Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

Caractérisation de la souche LR 7.2 impliquée dans la transformation anaérobie du phénol et du 4-hydroxybenzoate en benzoate

Par
Valérie Côté

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

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Dr. François Lépine INRS-Institut Armand-Frappier
Examinateur externe	André Morin Imperial Tobacco Canada
Directeur de recherche	Dr. Jean-Guy Bisaillon INRS-Institut Armand-Frappier
Codirecteur de recherche	Dr. Pierre Juteau INRS-Institut Armand-Frappier

© droits réservés de Valérie Côté

Résumé

Plusieurs composés sont d'importants polluants de l'environnement tels les composés aromatiques. Certains de ces composés aromatiques sont solubles et persistants dans l'environnement. Ils sont également toxiques. Parmi ces composés, le phénol constitue un problème majeur puisqu'il est produit en quantité importante par plusieurs industries dont les raffineries de pétrole, les papetières et les industries pharmaceutiques. Il constitue un véritable danger pour la faune et la flore ainsi que pour la santé humaine.

Le but visé par ce projet de maîtrise était la caractérisation de la souche LR 7.2 suite à son isolement en culture pure sur milieu semi-solide. La souche LR7.2 est une bactérie anaérobie stricte Gram-positive transformant le phénol et le 4-hydroxybenzoate en benzoate. Cet organisme serait le premier intervenant dans le processus de minéralisation du phénol en conditions méthanogènes. La souche LR 7.2 est la seule bactérie de ce type à avoir été isolée en culture pure à ce jour. Lorsqu'elle est cultivée en présence de 4-hydroxybenzoate, ce dernier est transformé en phénol via une décarboxylation en position *para*. Ensuite, le phénol est transformé à nouveau en 4-hydroxybenzoate par carboxylation, lequel est par la suite déshydroxylé en benzoate. La principale source de carbone et d'énergie permettant la croissance de cette souche est l'extrait de levures. C'est une souche qui a une croissance extrêmement faible (10^6 bactéries/mL au maximum) et qui nécessite la présence d'un surnageant de culture de *Clostridium sporogenes* M55. La comparaison de la séquence du gène de son ARN 16S avec celles contenues dans les banques de données indique que la souche LR 7.2 n'est apparentée à aucune espèce cultivable. L'activité de transformation du 4-hydroxybenzoate est essentielle pour la croissance de la souche. Il s'agirait donc d'une forme de respiration anaérobie impliquant le 4-hydroxybenzoate ou le phénol comme accepteur d'électrons. De plus, elle n'utilise aucun accepteur d'électrons inorganique. L'hydrogène gazeux ne sert pas de donneur d'électrons puisqu'il n'est pas essentiel pour sa croissance et son activité. Une température de 37°C et un pH entre 7.5 et 8 permettent d'avoir une croissance et une activité optimales. L'ensemble de ces travaux suggère que la souche LR 7.2 appartient à un nouveau genre bactérien. Ces travaux auront servi à mieux comprendre cette souche qui a une ac-

tivité particulière et à lui assigner une position taxonomique précise se rapprochant phylogéniquement des espèces bactériennes incluent dans les genres *Desulfotomaculum*, *Desulfosporosinus*, *Moorella* et *Desulfitobacterium*.

Valérie Côté

Jean-Guy Bisaillon

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche Jean-Guy Bisaillon ainsi que mon codirecteur de recherche Pierre Juteau pour leurs judicieux conseils, les connaissances qu'ils m'ont transmises et leurs nombreux encouragements. Un gros merci également à Louis Racine pour son excellent support technique et moral et pour ses nombreuses blagues. Merci à Annie, à Danielle et à tout le groupe de l'environnement pour vos conseils, votre support et votre amitié. Ce fut réellement un plaisir de travailler et de partager de beaux moments avec vous tous.

Un merci spécial à toute ma famille et à Steve pour votre présence et votre appui continus.

Merci à tous !

Table des matières

Résumé.....ii
Remerciements.....iv
Table des matières.....v
Liste des figures.....ix
Liste des tableaux.....xi
Liste des abréviations.....xii
Introduction.....1
1. Revue de littérature.....4
1.1 Les composés aromatiques.....5
1.2 Le phénol.....5
1.3 Biodégradation des composés aromatiques.....7
1.3.1 Biodégradation aérobie.....7
1.3.2 Biodégradation anaérobie.....7
1.3.3 Stratégie générale de dégradation des composés aromatiques en conditions anaérobies.....9
1.4 Différents métabolismes de dégradation anaérobie des composés aromatiques.....12
1.4.1 Le photométabolisme.....12
1.4.2 La réduction du nitrate.....15
1.4.3 La réduction du sulfate.....16
1.4.4 La fermentation.....16
1.5 Biodégradation anaérobie du phénol.....19
1.5.1 Voie de réduction.....19
1.5.2 Voie de phosphorylation.....21
1.5.3 Voie de carboxylation.....21
1.6 Bactéries dégradant le phénol, autres que la souche LR 7.2.....24
1.7 Bactéries dégradant le 4-hydroxybenzoate, autres que la souche LR 7.2.....29
1.8 La souche LR 7.2.....30
1.9 Enzymes impliquées dans la voie de carboxylation.....34
2. Matériel et méthodes.....35

2.1 Souches bactériennes utilisées et conditions de culture 36
2.1.1 Souche LR 7.2 36
2.1.2 Souche 6 36
2.1.3 Clostridium sporogenes M-55 37
2.2 Milieux de culture 37
2.2.1 Milieu de Boyd modifié 37
2.2.2 Surnageant de la souche 6 ou de *Clostridium sporogenes* M55 39
2.3 Méthodes analytiques 39
2.3.1 Suivi du phénol, du 4-OHB et du benzoate par GC-FID 39
2.3.2 Suivi du [D_4]-4-OHB par GC-MS 40
2.3.3 Suivi des analogues du 4-OHB et de différents composés phénoliques par HPLC 40
2.3.4 Suivi de la croissance par densité optique 41
2.4 Caractérisation physiologique de la souche LR 7.2 41
2.4.1 Milieux exempts du précipité FeS 41
2.4.2 Comparaison entre le surnageant de culture de la souche 6 et celui de *Clostridium sporogenes* M55 42
2.4.3 Ajout de $Na_2S_2O_4$ au milieu de culture 42
2.4.4 Barbotage des milieux de culture avec différents mélanges gazeux 42
2.4.5 Variation de la concentration en 4-hydroxybenzoate 43
2.4.6 Variation de la concentration en phénol 43
2.4.7 Ajout d'extrait de levures, de surnageant et de milieu de culture 44
2.4.8 Détermination du pH optimal 44
2.4.9 Détermination de la température optimale 44
2.4.10 Accepteurs d'électrons 44
2.4.11 Analogues du 4-OHB et du phénol 45
2.4.12 Ajout de [D_6]-phénol 46
2.5 Caractérisation génétique de la souche LR 7.2 46
2.5.1 Détermination du contenu en G + C 46
2.5.2 Détermination de la séquence du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S 48
2.6 Vérification de l'identité de *C. sporogenes* M 55 52

2.7 Caractérisation morphologique de la souche LR 7.2 52
2.7.1 Résistance à la chaleur et coloration au vert de malachite 52
2.7.2 Analyse des acides gras membranaires 53
2.7.3 Observations au microscope électronique 53
3. Résultats 54
3.1 Caractérisation physiologique de la souche LR 7.2 55
3.1.1 Activité de la souche LR 7.2 en conditions standards 55
3.1.2 Milieux sans précipité FeS 55
3.1.3 Comparaison entre le surnageant de culture de la souche 6 et celui de *C. sporogenes* M 55 58
3.1.4 Ajout de dithionite de sodium comme agent réducteur 58
3.1.5 Barbotage des milieux de culture avec différents mélanges gazeux 58
3.1.6 Variation de la concentration en 4-hydroxybenzoate 61
3.1.7 Variation de la concentration en phénol 61
3.1.8 Comparaison entre le phénol et le 4-hydroxybenzoate 65
3.1.9 Lien entre l'activité et la croissance 65
3.1.10 Ajout d'extrait de levures, de surnageant et de milieu de culture 65
3.1.11 Détermination du pH optimal 69
3.1.12 Détermination de la température optimale 69
3.1.13 Accepteurs d'électrons 69
3.1.14 Différentes concentrations en sulfite et sulfate 74
3.1.15 Spectre d'activité 74
3.1.16 Ajout de [D_6]-phénol 78
3.2 Caractérisation génétique de la souche LR 7.2 82
3.2.1 Contenu en G+C 82
3.2.2 Séquence nucléique codant pour l'ARNr 16S 82
3.3 Vérification de l'identité de *C. sporogenes* M 55 82
3.4 Caractérisation morphologique de la souche LR 7.2 84
3.4.1 Analyse des acides gras membranaires 84
3.4.2 Sporulation 84
3.4.3 Observations en microscopie électronique de la souche LR 7.2 84

4. Discussion 87
4.1 Optimisation des conditions de culture 88
4.1.1 Réduction du FeS 88
4.1.2 Effet du $Na_2S_2O_4$ 88
4.1.3 Effet des surnageants de *C. sporogenes* M55 et de la souche 6 89
4.1.4 Effet de l'ajout de surnageant, de milieu de culture et d'extrait de levures 90
4.1.5 Effet de la concentration en 4-hydroxybenzoate 91
4.1.6 Effet de la concentration en phénol 92
4.2 Caractérisation physiologique et morphologique 92
4.2.1 Accepteurs d'électrons 92
4.2.2 Lien entre croissance et activité 95
4.2.3 Confirmation de la voie biochimique 97
4.2.4 Spectre d'activité 98
4.2.5 Effet de l'hydrogène 99
4.2.6 pH et température optimaux 100
4.2.7 Sporulation 100
4.2.8 Acides gras membranaires 101
4.2.9 Microscopie 101
4.3 Caractérisation génétique 102
4.3.1 Gène de l'ADNr 16S 102
4.3.2 Pourcentage en G + C 102
4.4 Position taxonomique 103
4.5 Confirmation de l'identité de *Clostridium sporogenes* M55 103
Conclusion 105
Références 109

Liste des figures

Figure 1 : Structure chimique du phénol.....6

Figure 2 : Intermédiaires centraux de dégradation des composés aromatiques en conditions aérobies.....8

Figure 3 : Intermédiaires centraux de dégradation des composés aromatiques en conditions anaérobies.....10

Figure 4 : Stratégie de canalisation des composés aromatiques en conditions anaérobies.....11

Figure 5 : Transformation du benzoate par photométabolisme chez *Rhodopseudomonas palustris*.....14

Figure 6 : Groupes bactériens impliqués dans la fermentation méthanique de composés organiques complexes.....18

Figure 7 : Voie de réduction du catéchol par le consortium méthanogène de Balba et Evans.....20

Figure 8 : Voie de phosphorylation chez *Thauera aromatica*.....22

Figure 9 : Voie de carboxylation du phénol utilisée par *S. hydroxybenzoïcus*, la souche GS-15 et la souche LR 7.2.....27

Figure 10 : Voie de dégradation du phénol observée chez le consortium méthanogène de Beaudet et al.....32

Figure 11 : Activité de transformation du 4-hydroxybenzoate en benzoate par la souche LR 7.2 sous des conditions standards.....56

Figure 12 : Effet de milieux sans précipité FeS sur l'activité de la souche LR 7.2.....57

Figure 13 : Comparaison entre le surnageant de culture de *C. sporogenes* M55 et celui de la souche 6.....59

Figure 14 : Effet du dithionite de sodium sur l'activité de la souche LR 7.2.....60

Figure 15 : Effet de la composition du mélange gazeux sur l'activité (A) et sur la croissance (B) de la souche LR 7.2.....62

Figure 16 : Effet de la concentration en 4-hydroxybenzoate sur la croissance et l'activité de la souche LR 7.2.....63

Figure 17 : Effet de la concentration en phénol sur la croissance et l'activité de la souche LR 7.2.....64

Figure 18 : Comparaison entre le phénol et le 4-hydroxybenzoate.....66

Figure 19 : Transformation du 4-OHB et du phénol, accumulation du benzoate et croissance de la souche LR 7.2 en fonction du temps.....67

Figure 20 : Effet de l'ajout d'extrait de levures, de surnageant de *C. sporogenes* M55 et de milieux de culture BM2 sur l'activité (A) et la croissance (B) de la souche LR 7.2.....68

Figure 21 : Effet du pH sur l'activité (A) et la croissance (B) de la souche LR 7.2.....70

Figure 22 : Effet de la température sur l'activité (A) et la croissance (B) de la souche LR 7.2.....71

Figure 23 : Effet des accepteurs potentiels d'électrons en présence de 4-hydroxy-benzoate sur l'activité (A) et la croissance (B) de la souche LR 7.2.....72

Figure 24 : Effet des accepteurs potentiels d'électrons en absence de 4-hydroxy-benzoate sur la croissance de la souche LR 7.2.....73

Figure 25 : Effet de différentes concentrations en sulfite sur l'activité et la croissance de la souche LR 7.2.....75

Figure 26 : Effet de différentes concentrations en sulfate sur l'activité et la croissance de la souche LR 7.2.....76

Figure 27 : Effet de différents composés analogues au 4-hydroxybenzoate sur la crois-sance de la souche LR 7.2.....77

Figure 28 : Effet de différents composés analogues au phénol sur la croissance de la souche LR 7.2.....79

Figure 29 : Suivi du [D_4]-4-OHB dans des cultures de la souche LR 7.2 ayant reçu du [D_6]-Phénol.....80

Figure 30 : Spectre de masses d'un standard de 4-OHB.....81

Figure 31 : Microscopie électronique en coupe mince de la souche LR 7.2.....86

Liste des tableaux

Tableau 1 : Potentiels d'oxydoréduction associés aux principaux métabolismes utilisés par les bactéries présentes dans l'environnement.....13

Tableau 2 : Valeurs des aires sous la courbe obtenues pour chacun des désoxy-ribonucléosides.....83

Tableau 3: Séquences les plus apparentées à l'ADNr de la souche LR 7.2.....83

Tableau 4: Séquences les plus apparentées à l'ADNr 16S de C. sporogenes M55...85

Tableau 5 : Acides gras membranaires présents chez la souche LR 7.2 et leur intensité relative.....85

Liste des abréviations

D_6-phénol : Phénol deutéré 6x

D_4-benzoate : Benzoate deutéré 4x

D_4-4-OHB: 4-hydroxybenzoate deutéré 4x

dNTP: Desoxynucléotide triphosphate

G + C: Guanine + Cytosine

GC-FID : Chromatographe en phase gazeuse couplé à un détecteur à ionisation à la flamme

GC-MS : Chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse

HPLC : Chromatographe liquide à haute performance

4-OHB : 4-hydroxybenzoate

4-OHB-DC : 4-hydroxybenzoate décarboxylase

PCR: Polymerase chain reaction

Introduction

Depuis l'ère agricole et industrielle, plusieurs polluants générés par l'homme ont été répandus dans l'environnement. Parmi ceux-ci, les composés aromatiques occupent une place importante. Malgré le fait que la majorité d'entre eux soit générée par l'activité humaine, une partie de ces composés est présente naturellement dans l'environnement. Leur caractère toxique constitue un danger pour l'homme, la faune et la flore. De plus, ce sont des composés persistants puisqu'ils sont chimiquement stables. Dans la famille des composés aromatiques, le phénol et ses dérivés font partie des polluants les plus répandus dans l'environnement. En effet, le phénol est le composé aromatique le plus produit et utilisé au monde (Boopathy, 1997). Sa forte toxicité et sa présence en grande quantité au niveau de l'eau, du sol et de l'air constituent un véritable danger pour la santé humaine. Il a donc été désigné comme un polluant prioritaire (EPA, 1998). Ainsi, l'élimination des composés aromatiques de l'environnement, plus particulièrement celle du phénol, présente un intérêt majeur pour la conservation d'un environnement propre et sain pour la vie terrestre.

Plusieurs méthodes ont été développées afin d'éliminer les principaux polluants de l'environnement. Ces méthodes se regroupent en trois catégories : les méthodes chimiques, physiques et biologiques. Les méthodes chimiques et physiques sont couramment utilisées, mais elles sont coûteuses et la plupart d'entre elles isole et concentre le polluant, plutôt que de le détruire. Les méthodes biologiques font appel à l'utilisation de consortiums microbiens pour dégrader les composés organiques. Cependant, ces composés doivent être biodisponibles et biodégradables pour pouvoir être utilisés par les microorganismes. Contrairement aux méthodes physiques et chimiques, les méthodes biologiques permettent l'élimination complète des composés organiques puisque ceux-ci sont complètement minéralisés par un regroupement de bactéries, ayant des besoins nutritifs complexes et des relations très étroites entre elles, appelé consortium microbien. Ces techniques de biodégradation sont divisées en deux catégories : la biodégradation aérobie et anaérobie.

La biodégradation anaérobie possède plusieurs avantages puisqu'elle est plus spécialisée et moins coûteuse que la biodégradation aérobie. Elle demande une plus faible quantité d'énergie (aucune oxygénation) et produit une faible quantité de biomasse. De plus, le méthane produit lors de la méthanogénèse peut être récupéré et utilisé ultérieurement comme source d'énergie.

Contrairement à la biodégradation anaérobie, la biodégradation aérobie de plusieurs composés aromatiques a beaucoup été étudiée (Fuchs et al., 1994; Harwood et al., 1999; Powlowski et Shingler, 1994; Heider et Fuchs, 1997). Les microorganismes impliqués de même que les voies métaboliques utilisées sont donc très bien connus. Les microorganismes anaérobies ont un métabolisme plus lent et plus complexe et ils possèdent des liens indispensables avec les autres membres du consortium. Ceci explique le manque de connaissances à leur sujet.

La biodégradation anaérobie du phénol a été étudiée par plusieurs auteurs (Bak et Widdel, 1986; Kuever et al., 2001; Tschech et Fuchs, 1989 ; Shinoda et al., 2000 ; Knoll et Winter, 1989 ; Sharak Genthner, Townsend et Chapman, 1989 ; Sharak Genthner, Townsend et Chapman, 1991 ; Zhang et Wiegel, 1994 ; Karlsson, Ejlertsson et Svensson, 2000 ; Beaudet et al., 1986 ; Bisaillon et al., 1994 ; Béchard et al., 1990 ; Létourneau et al., 1995 ; Li et al., 1996). Cependant, parmi ceux qui ont étudié la carboxylation du phénol au sein de consortiums méthanogènes, Letowski (2000) a été le seul capable d'obtenir une souche (souche 7) en culture liquide apparemment pure capable de transformer le phénol. Letowski a réalisé cela en éliminant une autre souche (souche 6) qui formait avec la souche 7 une coculture. Toutefois, à cette époque, la souche 7 n'a pu être isolée sur milieu solide. Cette souche constitue le premier intervenant dans la réaction de transformation du phénol en méthane et CO_2 au sein du consortium méthanogène de Beaudet et al. (1986). Elle effectue la carboxylation du phénol en 4-hydroxybenzoate et la déshydroxylation de ce dernier en benzoate (Figure 9). Elle est également capable de transformer le 4-hydroxybenzoate en phénol via une décarboxylation. La souche 7 est donc la seule bactérie isolée d'un consortium méthanogène capable d'effectuer la transformation du phénol et du 4-hydroxybenzoate en benzoate. La seule autre bactérie présentant une

activité similaire est *Sedimentibacter hydroxybenzoïcus* isolée par Zhang et Wiegel (1994). Elle est capable de décarboxyler le 4-hydroxybenzoate en phénol, mais n'est pas capable de poursuivre la transformation de ce dernier jusqu'au benzoate. Ils ont également montré une activité de carboxylation du phénol, mais seulement à l'aide d'une suspension cellulaire concentrée et en présence d'une concentration élevée en phénol et en CO_2. Contrairement à la souche 7, le phénol n'était pas métabolisé par leur culture pure en conditions de croissance.

Des travaux d'optimisation de la croissance et de l'activité de la souche 7 ont été réalisés par Duckett (2000). Ils ont permis d'améliorer les conditions de culture et de mieux connaître cette souche. Duckett a démontré que l'ajout d'un surnageant de culture de la souche 6 ou de *Clostridium sporogenes* M55 améliorait l'activité et la stabilité de la souche 7. De plus, elle a observé que la souche était plus stable en présence de 4-hydroxybenzoate. Suite à ces travaux, la souche a donc été maintenue en présence de surnageant de culture de la souche 6 ainsi qu'en présence de 4-hydroxybenzoate. Les travaux de Duckett (2000) ont aussi permis la culture de la souche 7 en milieu semi-solide et le repiquage de colonies isolées. Une souche obtenue à la suite d'une série de repiquage a été nommée souche LR 7.2.

La poursuite de ce projet présente un intérêt scientifique puisque la souche LR 7.2 est la seule souche à présenter cette double activité de transformation du phénol et du 4-hydroxybenzoate en benzoate et que les premiers résultats de caractérisation semblent indiquer que la souche LR 7.2 est une nouvelle espèce ou même un nouveau genre bactérien. L'objectif de ce projet est donc d'optimiser davantage les conditions de culture, de confirmer les résultats obtenus par Duckett (2000) et de poursuivre de façon plus approfondie la caractérisation physiologique, morphologique et génétique de la souche LR 7.2. Cette étude permettra ainsi de lui assigner une position taxonomique précise et de la désigner comme étant une nouvelle espèce ou un nouveau genre bactérien.

1. Revue de littérature

1.1 Les composés aromatiques

Plusieurs des composés aromatiques sont d'importants polluants de l'environnement. Ils sont formés d'un ou plusieurs noyaux aromatiques. Cette structure, difficilement dégradable, leur confère une très grande stabilité chimique (Evans et Fuchs, 1988). Les phénols, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les biphényles polychlorés (BPC) en sont quelques exemples. Bien que la majorité d'entre eux soit générée par l'activité humaine (industries, agriculture), plusieurs de ces composés sont d'origine naturelle tels la lignine, les acides aminés aromatiques, les quinones, les tannins et plusieurs composés phénoliques (Schink, Brune et Schnell, 1992; Breinig, Schiltz et Fuchs, 2000; Colberg et Young, 1982; Elder et Kelly, 1994). Certains composés aromatiques sont toxiques et représentent des dangers potentiels pour la santé lorsqu'ils sont retrouvés en grande quantité dans l'environnement. Par exemple, plusieurs composés chlorophénoliques sont cancérigènes (Boopathy, 1997; Boyd et al., 1983). L'élimination de ces composés toxiques des environnements contaminés peut se faire selon des méthodes physiques et chimiques, mais la plupart de ces méthodes ne règle pas le problème définitivement. Elles ne font que l'isoler, le concentrer ou entraînent la libération de produits encore plus toxiques. Plusieurs méthodes biologiques ont aussi été développées. Elles sont basées sur la dégradation de la matière organique par les microorganismes lorsque celle-ci est biodisponible et biodégradable. Elles se divisent en deux catégories : la biodégradation aérobie et anaérobie (Evans et Fuchs, 1988; Heider et Fuchs, 1997; Fuchs et al., 1994; Berry, Francis et Bollag, 1987).

1.2 Le phénol

Le phénol est le composé aromatique le plus simple de la famille des composés phénoliques. Il a été découvert en 1834 par Runge dans le goudron de houille. Il est composé d'un seul noyau aromatique (Figure 1) et a un poids moléculaire de 94,11 g/mol. Son point de fusion est de 43°C (EPA, 1998). C'est un composé relativement soluble dans l'eau. Bien que présent naturellement dans l'environnement, sa présence est due en grande partie à l'activité humaine (Montizaan, 1994). Le phénol est un des composés aromatiques le plus produit et utilisé au monde. Chaque année, 1,25 x 10^9 Kg de phénol

sont produits ou rejetés par les industries (Boopathy, 1997; Boyd et al., 1983). Il entre dans la fabrication de résines synthétiques, de teintures chimiques, de désinfectants, d'antiseptiques et de plusieurs autres composés chimiques (Montizaan, 1994). De plus, les effluents des raffineries de pétrole, des papetières et des industries pharmaceutiques et métallurgiques contiennent une quantité importante de phénol (Babich et Davis, 1981). En agriculture, il entre dans la composition de plusieurs pesticides et herbicides chimiques (Davi et Gnudi, 1999). D'autres sources de phénol telles la combustion du bois, les émanations des voitures et la fumée de cigarette contribuent à la pollution de l'environnement (Montizaan, 1994). De plus, il est un intermédiaire de la dégradation de plusieurs composés aromatiques comme le benzoate et plusieurs composés phénoliques (Paula, Schie et Young, 1998). Sa grande solubilité dans l'eau ainsi que sa forte toxicité (Boyd et al., 1983; Powlowski et Shingler, 1994) font en sorte qu'il est un des plus importants polluants des eaux souterraines. Sa présence dans plusieurs environnements constitue un véritable danger pour la santé humaine. Une exposition des voies cutanées, buccales et respiratoires peut entraîner divers symptômes. Tout dépendant de la durée d'exposition et de la dose, les problèmes engendrés vont de la simple irritation de la peau à des complications plus sévères comme des dommages cardio-vasculaires, neurotoxiques ainsi qu'au foie et aux reins pouvant entraîner la mort dans certains cas. Étant donné que le phénol est toxique pour l'humain, la faune et la flore, il a été désigné comme étant un polluant prioritaire et est soumis à une législation très stricte (EPA, 1998).

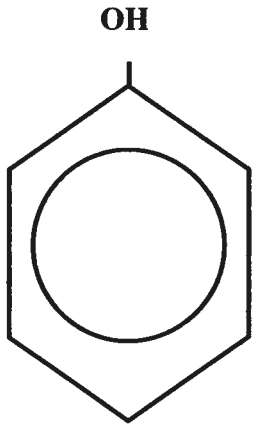


Figure 1 : Structure chimique du phénol

1.3 Biodégradation des composés aromatiques

1.3.1 Biodégradation aérobie

La présence d'oxygène est obligatoire pour que les microorganismes aérobies transforment la matière organique. La biodégradation aérobie se divise en deux étapes. Tout d'abord, les composés aromatiques sont transformés par des monooxygénases et dioxygénases en des intermédiaires centraux de dégradation tels le catéchol, le protocatéchuate et le gentisate (Figure 2). Ensuite, ces intermédiaires hydroxylés sont clivés par une molécule d'oxygène (Fuchs et al., 1994; Harwood, 1999; Powlowski et Shingler, 1994; Heider et Fuchs, 1997).

1.3.2 Biodégradation anaérobie

Plusieurs composés aromatiques de faible poids moléculaire sont dégradés par différents groupes de bactéries anaérobies. Généralement, le cycle aromatique est attaqué par réduction et s'ouvre suite à une hydrolyse (Harwood, 1999). L'anaérobiose se définit comme étant l'état d'un environnement créé lorsque le taux de consommation en oxygène excède le taux d'entrée de ce dernier (Berry, Francis et Bollag, 1987). Dans ces conditions, les microorganismes habitant ces environnements sont privés d'oxygène et ils utilisent des voies métaboliques particulières. On y retrouve principalement la respiration anaérobie, la fermentation et la méthanogénèse (Berry et al, 1987). Généralement le métabolisme des microorganismes impliqués dans la biodégradation des composés aromatiques en conditions anaérobies est plus spécialisé qu'en conditions aérobies. Les réactions biochimiques impliquées génèrent également moins d'énergie que les réactions aérobies et, conséquemment, une plus faible quantité de biomasse est produite. Le principal inconvénient de la dégradation des composés aromatiques en anaérobie est sa lenteur comparativement à celle qui a lieu en aérobie.

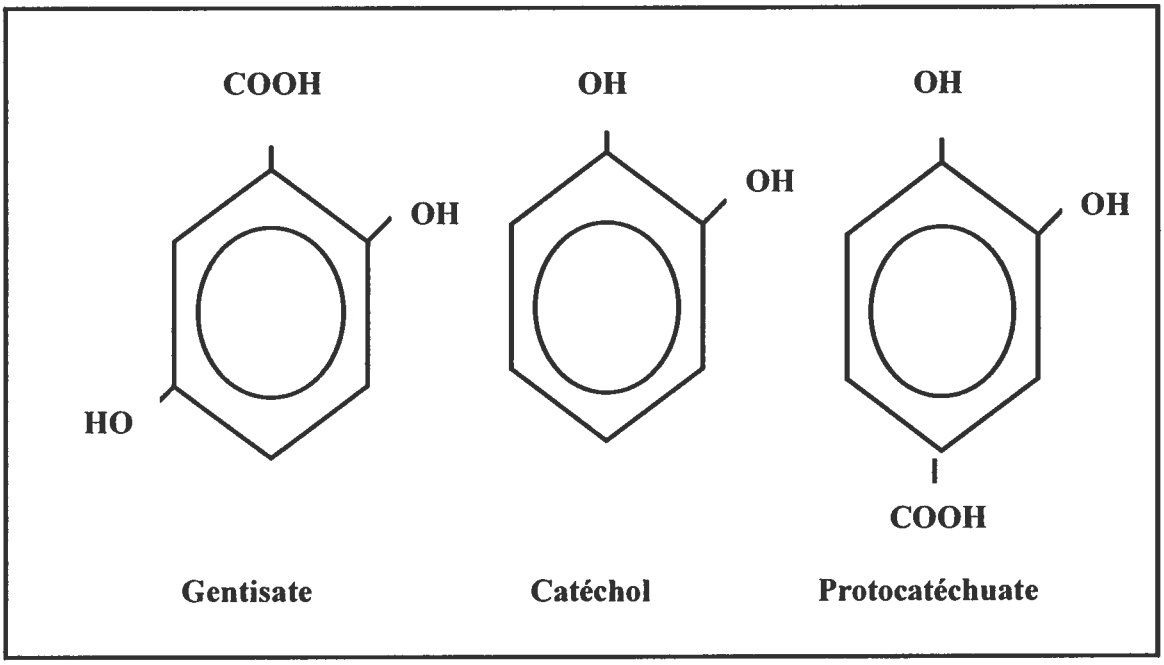


Figure 2 : Intermédiaires centraux de dégradation des composés aromatiques en conditions aérobies

1.3.3 Stratégie générale de dégradation des composés aromatiques en conditions anaérobies

Les bactéries anaérobies strictes sont capables de dégrader plusieurs types de composés aromatiques. Étant donné la faible quantité d'énergie générée lors de la dégradation anaérobie, elles ont développé une stratégie leur permettant d'utiliser un grand nombre de composés à partir de la production d'un nombre limité d'enzymes. Cette stratégie consiste à diminuer la diversité des composés aromatiques par la canalisation vers des intermédiaires centraux de dégradation. Les intermédiaires centraux connus jusqu'à présent sont : le benzoyl-CoA, le résorcinol et le phloroglucinol (Figure 3). Ceci n'exclue pas la possibilité qu'il existe d'autres intermédiaires et d'autres voies métaboliques (Heider et Fuchs, 1997 ; Fuchs et al, 1994 ; Harwood et al., 1999). Généralement, l'intermédiaire le plus fréquemment observé est le benzoyl-CoA (Koch et Fuchs, 1992). Cette voie métabolique, passant par le benzoyl-CoA, a été étudiée chez une bactérie phototrophe, *Rhodopseudomonas palustris* (Dutton et Evans, 1969; Gibson et Gibson, 1992; Koch et al., 1993; Elder et Kelly, 1994), et chez deux bactéries dénitrifiantes *Thauera aromatica* et *Azoarcus evansii* (Koch et Fuchs, 1992; Koch et al., 1993; Anders et al., 1995).

