35,5 / 32,9	5,44 / 5,10
<i>frdA1</i>	1647 / 1566	548 / 521	60,9 / 58,3	5,63 / 5,40
<i>cprA1</i>	1338 / 1212	445 / 404	49,3 / 45,0	7,08 / 5,87
<i>cprA2</i>	1467 / 1269	488 / 422	53,9 / 47,0	6,53 / 5,57
<i>cprA3</i>	1377 / 1233	458 / 410	51,0 / 45,7	7,02 / 6,05
<i>cprA4</i>	1392 / 1233	463 / 410	51,0 / 45,7	6,97 / 5,96

Tableau 2. Résultats des analyses de séquences des gènes *cprA1*, *cprA2*, *cprA3* et *cprA4* retrouvés dans les contigs de la souche *D. hafniense* DCB-2 ainsi que des gènes *crdA1* et *frdA1* chez *D. frappieri* PCP-1. Pour chacun des gènes, le nombre de nucléotides, le nombre d'acides aminés, le poids moléculaire ainsi que le point isoélectrique ont été déterminés avec et sans le peptide signal (P).

Protéines	% d'identité à:			
	CprA1	CprA2	CprA3	cprA4
CprA1	100	-	-	-
CprA2	56	100	-	-
CprA3	62	60	100	-
CprA4	60	63	63	100

Tableau 3. Pourcentage d'identité des 4 CprA retrouvées dans les contigs 3277, 3246 et 3185 de la souche *D. hafniense* DCB-2 suite à un alignement de chacun des gènes entres eux.

3.7 Présence des gènes *frdA1*, *crdA1*, *cprA1*, *cprA2*, *cprA3* et *cprA4* chez *D. frappieri* PCP-1 et chez sept autres souches de *Desulfitobacterium*

3.7.1 Par méthode de PCR

Incluant *D. frappieri* PCP-1, huit souches de *Desulfitobacterium* ont été examinées pour la présence des gènes *frdA1* et *crdA1* (responsables respectivement du deuxième et du premier système de déshalogénéation du PCP chez *D. frappieri* PCP-1) ainsi que pour la présence des gènes *cprA1*, *cprA2*, *cprA3* et *cprA4* (gènes hypothétiques retrouvés dans certains contigs du génome de *D. hafniense* DCB-2 pouvant possiblement coder pour des déshalogénases réductrices). Les souches qui ont été étudiées au cours de ce projet de maîtrise sont: *D. dehalogenans*, *D. chlororespirans*, *Desulfitobacterium* sp. PCE1, *D. hafniense* DCB-2, et les souches *D. frappieri* DP7, TCE1 et TCP-A. Les amplifications de ces gènes ont été effectuées grâce à des paires d'amorces spécifiques respectives (tableau 1, figures 9 à 14).

Le gène *crdA1* a pu être amplifié chez les souches *D. frappieri* PCP-1, *D. frappieri* DP7, *D. frappieri* TCE1 et *D. hafniense* DCB-2 (figure 23A). Aucune amplification n'a été observée chez *D. frappieri* TCP-A et chez les autres souches. Le gène *frdA1* a été amplifié seulement chez les souches *D. frappieri* PCP-1, *D. frappieri* TCP-A et *D. hafniense* DCB-2 (figure 23B). Le gène *cprA1* a été amplifié chez *D. hafniense* DCB-2, *Desulfitobacterium* sp. PCE1 et *D. dehalogenans* (figure 23C). Les gènes *cprA2*, *cprA3* et *cprA4* (figures 23D, 23E et 23F respectivement) ont tous été amplifiés chez *D. frappieri* PCP-1, *D. frappieri* TCP-A et *D. hafniense* DCB-2.

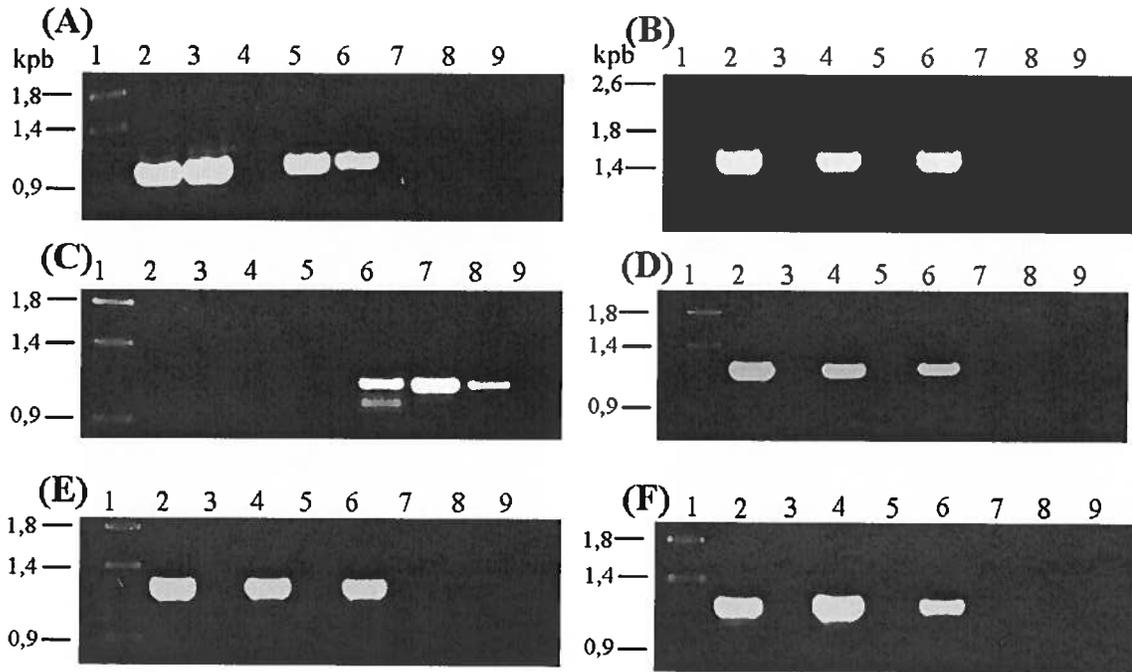


Figure 23. Résultats des amplifications par PCR des 6 différents gènes chez huit souches de *Desulfitobacterium*. Des volumes de 5 μ l de produit de PCR ont été fractionnés par électrophorèse sur gel d'agarose 1 %. *Lambda StyI* (500 ng) (1), *D. frappieri* PCP-1 (2), *D. frappieri* DP7 (3), *D. frappieri* TCP-A (4), *D. frappieri* TCE1 (5), *D. hafniense* DCB-2 (6), *Desulfitobacterium* sp. PCE1 (7), *D. dehalogenans* (8), *D. chlororespirans* (9). Gènes amplifiés : *crdA1* (A), *frdA1* (B), *cprA1* (C), *cprA2* (D), *cprA3* (E), *cprA4* (F).

3.7.1.1 Vérification de l'authenticité des gènes *cprA1*, *cprA2*, *cprA3*, *cprA4*, *crdA1* et *frdA1* par digestion de chacun des gènes par des enzymes de restriction.

Afin de vérifier si les fragments amplifiés sont ceux espérés, des digestions enzymatiques de ces gènes ont été réalisées. Puisque tous ces gènes se retrouvent chez *D. hafniense* DCB-2, une digestion de chacun des gènes amplifiés chez la souche DCB-2 a été réalisée. Des digestions théoriques de chacun de ces gènes ont été réalisées à l'aide du Logiciel Clone Manager. Ainsi, le gène *cprA1* devrait générer des fragments de 268 pb et de 123 pb (par l'enzyme *EcoR1*), le gène *cprA2* des fragments de 966 pb et 312 pb (par l'enzyme *BamH1*), le gène *cprA3* des fragments de 991 pb, 189 pb et 62 pb (par l'enzyme *EcoR1*), le gène *cprA4* des fragments de 997 pb et 245 pb (par l'enzyme *EcoR1*), le gène *crdA1* des fragments de 678 pb et 357 pb (par l'enzyme *Sty1*) et le gène *frdA1* des fragments de 1459 pb et 115 pb (par l'enzyme *HindIII*). Bien qu'il semble que tous les fragments aient été légèrement retardés par rapport au marqueur dans le gel d'agarose 1% présenté à la figure 24 (y compris les fragments de gènes non totalement digérés), tous les gènes ont été coupés au bon endroit.

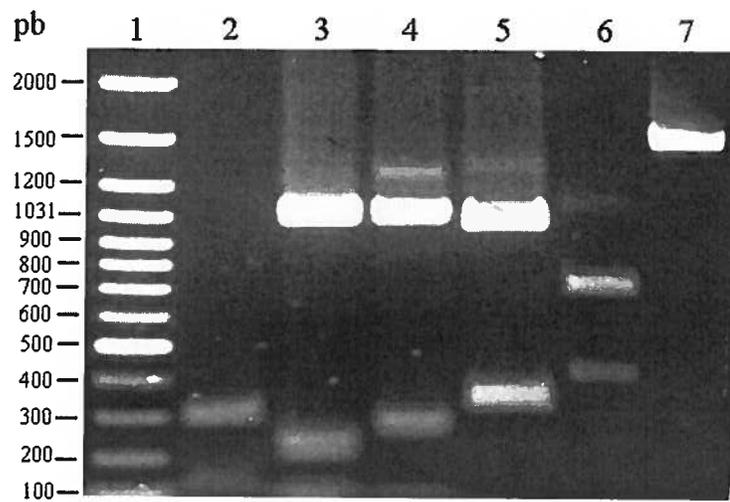


Figure 24. Digestion des gènes *cprA1*, *cprA2*, *cprA3*, *cprA4*, *crdA1* et *frdA1* par des enzymes de restriction. Digestion des gènes *cprA1* (2), *cprA3* (3), *cprA4* (4) par l'enzyme *EcoR1*, digestion du gène *cprA2* (5) par l'enzyme *BamH1*, digestion du gène *crdA1* (6) par l'enzyme *Sty1* et digestion du gène *frdA1* (7) avec l'enzyme *HindIII*. Marqueur (1).

3.7.2 Par buvardage de type Southern

Nous avons supposé qu'un ou deux nucléotides de différences dans les amorces spécifiques à chacun des gènes ont pu inhiber l'amplification chez les souches dont les gènes étudiés n'ont pu être amplifiés. Des buvardages de type Southern ont été réalisés afin de déterminer la présence des gènes *cprA1*, *cprA2*, *cprA3*, *cprA4*, *crdA1* et *frdA1* chez les huit souches de *Desulfitobacterium*. Cette technique est particulièrement intéressante parce qu'elle permet de sonder la présence de gènes sur toute leur longueur et non sur de courtes séquences qui correspondaient aux oligonucléotides.