Cette stratégie de canalisation visant la biodégradation anaérobie des composés aromatiques solubles se fait en trois étapes : la phase d'activation et de diminution de la diversité moléculaire, la phase de réduction et la phase d'hydrolyse (Figure 4). La diminution de la diversité moléculaire se fait par l'enlèvement des chaînes aliphatiques latérales des composés aromatiques. Les mécanismes de β-oxydation, de déshydroxylation réductrice et de transhydroxylation sont les mieux connus. Ensuite, il y a activation des composés aromatiques afin de déstabiliser leur noyau par la formation de CoA thioesters, la carboxylation ou l'hydroxylation. Cette déstabilisation a pour conséquence de faciliter la prochaine transformation au cours de laquelle les intermédiaires centraux sont attaqués par les enzymes réductases et transformés en composés alicycliques. Ces derniers sont par la suite β-oxydés, hydrolysés et transformés en métabolites centraux comme l'acétyl-CoA.

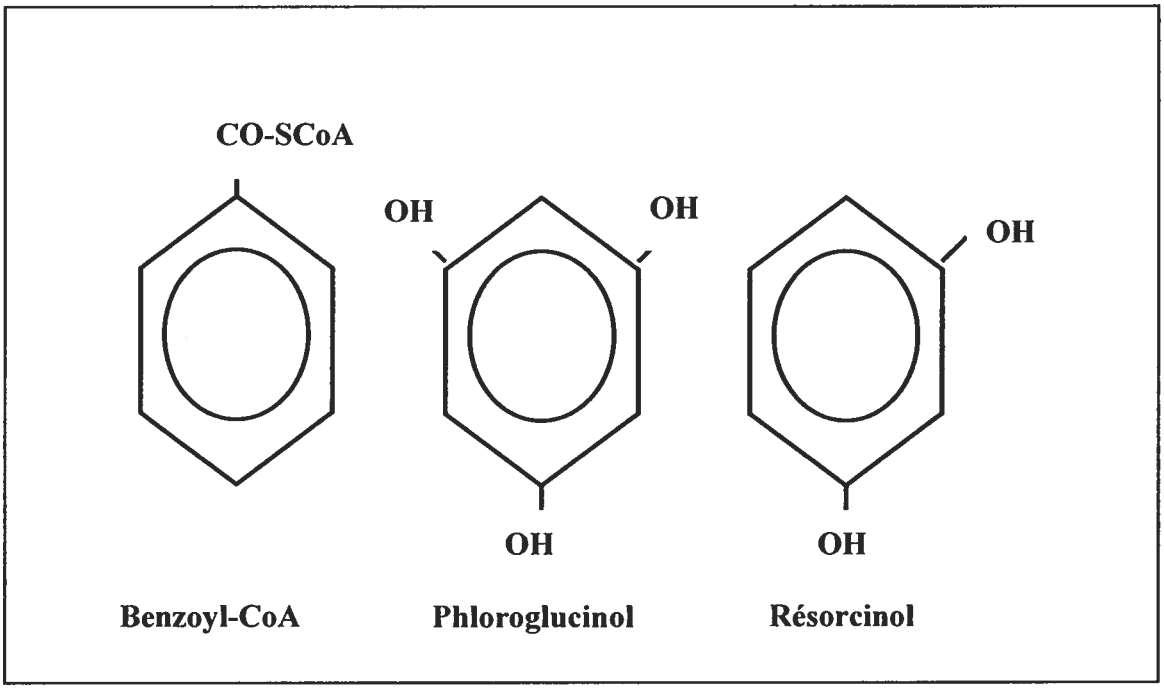


Figure 3 : Intermédiaires centraux de dégradation des composés aromatiques en conditions anaérobies

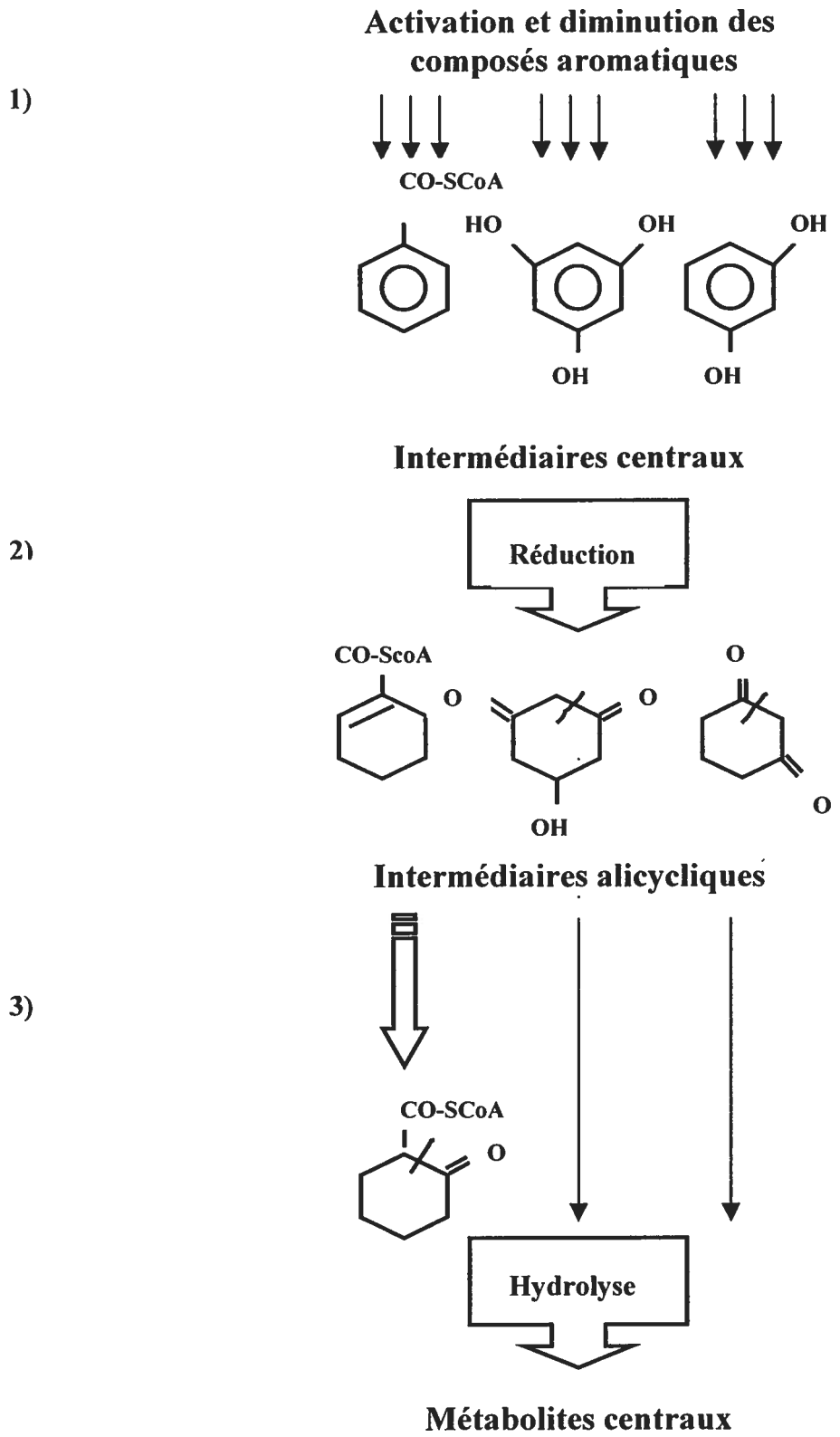


Figure 4 : Stratégie de canalisation des composés aromatiques en conditions anaérobies (modifié d'après Fuchs et al., 1994)

1.4 Différents métabolismes de dégradation anaérobie des composés aromatiques

Dans les environnements anaérobies, la disponibilité et le type de donneur et d'accepteur d'électrons influenceront la diversité et l'activité microbienne. Certains microorganismes habitant ces endroits utilisent la matière organique (carbone) comme donneur d'électrons et le nitrate, le sulfate, le fer (Fe III) ou le manganèse (Mn IV) comme accepteur d'électrons lors de la respiration anaérobie (Evans, 1977). D'autres bactéries utilisent la lumière afin de réduire la matière organique par photométabolisme. Par contre, dans les environnements anaérobies où aucun accepteur externe d'électrons n'est présent, les microorganismes fermentent la source de carbone en l'utilisant à la fois comme donneur et comme accepteur d'électrons. La fermentation méthanique transformant les composés aromatiques en méthane et dioxyde de carbone est la voie métabolique la plus fréquemment observée dans les environnements anaérobies (Berry, Francis et Bollag, 1987; Fuchs et al., 1994). D'un point de vue énergétique, si on compare les valeurs du potentiel d'oxydoréduction de chacune des réactions anaérobies, la respiration anaérobie est favorisée par rapport à la fermentation méthanique (Tableau 1). Ceci explique la raison pour laquelle cette fermentation a lieu dans les environnements où il y a absence d'accepteur externe d'électrons.

1.4.1 Le photométabolisme

Le photométabolisme a lieu chez les bactéries phototrophes. Ces bactéries obtiennent leur énergie de la lumière par une série de réactions impliquant des transporteurs d'électrons. Elles ont la capacité d'utiliser les composés aromatiques comme seule source de carbone. En 1969, Dutton et Evans ont observé la dégradation anaérobie du benzoate par photométabolisme chez *Rhodopseudomonas palustris* (Figure 5). Cette bactérie a la double capacité d'utiliser le benzoate comme seule source de carbone et de le transformer soit par photométabolisme en conditions anaérobies ou par la respiration aérobie en présence d'oxygène. Lorsque le benzoate est transformé par photométabolisme, ce dernier est tout d'abord transformé en benzoyl-CoA par l'incorporation d'un groupement CoA. Ensuite, le benzoyl-CoA est réduit en cyclohexane carboxylate par

Tableau 1 : Potentiels d'oxydoréduction associés aux principaux métabolismes utilisés par les bactéries présentes dans l'environnement (modifié d'après Berry, Francis et Bollag, 1987)

Métabolisme	Réaction [a + b]	Potentiel redox (mV)
Respiration aérobie	$MO + O_2 \rightarrow CO_2$	700-500
Denitrification	$MO + NO_3^{--} \rightarrow N_2 + CO_2$	300
Fermentation	$MO \rightarrow$ acides organiques[c]	300 - -200
Réduction du sulfate	$MO\ (H_2) + SO_4^{2--} \rightarrow H_2S + CO_2$	200
Réduction des protons	$MO\ (C_4\text{- } C_8\ AG)^d + H^+ \rightarrow H_2$ + acétate	< -200
Méthanogénèse	$MO \rightarrow CO_2 + CH_4$	< -200

[a] donneur d'électrons: MO= Matière organique
[b] accepteur d'électrons
[c] acides propionique, acétique et butyrique
[d] acides gras

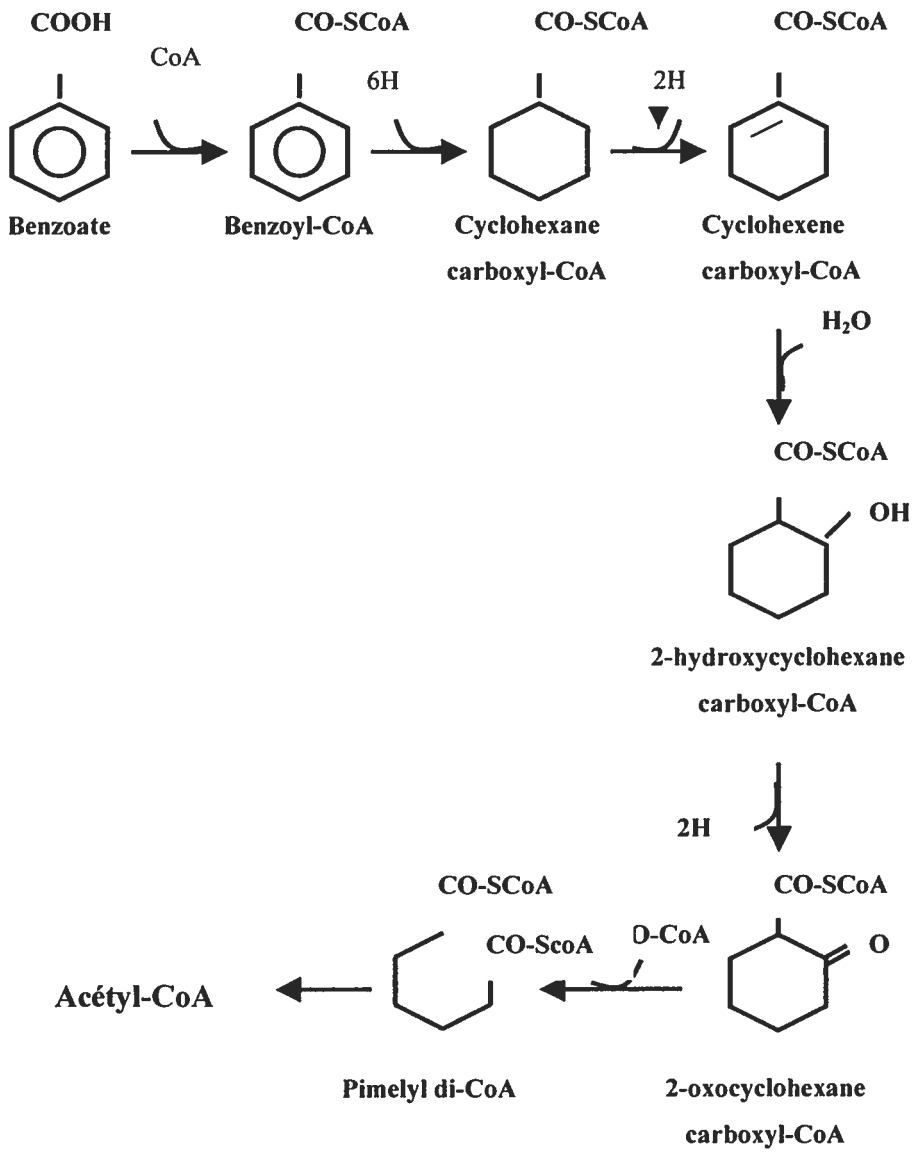


Figure 5 : Transformation du benzoate par photométabolisme chez *Rhodopseudomonas palustris* (modifié d'après Dutton et Evans, 1969)

l'introduction de six molécules d'hydrogène. Suite à la réduction, a lieu une série de ß-oxydations conduisant à l'ouverture du cycle aromatique et à la formation d'acétate. *R. palustris* est également capable d'utiliser le *m* et le *p*-hydroxybenzoate comme unique source de carbone. (Merkel et al., 1989; Dutton et Evans, 1969; Berry, Francis et Bollag, 1987; Fuchs et al. 1994; Schink, Brune et Schnell, 1992; Evans, 1977).

1.4.2 La réduction du nitrate

Lors de la respiration anaérobie par les bactéries réduisant le nitrate, l'oxydation des composés organiques par des molécules d'eau est couplée à la réduction du nitrate en nitrite, puis en N_2 et quelques fois en NH_3. Cette réduction est une réaction exergonique dont l'énergie est obtenue par transport des électrons impliquant des intermédiaires phosphorylés (Evans et Fuchs, 1988). On retrouve ces bactéries dans plusieurs sols, lacs, rivières et océans (Berry, Francis et Bollag, 1987).

En 1970, Taylor, Campbell et Chinoy ont isolé une souche dégradant le benzoate en présence du nitrate sous des conditions anaérobies (Evans, 1977). À l'époque, elle a été nommée *Pseudomonas* souche PN-1, ensuite, elle a été reclassée sous *Achromobacter xylosoxidans denitrificans*. Cette bactérie transforme complètement le benzoate en CO_2, en passant par l'intermédiaire central benzoyl-CoA. Également, il y a William et Evans (1975) qui ont isolé *Paracoccus denitrificans* effectuant la dégradation du benzoate en présence du nitrate comme accepteur d'électrons. *Thauera aromatica* (Tschech et Fuchs, 1989) utilise le nitrate afin de dégrader plusieurs composés aromatiques par la voie de phosphorylation (section 1.5.2). Récemment, une bactérie nommée *Azoarcus* souche CC-11 (Shinoda et al., 2000) a été isolée. Cette bactérie utilise le nitrate comme accepteur d'électrons pour dégrader le phénol (section 1.6). De plus, les genres *Pseudomonas* et *Spirillum* dégradant le phénol et les crésols nécessitent la présence du nitrate pour croître (Evans et Fuchs, 1988).

1.4.3 La réduction du sulfate

Les réactions métaboliques catalysant la réduction du sulfate en sulfite, puis finalement en sulfide sont également exergoniques. Tout comme c'est le cas pour la réduction du nitrate, l'énergie produite lors de la réduction du sulfate est obtenue par transport des électrons couplé à une phosphorylation. La plupart des bactéries réduisant le sulfate (SRB) utilisent des composés organiques de faible poids moléculaire tels des acides gras, des alcools, le lactate, l'acétate et le pyruvate. Plusieurs composés organiques aromatiques comme le phénol, l'indole et le catéchol peuvent également être utilisés comme source de carbone chez certaines espèces. Les principales bactéries réduisant le sulfate appartiennent aux genres *Desulfovibrio, Desulfobacter* et *Desulfotomaculum.* Elles sont retrouvées entre autre dans les boues d'épuration et les sédiments marins. (Tardy-Jacquenod et al., 1996). Une autre bactérie réduisant le sulfate a été isolée en 1987 par Cord-Ruwisch. Elle se nomme *Desulfotomaculum sapomandens.* C'est une bactérie formant des spores et capable de dégrader plusieurs composés aromatiques en réduisant le sulfate, le sulfite, le thiosulfate et le soufre élémentaire en H_2S. *Desulfobacula phenolica* dégradant le phénol ainsi que *Desulfobacterium indolicum* dégradant l'indole font toutes les deux partie de la classe des bactéries réductrices de sulfate. De plus, *Desulfotignum balticum* souche Saxt utilise le formate en présence de sulfate comme accepteur d'électrons (Kuever et al., 2001; Evans et Fuchs 1988).

1.4.4 La fermentation

Dans la majorité des environnements anaérobies, les bactéries produisent de l'énergie par fermentation. Ces environnements ne contiennent aucun accepteur externe d'électrons (Evans, 1977). Les bactéries présentes utilisent la source de carbone organique à la fois comme donneur et accepteur d'électrons et l'énergie générée par la fermentation résulte d'une phosphorylation au niveau du substrat. La fermentation peut avoir lieu en absence totale de lumière et est effectuée par des microorganismes anaérobies stricts ou facultatifs. Les composés organiques sont principalement transformés en acétate et CO_2. La fermentation la plus fréquemment rencontrée au sein des environnements anaérobies est la fermentation méthanique. Ce type de fermentation résulte du couplage de la fermenta-

tion et de la méthanogénèse. Elle est effectuée par des regroupements de bactéries, certaines ayant des interactions très étroites entre elles, appelés consortiums méthanogènes. Dans ces consortiums les produits finaux de dégradation sont le méthane et le CO_2 (Evans, 1977; Berry, Francis et Bollag, 1987; Evans et Fuchs, 1988; Ferry et Wolfe, 1976).

Les trois principaux groupes de bactéries impliquées dans la méthanogénèse sont les bactéries fermentaires, acétogènes et méthanogènes. Ils sont associés aux principales étapes de la fermentation méthanique soit la fermentation, l'acétogénèse et la méthanogénèse (Figure 6). Lors de la première phase, les bactéries fermentaires hydrolysent des polymères complexes (lipides, protéines, polysaccharides) en molécules plus courtes, les oligomères et les monomères (acides aminés, peptides, sucres simples). Les bactéries fermentaires poursuivent leur activité en transformant majoritairement ces molécules simplifiées en acides gras de trois à six carbones. Une toute petite proportion des oligomères et monomères générés par les fermentaires est transformée en H_2, CO_2 et acétate. Ensuite, la deuxième étape débute avec l'action des bactéries acétogènes (Auburger et Winter, 1995). Deux types de bactéries acétogènes sont directement impliqués : les acétogènes productrices d'hydrogène et les acétogènes consommatrices d'hydrogène. Premièrement, les acétogènes productrices d'hydrogène convertissent les acides gras générés lors de la première étape en H_2, CO_2 et acétate. À ce moment, interviennent les acétogènes consommatrices d'hydrogène qui convertiront l'H_2 et le CO_2 en acétate. Finalement, au cours de la méthanogénèse, les produits générés par l'acétogénèse (H_2, CO_2 et l'acétate) sont transformés en méthane et CO_2. Ces derniers constituent les produits finaux de la fermentation méthanique. Durant cette étape, les méthanogènes hydrogénotrophes sont responsables de la formation du méthane par réduction du CO_2, tandis que les méthanogènes acétoclastes convertissent l'acétate en méthane et en CO_2. Le transfert d'hydrogène entre les espèces bactériennes constitue une relation de syntrophie. En effet, la consommation d'hydrogène par les bactéries méthanogènes et les acétogènes consommatrices d'H_2 est essentielle afin d'abaisser la trop grande concentration en hydrogène qui est produite lors des étapes de fermentation et d'acétogénèse. Puisqu'il n'y a qu'une très faible quantité d'énergie contenue dans les

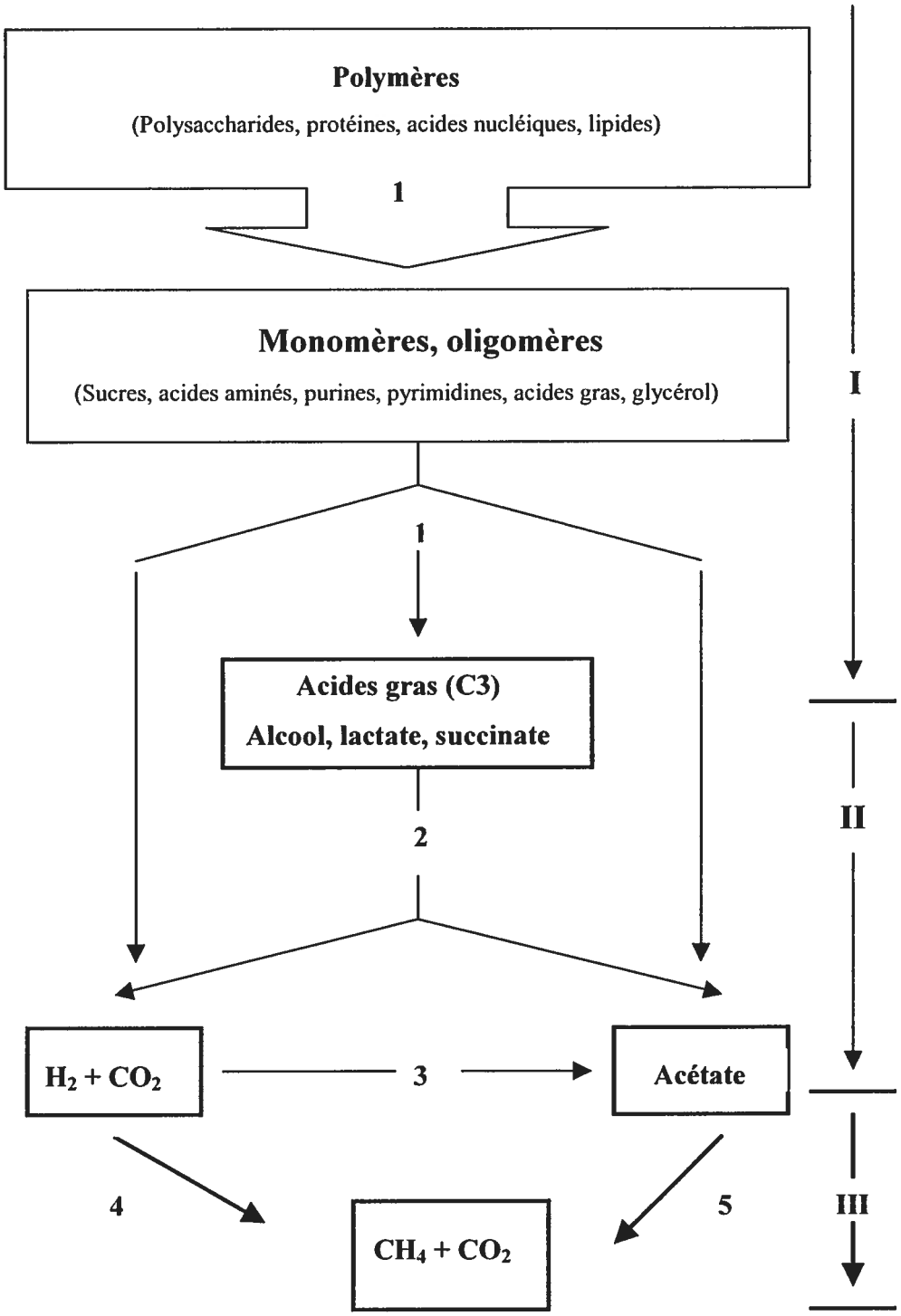


Figure 6 : Groupes bactériens impliqués dans la fermentation méthanique de composés organiques complexes. Groupes bactériens : 1. Fermentaires; 2. Acétogènes productrices d'hydrogène; 3. Acétogènes consommatrices d'hydrogène; 4. Méthanogènes hydrogénotrophes; 5. Méthanogènes acétoclastes. Principales étapes : I. Fermentation; II. Acétogénèse; III. Méthanogénèse (modifié d'après Schink, 1997; Zinder, 1984).

acides gras, lorsque la concentration en hydrogène devient très importante, les réactions impliquant les acétogènes deviennent défavorables. Cette conversion de l'hydrogène en acétate et méthane permet alors aux acétogènes productrices d'H_2 de poursuivre leur activité de dégradation des acides gras. La fermentation méthanique ne libère pas beaucoup d'énergie, car la majorité de l'énergie produite est sous forme de méthane. Le méthane constitue d'ailleurs un combustible hautement énergétique (Evans et Fuchs, 1988; Schink, 1997; Zinder, 1984).

1.5 Biodégradation anaérobie du phénol

1.5.1 Voie de réduction

En 1977, Bakker a obtenu par enrichissement, à l'aide du phénol, d'un mélange de sols, de fumier et de boues d'épuration, une population bactérienne composée principalement des genres *Pseudomonas* et *Spirillum.* Cette population était capable de dégrader le phénol en présence du nitrate en conditions anaérobies. En marquant le phénol au ^{14}C, du CO_2, de l'acétate et du η-caproate marqués ont été identifiés comme produits de dégradation. La présence d'acide η- caproïque a permis de suggérer que le phénol est réduit en cyclohexanol qui est par la suite déshydrogéné en cyclohexanone. Finalement le cycle aromatique est hydrolysé en η-caproate et d'autres composés aliphatiques sont générés à partir de celui-ci.

La dégradation du phénol via une voie réductrice a également été observée en conditions méthanogènes par le consortium adapté au catéchol de Balba et Evans (Balba et Evans, 1977; Balba et Evans, 1979; Balba, Clarke et Evans, 1979). Le catéchol est tout d'abord déshydroxylé en phénol, puis le phénol est réduit selon la même voie réductive énoncée par Bakker (Figure 7). Par contre, cette voie n'a jamais été observée depuis.