Après avoir digéré 2,5 µg d'ADN génomique de chacune des huit souches de *Desulfitobacterium* avec l'enzyme de restriction *EcoR1*, ces échantillons ont subi une migration par électrophorèse sur gel d'agarose suivi d'un transfert de cet ADN sur une membrane de nylon. Chacune des membranes a ensuite été hybridée avec chacune des sondes représentant *frdA1*, *crdA1*, *cprA1*, *cprA2*, *cprA3* et *cprA4*. Toutes les membranes de nylon étudiées ont été hybridées dans des conditions de stringence moyenne afin de permettre aux sondes de s'hybrider aux gènes malgré le fait que ceux-ci ne soient pas nécessairement identiques aux sondes.

Le gène *crdA1* a été retrouvé chez chacune des huit souches de *Desulfitobacterium* (figure 25A). Quoique difficilement visible, un signal d'hybridation a été observé pour ce gène chez *D. frappieri* TCE1 au même poids moléculaire que les autres souches de *frappieri* (*hafniense*). Pour sa part, la sonde représentant *frdA1* a hybridé chez *D. frappieri* PCP-1, *D. frappieri* TCP-A ainsi que chez *D. hafniense* DCB-2 (figure 25B). Le gène *cprA1* a été retrouvé de façon évidente chez les souches *D. hafniense* DCB-2, *Desulfitobacterium* sp. PCE1 et chez *D. dehalogenans* (figure 26A). Cependant, des bandes ayant produit un faible signal d'hybridation ont pu être observées chez les souches *D. frappieri* PCP-1 et chez *D. frappieri* TCP-A. La sonde représentant *cprA2* a hybridé

fortement chez *D. frappieri* PCP-1, *D. frappieri* TCP-A ainsi que chez *D. hafniense* DCB-2 alors que des bandes ayant produit un faible signal d'hybridation ont également été observées pour les souches *Desulfitobacterium* sp. PCE1, *D. dehalogenans* et pour *D. chlororespirans* (figure 26B). Pour ce qui est du gène *cprA3*, sa présence a été observée chez toutes les souches à l'exception de la souche *D. frappieri* TCE1 (figure 26C). La sonde représentant *cprA4* a pour sa part hybridé fortement chez *D. frappieri* PCP-1, *D. frappieri* TCP-A ainsi que chez *D. hafniense* DCB-2 mais des bandes ayant produit un faible signal d'hybridation sont également visibles chez *Desulfitobacterium* sp. PCE1 et chez *D. dehalogenans* (figure 26D).

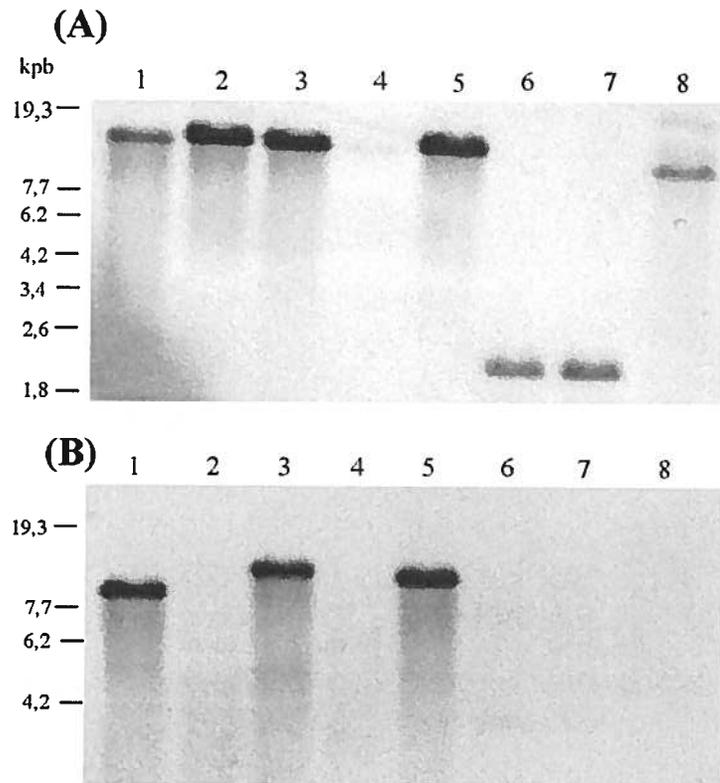


Figure 25. Présence des gènes *crdA1* et *frdA1* chez huit souches de *Desulfitobacterium* par technique de buvardage de type Southern. 2,5 µg d'ADN total digéré avec l'enzyme de restriction *EcoR1* de chacune des souches ont été fractionnés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% et hybridés respectivement avec les sondes représentant *crdA1* (A) et *frdA1* (B). *D. frappieri* PCP-1 (1), *D. frappieri* DP7 (2), *D. frappieri* TCP-A (3), *D. frappieri* TCE1 (4), *D. hafniense* DCB-2 (5), *Desulfitobacterium* sp. PCE1 (6), *D. dehalogenans* (7), *D. chlororespirans* (8).

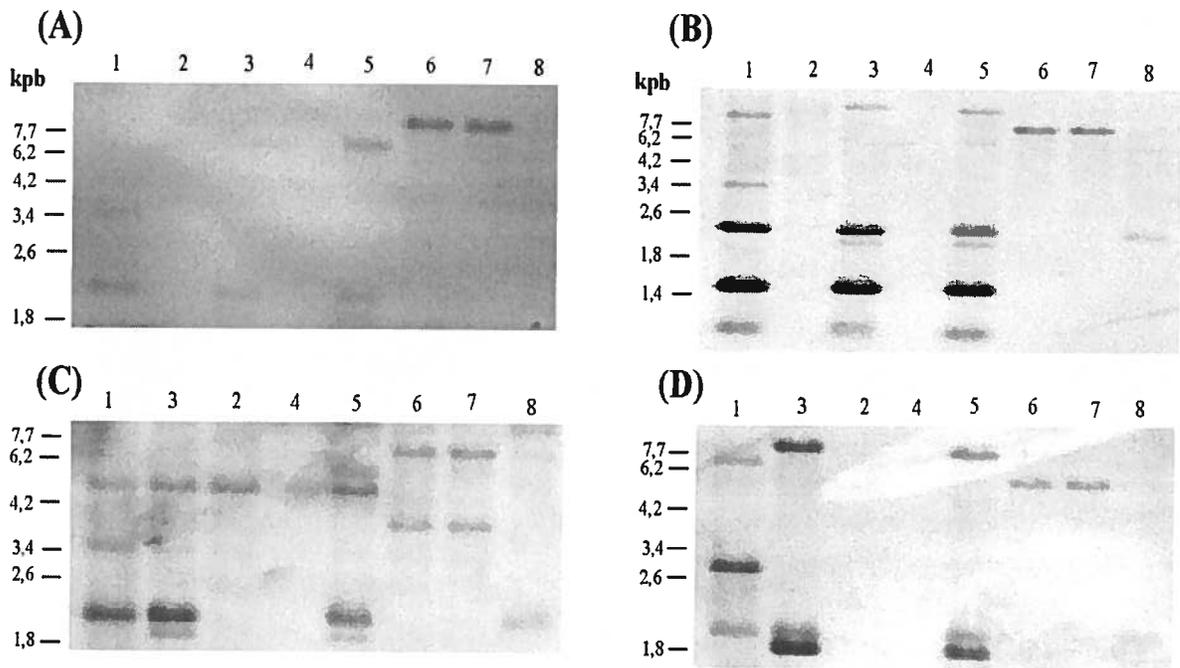


Figure 26. Présence des gènes *cprA1*, *cprA2*, *cprA3* et *cprA4* chez huit souches de *Desulfitobacterium* par technique de buvardage de type Southern. 2,5 µg d'ADN total digéré avec l'enzyme de restriction *EcoR1* de chacune des souches ont été fractionnés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% et hybridés respectivement avec les sondes représentant *cprA1* (A), *cprA2* (B), *cprA3* (C) et *cprA4* (D). *D. frappieri* PCP-1 (1), *D. frappieri* DP7 (2), *D. frappieri* TCP-A (3), *D. frappieri* TCE1 (4), *D. hafniense* DCB-2 (5), *Desulfitobacterium* sp. PCE1 (6), *D. dehalogenans* (7), *D. chlororespirans* (8).

3.8 Expression du gène *crdA1* chez la souche *D. frappieri* PCP-1

La souche PCP-1 a été cultivée en présence de plusieurs chlorophénols dont le PCE, le PCP, le 2,4,6-TCP, le 3,5-DCP et également en absence de chlorophénol. Les ARNs totaux de ces cultures ont été extraits après 48 heures de culture et 20 µg de chacun des ARNs a été analysé par électrophorèse sur un gel d'agarose puis transféré à une membrane de nylon. Celle-ci a ensuite été hybridée avec une sonde représentant le gène *crdA1* dans des conditions de stringence élevée. Le résultat de l'hybridation est présenté à la figure 27. Pour chacun des chlorophénols testés de même qu'en absence de chlorophénol, des transcrits du gène *crdA1* ont pu être observés.

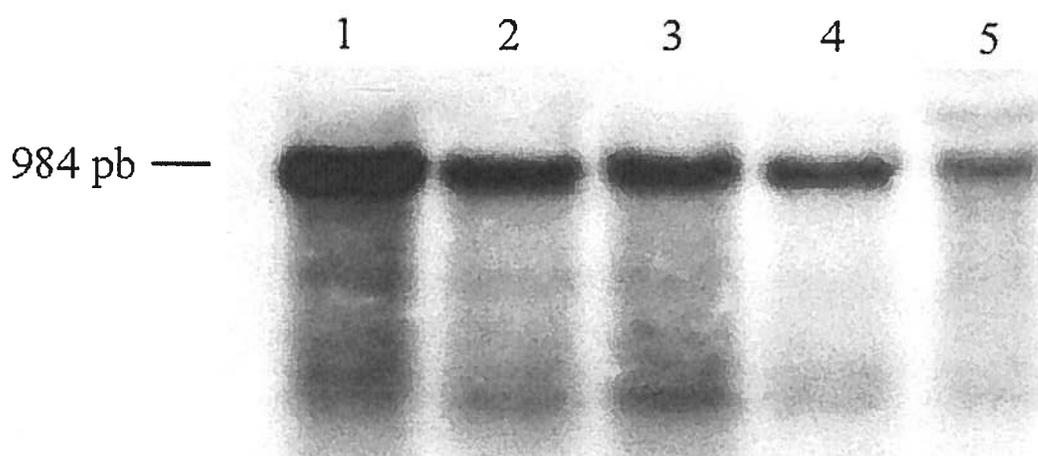


Figure 27. Expression du gène *crdA1* chez la souche PCP-1 lorsque celle-ci a été cultivée en présence de différents chlorophénols et en absence de chlorophénol (par buvardage de type Northern). La souche PCP-1 a été cultivée en absence de chlorophénol (1), en présence de PCE (2), de PCP (3), de 2,4,6-TCP (4) et de 3,5-DCP (5), puis, tous les ARN totaux en ont été extraits. 20 µg d'ARN total ont été fractionnés par électrophorèse sur gel d'agarose-glyoxal (1,4% d'agarose) et hybridés avec la sonde représentant *crdA1*.