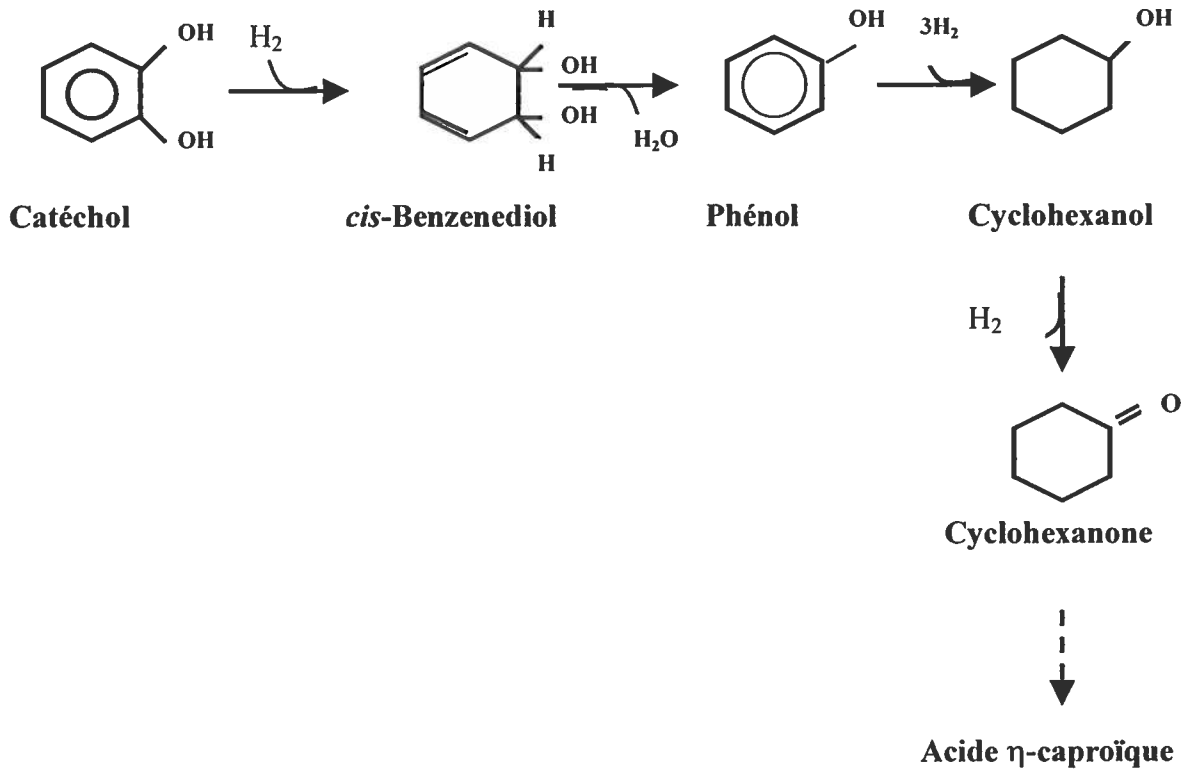


Figure 7 : Voie de réduction du catéchol par le consortium méthanogène de Balba et Evans (1977)

1.5.2 Voie de phosphorylation

Initialement, la voie de phosphorylation (Figure 8) a été observée chez *Pseudomonas* sp. K172 présentement connue sous le nom de *Thauera aromatica*. Cette bactérie utilise le nitrate en tant qu'accepteur d'électrons et dégrade plusieurs composés monoaromatiques principalement le phénol, le 4-hydroxybenzoate, le benzoate, le *p*-crésol, le phénylacétate et le 4-hydroxyphénylacétate. La plupart de ces composés sont métabolisés aussi bien en anaérobie qu'en aérobie, mais quelques-uns ne sont métabolisés que sous des conditions anaérobies. Au cours de la voie de phosphorylation anaérobie du phénol, ce dernier est carboxylé en benzoyl-CoA, intermédiaire central de la dégradation anaérobie de plusieurs composés organiques aromatiques, en passant par un état hautement énergétique permettant aux réactions subséquentes de la voie de se produire. En effet, le phénol est transformé rapidement en phénylphosphate, premier intermédiaire de dégradation détecté, par une phénol kinase induite par le phénol. Ensuite, l'hydrolyse du lien phosphate entraîne une libération d'énergie suffisante permettant sa carboxylation en 4-hydroxybenzoate (Breinig, Schiltz et Fuchs, 2000). La carboxylation du phénylphosphate est induite par une faible quantité de substrat et est Mn^{2+} dépendante. Cette réaction de carboxylation du phénylphosphate est beaucoup plus exergonique que la carboxylation directe du phénol, donc par le fait même beaucoup plus favorable. Le 4-hydroxybenzoate, produit de la carboxylation, est par la suite converti en 4-hydroxybenzoyl-CoA. Cette réaction nécessite la présence d'une molécule de coenzyme A et d'ATP. Une réduction du 4-hydroxybenzoyl-CoA amène la formation du produit central de cette voie de phosphorylation : le benzoyl-CoA (Lack et Fuchs, 1994; Lack et Fuchs, 1992; Lack et al., 1991; Tschech et Fuchs, 1989; Tschech et Fuchs, 1987 ; Glöckler, Tschech et Fuchs, 1989; Dangel et al., 1991; Phillip et Schink, 2000; Heider et al., 1998).

1.5.3 Voie de carboxylation

Jusqu'à maintenant les réactions de carboxylation directe du phénol, sans intermédiaire phosphorylé, ont été principalement observées au niveau de consortiums

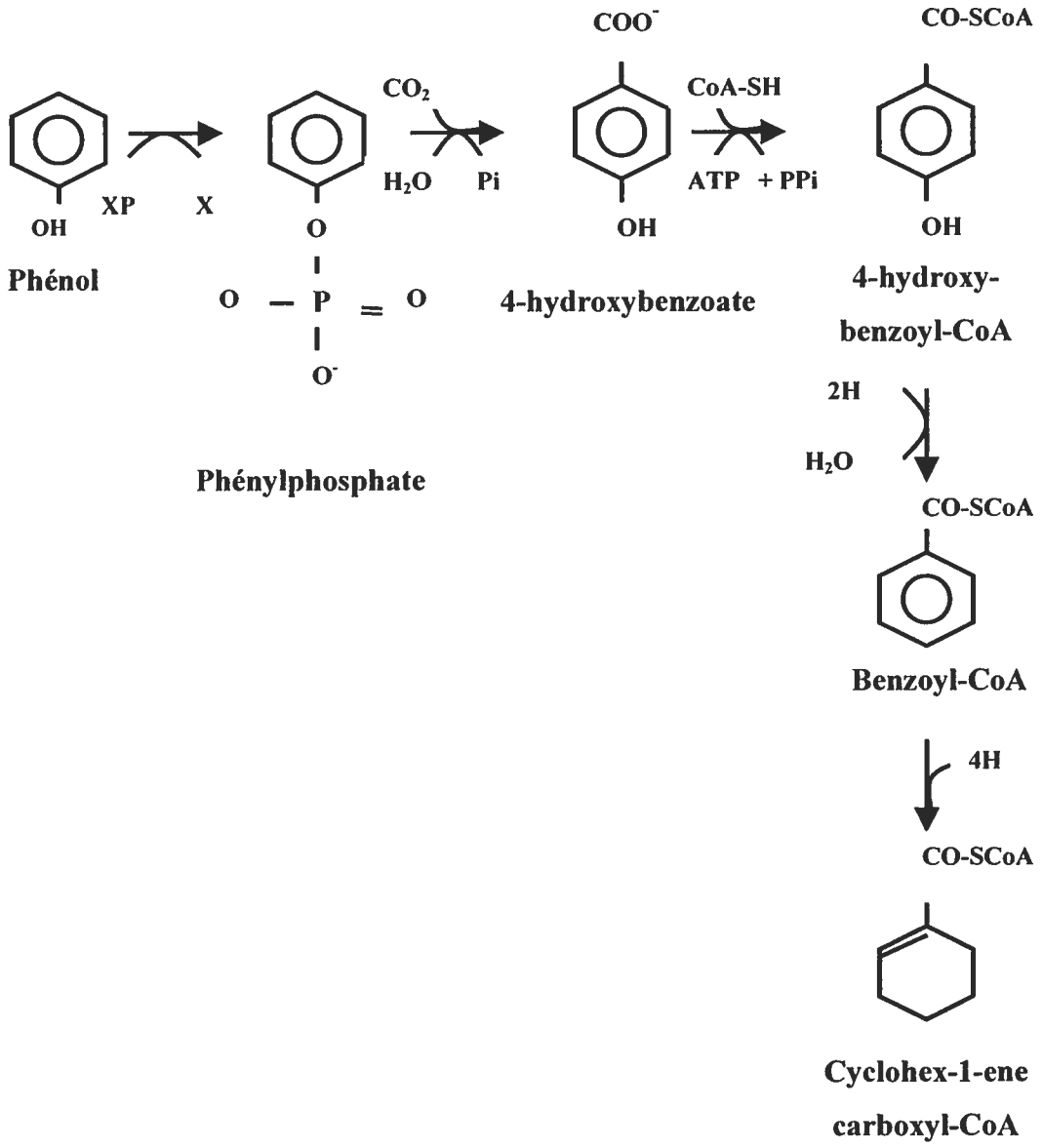


Figure 8 : **Voie de phosphorylation chez *Thauera aromatica*** (modifié d'après Lack et Fuchs, 1994)

méthanogènes (Bisaillon, Lépine et Beaudet, 1991; Dangel et al., 1991; Gallert et Winter, 1993; Sharak Genthner, Townsend et Chapman, 1990; Knoll et Winter, 1987; Zhang, Morgan et Wiegel, 1990). Il n'existe que deux souches isolées en cultures pures présentant cette activité dont la souche LR 7.2 sur laquelle porte le présent projet (section 1.8). Sous cette voie, le phénol est transformé en 4-hydroxybenzoate (4-OHB), composé qui est ensuite déshydroxylé en benzoate (Figure 9). Le 4-hydroxybenzoate n'est cependant pas facilement détecté. Ceci est dû au fait que la carboxylation du phénol et la réaction inverse, la décarboxylation du 4-hydroxybenzoate, forment un équilibre qui favorise la décarboxylation. Il peut quand même y avoir carboxylation complète du phénol grâce à la réaction de déshydroxylation du 4-hydroxybenzoate qui, en réduisant la concentration de ce dernier à presque rien, tire l'équilibre phénol/4-hydroxybenzoate vers le 4-hydroxybenzoate.

Tout d'abord, en 1987, le consortium de Knoll et al. a été cultivé en présence de CO_2 marqué au ^{14}C (Gallert, Knoll et Winter, 1991). La détection et l'accumulation de benzoate radioactif leur ont permis de suggérer que la transformation du phénol par leur consortium passe par la carboxylation du phénol. En 1989, Sharak Genthner, Townsend et Chapman ont suggéré pour la première fois que le phénol est carboxylé en position *para* en suivant la dégradation anaérobie du 2-fluorophénol, du 3-fluorophénol et du 4-fluorophénol par un consortium dégradant le phénol provenant de sédiments d'eau douce. Dans le cas du 2-fluorophénol, portant un groupement fluor en position *ortho* par rapport au groupement hydroxyle, il était transformé en 3-fluorobenzoate. Cette transformation en 3-fluorobenzoate indique qu'il y a une carboxylation soit en position *para* ou *ortho*. Pour le 3-fluorophénol, le fluor est en position *meta* par rapport au groupement hydroxyle. La production de 2-fluorobenzoate (position du fluor en position *meta*) indique que la carboxylation du 3-fluorophénol a eu lieu soit en position *para ou ortho*. Lorsqu'ils ont testé le 4-fluorophénol (fluor en position *para* par rapport au groupement hydroxyle), aucune carboxylation de ce dernier n'a été observée. Ils ont alors conclu que la carboxylation est effectuée uniquement en position *para* par rapport au groupement hydroxyle. En 1990, Sharak Genthner, Townsend et Chapman ont observé l'apparition de 2-fluorophénol et de 3-fluorobenzoate suite à l'ajout de 3-fluoro-4-hydroxybenzoate (analogue fluoré du 4-

hydroxybenzoate) à leur consortium transformant à la fois le phénol et le 4-hydroxybenzoate. Au cours de cette expérience, le 3-fluoro-4-hydroxybenzoate était simultanément décarboxylé en 2-fluorophénol et déshydroxylé en 3-fluorobenzoate. Cette expérience suggère encore une fois que la transformation du phénol passe par la carboxylation du phénol en 4-hydroxybenzoate et par la déshydroxylation de ce dernier en benzoate. En 1991, Gallert, Knoll et Winter ont fait une démonstration rigoureuse que la carboxylation du phénol avait lieu en position *para* en suivant la transformation de phénol deutéré. Zhang, Morgan et Wiegel (1990) sont également arrivés à cette conclusion, car suite à la transformation du phénol marqué au ^{13}C en position 1 par leur consortium méthanogène, ils ont détecté l'accumulation de benzoate marqué au ^{13}C en position 4 (position *para* par rapport au groupement carboxyle) (Zhang, Morgan et Wiegel, 1990). En 1993, Bisaillon et al., ont également conclu que la carboxylation du phénol se faisait en position *para* en testant différents composés phénoliques substitués en position *ortho* (2-crésol, catéchol, 2-fluorophénol, etc.). Dans tous les cas, il y avait carboxylation et déshydroxylation pour former des composés analogues au benzoate et substitués en position *meta* (3-méthylbenzoate, 3-hydroxybenzoate, 3-fluorobenzoate, etc.). Bisaillon et al. (1991) ont également démontré que la réaction de carboxylation effectuée par leur consortium méthanogène avait lieu en position *para*, à l'aide de l'expérience impliquant le *o*-crésol-d_6. Au cours de cette réaction, de l'acide 3-méthylbenzoïque était produit. Ceci suggérait que la carboxylation avait lieu soit en position *para* ou *ortho* par rapport au groupement hydroxyle du *0*-crésol. De plus, l'acide 3-méthylbenzoïque produit était marqué en position *meta* par rapport à son groupement carboxyle, ce qui indique que la carboxylation avait lieu en position *para* par rapport au groupement hydroxyle du *0*-crésol.

1.6 Bactéries dégradant le phénol, autres que la souche LR 7.2

Plusieurs études ont été effectuées sur la biodégradation anaérobie du phénol. Cependant, dans la littérature, on ne retrouve que quelques exemples de souches bactériennes isolées en cultures pures capables de dégrader ce composé en anaérobiose.

La première bactérie découverte dégradant complètement le phénol en CO_2, *Desulfobacterium phenolicum*, a été enrichie et isolée sous des conditions réductrices de sulfate à partir de sédiments marins (Bak et Widdel, 1986). Elle a été reclassifiée et se nomme maintenant *Desulfobacula phenolica* (Kuever et al., 2001). La voie de dégradation n'est pas encore connue. On sait cependant qu'elle ne passe pas par la réduction du phénol, car la souche n'utilise pas le cyclohexanol, le cyclohexanone, l'adipate et le η-caproate, ces derniers étant les principaux intermédiaires rencontrés lors de la voie de réduction du phénol (voir section 1.5.1).

Une autre souche a été isolée sous des conditions dénitrifiantes : *Pseudomonas* sp. K172 ou *Thauera aromatica* (Tschech et Fuchs, 1989). Celle-ci est responsable de la dégradation anaérobie du phénol via la voie de phosphorylation décrite au point 1.5.2. De plus, trois autres souches bactériennes dénitrifiantes ont été isolées de sédiments de différentes régions géographiques (Paula, Schie et Young, 1998). Il s'agit des souches PH002, FL05 et CR23. Les trois souches peuvent dégrader un large spectre de substrats autant aromatiques (toluène, catéchol, crésol) qu'aliphatiques (glucose, succinate, éthanol, pyruvate). Le mécanisme de dégradation n'est pas encore bien connu. Ce qui est connu c'est que la souche PH002 ne passe pas par la réduction du phénol puisqu'elle ne métabolise aucun des intermédiaires impliqués dans cette voie.

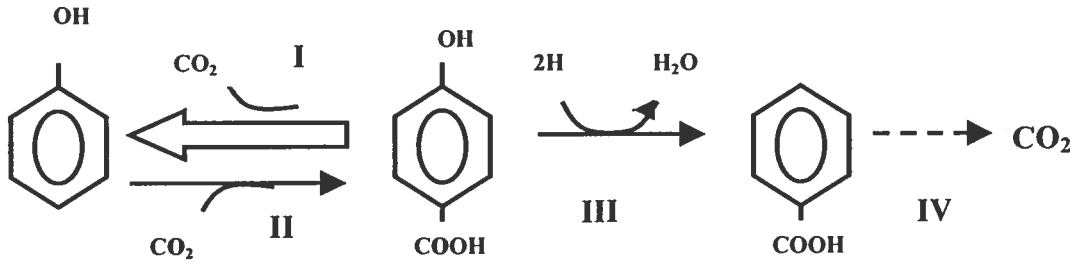
Récemment, deux souches bactériennes capables de dégrader le phénol en conditions dénitrifiantes ont été isolées (Shinoda et al., 2000). Elles ont été nommées CC-11 et CC-26. La souche CC-11 est un court bâtonnet et elle est apparentée au genre *Azoarcus* tandis que la souche CC-26 est un spirochète et elle est apparentée au genre *Magnetospirillum*. Les deux souches nécessitent du fer pour croître. La souche CC-26 est capable d'utiliser le phénol, le benzoate ainsi que plusieurs autres composés aromatiques uniquement sous des conditions dénitrifiantes.

En 1990, Lovley et Lonergan ont isolé une souche réductrice de Fe^{3+} métabolisant le phénol en CO_2 qu'ils ont nommée GS-15. Elle serait impliquée directement dans la voie de carboxylation du phénol puisqu'une accumulation en 4-hydroxybenzoate a lieu

durant la dégradation (Figure 9). Au niveau des consortiums méthanogènes, plusieurs scientifiques ont observé l'utilisation du phénol. Le consortium méthanogène de Balba et Evans (1977) adapté au catéchol dégradait complètement le phénol en composés aliphatiques au moyen d'une voie réductrice (section 1.5.1).

En 1987, Knoll et Winter ont isolé un consortium méthanogène à partir de boues d'épuration. Il était composé d'un long bâtonnet, d'une espèce du genre *Desulfovibrio* et de la bactérie méthanogène *Methanospirillum hungatei* (Knoll et Winter, 1989). Ce consortium utilisait le phénol et le 4-hydroxybenzoate. À partir du 4-hydroxybenzoate, il y avait formation de phénol, de benzoate, d'acétate, de méthane et de CO_2. Suite à l'élimination du long bâtonnet par une série de dilutions, l'activité de dégradation du phénol et du 4-hydroxybenzoate était perdue. L'activité serait donc attribuable au long bâtonnet. Cependant toutes les tentatives d'isolement du microorganisme responsable de la dégradation du phénol et du 4-hydroxybenzoate ont échoué, car des relations symbiotiques existent entre les bactéries présentes au sein de consortiums méthanogènes.

Le consortium de Sharak Genthner, Townsend et Chapman (1989 ; 1991) isolé de boues d'épuration, dégrade le phénol en benzoate en présence de CO_2 et H_2. Au départ, il était cultivé avec du 2-chlorophénol. Suite à une série de dilutions (10^{-3} à 10^{-9}) dans un milieu contenant du phénol, la dilution 10^{-9} a été retenue et a servi d'inoculum pour les autres repiquages dans un milieu contenant du phénol. D'abord, le phénol est transformé en benzoate par la voie de carboxylation, puis ce dernier est complètement métabolisé en CO_2 et CH_4 par les bactéries méthanogènes. La dilution 10^{-8} a ensuite été retenue et nommée sous-culture B-1. Cette sous-culture était capable de transformer le phénol en benzoate, mais contrairement au consortium original, ne permettait pas une minéralisation complète en CO_2 et CH_4. Malgré le manque d'informations sur la composition exacte du consortium microbien, 5 types morphologiques ont été observées : un bâtonnet, un coccobacille, un cocci et des bâtonnets ressemblant morphologiquement à *Methanospirillum* sp. et à *Methanosaeta* sp. (Sharak Genthner, Townsend et Chapman, 1991). Toutes les formes microbiennes présentes dans le consortium étaient Gram-



S. hydroxybenzoïcus	**Souche GS-15**	**Souche GS-15**
Souche GS-15	**Souche 7 ou LR 7.2**	
Souche 7 ou LR 7.2		

Figure 9 : Voie de carboxylation du phénol utilisée par *S. hydroxybenzoïcus*, la souche GS-15 et la souche LR 7.2 (d'après Duckett, 2000). I : décarboxylation ; II : carboxylation ; III : déshydroxylation ; IV : minéralisation du benzoate en CO_2

négatives. Les souches responsables des étapes de la transformation du phénol en benzoate n'ont pas été identifiées.

Étant donné les relations d'interdépendance étroites existant entre les bactéries au sein des consortiums méthanogènes, plusieurs auteurs ont échoué les tentatives d'isolement des microorganismes responsables de la carboxylation du phénol. Zhang et Wiegel (1994) y sont parvenus en isolant *Sedimentibacter hydroxybenzoïcus* anciennement nommée *Clostridium hydroxybenzoïcum* JW/Z-1 (Breitenstein et al., 2002). Cette bactérie provient d'un consortium méthanogène isolé de sédiments d'eau douce. Les milieux liquides étaient composés d'extrait de levures, de 2,4-dichlorophénol ou de phénol. La souche a été isolée sur milieu solide en présence de 4-hydroxybenzoate. Les colonies cultivées en milieu liquide effectuaient la décarboxylation du 4-hydroxybenzoate en phénol. Par contre, elles n'étaient pas capables de carboxyler le phénol en 4-hydroxybenzoate. Ils ont cependant observé la carboxylation du phénol au niveau d'une suspension cellulaire ou d'extraits cellulaires de *Sedimentibacter hydroxybenzoïcus* et en présence d'une concentration élevée en phénol et en CO_2. De plus, le 4-hydroxybenzoate n'était pas métabolisé en benzoate, car aucune déshydroxylation de ce dernier n'a été observée (Figure 9). Zhang et Wiegel (1994) ont également isolé et purifié l'enzyme responsable de la décarboxylation : la phénol décarboxylase. Ils ont montré que cette même enzyme a une activité réversible de carboxylation du phénol, même si la réaction de décarboxylation est beaucoup plus favorable.

Une culture mixte non-méthanogène dégradant le phénol, composée de deux bactéries ayant une morphologie distincte, a été étudiée par Karlsson, Ejlertsson et Svensson (2000). Dans cette culture, le phénol est fermenté en benzoate, acétate et butyrate. Cette culture serait la première culture non-méthanogène à fermenter le phénol en des composés non-aromatiques.

Jusqu'à aujourd'hui, la seule souche isolée en culture pure, provenant d'un consortium méthanogène, capable de dégrader en conditions anaérobies le phénol et le 4-hydroxybenzoate en benzoate via la voie de carboxylation du phénol est la souche LR 7.2

(Figure 9), soit celle qui fait l'objet du présent projet de recherche. Les travaux ayant mené à son isolement sont présentés à la section 1.8.

1.7 Bactéries dégradant le 4-hydroxybenzoate, autres que la souche LR 7.2

Le 4-hydroxybenzoate est fréquemment retrouvé comme intermédiaire au cours de la biodégradation anaérobie de plusieurs composés aromatiques, notamment celle du phénol. Ces bactéries transformant le phénol en passant par l'intermédiaire 4-hydroxybenzoate ont été présentées à la section précédente (1.6).

Outres ces bactéries, il existe plusieurs bactéries utilisant le 4-hydroxybenzoate comme principale source de carbone. Il y a entre autre les deux bactéries dénitrifiantes *Thauera aromatica* et *Rhodopseudomonas palustris* qui utilisent le 4-hydroxybenzoate et le transforme ensuite en 4-hydroxybenzoyl-CoA, puis en benzoyl-CoA. Le benzoyl-CoA est un intermédiaire central de la biodégradation anaérobie (section 1.3.3), ce qui suggère la réduction ainsi que l'ouverture subséquente du cycle aromatique (Lack et Fuchs, 1992; Tschech et Fuchs, 1987 ; Merkel et al., 1989 ; Gibson, Dispensa et Harwood, 1997). Une autre bactérie dénitrifiante, *Achromobacter xylosoxidans denitrificans*, utilise le 4-hydroxybenzoate comme source de carbone (Taylor, Campbell et Chinoy, 1970). Lorsque cette bactérie utilise le benzoate, le benzoyl-CoA est retrouvé comme intermédiaire de dégradation. Ceci suggère que la transformation du 4-hydroxybenzoate passe par le 4-hydroxybenzoyl-CoA et le benzoyl-CoA. De plus, *Klebsiella planticola* souche DSZ1 utilise le 4-hydroxybenzoate, le benzoate et différents composés organochlorés. En présence de 4-hydroxybenzoate, ce dernier est d'abord transformé en protochatéchuate, puis en CO_2. La bactérie utilise le nitrate comme accepteur d'électrons pour effectuer la transformation du 4-hydroxybenzoate.

Desulfobacula phenolica transformant le phénol en conditions sulfatoréductrices est également capable de croître en présence de 4-hydroxybenzoate (Bak et Widdel, 1986). Deux autres bactéries, *Desulfonema magnum* et la souche SAX faisant partie du genre *Desulfoarculus*, utilisent le 4-hydroxybenzoate comme source de carbone ainsi que le

sulfate comme accepteur d'électrons (Widdel et al., 1983; Drzyzga, Kuver, Blotevogel, 1993).

D'autres bactéries comme *Sedimentibacter hydroxybenzoïcus*, isolée d'un consortium méthanogène dégradant le phénol, transforment également le 4-hydroxybenzoate en phénol (section 1.6). Parmi celles-ci, *Klebsiella aerogenes* effectue la décarboxylation du 4-hydroxybenzoate en phénol, mais uniquement en présence du protochatéchuate (Grant et Patel, 1969). De plus, Tschech et Shink (1986) ont isolé une coculture, formée de *Desulfovibrio vulgaris* et de *Methanospirillum hungatei*, transformant d'abord le 4-hydroxybenzoate en phénol. Ensuite, ce dernier est transformé en acétate, méthane et CO_2.

Clostridium thermoaceticum, transformant principalement le vanillate en catéchol, croît également en présence de 4-hydroxybenzoate lorsqu'elle est cultivée avec du méthanol ou du glucose (Hsu et al., 1990). Finalement, *Ferroglobus placidus*, utilise un éventail de composés organiques dont le 4-hydroxybenzoate en présence de Fe III. Cette dernière est le premier exemple d'une archaebactérie capable d'oxyder des composés aromatiques en conditions anaérobies.

1.8 La souche LR 7.2

La souche LR 7.2 a été isolée d'un consortium méthanogène provenant d'un mélange de lisier de porc, de boues d'épuration, d'eau de marécages et de sols (Beaudet et al., 1986 ; Bisaillon et al., 1994). Ce consortium utilisait le protéose peptone comme source principale de carbone et dégradait le phénol en méthane et CO_2 en suivant la voie de carboxylation (Bisaillon, Lépine et Beaudet, 1991). De plus, la présence de 4-hydroxybenzoate au cours de la dégradation indique que la carboxylation était effectuée en position *para* (Bisaillon et al., 1994). Les principaux intermédiaires étaient le benzoate, le 1-cyclohexène, le cyclohexane carboxylate, l'heptanoate, et l'acétate (Figure 10) (Béchard et al.,1990). Un mélange de tryptophane et lysine ainsi que l'extrait de levures pouvaient remplacer le protéose peptone comme source de carbone (Bisaillon, Lépine et

Beaudet, 1991). Cependant, le consortium ne pouvait être maintenu durant plus de deux transferts dans ces conditions. L'isolement de la souche LR 7.2 du consortium méthanogène a comporté plusieurs étapes. La première étape a été l'ajout d'acide 2-bromoéthanosulfonique (BESA) au milieu de culture afin d'éliminer les bactéries méthanogènes. Suite à cet ajout, il y avait une accumulation de benzoate dans le milieu. De plus, la présence ou l'absence d'hydrogène dans la culture n'influençait aucunement la transformation du phénol. Donc, les bactéries responsables de la transformation du phénol en benzoate ne sont pas dépendantes de la méthanogénèse (Béchard et al., 1990). Ensuite, le consortium, composé principalement de bâtonnets Gram-négatifs, a été soumis à un traitement à la chaleur (80°C, 15 minutes). Après cette étape, il y avait toujours transformation du phénol en benzoate. Donc, les auteurs ont conclu que le ou les microorganismes responsables de la carboxylation étaient des bactéries formant des spores (Létourneau et al., 1995). Lors de leurs nombreuses tentatives d'isolement, Létourneau et al. ont réussi à isoler cinq colonies différentes sur gélose sang Columbia ainsi que sur un milieu minimal solide de Boyd. Quatre des cinq colonies isolées ont été identifiées comme étant des *Clostridium* (*C. ghonii, C. hastiforme* et *C. glycolicum*). Cependant aucune n'était capable de dégrader le phénol en culture pure ou en coculture. L'étape suivante a consisté à éliminer les quatre souches de *Clostridium* à l'aide de différents antibiotiques (chloramphénicol, tétracycline, clindamycine et bacitracine). Suite à ce traitement, l'activité de carboxylation était conservée et une seule souche était observée dans les cultures : un long bâtonnet flagellé, Gram-variable et très apparenté au genre *Clostridium* (Li et al., 1996).