3.9 Expression du gène *crdA1* chez huit souches de *Desulfotobacterium*

Chacune des huit souches de *Desulfotobacterium* a été cultivée en absence de chlorophénol et les ARNs totaux ont été extraits après 24 heures de culture puis 20 µg de chacun de ces ARNs ont été analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose-glyoxal. Ces ARNs ont été transférés du gel d'agarose à une membrane de nylon et celle-ci a été hybridée avec la sonde *crdA1*, et ce, dans des conditions de stringence moyenne. Les résultats obtenus ont démontré que le gène *crdA1* est transcrit de façon constitutive chez la souche *D. frappieri* PCP-1 (tel que mentionné à la section 3.8) mais également chez la souche *D. hafniense* DCB-2 (figure 28). Aucun transcrit n'a pu être observé chez les 6 autres souches de *Desulfotobacterium*.

Il est possible que la technique de buvardage de type Northern ne soit pas assez sensible pour la détection de transcrits chez ces souches. Afin d'augmenter le niveau de sensibilité, la technique de RT-PCR a été effectuée. Une amorce a été conçue afin d'amplifier une partie du gène *crdA1*, permettant une amplification d'un fragment de 343 pb chez la souche *D. frappieri* PCP-1 (tableau 1, figure 14). Des réactions de RT-PCR suivi de PCR ont été effectuées pour les souches *D. frappieri* PCP-1, DP7 et TCE1 et pour *D. hafniense* DCB-2. Les souches *D. frappieri* TCP-A, *Desulfotobacterium* sp. PCE1, *D. dehalogenans* ainsi que *D. chlororespirans* n'ont pas subi de RT-PCR puisque le gène *crdA1* n'a pas pu être amplifié par PCR chez celles-ci. Un signal a été obtenu pour les souches *D. frappieri* PCP-1, *D. hafniense* DCB-2 et également chez la souche TCE1 (figure 29). Aucun signal n'a pu être observé pour la souche DP7.

Des RT-PCR ont également été réalisés pour *D. frappieri* PCP-1 et *D. hafniense* DCB-2 lorsque ces souches avaient été induites par le 2,4,6-TCP ainsi que par le 3,5-DCP. Les résultats se sont avérés positifs dans tous ces cas (figure 30).

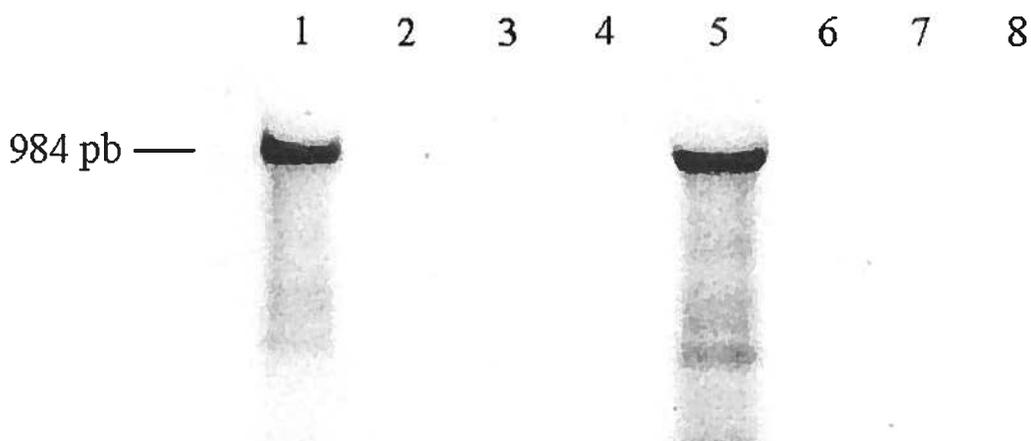


Figure 28. Expression du gène *crdA1* chez huit souches de *Desulfitobacterium* par technique de buvardage de type Northern. Les souches ont été cultivées en absence de chlorophénol et l'ARN total de ces cultures a été extrait après 24 heures. Une quantité de 20 µg d'ARN total a été fractionnée par électrophorèse sur gel d'agarose-glyoxal (1,4% d'agarose) et hybridée avec la sonde représentant *crdA1*. *D. frappieri* PCP-1 (1), *D. frappieri* DP7 (2), *D. frappieri* TCP-A (3), *D. frappieri* TCE1 (4), *D. hafniense* DCB-2 (5), *Desulfitobacterium* sp. PCE1 (6), *D. dehalogenans* (7), *D. chlororespirans* (8).

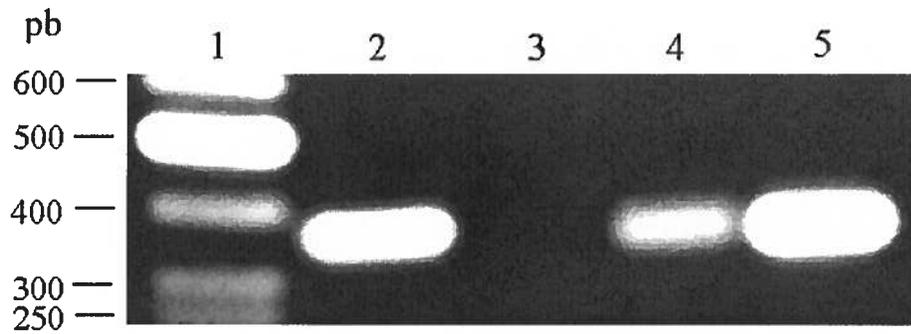


Figure 29. Détection de la présence de transcrits du gène *crdA1* chez quatre souches de *Desulfitobacterium* par technique de RT-PCR. Des volumes de 5 µl de produit de RT-PCR ont été fractionnés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,4%. Marqueur à ADN (1), *D. frappieri* PCP-1 (2), *D. frappieri* DP7 (3), *D. frappieri* TCE1 (4) et *D. hafniense* DCB-2 (5).

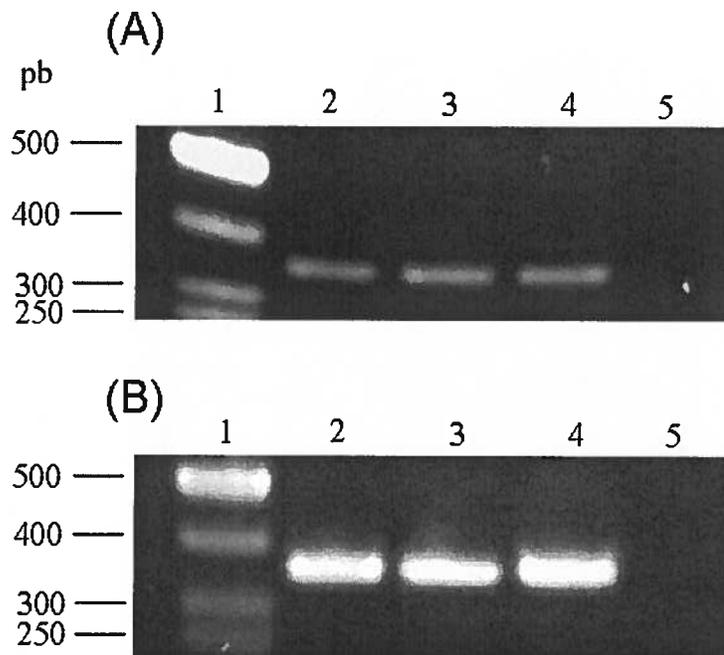


Figure 30. Expression du gène *crdA1* suite à une induction de deux chlorophénols chez deux souches de *Desulfitobacterium* par la technique de RT-PCR. L'ARN total de *D. frappieri* PCP-1 (A) ainsi que de *D. hafniense* DCB-2 (B) ont été extraits lorsque ces souches avaient été induites par le 2,4,6-TCP (2), par le 3,5-DCP (3) et sans chlorophénol (4). Marqueur à ADN (1), contrôle négatif (5).

3.10 Expression des gènes *frdA1*, *cprA2*, *cprA3* et *cprA4*

Des buvardages de type Northern ont été réalisés avec 20 µg d'ARNs totaux pour les gènes *frdA1*, *cprA2*, *cprA3* et *cprA4* mais aucun signal n'a pu être observé chez la souche PCP-1. La technique de RT-PCR devenait alors indispensable afin de déterminer si ces gènes étaient transcrits mais à des niveaux beaucoup moins élevés. Nous nous sommes concentrés sur les souches PCP-1, DCB-2 et TCP-A car seules ces souches ont produit une amplification PCR de ces gènes. Les amorces utilisées pour les réactions de RT-PCR sont décrites au tableau 1 ainsi qu'aux figures 9, 11, 12, 13 et 14. Les souches PCP-1, DCB-2 et TCP-A ont été cultivées en présence de 2,4,6-TCP, de 3,5-DCP et également en absence de chlorophénol. L'ARN de celles-ci a été extraite après 24 heures de culture et une quantité de 10 µg d'ARN total a été utilisée afin d'effectuer les réactions de RT-PCR.

Les résultats des RT-PCR pour ces gènes sont les mêmes pour chacune des trois souches à l'étude. En effet, le gène *frdA1* (389 pb) est transcrit lorsque les souches ont été cultivées en présence de 2,4,6-TCP et de 3,5-DCP (figure 31). Cependant, aucune transcription de ce gène n'a été observée lorsque que ces souches ont été cultivées en absence de chlorophénol. Les gènes *cprA2*, *cprA3* et *cprA4* (respectivement 438 pb, 388 pb et 312 pb) sont, pour leur part, transcrits chez les trois souches cultivées en présence de chlorophénols mais également en absence de chlorophénol. Nous n'avons pas pu déterminer si la variation des signaux des produits de PCR correspondait à la réalité ou était due à un artefact de la technique elle-même.