Cette souche nommée « souche 6 » croît en présence de protéose peptone, de phénol et de 4-hydroxybenzoate. De plus, la dégradation du phénol et du 4-hydroxybenzoate sont toutes deux des activités inductibles. Ensuite, elle a été isolée sur un milieu solide (gélose sang Columbia). Par contre, la plupart des colonies avaient perdu leur activité de carboxylation du phénol lors de leur repiquage en milieu liquide. Seulement quelques colonies la conservaient. Lors de l'observation microscopique des cultures liquides, inoculées à partir des colonies présentant l'activité de carboxylation, une seule morphologie bactérienne était visible. Ceci laissait croire que la culture était

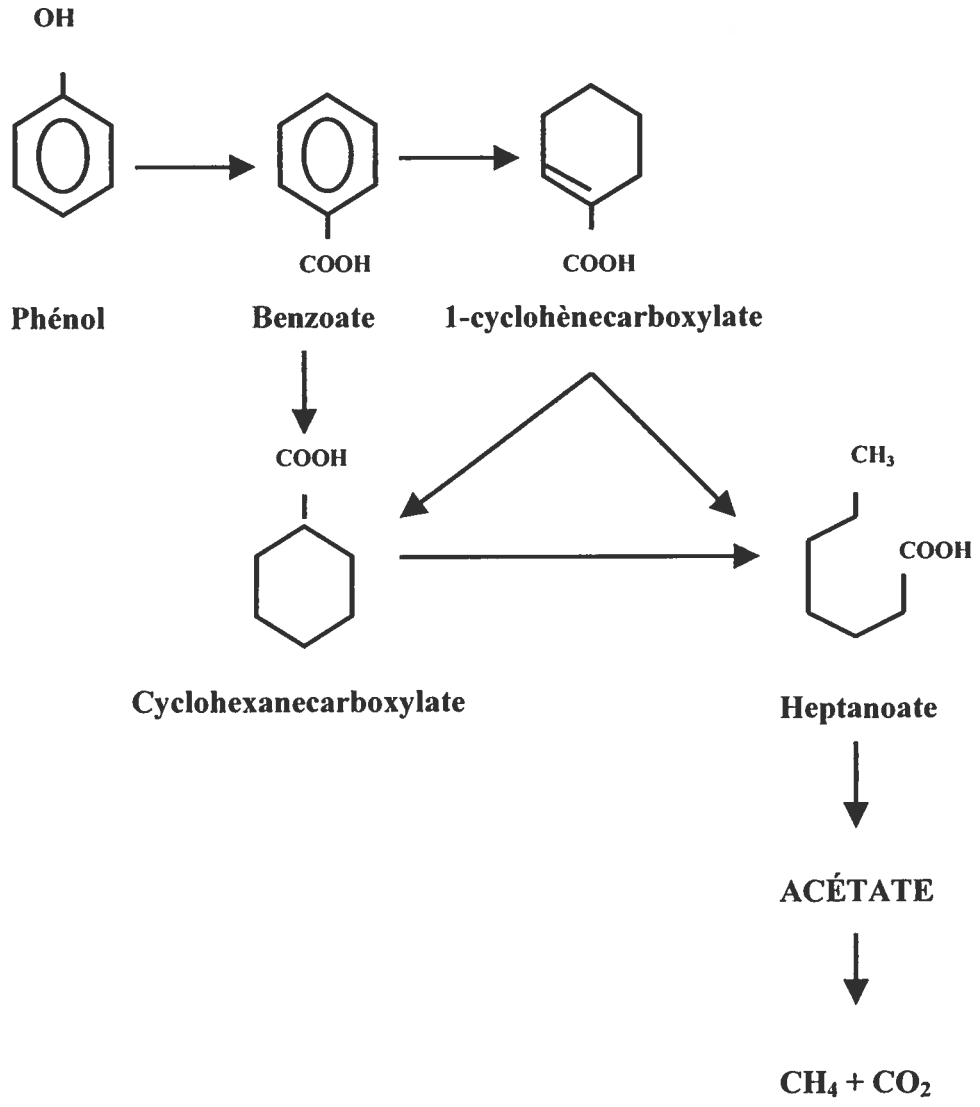


Figure 10 : Voie de dégradation du phénol observée chez le consortium méthanogène de Beaudet et al. (Bisaillon et al., 1994)

pure. Un peu plus tard, lors des travaux de Letowski (2000), une autre forme bactérienne est apparue dans le milieu liquide de Boyd suite à un changement dans le lot de protéose peptone utilisé. Cette nouvelle forme bactérienne a été nommée souche 7. La séparation de cette dernière de la souche 6 a été réalisée par un gradient de Percoll et une série de repiquages en milieu liquide. Suite à la séparation, une seule morphologie était observée soit un bâtonnet Gram-positif anaérobie strict. Cette culture liquide possédait l'activité de carboxylation du phénol en 4-hydroxybenzoate et de déshydroxylation de ce dernier en benzoate. De plus, lorsqu'elle était cultivée en présence de 4-hydroxybenzoate comme substrat de départ (plutôt que du phénol), la majeure partie était transformée en phénol. Celui-ci était par la suite transformé en benzoate via le 4-hydroxybenzoate qui était toujours indétectable suite à cette étape (Figure 9). Les travaux de Duckett (2000) ont montré que la culture de la souche est favorisée en présence de 4-hydroxybenzoate plutôt qu'en présence de phénol. Ceci suggère que l'activité de décarboxylation est favorisée par rapport à la carboxylation. De plus, Duckett a stabilisé et amélioré l'activité de la souche par l'ajout de surnageant de culture de *Clostridium sporogenes* M55[1] ou de surnageant de la souche 6. Ces travaux semblent également montrer que l'ajout de sulfite à de très faibles concentrations stimulerait la souche 7. Récemment, la souche a été isolée sur milieu (0,3% (p/v) agar) et repiquée plusieurs fois sur le même milieu (Duckett, 2000). C'est cette souche obtenue en culture pure selon la méthode traditionnelle qui est dénommée LR 7.2. Exactement la même morphologie a été observée en microscopie optique et électronique que celle de la souche 7. Elle a été nommée différemment puisque, à l'origine, lorsque la souche isolée était transférée dans un milieu contenant du 4-hydroxybenzoate, elle n'effectuait plus l'activité de décarboxylation. Cependant, après quelques repiquages, la souche a recouvré son activité de décarboxylation. Maintenant, la souche LR 7.2 se comporte exactement comme le faisait la souche 7.

---

[1] La souche *Clostridium sporogenes* M55 a été identifiée par erreur comme *Clostridium butyricum* M55 dans le mémoire de Duckett (2000).

1.9 Enzymes impliquées dans la voie de carboxylation

L'enzyme responsable de la décarboxylation du 4-OHB en phénol, la 4-hydroxybenzoate décarboxylase (4OHB-DC), a été isolée d'une coculture contenant la souche 6 et la souche LR 7.2 (Li et al., 2000). Elle catalyse également l'activité inverse soit la carboxylation du phénol en 4-OHB. Cette dernière transformation est plus lente. D'après son N-terminal, elle ressemble avec respectivement 95 et 76% d'homologie à la pyruvate-flavodoxine oxydoréductase d'*Enterobacter agglomerans* et de *Klebsiella pneumoniae*. En présence de coenzyme A, ces enzymes décarboxylent le pyruvate en acétyl-CoA et en CO_2, mais aucune activité de décarboxylation du 4-OHB n'a été observée. Par contre, une légère activité de décarboxylation du pyruvate et de l'α-*keto*-glutarate a été observée pour la 4OHB-DC isolée de la coculture de la souche 6 et de la souche 7. La seule 4OHB-DC précédemment purifiée est celle de He et Wiegel (1995) isolée de *Sedimentibacter hydrozybenzoïcus* (Zhang et Wiegel, 1990 ; Zhang et Wiegel, 1994). Elle effectue à la fois la décarboxylation du 4-OHB et la carboxylation du phénol, la première activité étant nettement privilégiée. Par contre, l'enzyme isolée par Li et al. (2000) diffère de celle de He et Wiegel (1995) par son N-terminal, son poids moléculaire (420 vs 350 Kda), son nombre de sous- unités (4 x 119 Kda vs 6 x 57 Kda) et son Km (5.4 mM vs 0.4 mM). De plus, la 4OHB-DC de Li et al. est stimulée par les cations Ca^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+} et Mg^{2+} tandis que celle de He et Wiegel ne dépend d'aucun cation. En 1999, Huang, He et Wiegel ont trouvé le gène codant pour leur 4OHB-DC, le gène *ohb1*. Il a été cloné et exprimé chez *Escherichia coli* DH5α. La protéine résultante OHB1 exprimé chez *E. coli* est similaire à la protéine native (4OHB-DC). Le cadre de lecture *ohb1* a une longueur de 1440 pb et code pour 480 acides aminés. D'après sa séquence en acides aminés, le gène *ohb1*, codant pour la 4OHB-DC chez *S. hydroxybenzoïcus* ferait partie d'une nouvelle famille de gènes.

2. Matériel et méthodes

2.1 Souches bactériennes utilisées et conditions de culture

2.1.1 Souche LR 7.2

La souche LR 7.2 a été isolée en conditions anaérobies, à partir d'une culture liquide de la souche 7, dans un milieu (agar 0,3% (p/v)) de Boyd modifié contenant 25 mL de surnageant de culture de *Clostridium sporogenes* M55 et 1,5 mM de 4-hydroxybenzoate (4-OHB) (Section 1.8).

La souche LR 7.2 a été maintenue en conditions anaérobies dans 45 mL d'un milieu de Boyd modifié (section 2.2.1) auquel ont été ajoutés 25 mL de surnageant de culture de la souche 6 ou de *Clostridium sporogenes* M55 (section 2.2.2), 1,5 mM de 4-OHB et 0,5% (v/v) d'extrait de levures. Un volume de 3 mL d'une culture de la souche LR 7.2 ayant complété la transformation du 4-OHB a servi d'inoculum. Les cultures ont été incubées à 37°C jusqu'à ce que la transformation du 4-OHB ait été complétée.

Une fois la transformation du 4-hydroxybenzoate complétée, les cultures ont toutes été conservées à 4°C puisqu'à cette température les cellules demeurent viables sans toutefois croître et présenter une activité. Quelques cultures ont également été congelées à –80°C dans du glycérol 15% (v/v) et d'autres lyophilisées, ce qui a permis la conservation à long terme de la souche.

2.1.2 Souche 6

La souche 6 a été obtenue d'une coculture (souche 6 et 7) provenant du même consortium méthanogène à partir duquel la souche LR 7.2 a été isolée (section 1.8). Elle a été cultivée dans 70 mL d'un milieu de Boyd modifié (section 2.2.1) en conditions anaérobies. Les milieux de culture ont été inoculés avec 1 mL de culture de la souche 6 et incubés à 37°C durant 5 à 8 jours. La conservation de cette souche s'est effectuée par l'entreposage de certaines de ces cultures à 4°C.

2.1.3 *Clostridium sporogenes* M-55

Clostridium sporogenes M-55 a été obtenue de la collection du Dr Fredette de l'INRS-Institut Armand-Frappier. Cette souche bactérienne a été déposée à l' « American Type Culture Collection » (ATCC) et à la « Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen » (DSMZ) sous le nom de *Clostridium butyricum* M55 (ATCC 13732, DSMZ 754). Une étude subséquente a cependant démontré qu'elle était similaire à *C. sporogenes* M55 (Möller, Hippe, Gottschalk, 1986). *C. sporogenes* M55 a été remise en culture par Duckett (2000) à partir d'un lot lyophilisé en 1972. Elle a été cultivée dans 70 mL d'un milieu de Boyd modifié (section 2.2.1) en conditions anaérobies. Les milieux de culture ont été ensemencés avec 1 mL d'inoculum et incubés à 37°C durant 5 à 8 jours. La conservation de cette souche s'est effectuée par l'entreposage de certaines de ces cultures à 4°C.

2.2 Milieux de culture

2.2.1 Milieu de Boyd modifié

Le milieu minéral de Boyd (Boyd et al., 1963) additionné d'extrait de levures a été utilisé. Ce milieu est nommé « milieu de Boyd modifié #2 » ou BM2 dans le présent mémoire. La différence de ce milieu avec le milieu BM utilisé par Duckett (2000) se situe au niveau de l'extrait de levures (qui remplace le protéose peptone) et des concentrations de Na_2S et de fer qui ont été réduites d'un facteur 10. Cette recette a été élaborée après les essais décrits à la section 2.4.1 concernant la réduction du précipité FeS. Pour préparer le milieu BM2 destiné à la culture de la souche LR 7.2, les ingrédients suivants ont été dissous dans 918 mL d'eau distillée : 0,27g de KH_2PO_4 (Baker, Phillipsburg, NJ), 0,35g de K_2HPO_4 (Fluka Biochemika, Buchs, Suisse), 0,53g de NH_4Cl (Fisher, Montréal, Qc),$l_2.6H_2O$ (Fluka Biochemika), 0,0006g de résazurine (BDH Chemicals, Toronto, On). Un volume de 940 mL d'eau distillé a été utilisé pour la préparation des milieux de culture de *C. sporogenes* M55. Une fois les ingrédients solubilisés, 10 mL d'une solution minérale (0,1g/L Mncl2, 0,1g/L $ZnCl_2$, 0,1g/L $CoCl_2.6H_2O$, 0,1g/L H_3BO_3, 0,1g/L

Na_2MoO_4) et 6,5 mL de NaOH 1N ont été ajoutés. De plus, 3,0 mM de 4-OHB ont été ajoutés dans les milieux servant à la culture de la souche LR 7.2.

Une fois complété, le milieu a été versé dans un ballon à fond plat et il a été bouilli pendant 15 minutes sur une plaque chauffante. Durant le chauffage, le ballon a été branché à une colonne réfrigérante pour éviter l'évaporation du milieu. Cette étape de chauffage était essentielle afin d'éliminer l'oxygène présent dans le milieu. Une fois bouilli, le milieu a été transvidé dans des bouteilles sérologiques au volume désiré (66 ou 41 mL). Les bouteilles contenant 66 mL ont servi à la culture de la souche 6 et de *Clostridium sporogenes* M55 tandis que celle contenant un volume de 41 mL ont servi à la culture de la souche LR 7.2. Le milieu contenu dans les bouteilles sérologiques a été barboté durant 5 minutes sous un jet gazeux de 10% H_2, 10% CO_2 et 80% N_2 (Praxair, Mississauga, On). Les bouteilles ont été fermées avec des bouchons de butyle (Bellco, Vineland, NJ) et scellées avec des anneaux de métal (Thompkins seal, Pottstown, PA) afin de préserver l'anaérobiose. Les milieux ont ensuite été stérilisés à l'autoclave à 121°C durant 20 minutes.

Suite à l'autoclavage, les milieux refroidis (41 mL et 66 mL) ont été complétés avec 0,7 mL d'une solution de vitamines (Wolin, Wolin et Wolfe, 1963), 1 mL de $NaHCO_3$ 10% (p/v) (BDH), 2 mL d'extrait de levures 20% (p/v) (Difco Laboratories, Détroit, MI), 0,7 mL d'une solution de $MgCl_2.6H_2O$ 1% (Fluka Biochemika), $CaCl_2.2H_2O$ 0,73% (Anachemia, Montréal, Qc) et $FeCl_2.4H_2O$ 0,02% (Anachemia) et 0,05 mL de $Na_2S.9H_2O$ 7% (Anachemia). Suite à ces ajouts, le volume final des milieux servant à la culture de la souche LR 7.2 était de 45 mL et celui des milieux servant à la culture de la souche 6 et de *Clostridium sporogenes* M55 était de 70 mL. La solution de vitamines était composée de : 2 mg/L biotine, 2 mg/L acide folique, 10 mg/L pyridoxine, 5 mg/L riboflavine, 5 mg/L thiamine, 5 mg/L acide nicotinique, 5 mg/L acide pantothénique, 0,1 mg/L vitamine B12, 5 mg/L acide p-aminobenzoïque, 5 mg/L acide thioctique. Toutes les solutions ajoutées après la stérilisation ont dû être filtrées sur une membrane de 0,22 µm (Nalgene, Rochester, NY) et barbotées sous un mélange gazeux de 10% H_2, 10% CO_2, 80% N_2.

2.2.2 Surnageant de la souche 6 ou de *Clostridium sporogenes* M55

Le surnageant a été préparé à partir de cultures de la souche 6 ou de *C. sporogenes* M55 ayant été incubées de 5 à 8 jours à 37°C dans un milieu de Boyd modifié (section 2.2.1). Premièrement, les cultures ont été autoclavées à 121°C pendant 20 minutes. Une fois refroidies, ces cultures ont été transvidées, à l'intérieur d'une enceinte anaérobie, dans des bouteilles à centrifugation Beckman de 500 mL. Ensuite, elles ont été centrifugées à 4°C pendant 60 minutes à 18 500 x g dans un appareil Beckman Aventi J-25 muni d'un rotor JLA-10,500. Le surnageant obtenu a été filtré sur du coton fromage dans une enceinte anaérobie et versé dans des bouteilles sérologiques de 100 mL. Les bouteilles ont été fermées avec des bouchons de butyle et scellées avec des anneaux de métal. Le surnageant a été stérilisé à 121°C pendant 20 minutes. Celui-ci a par la suite été refroidi avant d'être ajouté au milieu de Boyd modifié.

2.3 Méthodes analytiques

2.3.1 Suivi du phénol, du 4-OHB et du benzoate par GC-FID

D'abord, les composés aromatiques ont été extraits du milieu de culture. La procédure d'extraction a débuté par l'ajout des réactifs suivants à 1 mL de milieu de culture prélevé stérilement à l'aide d'une seringue et d'une aiguille : 20 µL d'une solution du standard interne *p*-crésol (7 mM) (Baker), 200 µL de H_2SO_4 50% (v/v) (Fisher), 4 g de NaCl (Fisher), 1 mL d'acétate d'éthyle (EM Science, Gibbstown, NJ). Ensuite, les échantillons ont été agités 30 secondes et centrifugés 1 minute à 1000 x g. Après la centrifugation, les 2/3 de la phase éther (phase supérieure) ont été prélevés et ajoutés à un tube contenant 3 g de Na_2SO_4 (Fisher). Les tubes ont été placés à –20°C pendant 20 minutes. Un volume de 240 µL a été prélevé de ces tubes et ajouté à un flacon à chromatographie contenant 60 µL de N,O-bis (triméthylsilyl)-trifluoroacélanide (BSTFA) (Supelco, Park Bellefonte, PA). Les flacons ont été fermés avec des bouchons et mis durant 20 minutes à 70°C. Après ce temps, 1 µL de chaque échantillon a été injecté sur une colonne capillaire (5% méthyl-silicone) de 30 m et de 0,25 mm de diamètre interne (J&W Scientific, Folsom, Ca) d'un appareil à chromatographie en phase gazeuse (modèle 5890) muni d'un

injecteur automatique et d'un contrôleur HP 7673A (Hewlett Packard Canada, Kirkland, Qc). Cet appareil était couplé à un détecteur à ionisation à la flamme. L'hélium a servi de gaz porteur (Praxair). La température initiale du four était de 50°C. Ensuite, elle a été augmentée de 5°C/minute jusqu'à 100°C. Le four est resté à cette température durant 6 minutes, puis la température a été augmentée de 20°C/minute jusqu'à 230°C et de 30°C/minute jusqu'à 310°C. Finalement, le four est resté à cette température durant 2 minutes. Les températures de l'injecteur et du détecteur lors de la chromatographie étaient respectivement de 250 et de 340°C. Le logiciel d'acquisition et d'analyse des données était HP Chemstation version A.03.34.

2.3.2 Suivi du [D_4]-4-OHB par GC-MS

Après avoir ajouté du [D_6]-phénol dans les milieux de culture, nous avons vérifié la présence de [D_4]-4-OHB par spectrométrie de masse suite à une chromatographie en phase gazeuse. Les échantillons ont été extraits par la procédure décrite à la section 2.3.1 et un volume de 1 µL de chaque échantillon a été injecté sur une colonne capillaire identique à celle décrite ci-dessus (section 2.3.1) d'un appareil à chromatographie gazeuse de type Varian 3005 (Varian, Walnut Creek) couplé à un spectromètre de masse à trappe ionique (Ion Trap 800, Finnigan, San Jose). Le même programme de température que celui décrit à la section 2.3.1 a été utilisé.

2.3.3 Suivi des analogues du 4-OHB et de différents composés phénoliques par HPLC

Différents composés analogues au 4-OHB et composés phénoliques énumérés à la section 2.4.11 ont été analysés par chromatographie en phase liquide (HPLC). Les échantillons de 1 mL de culture ont d'abord été équilibrés avec un pourcentage en acétonitrile/acide acétique 1% (v/v) égal à celui contenu dans le solvant de départ utilisé pour la chromatographie (voir composition du solvant). Ensuite, ils ont été centrifugés pendant 5 minutes à 15 000 x g avec un appareil de table Biofuge (Tonlab, Montréal, QC). Un volume de 10 µl du surnageant obtenu a été injecté sur une colonne Nova Pak C18 de 3,9 x 150 mm d'un appareil à chromatographie modèle 600 (Waters Corporation, Mississauga,

Ontario) muni d'un injecteur automatique Waters 717 Plus et d'un détecteur Waters 486. Le solvant utilisé pour la chromatographie des composés analogues au 4-OHB, du catéchol et du 2-aminophénol était composé de 10% acétonitrile et de 90% H_2O/acide acétique 0,1%. Pour les autres composés phénoliques, le solvant utilisé au départ était composé de 20% acétonitrile et de 80% H_2O/acide acétique 0,1%. Durant les 4 premières minutes, le pourcentage d'acétonitrile a augmenté linéairement jusqu'à 40%. Ensuite, le solvant est resté à ce pourcentage d'acétonitrile durant 2 minutes, puis est redescendu à 20% en 3 minutes. Le débit du solvant était de 2 mL/minute. Les composés ont été détectés à une longueur d'onde de 220 nm. Les données ont été analysées par le logiciel Millennium version 3.05.01 (Waters Corporation).

2.3.4 Suivi de la croissance par densité optique

L'évaluation de la croissance de la souche LR 7.2 a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre Spectronic 1001 Plus (Milton Roy, Rochester, NY) ajusté à une longueur d'onde de 400 nm. Un échantillon de 1 mL a été prélevé à l'aide d'une seringue et d'une aiguille et placé dans une cuvette en acrylique pour spectrophotomètre (Sarstedt, Montréal, QC). Pour chaque mesure, un témoin négatif non-inoculé a été préparé. La valeur de ce témoin négatif a dû être soustraite des valeurs de densité optique obtenues pour les différents échantillons.

2.4 Caractérisation physiologique de la souche LR 7.2

2.4.1 Milieux exempts du précipité FeS

Différents milieux de cultures ont été testés afin d'éliminer le précipité fer-soufre formé dans les milieux et de vérifier leur effet sur la souche LR 7.2. Premièrement, des milieux avec de la cystéine ou du Na_2S 0,05% (p/v) ont été préparés et ont été filtrés avant leur ensemencement avec la souche LR 7.2. Ensuite, d'autres milieux avec de la cystéine ou du Na_2S 0,05% et 10 fois moins de fer ($FeCl_2$ 0,002 g/L) ont été préparés. Finalement, des milieux contenant à la fois 10 fois moins de Na_2S (0,005%) et de fer ($FeCl_2$ 0,002 g/L) ont été préparés. Pour cette expérience et celles décrites ci-dessous,

tous les essais ont été effectués en duplicata. De plus, un témoin positif contenant 0,02g/L de $FeCl_2$ et 0,05% de Na_2S ainsi qu'un témoin négatif non-inoculé ont toujours été préparés. L'activité de transformation du 4-OHB de ces cultures a été suivie par GC-FID (section 2.3.1). Étant donné que le milieu avec 10 fois moins de $FeCl_2$ (0,002g/l) et de Na_2S (0,005%) a permis d'éliminer le précipité fer-soufre, les expériences suivantes ont été faites avec ce milieu. Grâce à ce milieu et à l'augmentation de la concentration en 4-hydroxybenzoate (section 2.4.5), il a été possible de suivre la croissance de la souche par densité optique.

2.4.2 Comparaison entre le surnageant de culture de la souche 6 et celui de *Clostridium sporogenes* M55

Des milieux contenant 25 mL de surnageant de culture de la souche 6 et d'autres contenant 25 mL de surnageant de culture de *C. sporogenes* M55 ont été préparés afin de comparer l'activité de transformation du 4-OHB. La croissance n'a pas été mesurée puisqu'elle était toujours trop faible. Les deux surnageants ont été préparés tel que décrit dans la section 2.2.2. L'activité de transformation du 4-OHB de ces cultures a été suivie par GC-FID (section 2.3.1). Le milieu contenant le surnageant de *C. sporogenes* M55 a été utilisé dans les expériences subséquentes.

2.4.3 Ajout de $Na_2S_2O_4$ au milieu de culture

Au cours de cette expérience de caractérisation physiologique, 1,5 % (p/v) de $Na_2S_2O_4$ a été ajouté au milieu de culture dans le but d'optimiser les conditions de culture de la souche LR 7.2. Un témoin positif ne contenant pas de $Na_2S_2O_4$ a également été préparé. L'activité de transformation du 4-OHB de ces cultures a été suivie par GC-FID. La croissance de la souche LR 7.2 dans ces cultures n'a pu être mesurée étant donnée qu'elle était trop faible.

2.4.4 Barbotage des milieux de culture avec différents mélanges gazeux

Des milieux BM2 ont été préparés en les barbotant avec différents mélanges gazeux et ont été comparés à des milieux BM2 barbotés avec le mélange gazeux 10% H_2, 10%

CO_2, 80% N_2. Les autres mélanges gazeux (H_2 : CO_2 : N_2) utilisés étaient en pourcentage: H_2 : CO_2 : N_2 (10 : 0 : 90), (20 : 0 : 80), (80 : 0 : 20) et (0 : 0 : 100). Même si certains de ces mélanges ne contenaient pas de CO_2 gazeux, le milieu contenait toujours une source de CO_2 soit celle provenant du $NaHCO_3$. Le surnageant utilisé pour la fabrication des différents milieux a également été barboté avec le mélange gazeux correspondant avant d'être autoclavé. L'activité de transformation du 4-OHB de ces cultures a été suivie par GC-FID (section 2.3.1) et leur croissance par densité optique (section 2.3.4).

2.4.5 Variation de la concentration en 4-hydroxybenzoate

Différentes concentrations en 4-OHB ont été testées afin de déterminer la concentration optimale, c'est-à-dire celle permettant une activité et une croissance maximales. Les concentrations en 4-OHB testées étaient : 0, 0,79, 1,26, 4,59, 6,46 et 12 mM. La concentration utilisée normalement était de 1,26 mM. Les solutions de 4-OHB ont été autoclavées et déoxygénées sous jet gazeux avant d'être ajoutées au milieu de culture. L'activité et la croissance de ces cultures ont été suivies régulièrement. Suite à cette expérience, la concentration en 4-OHB utilisée lors de la préparation des milieux de culture était de 3 mM. Cette concentration a permis de suivre la croissance par densité optique.

2.4.6 Variation de la concentration en phénol

Différentes concentrations en phénol ont également été testées afin de déterminer la concentration permettant une croissance et une activité maximales de la souche LR7.2. Les concentrations en phénol testées étaient : 0, 0,99, 1,80, 3,54, 7 et 14,24 mM. La concentration utilisée normalement était de 1,80 mM. Les solutions stériles ont été ajoutées après l'autoclavage des milieux BM2. L'inoculum ayant servi à ensemencer ces milieux provenait d'une culture de la souche LR 7.2 contenant 1,80 mM en phénol. L'activité et la croissance de ces cultures ont ensuite été suivies en fonction du temps.

2.4.7 Ajout d'extrait de levures, de surnageant et de milieu de culture

Après 6 jours de croissance, 2 mL d'extrait de levures 20% (p/v) ont été ajoutés aux milieux BM2 alors que d'autres milieux ont été supplémentés avec 25 mL de surnageant de culture de *Clostridium sporogenes* M55 ou 10 mL de milieu BM2. Par la suite, l'activité et la croissance de ces cultures ont été suivies pendant plusieurs jours.

2.4.8 Détermination du pH optimal

La souche LR 7.2 a été cultivée dans des milieux à différents pH afin de déterminer celui permettant une croissance et une activité maximales. Les pH testés étaient : 6,0, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 et 9,0. Le pH était normalement de 7,5. Le pH de chacun des milieux a été ajusté au départ avec une solution de NaOH 3N, filtrée sur une membrane de 0,22 µm et déoxygénée sous jet gazeux, à l'aide d'une seringue et d'une aiguille pour préserver l'anaérobiose. Ensuite, un échantillon de 1 mL de chacun des milieux a été prélevé à l'aide d'une seringue et d'une aiguille afin de vérifier le pH. L'inoculum ayant servi à ensemencer ces cultures provenait d'une culture de la souche LR 7.2 cultivée à un pH de 7,5. La croissance et l'activité de ces cultures ont été suivies pendant plusieurs jours.

2.4.9 Détermination de la température optimale

La souche LR 7.2 a été cultivée à différentes températures afin de déterminer sa température optimale de croissance et d'activité. Les températures testées étaient : 4, 21, 30, 37, 42 et 55°C. Les cultures étaient incubées à 37 °C. L'inoculum ayant servi à ensemencer ces cultures provenait d'une culture de la souche LR 7.2 cultivée à 37°C. La croissance et l'activité de ces cultures ont été suivies pendant plusieurs jours.

2.4.10 Accepteurs d'électrons

Les accepteurs potentiels d'électrons suivants ont été testés : Na_2SO_4 10 mM (Fisher), Na_2SO_3 10 mM (EM Science), $Na_2S_2O_3$ 10 mM (Baker), soufre 0,2% (p/v), KNO_3 10 mM (Merk & Co. Inc.), KNO_2 10 mM (Baker), $FeCl_3$ 0,02% (Baker), fumarate 10 mM, arsenic 10 mM (Sigma, St-Louis, MO). Chacune des solutions a été filtrée sur une

membrane de 0,22 µm et déoxygénée sous jet gazeux. Les solutions ont été ajoutées à des milieux de culture BM2, avec et sans 4-hydroxybenzoate, dans lesquels le Na_2S a été remplacé par de la cystéine. Un milieu BM2 avec 4-OHB a servi de témoin positif et un autre milieu BM2 sans 4-OHB a servi de témoin négatif. L'activité et la croissance de ces cultures ont été mesurées pendant plusieurs jours.

Une autre expérience a été effectuée avec plusieurs concentrations de sulfate et de sulfite afin de déterminer si, à de plus faibles concentrations, ces derniers pouvaient être utilisés comme accepteurs d'électrons par la souche. Les concentrations testées étaient : 0, 0,25, 0,5, 2, 5 et 10 mM. Les solutions ont été filtrées sur une membrane de 0,22 µm et déoxygénées avant d'être ajoutées à des milieux BM2 contenant de la cystéine en remplacement du Na_2S avec et sans 4-OHB. Un milieu BM2 avec 4-OHB a servi de témoin positif et un milieu BM2 sans 4-OHB a servi de témoin négatif. La croissance et l'activité de ces cultures ont été suivies régulièrement.

2.4.11 Analogues du 4-OHB et du phénol

Différents composés ayant une structure similaire au 4-OHB ont été testés. Les composés testés étaient : le 4-hydroxybenzamide 0,73 mM, le méthyle 4-OHB 3 mM, l'acide 4-hydroxysulfonique 3 mM, le 4-hydroxyacétophénone 0,73 mM, l'alcool 4-hydroxybenzoïque 3 mM, l'hydroquinone 3 mM, le 4-chlorophénol 0,78 mM, l'acide 4-hydroxycinnamique 3 mM, le 4-OHB hydrazide 0,6 mM, le 4-hydroxybenzaldéhyde 3 mM, l'acide 4-hydroxyphényl pyruvique 3 mM, l'acide 3-(4-hydroxyphényl) propionique 3 mM, le *p*-crésol 3 mM, le 3-OHB 3 mM et le 4-hydroxypyridine 1 mM. Également, les composés phénoliques suivant ont été testés à une concentration finale de 3 mM : le catéchol, le 2-bromophénol, le 2-chlorophénol, le 2-fluorophénol et le 2-aminophénol. Chacune des solutions a été filtrée sur une membrane de 0,22 µm et déoxygénée sous jet gazeux avant d'être ajoutée aux milieux de culture ne contenant ni 4-OHB ni phénol. Un milieu de culture contenant du 4-hydroxybenzoate a servi de témoin positif et de point de comparaison. L'activité de ces cultures a été suivie par HPLC (section 2.3.3) et leur croissance par densité optique (section 2.3.4).

2.4.12 Ajout de [D_6]-phénol

Du [D_6]-phénol a été ajouté à une concentration de 3 mM, en remplacement du phénol non-marqué, dans le milieu de culture. Au cours de cette expérience, la présence de [D_4]-4-OHB et de [D_4]-benzoate dans les cultures a été vérifiée par GC-MS (section 2.3.2). Cette analyse a permis de distinguer le 4-OHB marqué de celui non marqué par leur différence de masse.

2.5 Caractérisation génétique de la souche LR 7.2

2.5.1 Détermination du contenu en G + C

La méthode de Mesbah, Premachandran et Whitman (1989) a été utilisée pour déterminer la proportion de guanine et cytosine de l'ADN génomique de la souche LR 7.2. Celle-ci se base sur la quantification par HPLC des différents désoxyribonucléosides obtenus après digestion de l'ADN génomique.

2.5.1.1 Extraction de l'ADN génomique

Deux cultures de 70 mL ont été centrifugées à 18,500 x g pendant 30 minutes à 4°C dans un appareil Beckman Aventi J-25 muni d'un rotor JLA-10,500. Le culot a été suspendu dans 1,0 mL de tampon TEN (Tris-HCl pH 8,0 50 mM, EDTA 10 mM, NaCl 150 mM). L'échantillon a été transféré dans un tube de 1,5 mL et centrifugé durant 10 minutes à 15 000 x g. Le culot a été suspendu dans 0,5 mL de TEN contenant 2.5 mg de lysozyme frais. Après une période d'incubation de 30 minutes à 37°C, 50 µL de sodium dodécyl sulfate (SDS) 20% (p/v) (Fisher) et 5 µL de β-mercaptoéthanol (Bio-rad, Montréal, QC) ont été ajoutés, puis l'échantillon a été incubé pendant 10 minutes à –70°C et pendant 5 minutes à 65°C. Les étapes d'incubation à – 70°C et à 65°C ont été répétées trois fois. Ensuite, 8 µL de protéinase K (0,006 mg/L) (Roche Diagnostics Canada, Laval, QC) ont été ajoutés et l'échantillon a été incubé à 45°C pendant 2 à 3 heures. Un volume de phénol-chloroforme-isoamyl alcool (25 : 24 : 1) a été ajouté, puis l'échantillon a été agité durant 15 secondes et centrifugé pendant 5 minutes à 15 000 x g. Ensuite, la phase

aqueuse contenant l'ADN a été recueillie. Cette étape a été répétée jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de débris cellulaires à l'interface. Un volume de 1 µL de RNase (10 mg/mL) a été ajouté afin de dégrader les ARNs présents dans l'échantillon. L'ADN en solution a par la suite été précipité avec 2 volumes d'éthanol 95% (v/v), incubé à –80°C durant 20 minutes et centrifugé pendant 10 minutes à 15 000 x g. Le culot obtenu correspondait à l'ADN génomique. Celui-ci a été séché et suspendu dans 50 µL d'H_2O.

2.5.1.2 Digestion de l'ADN génomique

À partir de l'ADN génomique extrait, un volume de 25 µL a été chauffé pendant 2 minutes dans l'eau bouillante, puis déposé dans la glace. Cette étape visait la dénaturation de l'ADN génomique. Ensuite, cet ADN dénaturé a été digéré en désoxyribonucléotides suite à une incubation de 2 heures à 37°C avec 50 µL de tampon acétate de sodium 30 mM pH 5,3, 5 µL de $ZnSO_4$ 20 mM et 3 µL de nucléase P1 (340 U/mL) (Roche Diagnostics Canada). Afin d'enlever les groupements phosphates des désoxyribonucléotides pour former des désoxyribonucléosides, l'ADN digéré a été incubé pendant 6 heures à 37°C avec 5 µL de tampon glycine hydrochloride 0,1 M, pH 10,4 et 5 µL de phosphatase alcaline (200 U/mL) (Sigma) provenant de la muqueuse intestinale bovine. Suite à cette incubation, l'échantillon a été centrifugé 4 minutes à 10 000 x g et conservé à –20°C jusqu'à l'étape de chromatographie.

2.5.1.3 Séparation des désoxyribonucléosides et quantification par HPLC

Les désoxyribonucléosides générés ont été séparés et quantifiés par chromatographie en phase liquide (HPLC). L'appareil décrit à la section 2.3.3 a été utilisé. Un volume de 20 µL de l'échantillon a été injecté sur une colonne C18 de 30 cm maintenue à 37°C. Ensuite, les désoxyribonucléosides ont été élués à un débit de 0,5 mL/minute avec un solvant composé de triéthylamine phosphate 20 mM pH 5,1 et de méthanol 12% (v/v), puis ils ont été détectés à une longueur d'onde de 254 nm. Le temps de rétention dépend du caractère hydrophobe de chacun des désoxyribonucléosides. Plus il est hydrophobe, plus son temps de rétention est élevé. La même procédure a été appliquée pour l'ADN du

phage lambda. Ce dernier a servi de standard, car il a un contenu en G+C connu de 49,858 Mol% (Mesbah, Premachandran et Whitman, 1989). Les pics chromatographiques obtenus ont été identifiés par comparaison avec le chromatogramme du phage lambda publié par Mesbah, Premachandran et Whitman. Le contenu en G+C a été déterminé en comparant la proportion (désoxyriboguanosine/(désoxyriboguanosine + désoxyribothymidine)) des aires sous la courbe des pics chromatographiques du chromatogramme de la souche LR7.2 avec celle obtenue pour le phage lambda.

Calcul du contenu G+C :

	Proportion (dG/(dG+dT))	**Contenu G + C (Mol%)**
Lambda :	**X**	**49,858**
LR 7.2 :	**Y**	**?**

Contenu G+C LR 7.2 = (Y x 49,858)/X

dG : aire sous la courbe du pic désoxyriboguanosine

dT : aire sous la courbe du pic désoxyribothymidine

X : proportion phage lambda

Y : proportion souche LR 7.2

2.5.2 Détermination de la séquence du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S

2.5.2.1 Extraction de l'ADN génomique par billes de verre

Deux cultures de 70 mL de la souche LR 7.2 ont été centrifugées à 8000 x g pendant 20 minutes. Le culot obtenu suite à la centrifugation a été suspendu dans 0,5 mL de la solution d'extraction (100 mM NaCl, 500 mM tris-HCl pH 8,0, SDS 10% (p/v)). Ensuite, 0,5 g de billes de verre (Braun, Melsungen, Allemagne) de 0,17 mm de diamètre, 0,5 mL de la solution d'extraction, 0,15 mL d'EDTA 0,5 M et 0,5 mL du culot suspendu ont été ajoutés dans un tube vissé de 1,5 mL. L'ADN a été extrait par lyse des cellules à l'aide de l'homogénéisateur Retsh (Brinkmann Instrument, Mississauga, ON). Les cellules ont été homogénéisées pendant 5 minutes à vitesse maximale, puis centrifugées 3 mi-

nutes à 15 000 x g. Le surnageant obtenu a été prélevé, placé dans un tube de 1,5 mL et purifié par la méthode phénol-chloroforme-isoamyl alcool (section 2.5.1.1).

2.5.2.2 Amplification par PCR

La région codant pour le gène de l'ARN ribosomal 16S (ADNr 16S) a été amplifiée par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à l'aide des amorces pA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et pH (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') correspondant à des séquences conservées de l'ADNr 16S des eubactéries (Genbank JO1695, Massol-Deya et al., 1995). Un volume de 10 µL d'ADN a été incorporé à un mélange de réactifs composé de 71 µL d'H_2O, 0,5 µL de la polymérase Taq (5000 U/mL) (Pharmacia, Mississauga, ON), 10 µL de tampon pour la polymérase Taq (Pharmacia), 3 µL de chacune des deux amorces pA (25 µM) et pH (25 µM) et 2 µL de dNTPs (10,0 mM). Le mélange de réactifs a été placé dans un appareil à PCR DNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). Le programme débutait par 3 minutes à 80°C, 5 minutes de dénaturation à 94°C, 5 minutes d'appariement des amorces à 55°C et 2 minutes d'élongation à 72°C. Ensuite, 35 cycles de 1 minute de dénaturation à 94°C, de 1 minute d'appariement à 55°C et de 2 minutes d'élongation à 72°C ont été programmés. Finalement, un cycle supplémentaire de 10 minutes d'élongation à 72°C a été programmé. La présence unique du fragment de 1,5 Kb a été vérifiée suite à l'amplification PCR en faisant comigrer le produit PCR et un standard de poids moléculaire (Bio-rad, Montréal, QC) sur un gel d'agarose 1,5% (p/v). Une fois vérifié, le produit PCR résultant a été précipité à l'acétate d'ammonium ($AcNH_4$) et à l'éthanol 95% (v/v) avant d'être cloné.

2.5.2.3 Clonage de l'ADNr 16S

Chacun des amplicons de 1,5 Kb de l'ADNr 16S, obtenu suite à l'amplification PCR, a été inséré dans le vecteur pGEM®-T-Easy (Proméga, Madison, WI), contenant un gène de résistance à l'ampicilline, dans le site de restriction *Eco*RI du gène de la β-galactosidase. Ensuite, les vecteurs résultants ont été insérés dans *E. coli* DH5α par la méthode de transformation par choc thermique. Cette méthode consiste à incuber à 42°C

pendant 90 secondes 5 μL du vecteur contenant l'insert avec 100 μL de cellules compétentes de *E. coli* DH5α, puis de laisser reposer les cellules 2 minutes sur la glace. Les cellules ainsi transformées ont été incubées pendant 45 minutes à 37°C dans un bouillon SOC (SOB pH 7,0 + glucose 0,01 M) sous agitation et étalées sur un milieu solide SOB pH 7,0 (Bacto tryptone 20 g/L, extrait de levures 5 g/L, NaCl 0,5 g/L, KCl (1M) 2,5 mL/L, $MgCl_2$ (1M) 10 mL/L, Agar 1,5% (p/v)) contenant par litre 2 mL d'ampicilline (500X), 2 mL de 5-bromo-4-chloro-3-idolyl-β-D-galactoside (XGal 500X) et 5 mL d'isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG 200X) pour sélectionner les clones contenant le vecteur. Les milieux solides ont été incubés à 37°C pendant 16 à 24 heures.

2.5.2.4 Vérification de la présence de l'insert dans le vecteur

Environ 10 colonies blanches, représentant les clones positifs, ont été repiquées dans 3 mL de bouillon SOB avec ampicilline et incubées sous agitation pendant 24 heures à 37°C. Un volume de 1,0 mL des cultures résultantes a été prélevé et centrifugé 30 secondes à 15 000 x g. Le culot obtenu a été lavé avec du tampon TEN. L'ADN plasmidique a été extrait des cellules par phénol-chloroforme (section 2.5.1.1) et précipité à l'acétate d'ammonium et à l'éthanol 95% (v/v). Finalement, l'ADN plasmidique a été traité avec 50 μL de RNase (10 μg/mL).

Par la suite, les plasmides extraits des cellules ont été digérés avec *Eco*RI afin de vérifier la présence de l'insert dans le plasmide. Les clones positifs étaient ceux possédant un fragment d'environ 1,5 Kb à l'intérieur du plasmide.

2.5.2.5 Extraction et purification de l'ADN plasmidique et séquençage

Un des clones possédant l'insert a été repiqué dans 250 mL de bouillon SOB contenant de l'ampicilline et incubé pendant 24 heures à 37°C. Les cellules ont été déposées par centrifugation pendant 10 minutes à 7000 rpm à 4°C. Le culot obtenu a été incubé pendant 10 minutes à la température de la pièce avec 9 mL de TEG (Tris 1 M pH 8.0, EDTA 0,5 M pH 8,0, glucose 1,8 g/200 mL) et 1 mL de lysozyme frais (10 mg/mL). Ensuite, un volume de 30 mL de NaOH 0,2 M et de SDS 1% (p/v) a été ajouté et le tout a été

incubé pendant 5 minutes à la température de la pièce. Après avoir ajouté 15 mL d'acetate de cobalt 3 M pH 4,8, l'échantillon a été placé sur la glace pendant 15 minutes, centrifugé pendant 15 minutes à 13 575 x g à 4°C et filtré sur coton fromage. Le filtrat recueilli suite à la centrifugation a été incubé à température pièce durant 60 minutes avec 0,6 volume d'isopropanol. Suite à l'incubation, l'échantillon a été centrifugé pendant 10 minutes à 13 575x g et le culot résultant a été suspendu dans 1,875 mL de TE (Tris. HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 10 mM) et 6,25 µL d'acétate d'ammonium 10 M, puis placé sur la glace pendant 20 minutes. Le tout a été centrifugé à 13 575 x g pendant 10 minutes et le surnageant a été précipité pendant 20 minutes sur la glace avec 2 volumes d'éthanol 95% (v/v). Une autre centrifugation à 13 575 x g pendant 15 minutes a été effectuée et le culot a été suspendu dans 7 mL de TE, puis incubé à 37°C avec 2 µL de RNase (10 mg/mL) pendant 15 minutes.

Suite à l'extraction, l'ADN plasmidique obtenu a été purifié en lui ajoutant 3 mL de NaCl 5 M, 2,5 mL de PEG 30% (v/v) et de NaCl 1,5 M et en laissant le tout 30 minutes sur la glace. L'échantillon résultant a été centrifugé pendant 10 minutes à 15 000 x g. Le culot obtenu a été suspendu dans 0,5 mL de TE, puis purifié par phénol-chloroforme-isoamyl alcool (section 2.5.1.1). Ensuite l'ADN a été précipité à l'acétate d'ammonium et à l'éthanol 95% (v/v), puis suspendu dans environ 400 µL d'eau.

Finalement, l'ADN a été séquencé à l'aide des amorces pA, pH, 926f, 907r, 533r et 530f par la méthode des didésoxyribonucléotides au service de séquençage de l'INRS-Institut Armand-Frappier. Le séquenceur utilisé était ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA).

2.6 Vérification de l'identité de *C. sporogenes* M 55

Nous avons sequencé une partie de l'ADNr 16S de *C. sporogenes* M 55 dans le but de confirmer son identité. Pour ce faire, nous avons extrait l'ADN génomique comme décrit à la section 2.5.1.1, amplifié par PCR la région codant pour l'ADNr 16S (section 2.5.2.2) et fait séquencer directement le produit PCR à l'aide des amorces pA et pH (section 2.5.2.5).

2.7 Caractérisation morphologique de la souche LR 7.2

2.7.1 Résistance à la chaleur et coloration au vert de malachite

Afin de déterminer si la souche LR 7.2 forme des spores, un test à la chaleur suivi d'une coloration au vert de malachite ont été effectués. Trois types de cultures de la souche LR 7.2 ont été préparés avec le milieu BM2 : la souche LR 7.2 seule, la souche LR 7.2 en présence de *C. sporogenes* M 55 et la souche LR 7.2 en présence de la souche 6. Après 6 jours d'incubation à 37°C, les trois types de cultures ont été incubés pendant 10 minutes à 70, 75 ou 80°C. Quelques gouttes des différentes cultures ont été prélevées immédiatement après le traitement à la chaleur. Ensuite, les cellules ont été fixées à la chaleur sur une lame de microscope, puis colorées au vert de malachite. Pour se faire les lames ont été complètement recouvertes avec une solution de vert de malachite 5% (p/v) et chauffées pendant 1 minute sur la flamme, elles ont été refroidies durant 1 minute, rincées et colorées avec de la fushine basique. Une fois colorées, les lames ont été observées au microscope optique. Suite au traitement à la chaleur, un volume de 1 mL de chacune des cultures a été prélevé et transféré dans un nouveau milieu BM2 afin de vérifier si les cellules étaient toujours viables. Les nouvelles cultures ont été incubées à 37°C et l'activité de transformation du 4-OHB a été mesurée après 10 jours et 1 mois d'incubation. De plus, la même expérience a été réalisée avec les mêmes types de cultures, mais après 10 jours d'incubation à 37°C au lieu de 6 jours.

2.7.2 Analyse des acides gras membranaires

Sept cultures de la souche LR 7.2 incubées à 37°C durant 6 jours ont été centrifugées 10 minutes à 15 000 x g. Ensuite, le culot a été resuspendu dans du glycérol 15% (v/v). Les acides gras membranaires du culot de cellules ont été saponifiés, c'est-à-dire décomposés en sel d'acides gras par une base. Ensuite, les acides gras saponifiés ont été méthylés et ils ont été extraits de la phase acide et transférés dans la phase organique. Les acides gras méthylés ont ensuite été séparés et identifiés à l'aide du système d'identification microbienne Sherlock (MIS version 2.11)) (MIDI Inc., Newark, DE). Ce système contenait un appareil de chromatographie en phase gazeuse Hewlett-Packard 6890 muni d'un injecteur automatique (modèle 7673) et du logiciel d'analyse des données Hewlett-Packard ChemStation. Le profil des acides gras membranaires obtenu a ensuite été comparé avec celui de microorganismes de référence d'une base de donnée contenue dans le logiciel.

2.7.3 Observations au microscope électronique

D'abord les cellules ont été fixées avec une solution de glutaraldéhyde 1 à 2% (p/v) et par la suite, elles ont été colorées négativement avec une solution de phosphotungstate 2% (p/v). Les cellules colorées ont été observées à l'aide du microscope électronique Hitachi, modèle 7100 (Hitachi, Tokyo, Japon).

3. Résultats

3.1 Caractérisation physiologique de la souche LR 7.2

3.1.1 Activité de la souche LR 7.2 en conditions standards

Au début de ce projet, la souche LR 7.2 était maintenue dans un milieu de culture liquide constitué de 45 mL d'un milieu de Boyd modifié (section 2.2.1) et de 25 mL de surnageant de *Clostridium sporogenes* M 55 (section 2.2.2) auquel a été ajouté du 4-hydroxybenzoate à une concentration de 1,5 mM et de l'extrait de levures 0,05% (p/v) comme source de carbone. À cette étape, ce milieu de culture constituait le témoin positif et le point de comparaison pour les expériences subséquentes. Sous ces conditions, l'activité de transformation du 4-hydroxybenzoate en phénol et en benzoate a été suivie en fonction du temps d'incubation (Figure 11). Cette expérience et toutes les expériences subséquentes ont été effectuées en duplicata. Les faibles écarts-types observés indiquent la fiabilité des résultats obtenus. Le suivi de la croissance par une mesure de la densité optique n'était pas possible avec ce milieu de culture puisqu'il contenait un précipité FeS. Il est important de mentionner que le rapport 4-hydroxybenzoate et benzoate formé a toujours été de un pour un. Par exemple, si le milieu contenait 1,5 mM de 4-hydroxybenzoate, il y avait 1,5 mM de benzoate formé à la fin de la transformation.

3.1.2 Milieux sans précipité FeS

Le premier objectif du projet était de préparer un milieu de culture sans précipité permettant de suivre la croissance par densité optique. Différentes recettes de milieux ont été testées (Figure 12). Parmi les milieux testés, tous ont donné une activité de transformation similaire du 4-hydroxybenzoate en benzoate. Par contre, le milieu dont la concentration en $FeCl_2$ et en Na_2S a été réduite par un facteur 10 s'est avéré plus facile et moins long à préparer. C'est pour ces raisons qu'il a été choisi comme milieu standard pour la maintenance de la souche LR 7.2. Les expériences de caractérisation physiologique effectuées par la suite ont toutes été réalisées avec ce milieu de culture. À ce moment, la croissance de la souche était trop faible pour être suivie par densité optique.

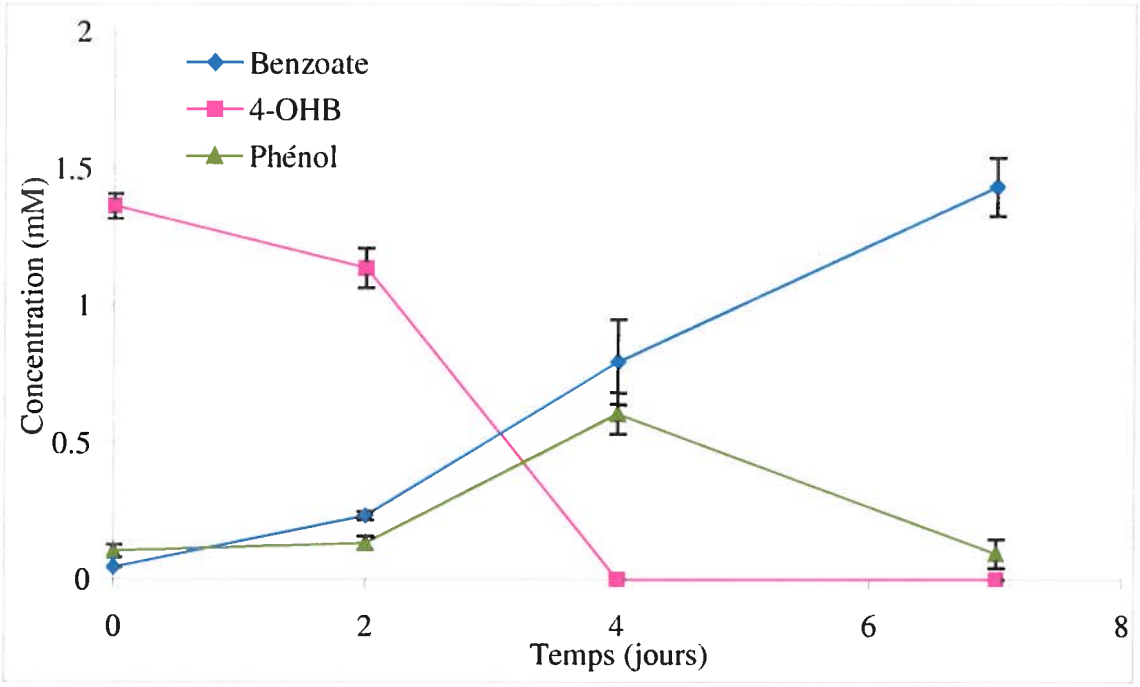


Figure 11: Activité de transformation du 4-hydroxybenzoate en benzoate par la souche LR 7.2 sous des conditions standards

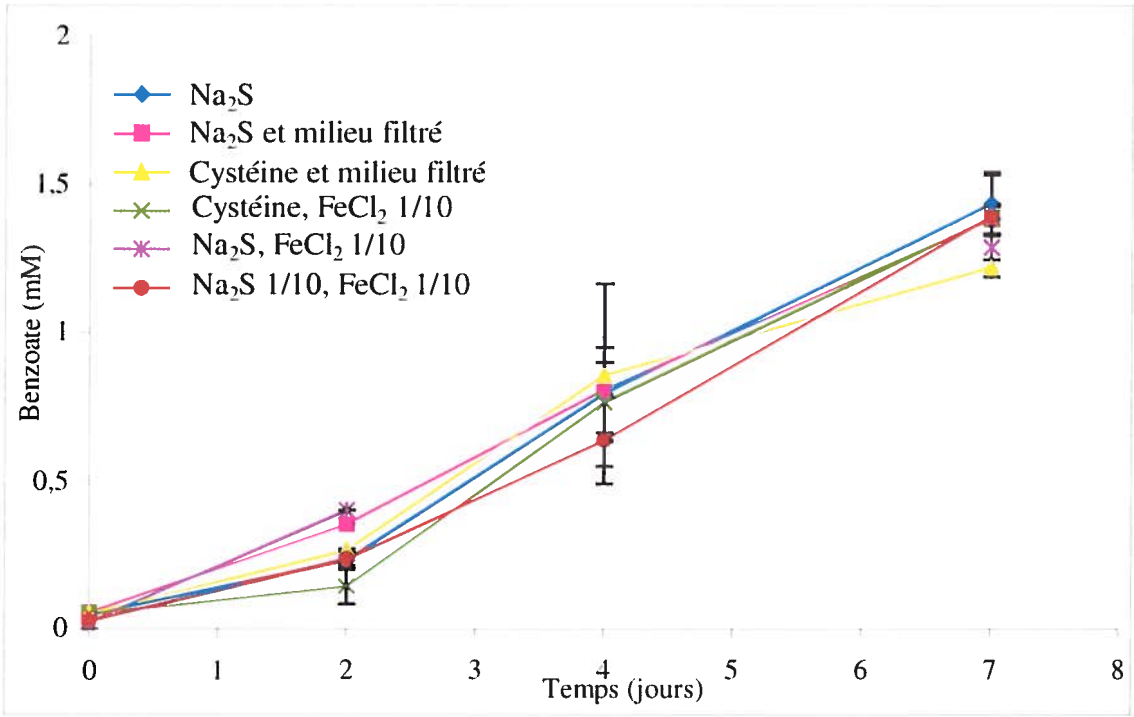


Figure 12 : Effet de milieux sans précipité FeS sur l'activité de la souche LR 7.2

3.1.3 Comparaison entre le surnageant de culture de la souche 6 et celui de *C. sporogenes* M 55

Auparavant, la souche 7 était cultivée avec le surnageant de culture de la souche 6. Une expérience réalisée antérieurement démontrait que le surnageant de *C. sporogenes* M 55 donnait une meilleure activité que celui de la souche 6. À partir de ce moment, le surnageant de la souche 6 a été remplacé par celui de *C. sporogenes* M 55. La présente expérience avait pour but de confirmer ce résultat. La Figure 13 montre que l'activité de transformation du 4-hydroxybenzoate est meilleure dans les milieux contenant un surnageant de culture de *C. sporogenes* M 55 plutôt que dans ceux contenant un surnageant de culture de la souche 6. La souche LR 7.2 a donc été cultivée avec le surnageant de culture de *C. sporogenes* M 55 pour les prochaines expériences. Suite à cette expérience, la croissance de la souche était toujours trop faible pour être suivie par densité optique.

3.1.4 Ajout de dithionite de sodium comme agent réducteur

Le but de cette expérience était de tenter d'améliorer l'activité et la croissance de la souche LR 7.2 par l'ajout d'un second agent réducteur soit le dithionite de sodium ($Na_2S_2O_4$). Pour ce faire, l'activité de transformation du 4-hydroxybenzoate en benzoate de milieux BM2 avec et sans $Na_2S_2O_4$ 0,3% (p/v) a été comparée. Selon la Figure 14, l'activité de transformation du 4-hydroxybenzoate en benzoate est similaire que ce soit en présence ou en absence de $Na_2S_2O_4$. Suite à cette expérience, la croissance était toujours trop faible pour être suivie par densité optique.

3.1.5 Barbotage des milieux de culture avec différents mélanges gazeux

Une expérience a été réalisée afin de déterminer le mélange gazeux le plus avantageux pour la croissance et l'activité de transformation du 4-hydroxybenzoate en benzoate de la souche LR 7.2. La croissance a été déterminée à la fin de l'activité de transformation du 4-OHB par la densité optique d'un échantillon de culture concentré 10 fois. De tous les mélanges gazeux testés, celui composé de 10% H_2 : 10% CO_2 : 80% N_2 a permis la meilleure croissance ainsi que la meilleure activité (Figure 15). Le mélange

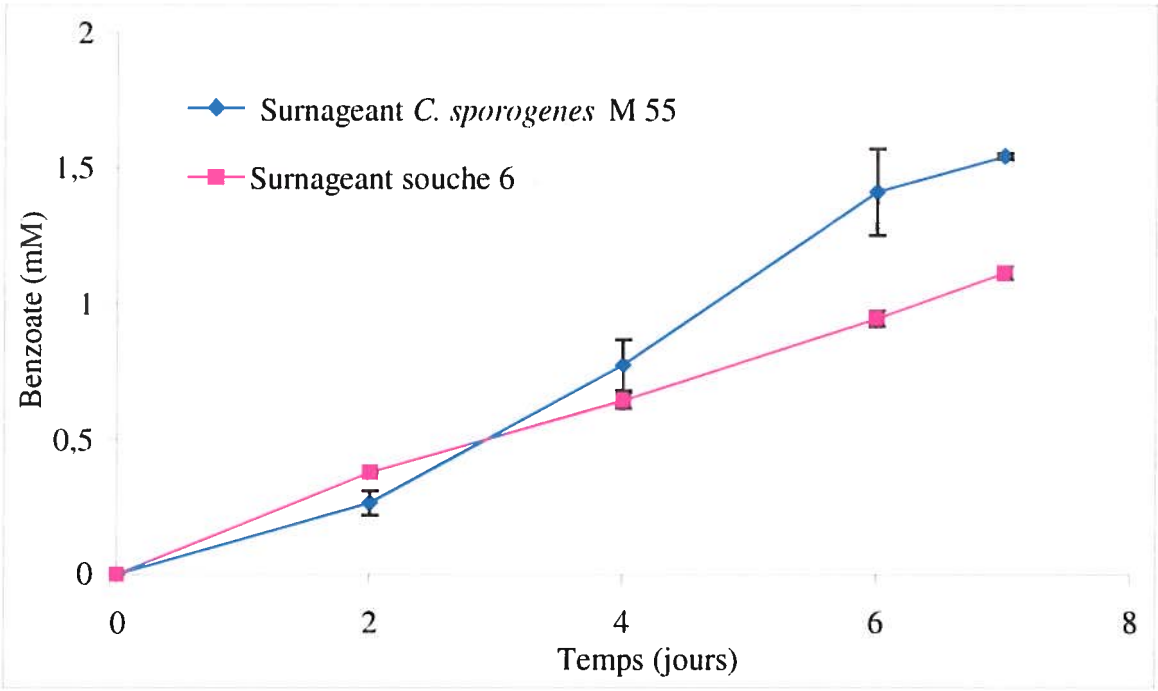


Figure 13 : Comparaison entre le surnageant de culture de *C. sporogenes* M 55 et celui de la souche 6

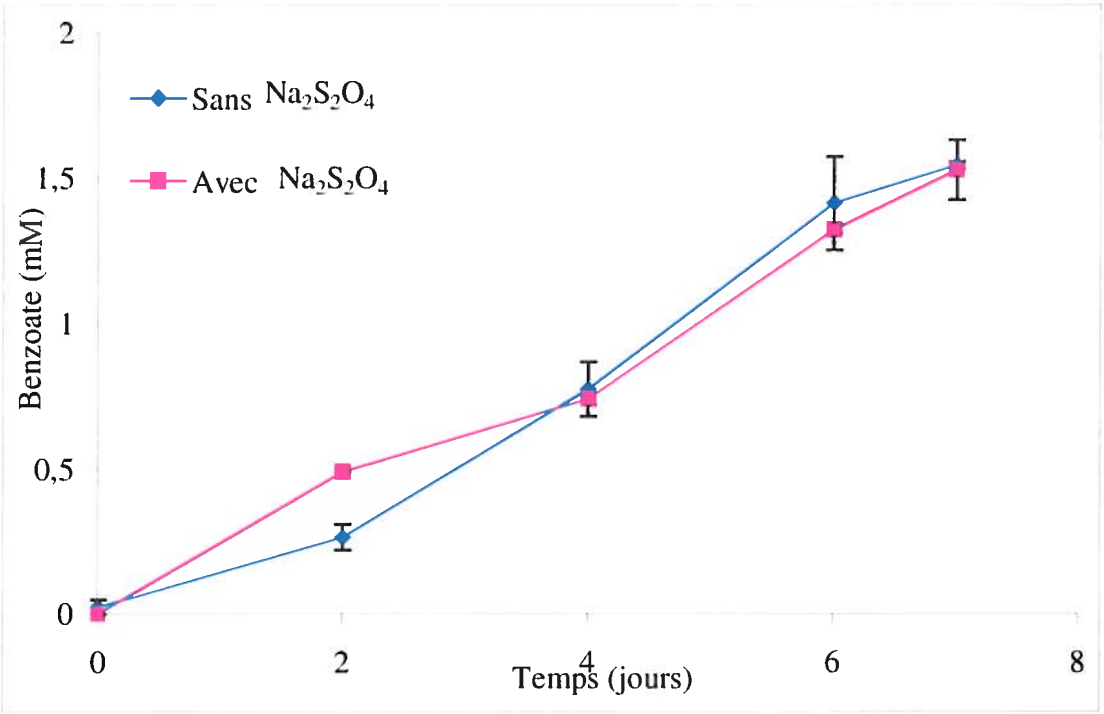


Figure 14: Effet du dithionite de sodium sur l'activité de la souche LR 7.2

composé uniquement de N_2 et celui composé de 10% H_2 : 90% N_2 ont donné des résultats de croissance et d'activité moindres. Finalement, les milieux ayant une teneur en hydrogène plus élevée (20 et 80%) ont permis une plus faible activité et croissance. Le mélange 10% H_2 : 10% CO_2 : 80% N_2 a donc été utilisé pour les expériences suivantes.