Puisque le gène *cprA1* a été retrouvé chez *D. hafniense* DCB-2, *Desulfitobacterium* sp. PCE1 et chez *D. dehalogenans* par la technique de PCR, des RT-PCR ont été réalisés pour ce gène afin de vérifier si celui-ci était transcrit. Aucun transcrit de ce gène n'a été observé chez ces souches lorsque celles-ci étaient cultivées en

absence de chlorophénol. De plus, aucun transcrit n'a été observé pour la souche DCB-2 lorsque celle-ci a été cultivée en présence de 3,5-DCP et de 2,4,6-TCP (photo non incluse dans le mémoire).

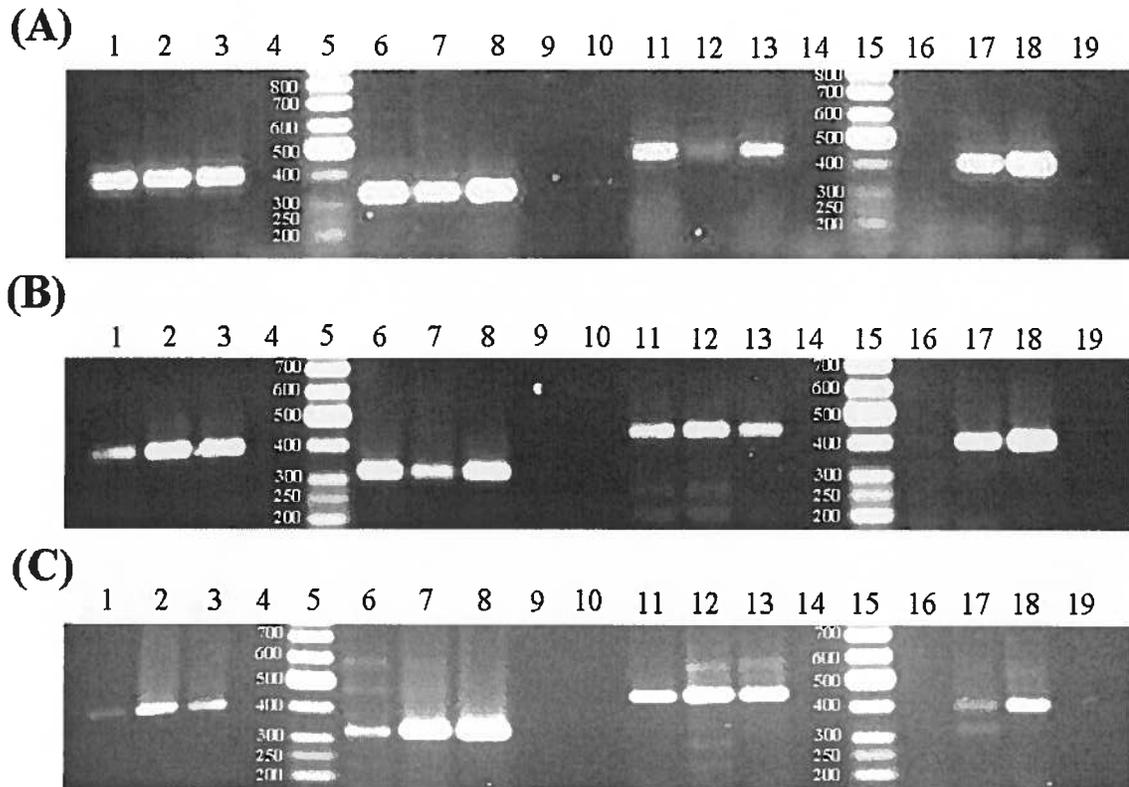


Figure 31. Expression des gènes *cprA1*, *cprA2*, *cprA3*, *cprA4* et *frdA1* chez 3 souches de *Desulfitobacterium*. 10 µg d'ARN total ont été utilisés pour effectuer les réactions de RT-PCR chez *D. frappieri* PCP-1 (A), *D. hafniense* DCB-2 (B) et chez *D. frappieri* TCP-A (C). *cprA3*, puits 1-4: non-induit (1), induit au 2,4,6-TCP (2), induit au 3,5-DCP (3) et le contrôle négatif (4). *cprA4*, puits 6-9: non-induit (6) induit au 2,4,6-TCP (7), induit au 3,5-DCP (8) et le contrôle négatif (9). *cprA2*, puits 11-14: non-induit (11), induit au 2,4,6-TCP (12), induit au 3,5-DCP (13) et le contrôle négatif (14). *frdA1*, puits 16-19: non-induit (16), induit au 2,4,6-TCP (17), induit au 3,5-DCP (18) et le contrôle négatif (19). Puits 5 et 15: marqueur d'ADN (pb).

4. DISCUSSION

4.1 Séquence des gènes *frdA1* et *frdB1* chez *Desulfotobacterium frappieri* PCP-1

Suite à des études protéomiques et de spectrométrie de masse (Duguay, 2003), des peptides obtenus de la déshalogénase II purifiée de la souche PCP-1 ont été retrouvés dans le contig 2977 du génome de la bactérie *D. hafniense* DCB-2. Rappelons qu'en 2001, Niggemyer et ses collaborateurs avaient déterminé que les souches PCP-1 et DCB-2 seraient en fait de la même espèce. À partir de la séquence en nucléotides obtenue du contig de la souche DCB-2, des amorces appropriées ont été conçues. Le fragment d'ADN contenant les gènes *frdA1* et *frdB1*, codant respectivement pour la déshalogénase II et pour une protéine membranaire hypothétique chez la souche PCP-1, a été amplifié, cloné et séquencé. Les deux gènes ne sont séparés que par 15 nucléotides. La présence d'un site putatif de fixation du ribosome situé en amont du gène *frdA1* ainsi qu'un site de terminaison potentiel de la transcription situé en aval du gène *frdB1* nous laisse croire que ces deux gènes sont situés sur un seul opéron et qu'ils sont transcrits successivement par le même promoteur. Aucun signal d'hybridation par la technique de Northern n'a été obtenu qui aurait pu nous indiquer si effectivement, selon la longueur du transcrit, les deux gènes font partie d'un même transcrit. L'absence de signal en Northern blot est probablement relié au fait que cette technique n'est pas assez sensible et qu'une grande quantité d'ARNm doivent être présents afin d'être détectés.

La séquence protéique de 548 acides aminés codée par le gène *frdA1* de la souche PCP-1 ne présente qu'une seule différence avec la séquence obtenue du contig 2977 de *D. hafniense* DCB-2. Ainsi, pour la souche PCP-1, une leucine est observée en position 273 à la place d'une proline chez DCB-2. Ce résultat concorde avec celui obtenu par Duguay (2003) qui avait également observé par spectrométrie de masse qu'une leucine ou une isoleucine devait être présente à cet endroit chez PCP-1 à la place d'une proline. Conséquemment, la mutation ne provient pas d'une erreur de lecture de la polymérase Taq. Cette séquence de 548 acides aminés présente le motif RRXFLK qui indique un mode d'exportation de cette protéine par le système TAT (twin arginine translocation).

Le système TAT sécrète des protéines qui sont déjà repliées et qui contiennent souvent des cofacteurs contrairement au système SEC qui sécrète non repliées qui se replient dans le périplasme après leur passage au travers de la membrane cytoplasmique. Les protéines portant la signature TAT possèdent un peptide signal qui sera clivé après leur exportation vers la membrane cytoplasmique. En effet, ces pré-protéines se lient à un ou plusieurs cofacteurs dans le cytoplasme en même temps que celles-ci adoptent leur conformation mature. Ces protéines peuvent alors être transportées sous cette forme à la membrane cytoplasmique et c'est à ce niveau que le peptide signal est clivé (Berks, 1996) (Santini *et al.*, 1998). Toutes les enzymes de type CprA ainsi que PceA possèdent ce genre de peptide signal. De plus, la masse théorique de la déshalogénase II est de 61 kDa. Sans le peptide signal, la masse de celle-ci est alors de 58 kDa, ce qui correspond à la masse retrouvée après purification de cette protéine sur SDS-PAGE (Thibodeau, 2003). La déshalogénase II doit alors se lier à ses cofacteurs et se replier avant de perdre son peptide signal et d'aller se fixer à la membrane cytoplasmique. L'activité enzymatique de la déshalogénase II avait d'ailleurs été retrouvée principalement dans les préparations membranaires (Boyer, 1999).

Une séquence pouvant être reliée à la liaison de la déshalogénase II avec un cofacteur corrinoïde dans le cytoplasme a été retrouvée (EYHYNG). Marsh et Holloway (1992) ont démontré que la séquence consensus DXHXXG indique la fixation d'un cofacteur corrinoïde. Dans le cas de la déshalogénase II, l'acide aspartique est remplacé par un acide glutamique. Ces deux acides aminés sont dits négatifs et la seule différence entre les deux n'est que l'ajout d'un groupement CH₂ au niveau de la chaîne aliphatique pour l'acide glutamique. Il serait alors possible de croire que la fonction de cette séquence soit conservée chez la souche PCP-1. De plus, Thibodeau (2003) a démontré par analyse au HPLC (sur une préparation membranaire de la déshalogénase II solubilisée) que la déshalogénase II est inhibée par le sulfite et non par le sulfate et le nitrate, ce qui peut nous laisser croire la présence d'un corrinoïde. Cependant, cette séquence consensus n'a pas été retrouvée chez les autres PceA ainsi que chez les CprA

décrites dans la littérature, de même que chez les CprA hypothétiques de la souche DCB-2 et PCP-1.

Les séquences CXXCXXCXXXCP et GXXCXXCXXXCS ont été retrouvées dans la séquence protéique du gène *frdA1* et sont également présentes chez les PceA réductases des souches *Desulfitobacterium frappieri* TCE1, *Desulfitobacterium* sp. Y51, *Desulfitobacterium* sp. PCE-S et chez *Dehalobacter restrictus*. Chez les autres PceA et CprA répertoriées, les motifs CXXCXXCXXXCP et GXXCXXCXXXCP ont plutôt été retrouvés. Le deuxième motif diffère par une proline à la place d'une cystéine. Dans tous les cas, ces séquences sont respectivement responsables de la liaison avec des centres Fe₄S₄ et Fe₃S₄ (von Wintzingerode *et al.*, 2001).