3.1.6 Variation de la concentration en 4-hydroxybenzoate

La concentration optimale en 4-hydroxybenzoate, c'est-à-dire celle permettant la meilleure croissance et la meilleure activité de transformation du 4-hydroxybenzoate en benzoate par la souche LR 7.2, a été déterminée au cours de cette expérience. Différentes concentrations ont été testées en comparaison avec celle utilisée dans les milieux standards qui était de 1,26 mM. D'après la Figure 16, la concentration optimale, autant au niveau de la croissance que de l'activité, se situe autour de 6,5 mM. Pour des concentrations inférieures, l'activité et la croissance ont été proportionnelles à la concentration en 4-OHB dans le milieu, alors que pour des concentrations supérieures tel que 11 mM, elles ont toutes deux diminué significativement. Il est important de remarquer qu'en absence de 4-hydroxybenzoate (activité = 0), la croissance de la souche a été nulle. Suite à cette expérience, la souche LR 7.2 a été maintenue dans un milieu contenant 3 mM de 4-hydroxybenzoate puisque cette concentration a permis une bonne croissance et une bonne activité, sans toutefois créer des conditions de cultures optimales qui auraient pu masquer l'effet des autres ajouts.

3.1.7 Variation de la concentration en phénol

La concentration optimale en phénol permettant la meilleure croissance et activité de transformation en benzoate de la souche LR 7.2 a aussi été déterminée. Différentes concentrations ont été testées en comparaison avec la concentration standard qui était de 1,8 mM. D'après la Figure 17, la concentration optimale est autour de 3,5 mM. À des concentrations inférieures, l'activité et la croissance ont été proportionnelles à la concentration en phénol présente dans le milieu, tandis qu'à des concentrations supérieures, elles ont toutes deux diminué significativement. Il est important de remarquer qu'en absence de phénol (activité = 0), la croissance a été nulle. Suite à cette

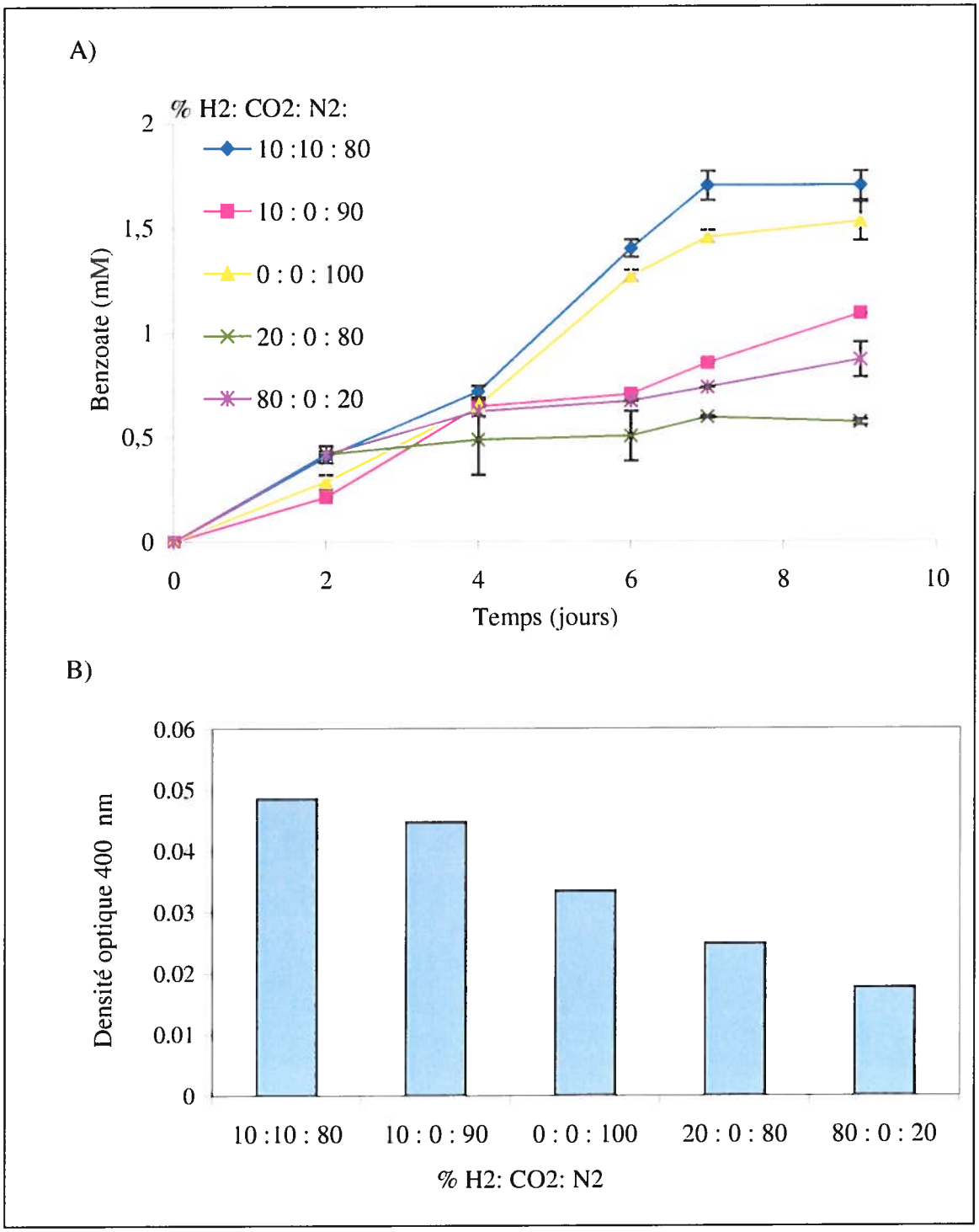


Figure 15 : Effet de la composition du mélange gazeux sur l'activité et sur la croissance de la souche LR 7.2. A) Benzoate formé en fonction du temps. B) Densités optiques obtenues après 9 jours d'incubation.

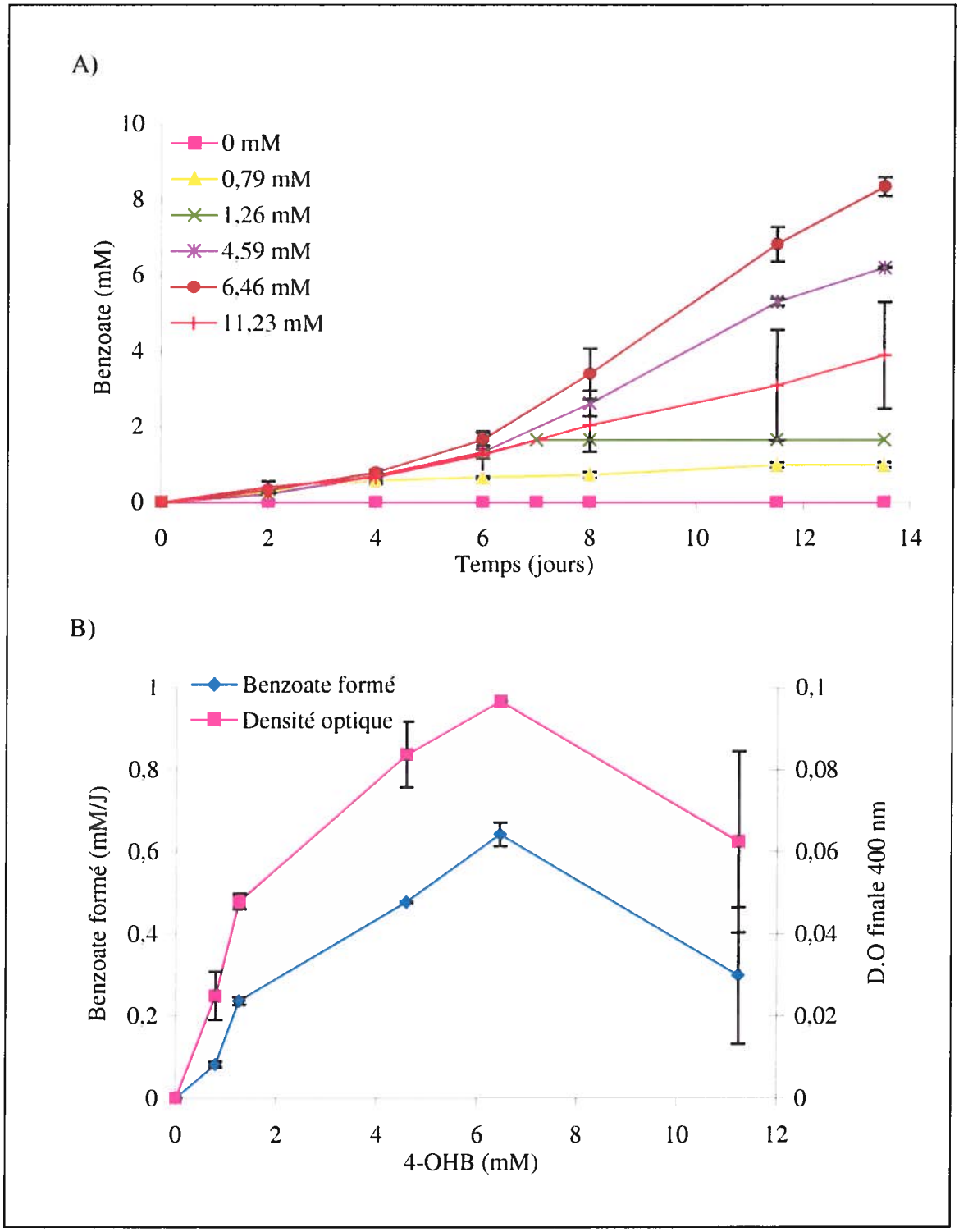


Figure 16 : Effet de la concentration en 4-hydroxybenzoate sur la croissance et l'activité de la souche LR 7.2. A) Benzoate formé dans le milieu en fonction du temps. B) Benzoate formé et densités optiques lues après 13,5 jours d'incubation en fonction de la concentration en 4-hydroxybenzoate.

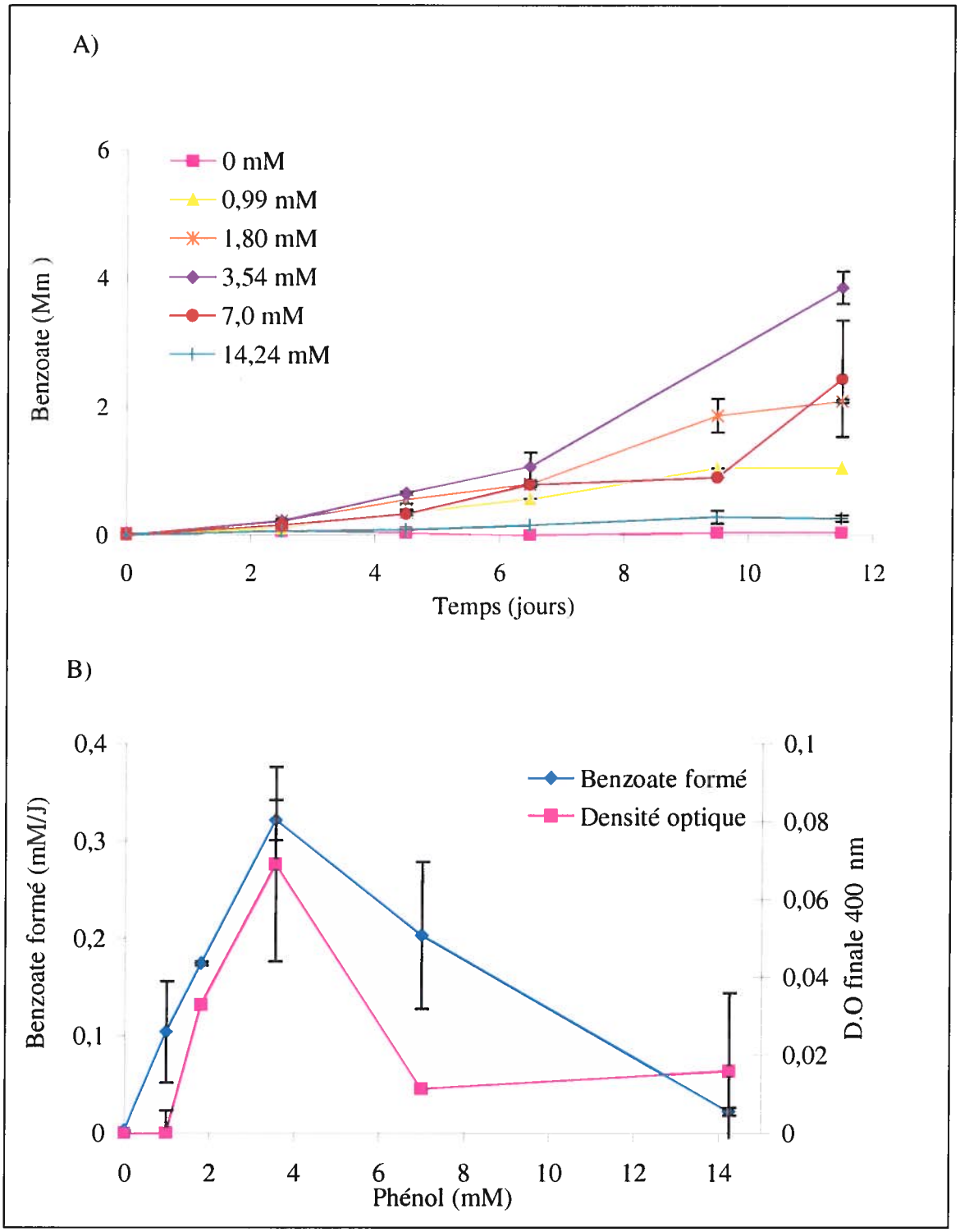


Figure 17 : Effet de la concentration en phénol sur la croissance et l'activité de la souche LR 7.2. A) Benzoate formé dans le milieu en fonction du temps. B) Taux d'apparition du benzoate et taux de croissance en fonction de la concentration en phénol.

expérience, la souche a également été maintenue en présence de 3,5 mM de phénol. Donc, à partir de ce moment, il y avait deux cultures de maintenance soit une contenant du phénol et l'autre du 4-OHB.

3.1.8 Comparaison entre le phénol et le 4-hydroxybenzoate

Une expérience a été réalisée afin de déterminer quel est le composé (phénol ou 4-OHB) le plus favorable énergétiquement pour la bactérie. Le milieu et les conditions de culture utilisées étaient identiques et la concentration en 4-OHB ou en phénol était de 3,5 mM. De plus l'inoculum utilisé pour ensemencer les cultures avait préalablement été acclimaté à chacun des composés. D'après la Figure 18, la croissance et l'activité sont plus rapides en présence de 4-hydroxybenzoate qu'en présence de phénol.

3.1.9 Lien entre l'activité et la croissance

La croissance de la souche et la transformation du 4-OHB et du phénol ainsi que l'accumulation du benzoate ont été suivis en fonction du temps d'incubation. La Figure 19 montre que la courbe de croissance suit celle de l'accumulation du benzoate.

3.1.10 Ajout d'extrait de levures, de surnageant et de milieu de culture

À cette étape, la croissance de la souche LR 7.2 était relativement faible ($D.O_{max}$ = 0,1). Cette expérience a été réalisée afin d'optimiser la croissance de la souche. Après 6 jours de croissance de la souche LR 7.2 en milieu BM2, un volume de 2 mL d'extrait de levures 20% (p/v), de 25 mL de surnageant de culture de *C. sporogenes* M55 ou de 10 mL de milieu de culture BM2 ont été ajoutés (Figure 20). La concentration en benzoate après 6 jours dans chacun des milieux de culture a été mesurée une fois les ajouts effectués. Les valeurs calculées suite à ces ajouts tiennent compte de l'effet de dilution. Les résultats indiquent que l'ajout d'extrait de levures après 6 jours favorise la croissance et l'activité de la souche LR 7.2, tandis que l'ajout de surnageant de *C. sporogenes* M55 semble les ralentir. L'ajout de milieu de culture BM2 après 6 jours n'a aucun effet sur la croissance et l'activité de la souche LR 7.2.

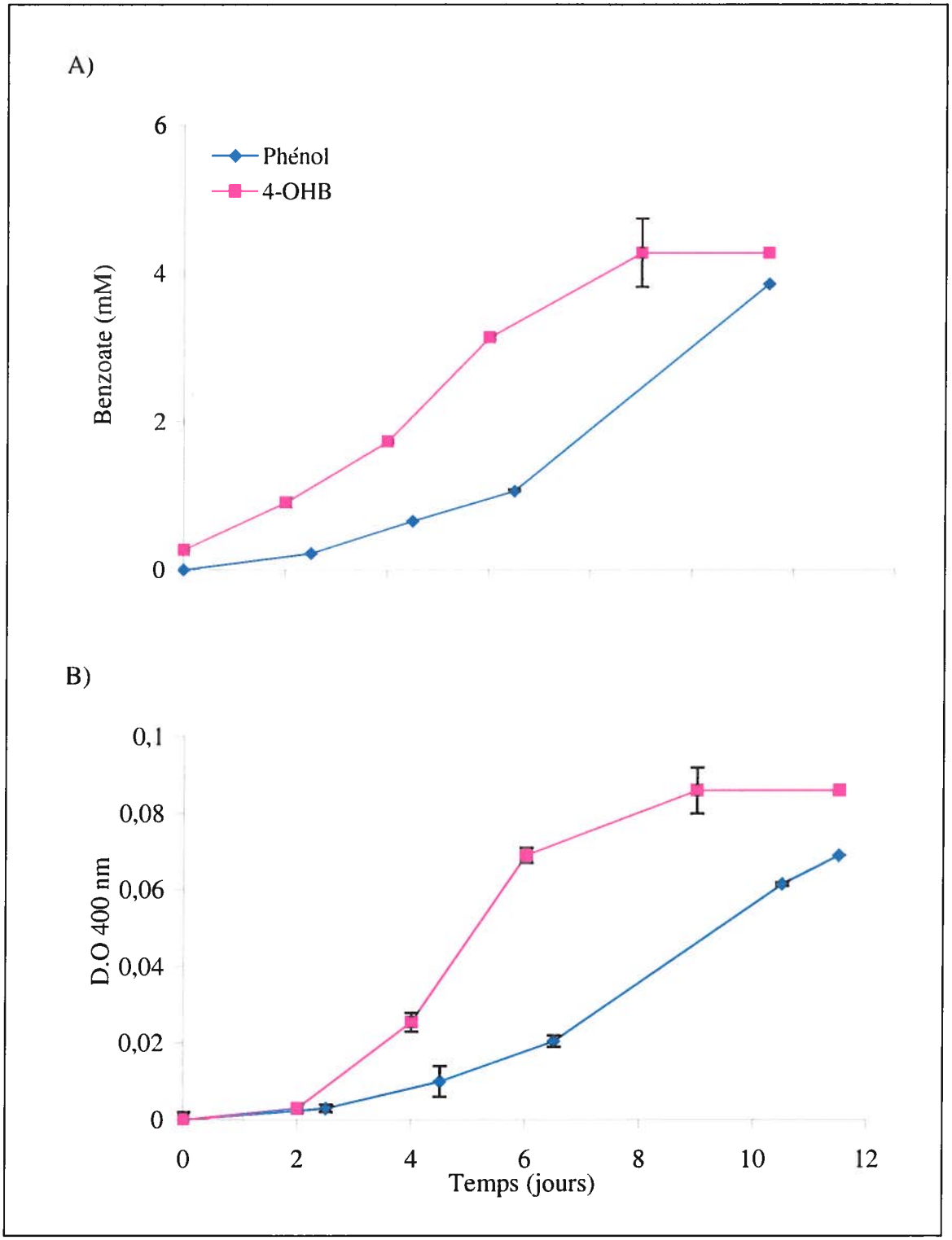


Figure 18 : Comparaison entre le phénol et le 4-hydroxybenzoate. A) Activité de transformation de la souche LR 7.2. B) Croissance de la souche LR 7.2. Les cultures contenaient la même concentration en phénol et en 4-hydroxybenzoate soit 3,5 mM.

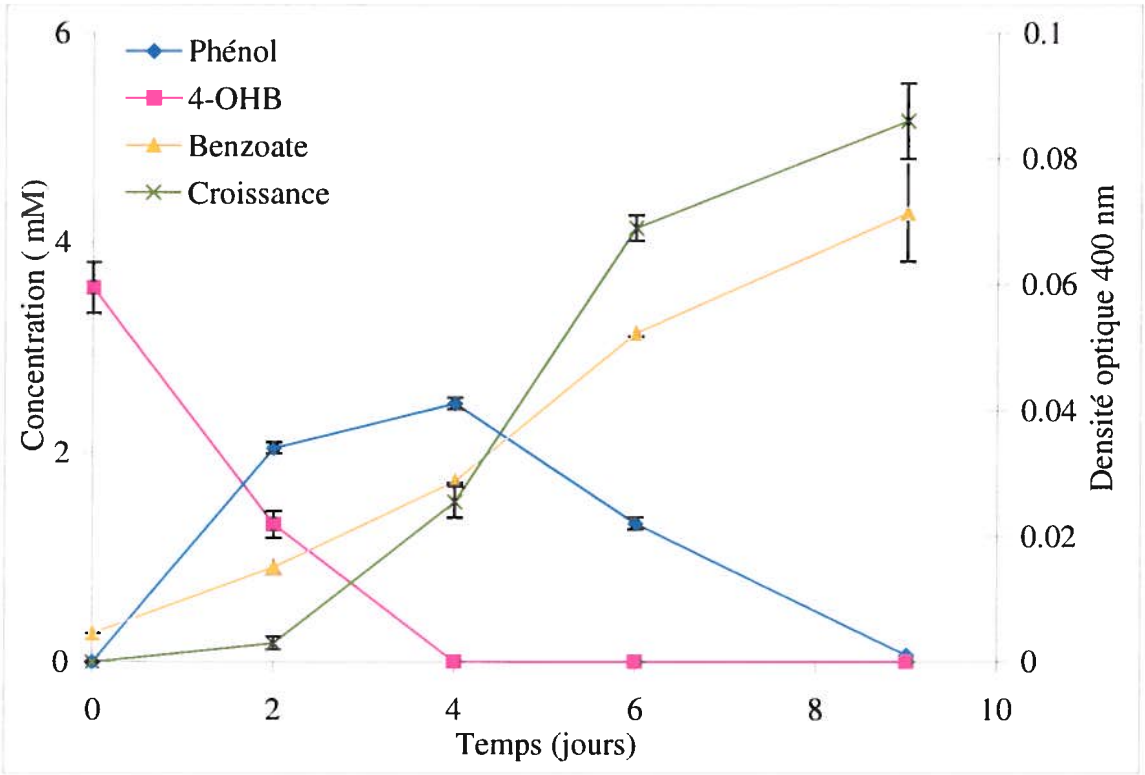


Figure 19 : Transformation du 4-OHB et du phénol, accumulation du benzoate, et croissance de la souche LR 7.2 en fonction du temps

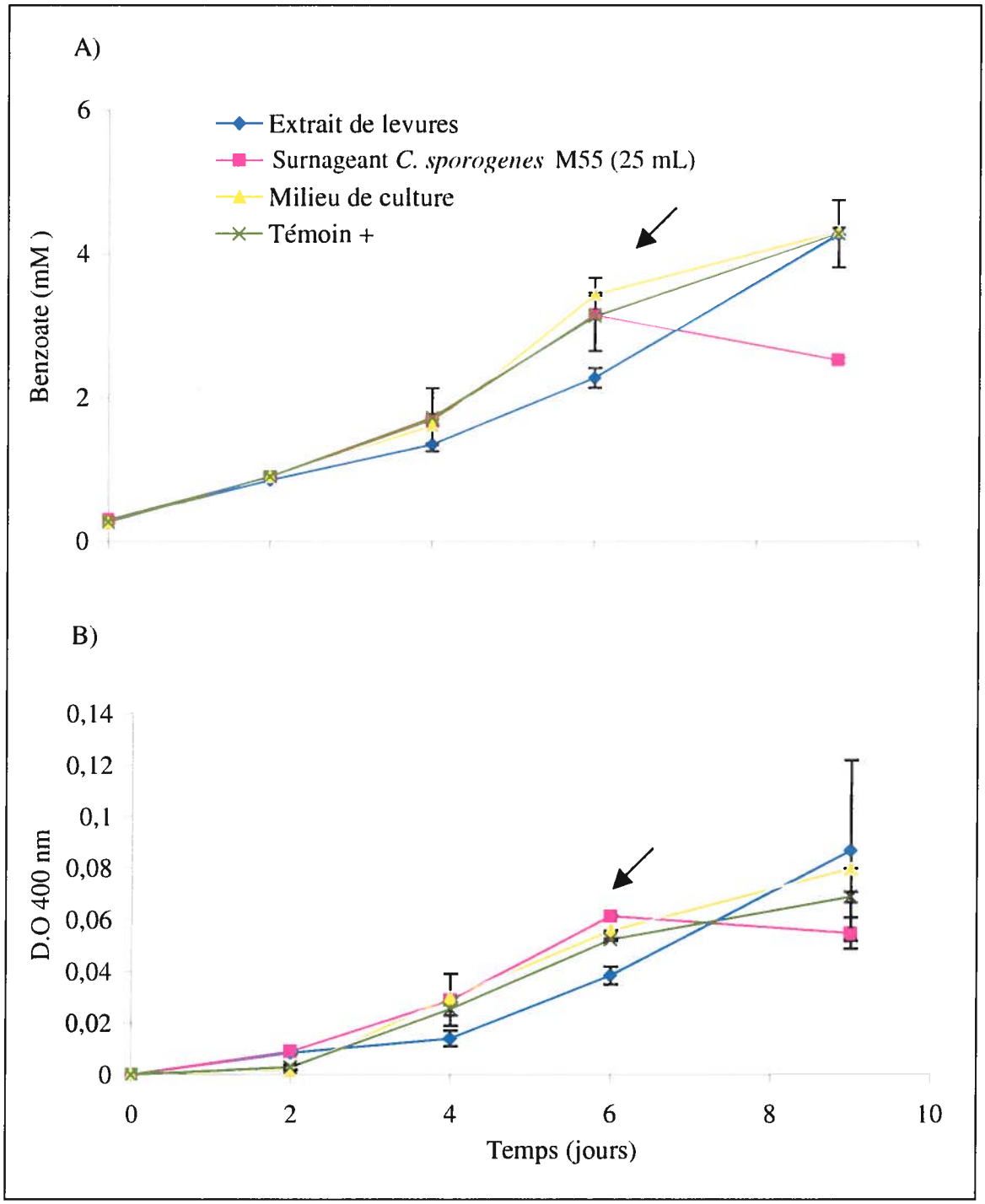


Figure 20 : Effet de l'ajout d'extrait de levures, de surnageant de *C. sporogenes* M55 et de milieux de culture BM2 sur l'activité et la croissance de la souche LR 7.2. A) Benzoate formé en fonction du temps. B) Densités optiques observées en fonction du temps. La flèche indique le moment où les ajouts ont été faits.

3.1.11 Détermination du pH optimal

L'activité et la croissance de cultures de la souche LR 7.2 cultivées à différents pH de départ ont été suivies dans le temps (Figure 21). Le pH standard était de 7,5 et servait de point de comparaison. Les résultats obtenus indiquent que le pH optimal se situe entre 7,5 et 8,0. En effet, à des valeurs de pH inférieures et supérieures, l'activité et la croissance sont nettement moindres. Par exemple, à pH 6 et 9, le benzoate formé et la densité optique sont pratiquement nuls. Suite à cette expérience, le pH des milieux a été ajusté à 7,5 comme précédemment.

3.1.12 Détermination de la température optimale

L'activité et la croissance de cultures de la souche LR 7.2 incubées à différentes températures ont été suivies dans le temps (Figure 22). La température standard était de 37°C et a servi de point de comparaison pour cette expérience. Les résultats obtenus indiquent que la température permettant une croissance et une activité optimale se situe entre 30 et 37°C. À des températures inférieures ou supérieures à celle optimale, l'activité et la croissance ont rapidement diminué. Par exemple, à des températures de 20 et de 42°C, le benzoate formé et la densité optique ont diminué d'environ les 2/3. La température standard de 37°C a donc été conservée.

3.1.13 Accepteurs d'électrons

3.1.13.1 Accepteurs d'électrons variés

L'activité et la croissance de la souche LR 7.2 en présence de différents accepteurs potentiels d'électrons ont été suivies dans le temps afin de déterminer quels accepteurs d'électrons utilisent la souche LR 7.2 pour croître. Les accepteurs d'électrons sélectionnés correspondent à ceux qui sont fréquemment utilisés par les bactéries en conditions anaérobies. La Figure 23 présente les résultats obtenus en présence de 4-hydroxybenzoate tandis que la Figure 24 présente ceux en absence de ce composé. En présence de 4-hydroxybenzoate, les valeurs obtenues pour la croissance et l'activité sont toutes égales ou inférieures à celles du témoin positif. Il y a un des composés testés qui

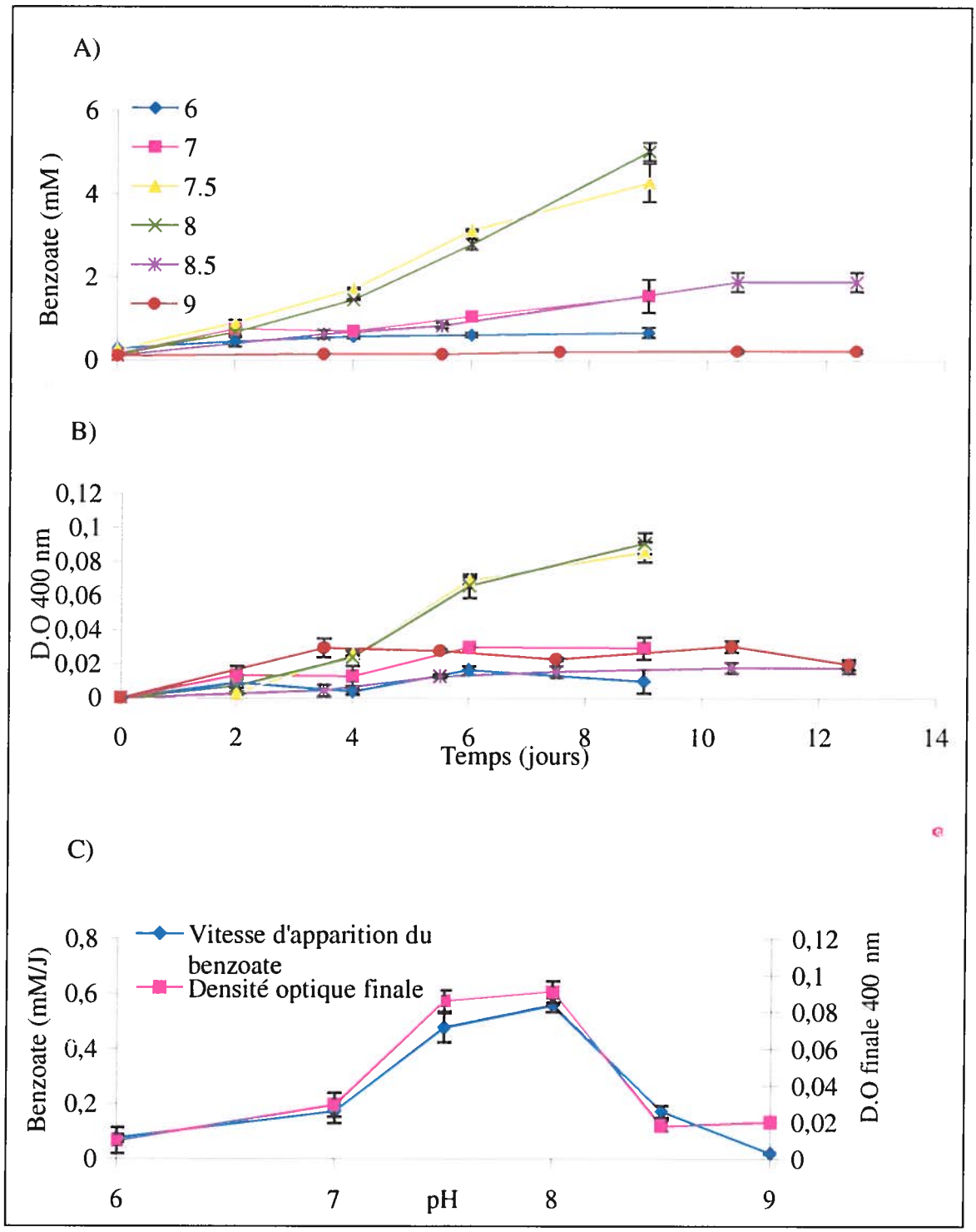


Figure 21 : Effet du pH sur l'activité et la croissance de la souche LR 7.2. A) Benzoate formé en fonction du temps. B) Densités optiques observées en fonction du temps. C) Benzoate formé par jour et densités optiques finales en fonction du pH.

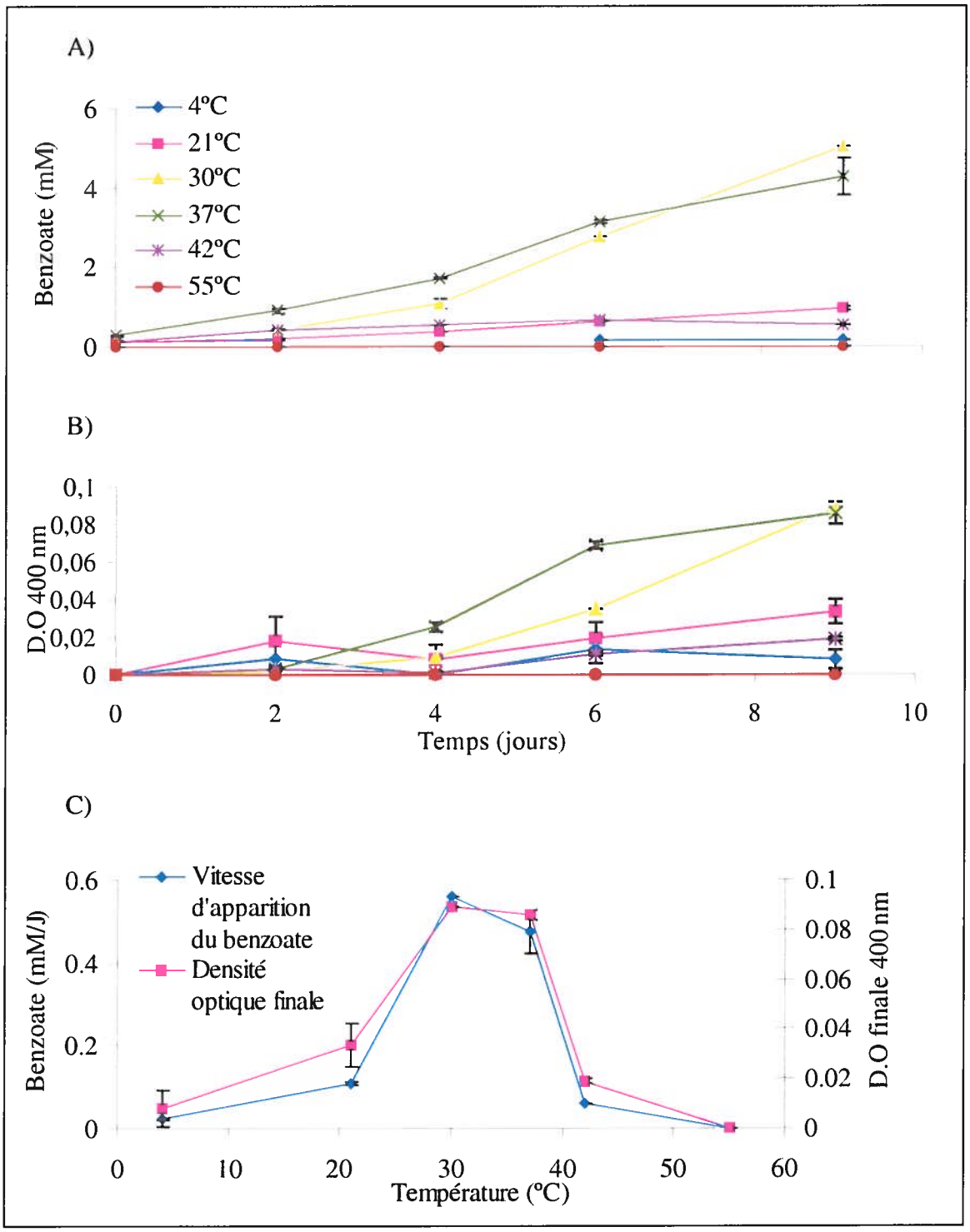


Figure 22 : Effet de la température sur l'activité et la croissance de la souche LR 7.2. A) Benzoate formé en fonction du temps. B) Densités optiques observées en fonction du temps. C) Benzoate formé par jour et densités optiques finales en fonction de la température.

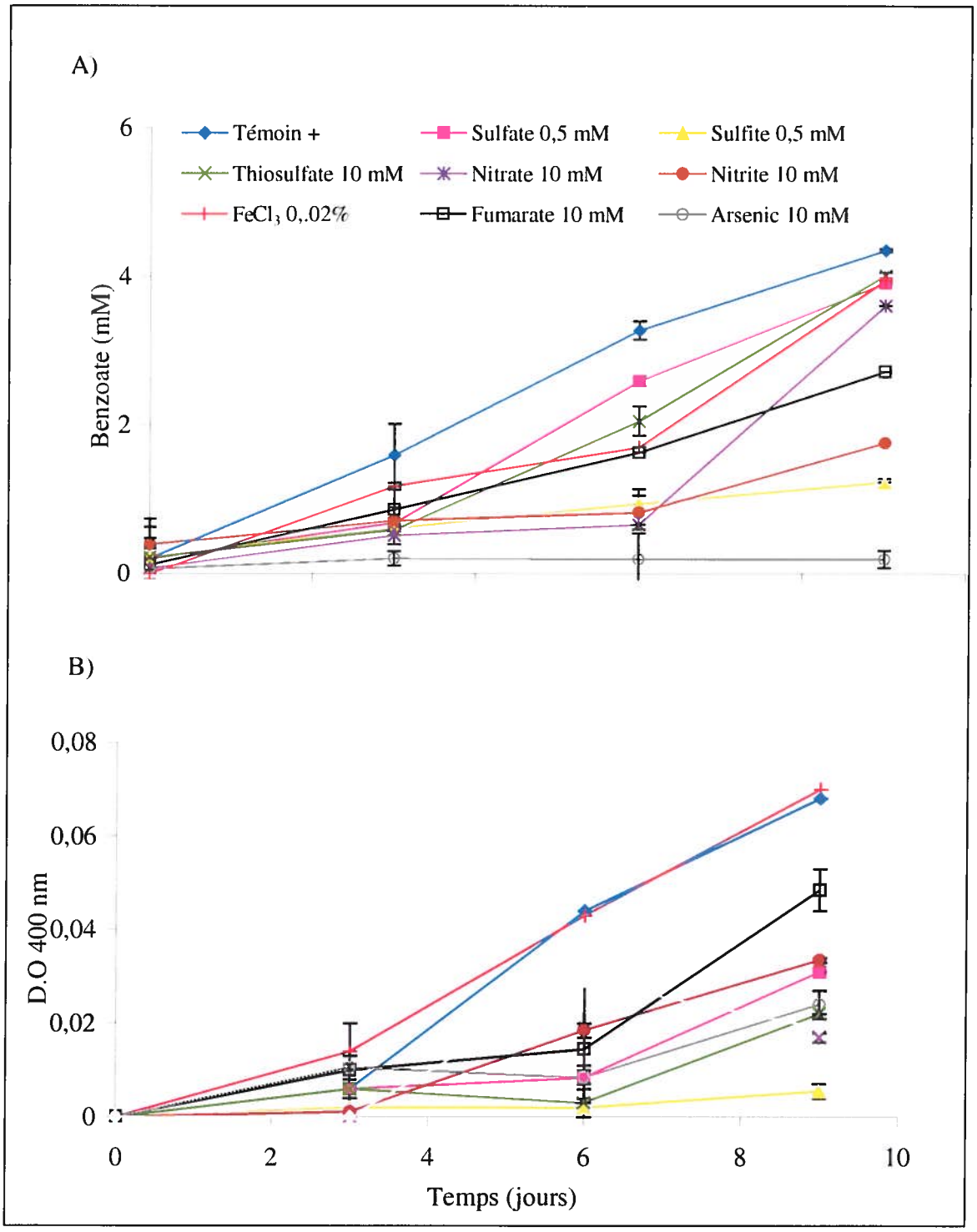


Figure 23 : Effet des accepteurs potentiels d'électrons en présence de 4-hydroxybenzoate sur l'activité et la croissance de la souche LR 7.2 A) Benzoate formé en fonction du temps. B) Densités optiques obtenues en fonction du temps.

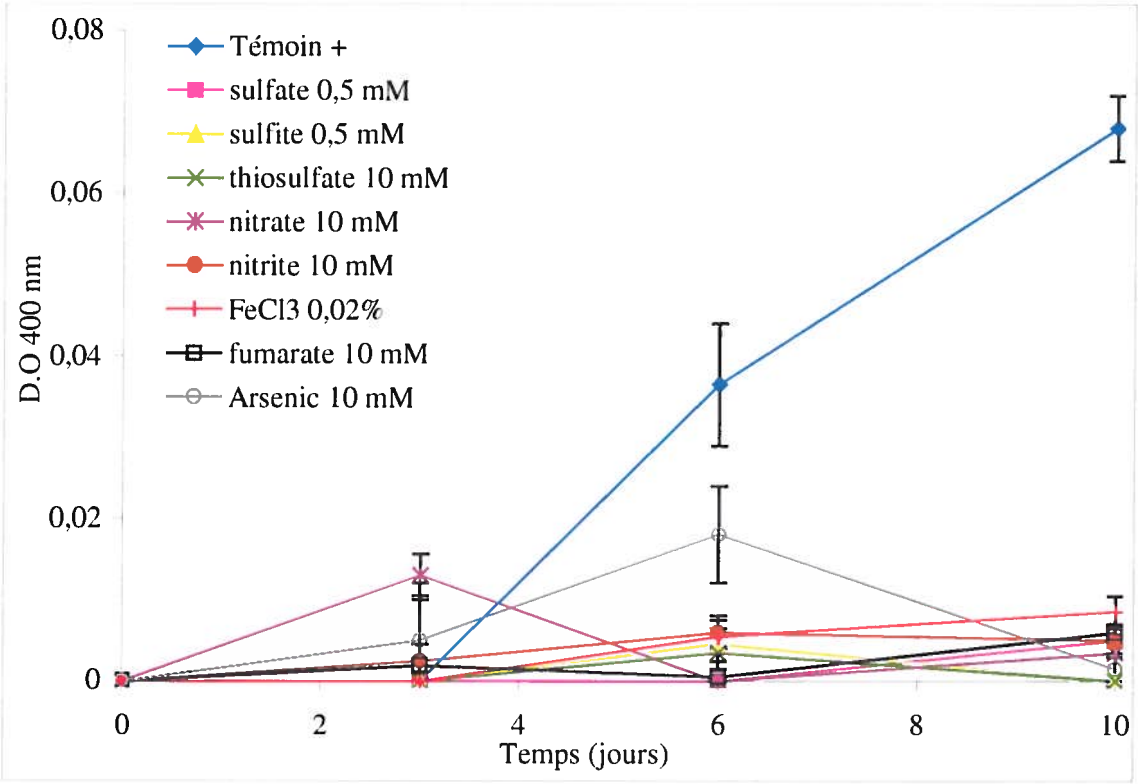


Figure 24 : Effet des accepteurs potentiels d'électrons en absence de 4-hydroxybenzoate sur la croissance de la souche LR 7.2

donne des résultats semblables au niveau de la croissance et l'activité ($FeCl_3$) tandis que les autres les inhibent en partie ou totalement (fumarate, nitrate, nitrite, sulfate, sulfite, thiosulfate, arsenic). En absence de 4-hydroxybenzoate, la croissance de la souche est presque nulle et ce, avec tous les accepteurs potentiels d'électrons testés.

3.1.14 Différentes concentrations en sulfite et sulfate

Les Figures 25 et 26 présentent l'effet de différentes concentrations en sulfite et sulfate sur l'activité et la croissance lorsque la souche est cultivée en présence ou en absence de 4-hydroxybenzoate. Le témoin positif était un milieu contenant du 4-hydroxybenzoate auquel n'a été ajouté aucun sulfite ou sulfate. En présence de 4-hydroxybenzoate et à des concentrations en sulfite de 0,25 ou de 0,5 mM, l'activité est comparable à celle observée pour le témoin positif (0 mM). Pourtant, l'expérience précédente montre que l'activité de la souche est inhibée par la présence de sulfite à une concentration de 0,5 mM. Une concentration supérieure à 0,5 mM tel que 2 mM a inhibé la croissance et l'activité de la souche. En absence de 4-hydroxybenzoate, une légère augmentation de la densité optique a été observée en présence de 0,25 mM de sulfite, mais celle-ci est trop faible pour être significative. Lorsque la souche a été cultivée en présence de sulfate et de 4-hydoxybenzoate, l'activité a été ralentie et la croissance a été inférieure à celle observée en absence de sulfate (Figure 26). En absence de 4-hydroxybenzoate, la croissance a été nulle autant en absence qu'en présence de sulfate.

3.1.15 Spectre d'activité

Le but de cette expérience était de déterminer si la souche LR 7.2 pouvait transformer et utiliser pour sa croissance des composés similaires au 4-hydroxybenzoate ou au phénol. Tous les composés testés avaient une structure chimique présentant des similarités avec celle du 4-hydroxybenzoate ou du phénol et tous possédaient un groupement hydroxyle. Parmi les composés testés, aucun n'a été transformé par la souche (résultats non-présentés). La Figure 27 illustre les valeurs de densité optique obtenues pour les cultures contenant des composés analogues au 4-hydroxybenzoate. La comparaison des différentes courbes de densité optique avec celle du témoin positif révèle que la souche ne croît pas

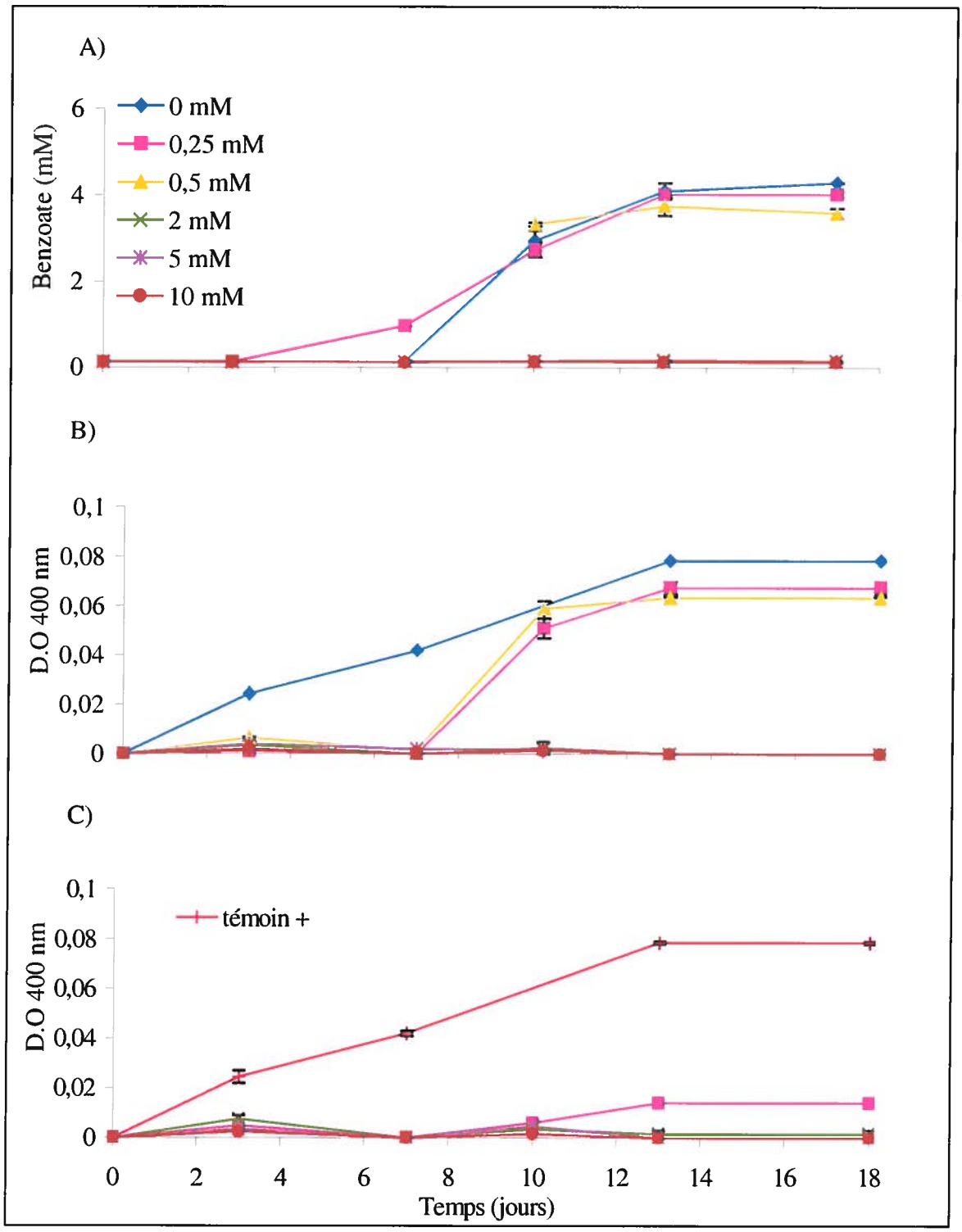


Figure 25 : Effet de différentes concentrations en sulfite sur l'activité et la croissance de la souche LR 7.2. A) Activité de la souche en présence de 4-hydroxybenzoate. B) Croissance de la souche en présence de 4-hydroxybenzoate. C) Croissance de la souche en absence de 4-hydroxybenzoate

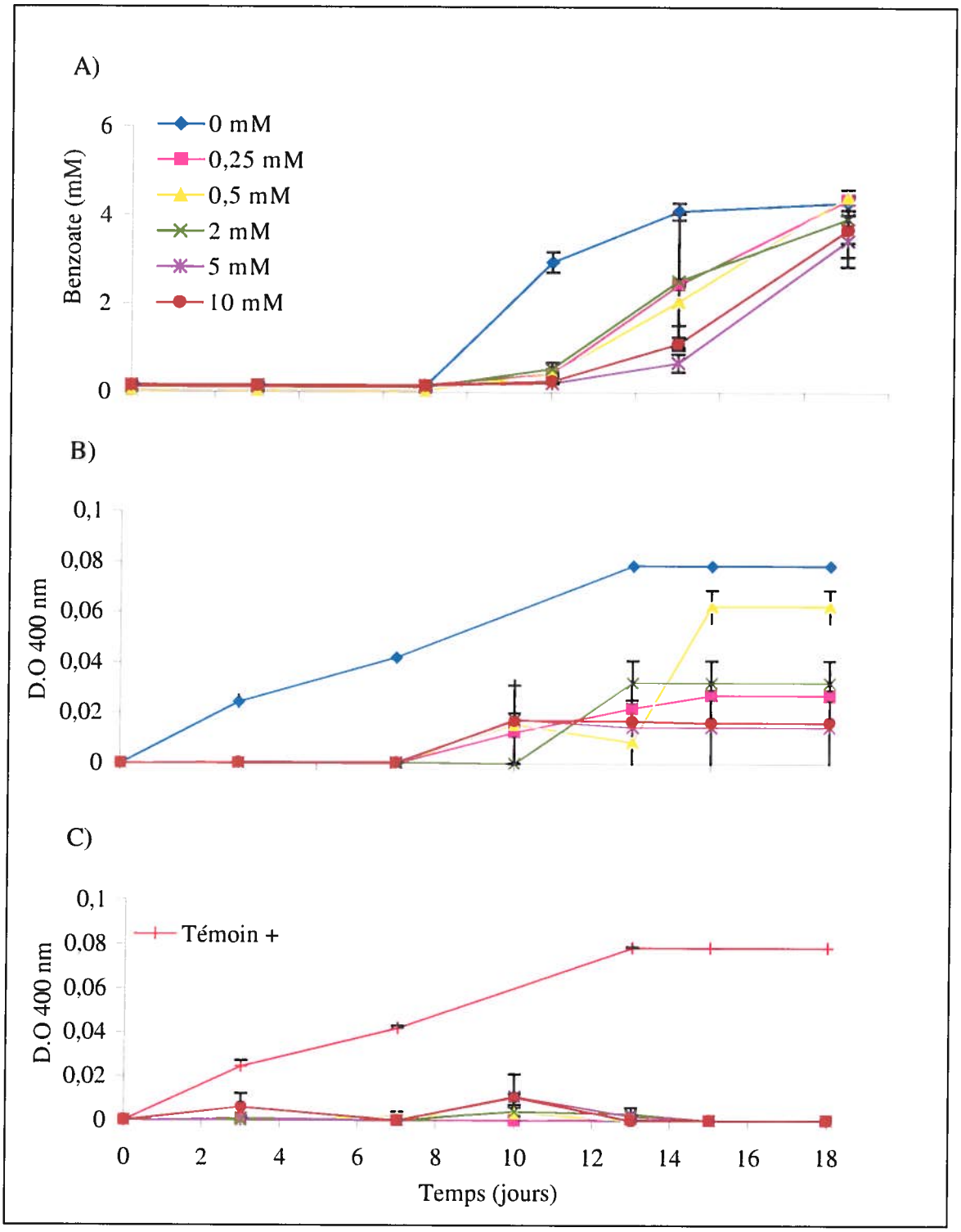


Figure 26 : Effet de différentes concentrations en sulfate sur l'activité et la croissance de la souche LR 7.2. A) Activité de la souche en présence de 4-hydroxybenzoate. B) Croissance de la souche en présence de 4-hydroxybenzoate. C) Croissance de la souche en absence de 4-hydroxybenzoate.

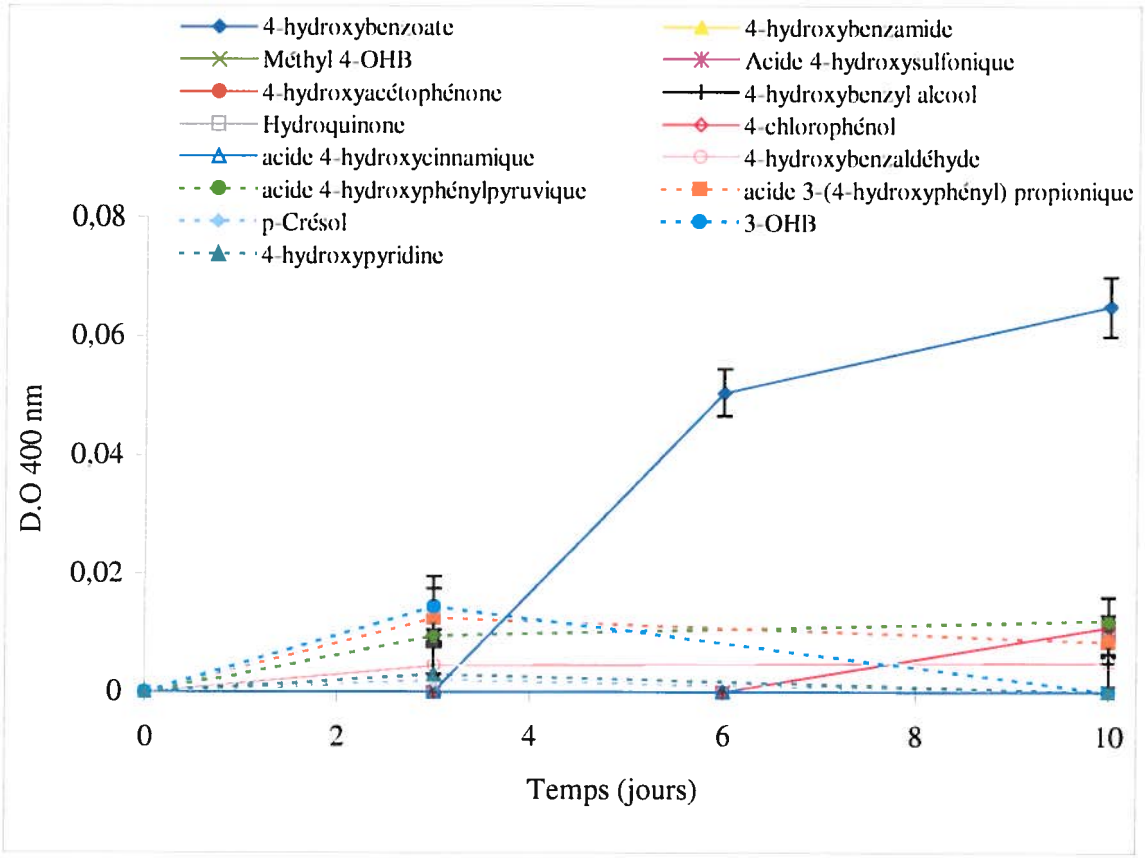


Figure 27 : Effet de différents composés analogues au 4-hydroxybenzoate sur la croissance de la souche LR 7.2

en présence d'aucun des composés testés. La Figure 28 illustre les valeurs de densité optique obtenues pour les cultures contenant des composés analogues au phénol. Aucun des composés phénoliques testés ne permet la croissance de la souche, car toutes les courbes de croissances obtenues se rapprochent de la courbe du témoin négatif.

3.1.16 Ajout de [D_6]-phénol

Le but de cette expérience était de vérifier la présence du 4-OHB comme intermédiaire durant la dégradation du phénol en benzoate. Il a été impossible de quantifier le 4-hydroxybenzoate par GC-FID. Étant donné que c'est un intermédiaire de dégradation, il est possible que ce dernier soit présent en trop petite quantité pour être quantifiable par cette méthode. Par contre, il nous a été possible de détecter le 4-OHB par GC-MS, mais ce dernier ne se détachait pas du bruit de fond lors du suivi. Nous avons donc ajouté du [D_6]-phénol et regardé s'il y avait apparition de [D_4]-4-OHB dans les cultures par spectrométrie de masse en comparant le spectre de masses du composé formé avec celui d'un standard de 4-OHB. La Figure 29 montre qu'il y a apparition de 4-OHB en très petite quantité et la Figures 30 compare le spectre de masse du composé retrouvé avec le spectre de masses d'un standard de 4-OHB. Le pic 271 illustré sur le spectre de masses de la Figure 30A correspond à l'ion moléculaire du [D_4]-4-OHB, dérivé par silylation, ayant perdu un groupement méthyle. Le pic 267 illustré sur la Figure 30B correspond à l'ion moléculaire du 4-OHB, dérivé par silylation, ayant perdu un groupement méthyle. La différence de masse de 4 Daltons entre ces deux ions est due à la présence de 4 deutériums qui ont chacun une masse additionnée de 1 comparativement à l'hydrogène retrouvé dans le 4-OHB. Cette différence de masse entre le standard de 4-OHB et le composé retrouvé dans les cultures ainsi que la similitude des deux spectres de masse confirment la présence de [D_4]-4-OHB dans les cultures de la souche LR 7.2 après 12 jours de croissance à 37°C.