La déshalogénase II est induite par le 3,5-DCP ainsi que par le 3,4,5-TCP. Elle peut également déshalogéner le PCP, le 3,4,5-TCP, le 2,4,6-TCP, le 3,5-DPC et le 2,4-DCP (Thibodeau, 2003). Cependant, aucune analyse n'a été réalisée afin de déterminer si le PCE pouvait induire la déshalogénase II ou si le PCE pouvait être déshalogéné par cette dernière. Il serait intéressant de vérifier ces deux avenues puisque le gène codant pour cette enzyme démontre 63% d'identité (72% de similarité) avec des PCE déshalogénases réductrices chez les souches *D. frappieri* TCE1, *Desulfitobacterium* sp. Y51, *Desulfitobacterium* sp. PCE-S et chez *Dehalobacter restrictus*. De plus, toutes ces bactéries ont la capacité de déshalogéner le PCE.

Le gène *frdB1* code pour une protéine de 11,5 kDa. Une analyse du profil d'hydrophobicité de Kyte et Doolittle révèle la présence de trois régions transmembranaires, suggérant ainsi que la protéine est située au niveau de la membrane cytoplasmique. Les profils d'hydrophobicité obtenu pour les PceB de *Desulfitobacterium frappieri* TCE1, *Desulfitobacterium* sp. Y51, *Desulfitobacterium* sp. PCE-S et *Dehalobacter restrictus* s'apparentent à ceux obtenus de *Dehalospirillum multivorans*

(PceB), *Dehalococcoides ethenogenes* (TceB) et de *Desulfitobacterium dehalogenans* (CprB) (Villemur *et al.*, 2002). Selon Van de Pas et ses collaborateurs (1999a), la CprB membranaire de *D. dehalogenans* serait nécessaire à l'ancrage de la CprA pour qu'il puisse y avoir transfert des électrons de la membrane à l'enzyme CprA puis à l'accepteur final d'électron. L'accepteur final d'électron serait, en fait, le chlorophénol déshalogéné. Le même mécanisme serait également présent pour FrdB1 et FrA1 de *D. frappieri* PCP-1.

Puisque le gène *hrdA1* a été retrouvé dans le contig 2977 du génome de *D. hafniense* DCB-2, une analyse des cadres de lecture dans ce contig a été réalisée. Ainsi, un cadre de lecture (*hrdC1*) a été retrouvé en amont du gène *hrdA1* et une analyse de la séquence protéique de ce gène a démontré 54% de similarité (37% d'identité) avec une protéine hypothétique de régulation de l'ancrage membranaire (CprC) chez *D. dehalogenans* (figure 21). Chez cette souche, le gène *cprC* est toutefois situé en aval du gène *cprA* (Smidt *et al.*, 2000). De plus, chez cette même bactérie, un autre gène de régulation (*cprD*) est situé en aval du gène *cprC*. Il serait donc possible de croire qu'un gène semblable au gène *cprD* soit présent chez *D. hafniense* et que celui-ci soit situé en amont du gène *hrdC1*. Cependant, cette avenue n'a pu être explorée puisque le contig 2977 est limité et ne permet pas de vérifier la présence de ce cadre de lecture. Il pourrait toutefois être intéressant de vérifier la présence de ces deux gènes chez les souches DCB-2, TCP-A et PCP-1 par des techniques de PCR ou de buvardage de type Southern.

4.2 Le gène *frdA1*-déshalogénase II

Tel que mentionné précédemment, le gène *frdA1* a été amplifié de la souche PCP-1. La présence de ce gène a également été observée chez *D. frappieri* TCP-A et chez *D. hafniense* DCB-2 par les techniques de PCR (figure 23B) et également par technique de buvardage de type Southern (figure 25). Il n'est pas vraiment surprenant de retrouver ce

gène chez la souche DCB-2 puisque les amorces conçues pour amplifier ce gène chez la souche PCP-1 ont été générées à partir d'un des contigs de son génome. La souche TCP-A, qui semble posséder aussi ce gène, est également une bactérie qui peut déshalogéner plusieurs types de chlorophénols, tout comme les souches PCP-1 et DCB-2. Les souches TCE1 et DP7, qui font toutes deux parties de l'espèce *D. frappieri* (ou *D. hafniense*), ne possèdent cependant pas ce gène. Ces deux souches ne peuvent déshalogéner les chlorophénols, ce qui pourrait peut-être s'expliquer par l'absence de ce gène. De plus, le gène *frdA1* semble être unique à l'espèce *frappieri* car celui-ci n'est pas présent chez les autres espèces étudiées.

L'étude de la transcription du gène *frdA1* par technique de RT-PCR a permis de déterminer que ce gène doit être induit par le 2,4,6-TCP ou par le 3,5-DCP afin d'être transcrit, et ce, pour les souches PCP-1, TCP-A et DCB-2 (figure 31). Aucune transcription du gène *frdA1* n'a été observée lorsque ces souches étaient cultivées en absence de chlorophénol. Duguay (2003) avait démontré que la déshalogénase II était présente sur gel en deux dimensions lorsque la culture de la souche PCP-1 avait été mise en présence de 3,5-DCP alors que celle-ci n'était pas visible lorsque que la culture n'avait pas été induite. Ces résultats concordent également avec ceux obtenus de Thibodeau (2003) qui démontraient que la déshalogénase II n'était présente et active que si la culture de la souche PCP-1 avait préalablement été induite par le 3,5-DCP ou le 3,4,5-TCP.

4.3 Le gène *crdA1*-déshalogénase I

Le gène *crdA1*, qui avait été isolé de la souche PCP-1, a également été amplifié par PCR chez les souches DP7, TCE1 et chez DCB-2 (figure 23A). Cependant, la technique de buvardage de type Southern (figure 25A) démontre clairement la présence de ce gène chez toutes les souches de *Desulfitobacterium*. Bien que l'hybridation de la sonde *crdA1* avec l'ADN génomique de la souche TCE1 ne soit pas intense (figure 25A, 4^{ième} puit), l'amplification de ce gène par PCR a confirmé la présence de cette bande

(figure 23A, 5^{ème} puit) et la présence de ce gène chez cette souche. Les résultats obtenus des hybridations de type Southern indiquent que parmi les 6 gènes étudiés au cours de ce projet, seul le gène *crdA1* est présent chez les huit souches de *Desulfitobacterium*. Le gène *crdA1* est donc un gène très bien conservé parmi les espèces du genre *Desulfitobacterium* qui ont été étudiées au cours de ce projet.

L'étude de la transcription du gène *crdA1* par la technique de buvardage de type Northern a permis de déterminer que ce gène est transcrit de façon constitutive chez la souche PCP-1 (figure 27). En effet, ce gène est toujours transcrit, qu'il ait été induit par des chlorophénols ou non. Des études protéomiques effectuées sur la souche PCP-1 avaient démontré que la protéine codée par le gène *crdA1*, la déshalogénase I, était présente sur gel d'électrophorèse en deux dimensions pour les lots induits aux chlorophénols et non-induits (Pagé-Bélanger, 2002; Duguay, 2003). Cependant, seuls les lots induits au 2,4,6-TCP présentaient une activité de déshalogénation (Pagé-Bélanger 2002). Afin d'expliquer ces résultats, Pagé-Bélanger avait suggéré que la déshalogénase I soit toujours présente dans la bactérie mais qu'elle y soit sous forme inactive. Celle-ci doit donc être activée ou se lier à un cofacteur afin d'acquérir une activité de déshalogénation. Il est possible que cette protéine de 37 kDa possède une fonction autre que la déshalogénation réductrice chez *D. frappieri* PCP-1 (Pagé-Bélanger 2002).

Il a également été démontré par la technique de buvardage de type Northern que le gène *crdA1* était également fortement transcrit chez la souche DCB-2 lorsque celle-ci était cultivée en absence de chlorophénol (figure 28, 5^{ème} puit). Ce résultat était tout de même attendu puisque ces deux souches seraient probablement de la même espèce. Aucun transcrit n'a pu être observé chez les 6 autres souches de *Desulfitobacterium* par cette technique. Cependant, des RT-PCR réalisés chez les souches dont le gène *crdA1* pouvait être amplifié par PCR (les souches PCP-1, DCB-2, DP7 et TCE1) ont été réalisés afin de déterminer si le gène *crdA1* était exprimé chez les souches DP7 et TCE1 mais de façon moins importante (figure 29). Les résultats de ces expériences ont montré que le

gène *crdA1* est également exprimé chez la souche TCE1. Quoique la technique de PCR ne soit pas quantitative, nous avons remarqué que le produit de RT-PCR avec la souche TCE1 est beaucoup moins abondant que celui des souches PCP-1 et DCB-2. Aucune transcription n'a pu être observée pour la souche DP7. La souche DP7 est différente des autres souches de *Desulfitobacterium* puisqu'elle est la seule à ne pas avoir été isolée à partir d'un environnement pollué à des composés chlorés et elle ne peut déshalogéner aucun des composés chlorés testés jusqu'à présent. Notons que la présence de gènes impliqués dans la déshalogénéation n'implique pas nécessairement l'activité de déshalogénéation. Ce même phénomène est présent pour deux souches d'une même espèce, les souches N et K de *Dehalospirillum multivorans* (Siebert *et al.*, 2002). En effet, il a été démontré que ces deux souches contiennent les gènes responsables de la déshalogénéation du PCE, soit les gènes *pceA* et *pceB*. Cependant, par la technique de RT-PCR, il a été démontré que le gène *pceA* était exprimé uniquement chez la souche K. Par des études en HPLC (High Performance Liquid Chromatography), l'absence d'un cofacteur corrinoïde a été remarquée chez la souche N par rapport à la souche K. Les auteurs ont alors attribué l'inhabilité de la souche N à déshalogéner le PCE par l'absence du cofacteur corrinoïde. Ces derniers croient que cette souche est tout simplement incapable de synthétiser ce cofacteur. Il serait possible que le même phénomène se présente pour la souche DP7. Afin de le confirmer, des études en HPLC devraient être effectuées. Ceci pourrait expliquer la différence d'expression de ce gène chez cette souche comparativement aux souches PCP-1, DCB-2 et TCE1. Cependant, on ne peut exclure le fait que le gène *crdA1* soit également exprimé mais plus faiblement chez les souches *D. frappieri* TCP-A, *Desulfitobacterium* sp. PCE1, *D. dehalogenans* et chez *D. chlororespirans*. Néanmoins, cette étude n'a pu être réalisée au cours de ce projet puisque aucune amorce fonctionnelle n'a pu être trouvée afin d'amplifier le gène *crdA1* chez ces souches.

4.4 Les gènes *cprA1*, *cprA2*, *cprA3* et *cprA4*

Villemur *et al* (2002) ont démontré la présence de 4 gènes *cprA* hypothétiques dans trois contigs du génome de la bactérie *D. hafniense* DCB-2. Puisque la souche DCB-2 est de la même espèce que la souche PCP-1 (Niggemyer *et al.*, 2001), la présence de ces gènes chez la souche PCP-1 a été vérifiée ainsi que chez 6 autres souches de *Desulfitobacterium*. Ainsi, il a été établi par les techniques de PCR et de buvardage de type Southern que les gènes *cprA2*, *cprA3* et *cprA4* étaient présents chez la souche PCP-1. Aucune amplification n'a pu être observée pour le gène *cprA1* chez cette souche. Toutefois, une réponse positive a été observée pour ce gène chez *D. hafniense* DCB-2, *Desulfitobacterium* sp. PCE1 et chez *D. dehalogenans*, indiquant que les amorces utilisées étaient bel et bien fonctionnelles. Villemur et ses collaborateurs (2002) ont également observé que la séquence en N-terminale de la protéine CprA purifiée de *D. dehalogenans* est exactement identique à la séquence déduite en acides aminés constituant le N-terminale du gène *cprA1* chez *D. hafniense* DCB-2. Chez *D. dehalogenans*, le gène *cprA* est responsable de la déshalogénéation du 3-chloro-4-hydroxyphényle acétate (3-Cl-4-OHPA). Les souches DCB-2 et PCE1 peuvent également déshalogéner ce produit contrairement à la souche PCP-1 qui est incapable de le faire. Également, aucune amplification du gène *cprA1* n'a été obtenue pour les autres souches de l'espèce *frappieri*, soit pour les souches DP7, TCP-A et TCE1, qui, à l'instar de la souche PCP-1, ne peuvent déshalogéner le 3-Cl-4-OHPA. Par conséquent, ces résultats laissent suggérer que le gène *cprA1* est essentiel à l'activité de déshalogénéation du 3-Cl-4-OHPA tel que proposé par Villemur *et al* (2002).

Par la technique de PCR, les gènes *cprA2*, *cprA3* et *cprA4* ont également été retrouvés chez *D. frappieri* TCP-A et chez *D. hafniense* DCB-2 (figure 23). Les résultats obtenus des buvardages de type Southern ont confirmé ceux obtenus par PCR et ont même permis de déterminer la présence de gènes *cprA* chez les autres souches de *Desulfitobacterium*, à l'exception de la souche TCE1 qui ne semble posséder aucun de ces gènes (figure 26). La souche DP7 ne présente qu'une seule bande sur buvardage de type Southern pour le gène *cprA3*. Ces résultats ne sont pas vraiment surprenant puisque

la souche DP7 ne peut déshalogéner les chlorophénols et autres composants chlorés alors que la souche TCE1 n'a montré aucune activité déshalogénéation face aux chlorophénols. La technique de buvardage de type Southern est une technique qui permet d'observer des hybridations sondes-gènes même si les séquences de celles-ci diffèrent quelque peu. Au contraire, la technique de PCR exige des amorces quasiment identiques à la séquence du gène d'intérêt afin de pouvoir amplifier le gène voulu. C'est pourquoi la technique de buvardage de type Southern devenait très intéressante au cours de cette étude puisqu'elle a permis de détecter la présence de gènes similaires d'une espèce à l'autre. Cependant, puisque les quatre gènes *cprA* semblent coder pour des CprA ayant des identités entre elles variant de 56% à 63% (tableau 3), il est fort probable que des hybridations croisées aient pu avoir lieu entre les différents gènes *cprA*. Les bandes de faibles intensités obtenues pour les souches PCP-1 et TCP-A avec la sonde *cprA1* seraient alors probablement le fruit d'hybridations croisées. De plus, aucune de ces deux souches ne peut déshalogéner le 3-Cl-4-OHPA. Il est également intéressant de noter que les bactéries *D. dehalogenans* ainsi que *Desulfitobacterium* sp. PCE1 ont démontré exactement le même patron d'hybridation pour tous les gènes étudiés. Ceci tend à soutenir l'hypothèse de Gerritse et collaborateurs (1996) voulant que ces 2 souches soient en fait de la même espèce.

Aucun signal n'a pu être observé par buvardage de type Northern pour les gènes *cprA2*, *cprA3* et *cprA4* chez la souche PCP-1. Des RT-PCR ont alors été effectués pour ces gènes chez celle-ci, mais aussi chez les souches TCP-A et DCB-2 puisque les amorces étaient fonctionnelles pour ces deux souches. Cette méthode, beaucoup plus sensible, a effectivement permis de déterminer que ces 3 gènes sont transcrits de façon constitutive, et ce, pour les 3 souches à l'étude (figure 31), ce qui pourrait nous laisser croire que ces gènes pourraient être impliqués dans d'autres processus que la simple déshalogénéation réductrice. Smidt *et al* (2000) avaient également effectué des RT-PCR chez *D. dehalogenans* afin de vérifier l'expression de plusieurs gènes dont le gène *cprA* en condition d'halorespiration (en présence de 3-Cl-4-OHPA). Dans ces conditions, l'expression des gènes *cprA* et *cprB* a pu être observée. Cependant, aucune expérience

n'a été réalisée à ce jour chez la souche PCP-1 afin de vérifier la présence des protéines codées par les gènes *cprA2*, *cprA3* et *cprA4*. Des études protéomiques pourraient peut-être être envisageables puisque la masse et le point isoélectrique théoriques de ces protéines hypothétiques sont connus. Toutefois, puisque le niveau de transcription de ces gènes n'est pas très élevé, il est possible que les protéines correspondantes ne puissent être vues même si elles sont présentes.

La transcription du gène *cprA1* a également été étudiée par la technique de RT-PCR. Aucun transcrit n'a été observé chez *D. hafniense* DCB-2, de même que chez *Desulfitobacterium* sp. PCE et chez *D. dehalogenans* lorsque ces souches n'avaient pas été induites. De plus, aucune transcription n'a été observée lorsque la souche DCB-2 avait été induite par le 3,5-DCP ainsi que par le 2,4,6-TCP. Ces résultats nous laissent supposer que ce gène doit être induit par le 3-Cl-4OHPA afin d'être transcrit puis traduit en protéine. Smidt *et al.*, (2000) avaient observé la transcription du gène *cprA* (ainsi que du gène *cprB*) lorsque *D. dehalogenans* était mise en présence de 3-Cl-4-OHPA. Une fois traduite, cette enzyme est responsable de la déshalogénation de ce composé chloré. Il serait toutefois intéressant de vérifier l'expression du gène *cprA1* chez *D. hafniense*, et *Desulfitobacterium* sp. PCE1 lorsque ces souches sont cultivées en présence de 3-Cl-4-OHPA.

5. CONCLUSION

La déshalogénation réductrice effectuée par différents microorganismes anaérobies est une avenue très intéressante et naturelle afin de remédier au problème de la pollution des sols par des composés fortement chlorés. Ainsi, il nous a semblé qu'une étude plus approfondie sur les gènes impliqués dans la déshalogénation réductrice pourrait améliorer notre compréhension de celle-ci. Le fait de mieux connaître les gènes impliqués dans la déshalogénation ainsi que l'expression de ceux-ci pourraient mener à l'élaboration de nouveaux procédés de déshalogénation des sols contaminés impliquant les microorganismes. Au cours de ce projet, 2 gènes impliqués dans la déshalogénation du PCP chez la souche *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 ont été investigués de même que 4 gènes hypothétiques chez 8 souches de *Desulfitobacterium*.

Ainsi, le gène codant pour la déshalogénase II de *D. frappieri* PCP-1 (*frdA1*) a été amplifié puis séquencé. Un autre gène, le gène *frdB1* a été identifié 16 nucléotides plus loin que le gène *frdA1*. La séquence protéique du gène *frdA1* démontre 63% d'identité (72% de similarité) avec des PCE déshalogénases chez les souches *Desulfitobacterium frappieri* TCE1, *Desulfitobacterium* sp. Y51, *Desulfitobacterium* sp. PCE-S et *Dehalobacter restrictus*. De plus, la séquence protéique du gène *frdB1* présente 65% (77% de similarité) avec des protéines membranaires servant d'ancrage à des PCE réductrices chez les mêmes souches que présentées précédemment. Le profil hydrophobique de cette dernière suggère fortement que celle-ci soit d'origine membranaire. De plus, la déshalogénase II présente la signature RRXFLK (système TAT) qui indique la perte d'un peptide signal. Suite à la perte de ce dernier, celle-ci est transportée au niveau du cytoplasme sous sa conformation repliée jusqu'à la membrane cytoplasmique. La protéine FrdB1, située au niveau de la membrane cytoplasmique, servirait d'ancrage à la déshalogénase II afin que celle-ci puisse effectuer la déshalogénation. Le gène *frdA1* a également été retrouvé chez les souches *D. frappieri* TCP-A et chez *D. hafniense* DCB-2. Ce gène est transcrit lorsque ces cultures ont préalablement été induites par le 2,4,6-TCP ou par le 3,5-DCP et n'est pas transcrit en absence d'induction.

Le gène codant pour la déshalogénase I de la souche PCP-1 (*crdA1*) a également été retrouvé chez les 7 autres souches de *Desulfitobacterium* à l'étude, soit *D. frappieri* DP7, *D. frappieri* TCP-A, *D. frappieri* TCE1, *D. hafniense* DCB-2, *Desulfitobacterium* sp. PCE1, *D. dehalogenans* et chez *D. chlororespirans*. Chez la souche PCP-1, ce dernier est transcrit de façon constitutive, qu'il ait été induit par des chlorophénols ou non. Une étude de la transcription de ce gène a pu être réalisée chez les souches DP7, TCE1 et DCB-2. Une transcription constitutive a été remarquée chez les souches DCB-2 et TCE1. Notons toutefois que la souche DP7 ne peut déshalogéner aucun chlorophénol ou composé chloré.

Quatre gènes *cprA* retrouvés dans les contigs du génome de la souche DCB-2 ont fait l'objet de ce projet de maîtrise. Trois de ces gènes ont été retrouvés chez la souche PCP-1. Quand au gène absent, le gène *cprA1*, celui-ci pourrait être responsable de la déshalogénation du 3-Cl-4-OHPA qui ne peut être déshalogéné par la souche PCP-1. Ce gène a d'ailleurs été retrouvé chez les souches pouvant déshalogéner ce composé, soit chez les souches DCB-2, PCE1 et chez *D. dehalogenans*. Aucun transcrit de ce gène n'a été observé chez ces trois souches lorsque celles-ci n'avaient pas été induites. L'induction de la souche DCB-2 n'a pas non plus produit transcrit du gène *cprA1*. Les gènes *cprA2*, *cprA3* et *cprA4* ont été retrouvés chez la plupart des sept autres souches à l'étude. Une étude de la transcription de ces gènes a pu être réalisée chez les souches PCP-1, TCP-A et chez DCB-2. Dans tous les cas (absence ou présence de chlorophénols), ces gènes étaient transcrits.

Le fait de retrouver plusieurs de ces gènes chez plusieurs souches bactériennes différentes nous porte à croire que ces microorganismes possèdent une multitude de gènes pouvant mener à la déshalogénation de composés chlorés. Ces microorganismes semblent en effet posséder plusieurs voies métaboliques différentes d'une souche à l'autre, et pouvant parfois être induites par des composés chlorés ou parfois être exprimées de façon constitutive. Les résultats obtenus au cours de ce projet de maîtrise

nous indiquent que ces souches possèdent différents systèmes et qu'il serait avantageux d'utiliser des procédés de dépollution impliquant plusieurs souches différentes afin d'optimiser la déshalogénéation des composés chlorés présents dans un milieu.

6. BIBLIOGRAPHIE

- Afanas'eva, E. V. and V. A. Kostyrko (1986). "Pentachlorophenol inhibition of succinate oxidation by the respiratory chain in submitochondrial particles from the bovine heart." *Biokhimiia* **51**(5): 823-9.
- Ahlborg, U. G. and T. M. Thunberg (1980). "Chlorinated phenols: occurrence, toxicity, metabolism, and environmental impact." *Crit Rev Toxicol* **7**(1): 1-35.
- Berks, B. C. (1996). "A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors." *Mol Microbiol* **22**(3): 393-404.
- B. Walsh, J. (1999). "A feasibility study of bioremediation in a highly organic soil." Mémoire de maîtrise, Worcester Polytechnic Institute.
- Bouchard, B., R. Beaudet, R. Villemur, G. McSween, F. Lepine and J. G. Bisailon (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): 1010-5.
- Boyd, S.A., D.R. Shelton, D. Berry et J.M. Tiedje (1983). "Anaerobic degradation of phenolic compound in digest sludge." *Appl Environ Microbiol* **46**(1):50-4.
- Boyer, A., R. Page-BeLanger, M. Saucier, R. Villemur, F. Lepine, P. Juteau and 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**(Pt 1): 297-303.
- Boyer, A. (1999). "Étude des déshalogénases I et II produites par *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1." Mémoire de maîtrise, Université du Québec, INRS-Institut Armand-Frappier.
- Breitenstein, A., A. Saano, M. Salkinoja-Salonen, J. R. Andreesen and 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): 133-42.
- Bruschi, M. and F. Guerlesquin (1988). "Structure, function and evolution of bacterial ferredoxins." *FEMS Microbiol Rev* **4**(2): 155-75.
- Cascorbi, I. and M. Foret (1991). "Interaction of xenobiotics on the glucose-transport system and the Na⁺/K⁺-ATPase of human skin fibroblasts." *Ecotoxicol Environ Saf* **21**(1): 38-46.
- Christiansen, N. and 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 and G. Diekert (1998). "Purification and characterization of the 3-chloro-4-hydroxy-phenylacetate reductive dehalogenase of *Desulfitobacterium hafniense*." *FEBS Lett* **436**(2): 159-62.

- Coad, S. and R. C. Newhook (1992). "PCP exposure for the Canadian general population: a multimedia analysis." *J Expo Anal Environ Epidemiol* **2**(4): 391-413.
- Cole, J. R., B. Z. Fathepure and J. M. Tiedje (1995). "Tetrachloroethene and 3-chlorobenzoate dechlorination activities are co-induced in *Desulfomonile tiedjei* DCB-1." *Biodegradation* **6**(2): 167-72.
- Dennie, D., I. I. Gladu, F. Lepine, R. Villemur, J. Bisailon and R. Beaudet (1998). "Spectrum of the reductive dehalogenation activity of *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1." *Appl Environ Microbiol* **64**(11): 4603-6.
- Dua, M., A. Singh, N. Sethunathan and A. K. Johri (2002). "Biotechnology and bioremediation: successes and limitations." *Appl Microbiol Biotechnol* **59**(2-3): 143-52.
- Duguay, M. (2003). "Étude protéomique de *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 lors de la déshalogénéation du 3,5-dichlorophénol." Mémoire de maîtrise, Université du Québec, INRS-Institut Armand-Frappier.
- Exon, J. H. (1984). "A review of chlorinated phenols." *Vet Hum Toxicol* **26**(6): 508-20.
- Fathepure, B., J. Nengu and S. Boyd (1987). "Anaerobic bacteria that dechlorinate perchloroethene." *Appl Environ Microbiol* **53**(11): 2671-4.
- Fetzner, S. (1998). "Bacterial dehalogenation." *Appl Microbiol Biotechnol* **50**(6): 633-57.
- Fetzner, S. and F. Lingens (1994). "Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics, and biotechnological applications." *Microbiol Rev* **58**(4): 641-85.
- Fisher, B. (1991). "Pentachlorophenol: Toxicology and Environment Fate." *Journal of Pesticide reform* **11**(1): 2-5.
- Gerhard, I., A. Frick, B. Monga and B. Runnebaum (1999). "Pentachlorophenol exposure in women with gynecological and endocrine dysfunction." *Environ Res* **80**(4): 383-8.
- Gerritse, J., O. Drzyzga, G. Kloetstra, M. Keijmel, L. P. Wiersum, R. Hutson, M. D. Collins and J. C. Gottschal (1999). "Influence of different electron donors and acceptors on dehalorespiration of tetrachloroethene by *Desulfitobacterium frappieri* TCE1." *Appl Environ Microbiol* **65**(12): 5212-21.
- Gerritse, J., V. Renard, T. M. Pedro Gomes, P. A. Lawson, M. D. Collins and 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): 132-40.

- Gerritse, J., V. Renard, J. Visser and J. C. Gottschal (1995). "Complete degradation of tetrachloroethene by combining anaerobic dechlorinating and aerobic methanotrophic enrichment cultures." *Appl Microbiol Biotechnol* **43**(5): 920-8.
- Gribble, G. W. (2003). "The diversity of naturally produced organohalogens." *Chemosphere* **52**(2): 289-97.
- Hardman, D. J. (1991). "Biotransformation of halogenated compounds." *Crit Rev Biotechnol* **11**(1): 1-40.
- Hattemer-Frey, H. A. and C. C. Travis (1989). "Pentachlorophenol: environmental partitioning and human exposure." *Arch Environ Contam Toxicol* **18**(4): 482-9.
- Holliger, C., D. Hahn, H. Harmsen, W. Ludwig, W. Schumacher, B. Tindall, F. Vazquez, N. Weiss and 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): 313-21.
- Holliger, C. and 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 and A. J. Zehnder (1993). "A highly purified enrichment culture couples the reductive dechlorination of tetrachloroethene to growth." *Appl Environ Microbiol* **59**(9): 2991-7.
- Holliger, C., G. Wohlfarth and G. Diekert (1999). "Reductive dechlorination into the energy metabolism of anaerobic bacteria." *FEMS Microbiol Rev* **22**: 383-398.
- Hoos, R. A. W. (1978). "Patterns of PCP usage in Canada-an overview." *Chemistry, pharmacology and environmental toxicology* Éditeur: Rao, K.R. Plenum Press, New-York: 402.
- Jacobson, J. L. and S. W. Jacobson (1997). "Teratogen update: polychlorinated biphenyls." *Teratology* **55**(5): 338-47.
- Jaga, K. and D. Brosius (1999). "Pesticide exposure: human cancers on the horizon." *Rev Environ Health* **14**(1): 39-50.
- Janssen, D. B., J. E. Oppentocht and G. J. Poelarends (2001). "Microbial dehalogenation." *Curr Opin Biotechnol* **12**(3): 254-8.
- Jorens, P. G., J. J. Janssens, W. I. van Tichelen, W. van Paesschen, P. P. de Deyn and P. J. Schepens (1991). "Pentachlorophenol concentrations in human cerebrospinal fluid." *Neurotoxicology* **12**(1): 1-7.

- Juteau, P., R. Beaudet, G. McSween, F. Lépine, S. Milot and J.-G. Bisailon (1995). "Anaerobic biodegradation of pentachlorophenol by methanogenic consortium." *Appl Microbiol Biotechnol* **44**: 218-224.
- Karamanev, D. G., C. Chavarie and R. Samson (1998). "Soil immobilization: new concept for biotreatment of soil contaminants." *Biotechnol Bioeng* **57**(4): 471-6.
- Karmaus, W. and N. Wolf (1995). "Reduced birthweight and length in the offspring of females exposed to PCDFs, PCP, and lindane." *Environ Health Perspect* **103**(12): 1120-5.
- Kato, H., K. Sato and C. Furusaka (1981). "Distribution of PCP and its effect on the change in number of aerobic bacteria in waterlogged soil." *J Pestic Sci* **6**: 37-42.
- Kishino, T. and K. Kobayashii (1996). "Studies on the mechanism of toxicity of chlorophenols found in fish through quantitative structure-activity relationship." *Water Res* **30**: 393-399.
- Krasotkina, J., T. Walters, K. A. Maruya and S. W. Ragsdale (2001). "Characterization of the B12- and iron-sulfur-containing reductive dehalogenase from *Desulfitobacterium chlororespirans*." *J Biol Chem* **276**(44): 40991-7.
- Lanthier, M., R. Villemur, F. Lepine, J. Bisailon and R. Beaudet (2001). "Geographic distribution of *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 and *Desulfitobacterium* sp. in soils from the province of Québec, Canada." *FEMS Microbiol Ecol* **36**(2-3): 185-191.
- Lee, M. D., J. M. Odom and R. J. Buchanan, Jr. (1998). "New perspectives on microbial dehalogenation of chlorinated solvents: insights from the field." *Annu Rev Microbiol* **52**: 423-52.
- Loffler, F. E., R. A. Sanford and T. J.M. (1996). "Initial characterization of a reductive dehalogenase from *Desulfitobacterium chlororespirans* Co23." *Appl Environ Microbiol* **62**(10): 3809-3813.
- Louie, T. M. and W. W. Mohn (1999). "Evidence for a chemiosmotic model of dehalorespiration in *Desulfomonile tiedjei* DCB-1." *J Bacteriol* **181**(1): 40-6.
- Louie, T. M., S. Ni, L. Xun and 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): 520-7.
- Madsen, T. and H. Aamand (1992). "Anaerobic transformation and toxicity of trichlorophenols in a stable enrichment culture." *Appl Environ Microbiol* **58**: 557-61.
- Madsen, T. and D. Licht (1992). "Isolation and characterization of an anaerobic chlorophenol-transforming bacterium." *Appl Environ Microbiol* **58**: 2874-8.

- Magnuson, J. K., M. F. Romine, D. R. Burris and M. T. Kingsley (2000). "Trichloroethene reductive dehalogenase from *Dehalococcoides ethenogenes*: sequence of *tceA* and substrate range characterization." *Appl Environ Microbiol* **66**(12): 5141-7.
- Magnuson, J. K., R. V. Stern, J. M. Gossett, S. H. Zinder and D. R. Burris (1998). "Reductive dechlorination of tetrachloroethene to ethene by a two-component enzyme pathway." *Appl Environ Microbiol* **64**(4): 1270-5.
- Marsh, E. N. and D. E. Holloway (1992). "Cloning and sequencing of glutamate mutase component S from *Clostridium tetanomorphum*. Homologies with other cobalamin-dependent enzymes." *FEBS Lett* **310**(2): 167-70.
- Maroni, M., C. Colosio, A. Ferioli and A. Fait (2000). "Biological Monitoring of Pesticide Exposure: a review. Introduction." *Toxicology* **143**(1): 1-118.
- Maymo-Gatell, X., Y. Chien, J. M. Gossett and S. H. Zinder (1997). "Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene." *Science* **276**(5318): 1568-71.
- Megharaj, M., I. Singleton and N. C. McClure (1998). "Effect of pentachlorophenol pollution towards microalgae and microbial activities in soil from a former timber processing facility." *Bull Environ Contam Toxicol* **61**(1): 108-115.
- Miller, E., G. Wohlfarth and G. Diekert (1997). "Comparative studies on tetrachloroethene reductive dechlorination mediated by *Desulfitobacterium* sp. strain PCE-S." *Arch Microbiol* **168**(6): 513-9.
- Miller, E., G. Wohlfarth and G. Diekert (1998). "Purification and characterization of the tetrachloroethene reductive dehalogenase of strain PCE-S." *Arch Microbiol* **169**(6): 497-502.
- Mohn, W. W. and K. J. Kennedy (1992). "Reductive dehalogenation of chlorophenols by *Desulfomonile tiedjei* DCB-1." *Appl Environ Microbiol* **58**(4): 1367-70.
- Mohn, W. W. and J. M. Tiedje (1990). "Strain DCB-1 conserves energy for growth from reductive dechlorination coupled to formate oxidation." *Arch Microbiol* **153**(3): 267-71.
- National Toxicology Program (1977). "Bioassay of Lindane for Possible Carcinogenicity (CAS No. 58-89-9)." *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser* **14**: 1-99.
- Neumann, A., G. Wohlfarth and G. Diekert (1996). "Purification and characterization of tetrachloroethene reductive dehalogenase from *Dehalospirillum multivorans*." *J Biol Chem* **271**(28): 16515-9.
- Neumann, A., G. Wohlfarth and 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): 4140-5.

- Ni, S., J. K. Fredrickson and 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): 5135-9.
- Niggemyer, A., S. Spring, E. Stackebrandt and 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): 5568-80.
- Pagé-Bélanger, R. (2002). "Étude protéomique de *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 lors de l'induction pour la déshalogénéation réductrice en position *ortho* du 2,4,6-TCP." Mémoire de maîtrise, Université du Québec, INRS-Institut Armand-Frappier.
- Pollitt, F. (1999). "Polychlorinated dibenzodioxins and polychlorinated dibenzofurans." *Regul Toxicol Pharmacol* **30**(2 Pt 2): S63-8.
- Roberts, H. J. (1990). "Pentachlorophenol-associated aplastic anemia, red cell aplasia, leukemia and other blood disorders." *J Fla Med Assoc* **77**(2): 86-90.
- Sandau, C. D., P. Ayotte, E. Dewailly, J. Duffe and R. J. Norstrom (2002). "Pentachlorophenol and hydroxylated polychlorinated biphenyl metabolites in umbilical cord plasma of neonates from coastal populations in Quebec." *Environ Health Perspect* **110**(4): 411-7.
- Sanford, R. A., J. R. Cole, F. E. Löffler and 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): 3800-8.
- Santini, C. L., B. Ize, A. Chanal, M. Muller, G. Giordano and L. F. Wu (1998). "A novel sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*." *Embo J* **17**(1): 101-12.
- Scholz-Muramatsu, H., A. Neumann, M. Messmer, E. Moore and G. Diekert (1995). "Isolation and characterization of *Dehalospirillum multivorans* gen. nov., sp., a tetrachloroethene-utilizing, strictly anaerobic bacterium." *Arch Microbiol* **163**: 48-56.
- Schumacher, W. and C. Holliger (1996). "The proton/electron ration of the menaquinone-dependent electron transport from dihydrogen to tetrachloroethene in *Dehalobacter restrictus*." *J Bacteriol* **178**(8): 2328-33.
- Schumacher, W., C. Holliger, A. J. Zehnder and W. R. Hagen (1997). "Redox chemistry of cobalamin and iron-sulfur cofactors in the tetrachloroethene reductase of *Dehalobacter restrictus*." *FEBS Lett* **409**(3): 421-5.
- Shelton, D. R. and J. M. Tiedje (1984). "Isolation and partial characterization of bacteria in an anaerobic consortium that mineralises 3-chlorobenzoic acid." *Appl Microbiol Biotechnol* **48**: 840-848.

Siebert, A., A. Neumann, T. Schubert and 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): 443-9.

Smejtek, P., A. W. Barstad and K. Hsu (1987). "Dielectric properties of adsorption/ionization site of pentachlorophenol in lipid membranes." *Biochim Biophys Acta* **902**(1): 109-27.

Smejtek, P., S. R. Wang and A. W. Barstad (1987). "Adsorption of ionized and neutral pentachlorophenol to phosphatidylcholine membranes." *Biochim Biophys Acta* **905**(1): 213-221.

Smidt, H., M. van Leest, J. van der Oost and W. M. de Vos (2000). "Transcriptional regulation of the *cpr* gene cluster in *ortho*-chlorophenol-respiring *Desulfitobacterium dehalogenans*." *J Bacteriol* **182**(20): 5683-91.

Suyama, A., M. Yamashita, S. Yoshino and K. Furukawa (2002). "Molecular characterization of the PceA reductive dehalogenase of *Desulfitobacterium* sp. strain Y51." *J Bacteriol* **184**(13): 3419-25.

Suyama, A., R. Iwakiri, K. Kai, T. Tokunaga, N. Sera and K. Furukawa (2001). "Isolation and characterization of *Desulfitobacterium* sp. strain Y51 capable of efficient dehalogenation of tetrachloroethene and polychloroethanes." *Biosci Biotechnol Biochem* **65**(7): 1474-81.

Thibodeau, J. (2003). "Étude de la déshalogénase II de *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1." Mémoire de maîtrise, Université du Québec, INRS-Institut Armand-Frappier.

Tiedje, J. M. and F. E. Löffler (1999). "Complete detoxification of short chain chlorinated aliphatic compounds: Isolation of halo-respiring organisms and biochemical studies of the dehalogenating enzymes systems." Rapport non publié, Université du Michigan.

Tisch, M., A. Lohmeier, P. Schmezer, H. Bartsch and H. Maier (2001). "Genotoxic effect of the insecticides pentachlorophenol and lindane on human nasal mucosal epithelium." *Dtsch Med Wochenschr* **126**(30): 840-4.

Umemura, T., S. Kai, R. Hasegawa, K. Sai, Y. Kurokawa and G. M. Williams (1999). "Pentachlorophenol (PCP) produces liver oxidative stress and promotes but does not initiate hepatocarcinogenesis in B6C3F1 mice." *Carcinogenesis* **20**(6): 1115-20.

Utkin, I., C. Woese and 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): 612-9.

van de Pas, B. A., J. Gerritse, W. M. de Vos, G. Schraa and A. J. Stams (2001a). "Two distinct enzyme systems are responsible for tetrachloroethene and chlorophenol

reductive dehalogenation in *Desulfitobacterium* strain PCE1." Arch Microbiol **176**(3): 165-9.

van de Pas, B. A., S. H., W. R. Hagen, G. Schraa, A. J. Stams and W. M. de Vos (1999b). "Regulation and properties of *ortho*-chlorophenol reductive dehalogenase of *Desulfitobacterium dehalogenans*."

van de Pas, B. A., H. J. Harmsen, G. C. Raangs, W. M. de Vos, G. Schraa and A. J. Stams (2001b). "A *Desulfitobacterium* strain isolated from human feces that does not dechlorinate chloroethenes or chlorophenols." Arch Microbiol **175**(6): 389-94.

van de Pas, B. A., H. Smidt, W. R. Hagen, J. van der Oost, G. Schraa, A. J. Stams and W. M. de Vos (1999a). "Purification and molecular characterization of *ortho*-chlorophenol reductive dehalogenase, a key enzyme of halorespiration in *Desulfitobacterium dehalogenans*." J Biol Chem **274**(29): 20287-92.

Veningerova, M., J. Uhnak, V. Prachar and J. Kovacicova (1996). "Chlorinated phenols in human milk." Z Lebensm Unters Forsch **203**(3): 309-10.

Villemur, R., M. Saucier, A. Gauthier and 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.

von Wintzingerode, F., C. Schlotelburg, R. Hauck, W. Hegemann and U. B. Gobel (2001). "Development of primers for amplifying genes encoding CprA- and PceA-like reductive dehalogenases in anaerobic microbial consortia, dechlorinating trichlorobenzene and 1,2-dichloropropane." FEMS Microbiol Ecol **35**(2): 189-196.

Wolf, J., P. Schmezer, D. Fengel, H. G. Schroeder, H. Scheithauer and P. Woeste (1998). "The role of combination effects on the etiology of malignant nasal tumours in the wood-working industry." Acta Otolaryngol Suppl **535**: 1-16.

World Health Organization (1987). "Pentachlorophenol. Environmental health criteria 71." Éditeur: United Nations Environment Programme, International Labour Organization et World Health Organization, Finland.