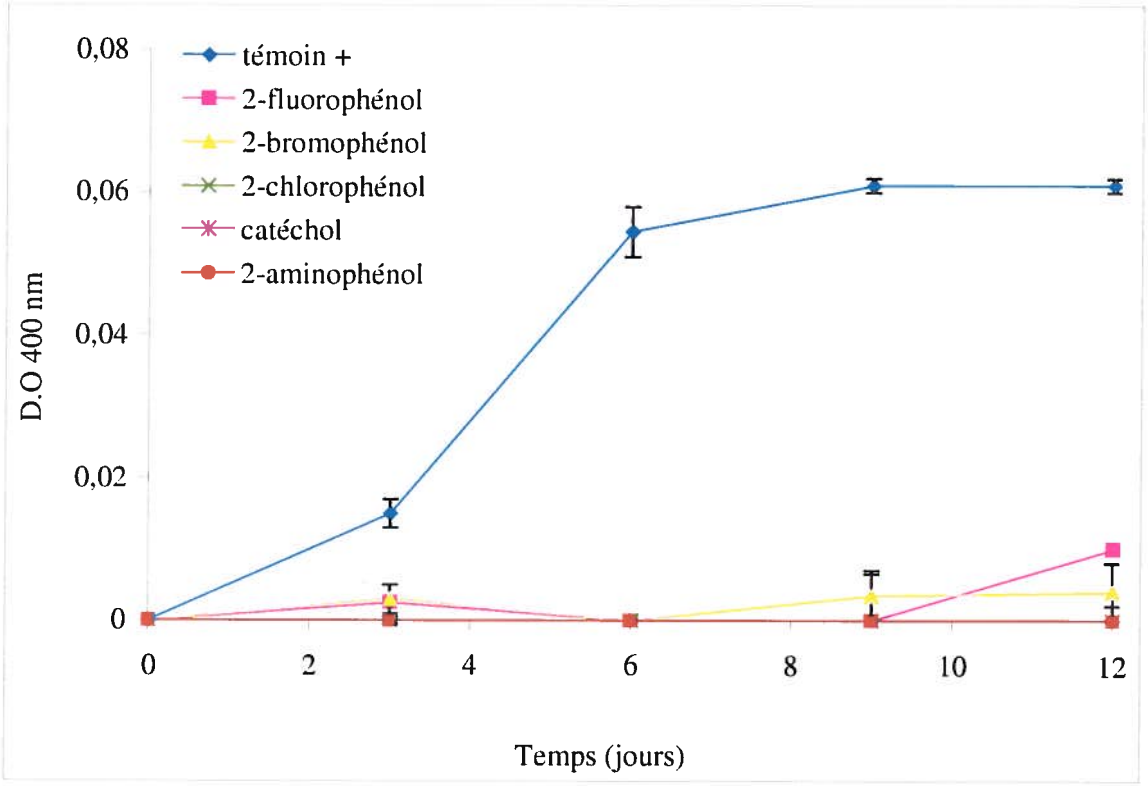


Figure 28 : Effet de différents composés analogues au phénol sur la croissance de la souche LR 7.2

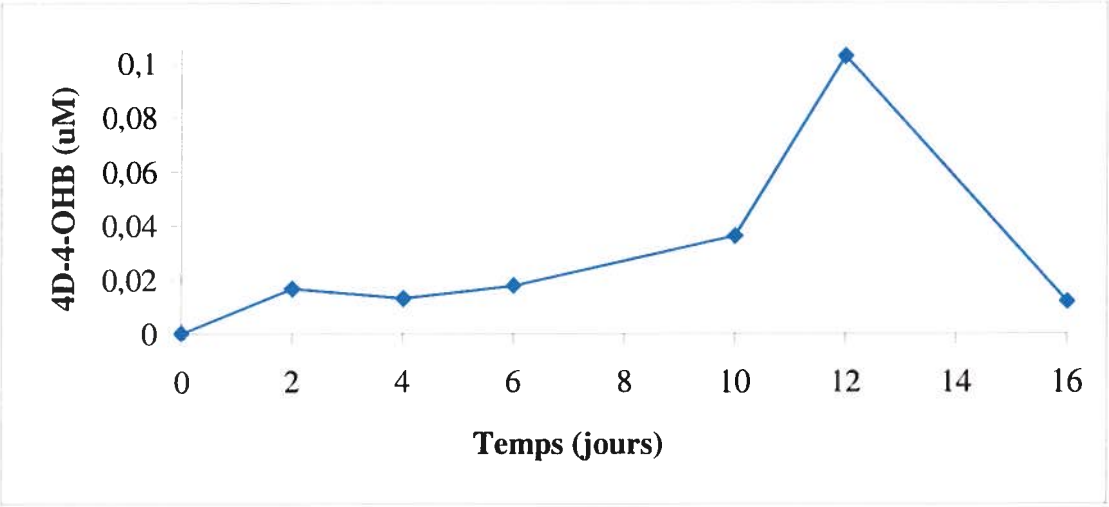
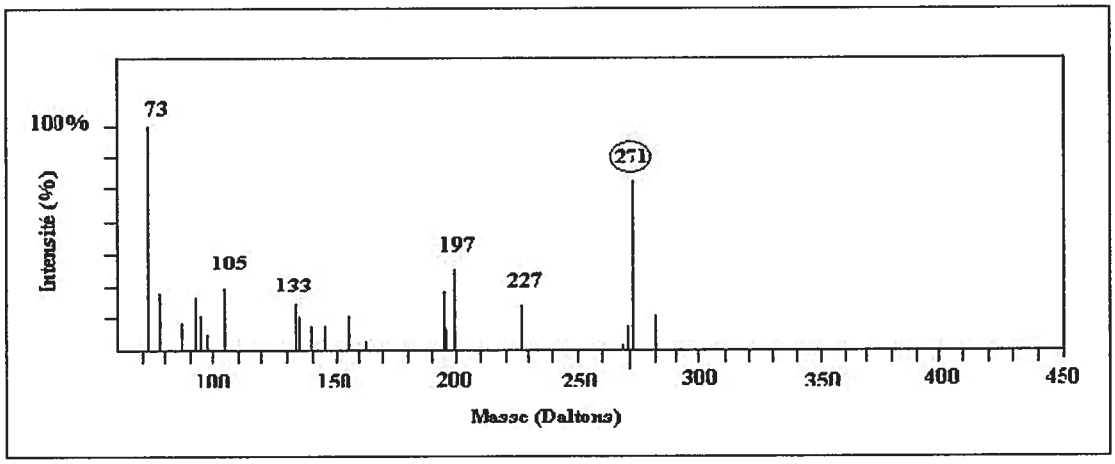


Figure 29 : Suivi du [D_4]-4-OHB dans des cultures de la souche LR 7.2 ayant reçu du [D_6]-Phénol.

A)



B)

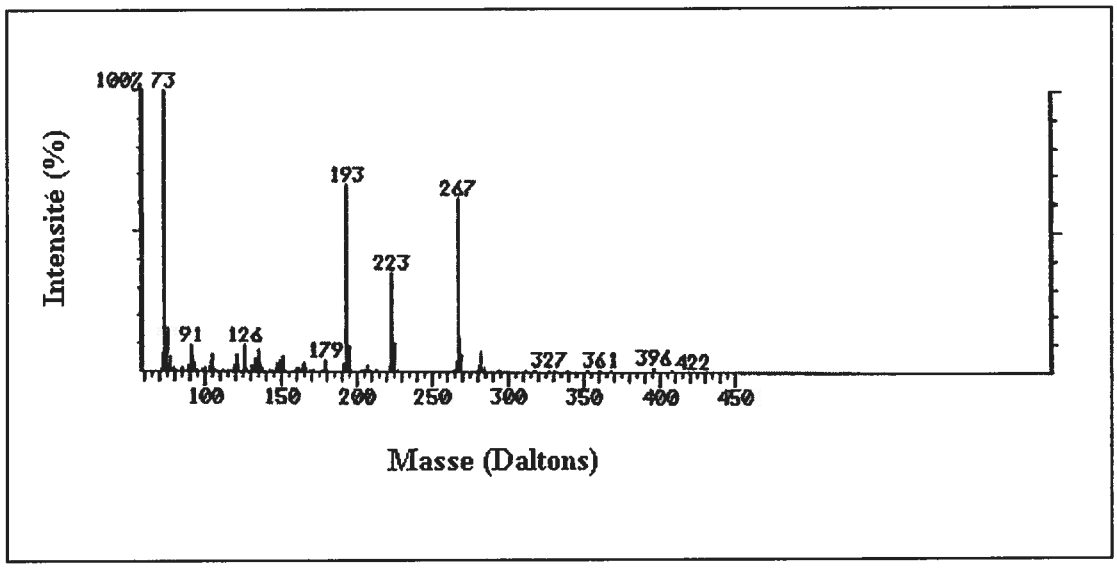


Figure 30 : Détermination de la présence de [D_4]-4-OHB par spectrométrie de masse dans une culture de la souche LR 7.2 ayant reçu du [D_6]-Phénol . A) Spectre de masses du composé retrouvé dans une culture de 12 jours de la souche LR 7.2. B) Spectre de masses d'un standard de 4-OHB.

3.2 Caractérisation génétique de la souche LR 7.2

3.2.1 Contenu en G+C

Le Tableau 2 nous donne les valeurs des aires sous la courbe de chacun des désoxyribonucléosides. Pour calculer le contenu en G + C, les équations présentées à la section 2.5.1.3 ont été utilisées. La proportion (dG/(dG + dT)) du phage lambda utilisé comme standard est de 0,716 (chromatogramme non-illustré). Le contenu en G + C de la souche LR 7.2 ainsi calculé est de 51,4 Mol %.

3.2.2 Séquence nucléique codant pour l'ARNr 16S

Cette expérience avait pour but de confirmer si la souche 7 et LR 7.2 étaient identiques par comparaison de leur gène codant pour l'ARNr 16S. La séquence obtenue pour la souche LR 7.2 (# d'accès : AY327251) diffère de deux nucléotides avec celle de la souche 7. La cytosine et l'adénosine présentes à la position 12 et 383 chez la souche 7 sont substituées respectivement par une adénosine et une cytosine chez la souche LR 7.2. Ce résultat confirme que la souche 7 et la souche LR 7.2 sont, à toute fin pratique, identiques par leur séquence du gène de l'ADNr 16S. Le Tableau 3 montre que l'ADNr 16S de la souche LR 7.2 a un pourcentage d'homologie de 96% avec celui de WCHB1-20 et de 94% avec celui de WCHB1-89. De plus, l'ADNr 16S de la souche LR 7.2 a une homologie de 85 à 94% avec celui de SporeA, SporeB, *Desulfotomaculum* Sp., *Desulfosporosinus orientis*, *Moorella thermoacetica*, *Moorella thermoautotrophicum*, *Desulfitobacterium metallireducens*.

3.3 Vérification de l'identité de *C. sporogenes* M 55

Le but de cette expérience était de confirmer l'identité de *C. sporogenes* M 55. Nous avons procédé par le séquençage de l'ADNr 16S de cette souche. Le Tableau 4 montre que la séquence obtenue est homologue à 99% avec *C. sporogenes* et *C. botulinum*. De plus, elle est homologue à 98% avec *C. putrificum* et à 94% avec *C. butyricum*.

Tableau 2 : Valeurs des aires sous la courbe obtenues pour chacun des désoxyribonucléosides

Désoxyribonucléosides	Temps de rétention	Aires sous la courbe
dC	2.773	11086
dG	**3.701**	**23473**
dT	**4.679**	**8312**
dA	6.594	13589

Tableau 3: Séquences les plus apparentées à l'ADNr de la souche LR 7.2

Séquences de l'ADNr 16S	Pourcentages d'homologie	Numéros d'accès
WCHB1-20	96%	AF050587
WCHB1-89	94%	AF050588
Desulfotomaculum Sp.	94%	AJ276558
SporeB	94%	X91170
SporeA	93%	X91169
Moorella thermoacetica	86%	AJ242494
Moorella thermoautotrophicum	86%	LO9168
Desulfosporosinus orientis	85%	Y11571
Desulfitobacterium metallireducens	85%	AF297871

3.4 Caractérisation morphologique de la souche LR 7.2

3.4.1 Analyse des acides gras membranaires

Les acides gras membranaires de la souche ont été analysés à l'aide du système MIDI. D'après le profil en acides gras obtenu, la souche ne s'apparente à aucune espèce bactérienne connue. Le Tableau 5 présente la composition en acide gras de la souche LR 7.2 ainsi que leurs intensités relatives.

3.4.2 Sporulation

Suite aux observations microscopiques des cultures de la souche LR 7.2 seule ou en présence de la souche 6 ou de *C. sporogenes* M 55, ayant subi le traitement à la chaleur, aucune structure similaire à celle d'une spore n'a été visualisée au niveau des cellules de la souche LR 7.2 (résultat non-illustré). De plus, aucune activité de transformation du 4-OHB n'a été observée suite aux repiquages des cultures traitées à la chaleur et cela après un mois de suivi des cultures. Ces résultats indiquent que la souche LR 7.2 ne sporule pas même si elle est soumise à des conditions extrêmes, qu'elle soit en présence de souches sporulées (souche 6 et *C. sporogenes* M 55) ou non.

3.4.3 Observations en microscopie électronique de la souche LR 7.2

La Figure 30 illustre une coupe mince de la souche LR 7.2 observée au microscope électronique. Cette photo montre que la souche LR 7.2 a une forme de bâtonnet particulière. De plus, sa paroi cellulaire est apparentée à celle des bactéries Gram-positives. L'opacité de la cellule montre que la souche LR 7.2 est très dense aux électrons.

Tableau 4: Séquences les plus apparentées à l'ADNr 16S de *C. sporogenes* M 55

Séquences de l'ADNr 16S	Pourcentages d'homologies	Numéros d'accès
Clostridium sporogenes	99%	X68189
Clostridium botulinum	99%	AF105402
Clostridium putrificum	98%	X73442
Clostridium butyricum	94%	AJ458421

Tableau 5 : Acides gras membranaires présents chez la souche LR 7.2 et leurs intensités relatives

Noms	Intensités relatives%
15 :0[a] ANTE[b] FAME[c]	18.9
15 :0 ISO[d] FAME	13.73
16:0 FAME	12.46
16 :1 ω9c[e] FAME	7.79
16 :0 ISO FAME	7.46
17 :0 ANTE ISO FAME	7.29
16:1 ω9c DMA[f]	5.88
14:0 FAME	5.80
17:0 ISO FAME	5.74
18:1 ω9c FAME	4.62
18 :0 FAME	4.24
15:0 FAME	3.46
Sum in feature 4[g]	2.63

[a] (x : y) : X= le nombre de carbones que contient l'acide gras
Y= le nombre de doubles liaisons que contient l'acide gras
[b] ANTE : Groupement méthyle sur le carbone 3 de l'acide gras à partir de son extrémité ?
[c] FAME : Groupement méthyle ajouté au groupement carboxyle de l'acide gras pour accroître sa volatilité
[d] ISO : Groupement méthyle sur le carbone 2 de l'acide gras à partir de son extrémité ?
[e] ? 9c : Double liaison sur le carbone 9 de l'acide gras à partir de son extrémité ? . c désigne que les deux hydrogènes sont du même côté de la double liaison
[f] DMA : Groupement diméthyle acétal présent sur le carbone a de l'acide gras
[g] Sum in feature 4 : Acide gras 15:2 FAME + composé inconnu de 14,762 carbones

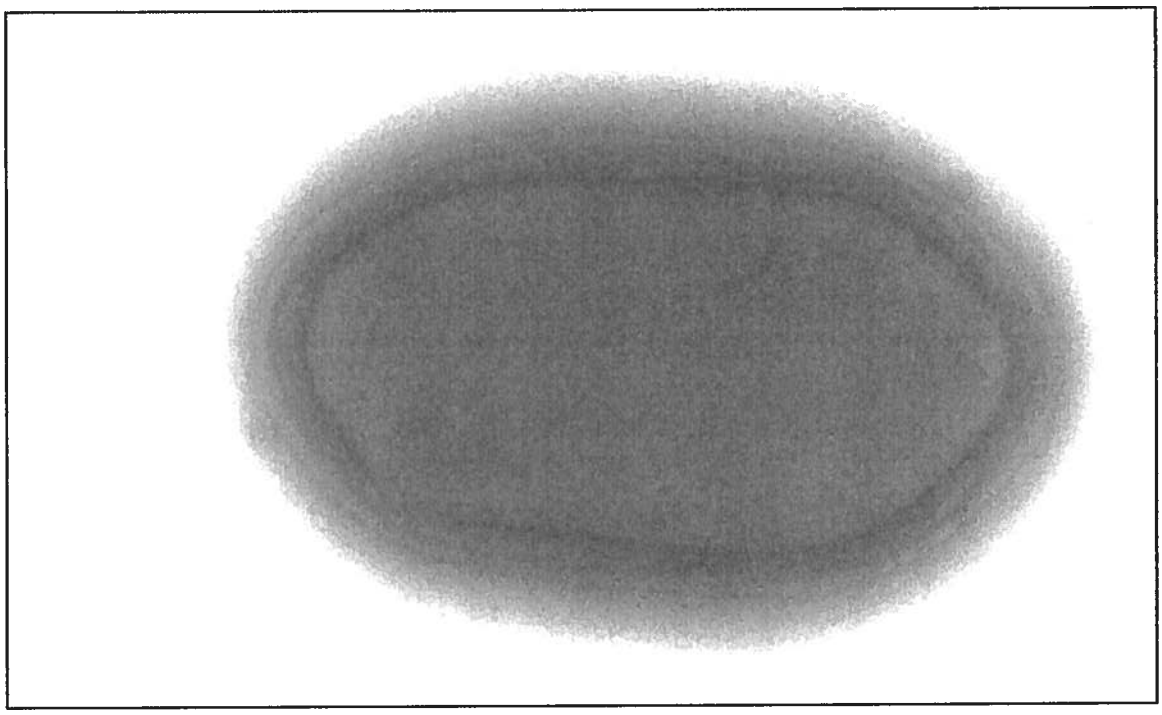


Figure 31 : Microscopie électronique en coupe mince de la souche LR 7.2. Le grossissement de l'image est de 88 000x.

4. Discussion

4.1 Optimisation des conditions de culture

4.1.1 Réduction du FeS

Au début de cette étude de caractérisation, le milieu utilisé était un milieu BM auquel était ajouté du surnageant de culture de *C. sporogenes* M55. En effet, Duckett (2000) avait démontré que l'ajout de ce surnageant accélérait l'activité de transformation du phénol et du 4-hydroxybenzoate en benzoate et augmentait également la stabilité de la culture bactérienne. Ce milieu de culture a donc permis d'effectuer des études de caractérisation plus poussées. Par contre, le désavantage du milieu BM était la présence d'un important précipité de FeS empêchant le suivi de la croissance au fil du temps par densité optique. Étant donné la présence de ce précipité, la croissance était suivie par compte bactérien au microscope optique. Étant donné la faible croissance, cette méthode était longue et imprécise. Nous avons donc voulu utiliser une méthode à la fois plus précise et plus rapide telle que la mesure de la densité optique de la culture bactérienne. Pour y arriver, il fallait que le milieu soit exempt de précipité. Différents milieux exempts de ce précipité ont alors été développés. La souche LR 7.2 cultivée dans ces milieux possédait exactement la même activité qu'en conditions standards de culture. Par contre, à cette étape, le suivi par densité optique était toujours impossible puisque la croissance était trop faible. Pour des raisons pratiques, le milieu réduit en $FeCl_2$ et Na_2S (milieu BM2) a servi de nouveau milieu de culture pour les expériences suivantes. Contrairement à ce qui avait été observé par Letowski (2000), l'élimination de ce précipité n'a pas affecté l'activité de la souche. Par contre, à l'époque de Letowski, le surnageant de *Clostridium sporogenes* M55 n'était pas présent dans la composition du milieu de culture. Le but des expériences effectuées suite à l'obtention de ce milieu clair était d'augmenter la croissance afin de pouvoir la suivre par densité optique, ce qui nous permettrait par la suite de caractériser l'activité physiologique de la souche LR 7.2.

4.1.2 Effet du $Na_2S_2O_4$

La croissance de certaines bactéries anaérobies est meilleure lorsque le $Na_2S_2O_4$ est utilisé comme agent réducteur (Brauman et al., 1998). Nous en avons donc ajouté une

petite quantité au milieu de culture réduit avec du Na_2S afin de réduire davantage le milieu de culture et de voir si cela permettrait une meilleure croissance et activité de la souche LR 7.2. Contrairement à Brauman et al., les résultats obtenus ne montrent pas d'amélioration de la croissance en présence de $Na_2S_2O_4$. De plus, l'activité de la souche LR 7.2 est identique en présence ou en absence de $Na_2S_2O_4$. Ces résultats signifient qu'une réduction supplémentaire du milieu de culture par le $Na_2S_2O_4$ n'a eu aucun effet (positif ou négatif) à la fois sur la croissance et sur l'activité de la souche.

4.1.3 Effet des surnageants de *C. sporogenes* M55 et de la souche 6

Comme il a été mentionné ci-dessus, la souche LR 7.2 a une meilleure activité en présence du surnageant de *C. sporogenes* M55. Elle a donc besoin de certains éléments contenus dans ce surnageant pour transformer de façon plus efficace le 4-hydroxybenzoate et le phénol en benzoate. Ces éléments pourraient être des cofacteurs, des accepteurs d'électrons ou des sources de carbone. Par contre, ces derniers ne permettent pas d'améliorer la croissance de la souche. Au départ, la souche LR 7.2 était cultivée avec un surnageant de la souche 6, car Duckett (2000) avait démontré que son activité était favorisée par la présence de ce dernier. Par la suite, Duckett (2000) a ajouté d'autres surnageants tels que *Desulfitobacterium frappieri, Enterococcus faecalis* et *Clostridium sporogenes* M55. Suite à cette expérience, il a été démontré que l'effet engendré par le surnageant de *C. sporogenes* M55 sur l'activité était légèrement supérieur à celui engendré par celui de la souche 6. À partir de ce moment, le surnageant de *C. sporogenes* M55 a été utilisé pour cultiver la souche LR 7.2. À la lumière de ces informations, avant de poursuivre les études de caractérisation de la souche, nous avons voulu vérifier si le surnageant de *C. sporogenes* M55 a réellement un effet positif. Selon la Figure 13, il est facile de constater que le surnageant de *C. sporogenes* M55 accélère l'activité de la souche LR 7.2 comparativement au surnageant de la souche 6. Ceci confirme les résultats obtenus précédemment par Duckett (2000). Il est donc évident qu'un ou plusieurs des éléments contenus dans ce surnageant sont bénéfiques à la souche LR 7.2.

Il existe quelques exemples de bactéries anaérobies qui dépendent des autres bactéries pour être active. Par exemple, au sein des consortiums méthanogènes, il y a la dépendance entre les acétogènes et les méthanogènes dans le processus de transfert d'hydrogène, phénomène invoqué à la section 1.4.4. Il existe quelques autres exemples d'interdépendance bactérienne. Parmi eux, il y a la coculture composée de la souche TMR1 et de *Wolinella succinogenes* (Meckenstock, 1999). La coculture est capable de dégrader le toluène en utilisant soit le nitrate ou le fumarate comme accepteur final d'électrons. Par contre, la croissance est supérieure lorsque le nitrate est utilisé comme accepteur d'électrons. Lorsque les deux souches sont cultivées en cultures pures, aucune dégradation du toluène en présence de nitrate ou de fumarate n'est observée. Mais, lorsque la souche TMR1 est cultivée en présence de sulfate comme accepteur d'électrons, celle-ci est capable d'utiliser le toluène. Dans ces conditions l'activité est supérieure à celle effectuée par la coculture. Ceci indique que les deux souches, TMR1 et *Wolinella succinogenes*, se partagent des éléments essentiels à l'activité de dégradation du toluène en présence de nitrate et de fumarate. De plus, la coculture composée de la bactérie déshalogénante *Desulfitobacterium frappieri* TCE1 et de *Desulfovibrio* sp. souche SULF1 réduisant les sulfates est un autre exemple de syntrophie bactérienne en conditions anaérobies (Drzyzga et al., 2001). Dans cette coculture, la bactérie responsable de la déshalogénation du pentachloroéthène (PCE) est uniquement *Desulfitobacterium frappieri* TCE1. Lorsque la proportion sulfate/ PCE est très élevé la souche SULF1 réduisant le sulfate est en plus grand nombre tandis que lorsque cette proportion est basse, *Desulfitobacterium frappieri* TCE1 est en plus grand nombre. Par contre, en absence de sulfate dans le milieu de culture, la souche SULF1 est toujours présente, mais en très petit nombre. Les auteurs suggèrent que la bactérie SULF1 cultivée en absence de sulfate avec *Desulfitobacterium frappieri* TCE1 utilise la bactérie déshalogénante comme « accepteur d'électron biologique ». En absence totale de sulfate, il y a donc syntrophie entre *Desulfovibrio* sp. souche SULF1 et *Desulfitobacterium frappieri* TCE1.

4.1.4 Effet de l'ajout de surnageant, de milieu de culture et d'extrait de levures

Nous soupçonnions qu'il y avait un élément limitant la croissance et l'activité de la souche LR 7.2. Nous avons donc tenté d'éliminer cette limite pour améliorer la croissance

afin d'obtenir une valeur de densité optique supérieure à 0,1. Cette dernière valeur de densité optique avait été obtenue avec une concentration en 4-OHB de 6,5 mM (section 4.1.5). L'ajout d'extrait de levures, de surnageant de *C. sporogenes* M55 ou de milieu de culture supplémentaire à la fin de la phase exponentielle n'a pas permis d'améliorer la croissance de façon importante. Cette conclusion peut paraître surprenante puisque le 4-OHB a été montré auparavant (voir section 4.1.5) être un élément limitant et le milieu ajouté contenait ce composé. Par contre, il est possible que le 4-hydroxybenzoate était en concentration trop faible dans la culture pour en améliorer la croissance et l'activité.

4.1.5 Effet de la concentration en 4-hydroxybenzoate

Durant plusieurs années, la souche LR 7.2 était cultivée en présence de phénol puisque celle-ci avait été isolée d'un consortium méthanogène pour sa capacité à transformer le phénol (Li et al., 1996). En présence de phénol, le maintien de la souche LR 7.2 était par contre difficile. Au fil des repiquages, la croissance et l'activité étaient de plus en plus lentes et instables. Duckett (2000) a démontré que la maintenance de la souche en présence de 4-hydroxybenzoate était possible. À cette époque, une augmentation de la concentration en 4-hydroxybenzoate accélérait l'activité, mais n'avait aucune influence sur la croissance de la souche. Par contre, le milieu de culture ne contenait aucun surnageant de culture ajouté. Donc, nous avons décidé de répéter l'expérience avec le milieu BM contenant du surnageant de *C. sporogenes* M55. La Figure 16 (a et b) confirme que la concentration en 4-OHB influence l'activité. Similairement aux résultats obtenus par Duckett (2000), plus la concentration en 4-OHB est élevée, plus l'activité est rapide jusqu'à l'atteinte de la concentration optimale qui est d'environ 6,5 mM. Par contre, contrairement à Duckett qui n'avait observé aucune variation de la croissance, nous avons observé une variation de la croissance, mesurée par densité optique, similaire à celle de l'activité. Les faibles valeurs d'écart types observées montrent que la méthode est précise. L'absence de variation au niveau de la croissance obtenue par Duckett peut être attribuable au manque de précision de la méthode analytique utilisée (dénombrement microscopique) étant donné la faible croissance de la souche. Une concentration de 3 mM en 4-hydroxybenzoate a été choisie pour effectuer les prochaines expériences puisqu'elle permet un suivi par densité optique au fil du temps. De plus, nous avons choisi cette concen-

tration plutôt que la concentration optimale afin de pouvoir mieux apprécier l'effet des futurs paramètres testés sur la croissance. Il est également important de remarquer qu'en absence de 4-hydroxybenzoate, l'activité et la croissance sont nulles. Ceci signifie que lorsqu'il n'y a aucune activité de transformation du 4-hydroxybenzoate en benzoate, la bactérie ne peut croître. Cette activité est donc essentielle pour la survie de la bactérie (voir section 4.2.1.1).

4.1.6 Effet de la concentration en phénol

Comme il a été mentionné à la section ci-dessus, la maintenance à long terme de la souche LR 7.2 dans un milieu BM additionné de phénol n'était pas possible. Lors de ce projet, nous avons réussi, pour la première fois, à cultiver et à maintenir à long terme la souche en présence de phénol dans un milieu de culture additionné de surnageant de *C. sporogenes* M55. Tout comme le 4-hydroxybenzoate, la concentration en phénol a un impact important sur la croissance et l'activité. Une augmentation de la concentration en phénol accélère l'activité et la croissance jusqu'à l'atteinte de la concentration optimale. Cependant, celle-ci est plus basse (3,5 mM) que la concentration optimale en 4-hydroxybenzoate (6,5 mM). Ceci indique que le phénol a un effet plus toxique que le 4-hydroxybenzoate sur la souche. De plus, comme pour le 4-hydroxybenzoate, l'activité et la croissance sont nulles en absence de phénol. Finalement, la Figure 18 montre que l'activité et la croissance de la souche LR 7.2 sont ralenties en présence de phénol comparativement au 4-OHB.

4.2 Caractérisation physiologique et morphologique

4.2.1 Accepteurs d'électrons

4.2.1.1 Accepteurs d'électrons organiques

Les Figures 16 et 17 (a et b) montrent qu'en absence de 4-hydroxybenzoate et de phénol, la croissance de la souche est nulle. Ceci indique que la croissance de la souche est impossible lorsque l'activité est nulle. De plus, lorsque la concentration de ces deux

composés est augmentée dans le milieu de culture jusqu'à la valeur maximale, la vitesse de transformation du phénol et du 4-OHB et celle de croissance sont proportionnelles à la concentration ajoutée. Les vitesses de croissance et d'activité sont donc proportionnelles pour chacune des concentrations testées. Ces observations permettent d'établir un lien très étroit entre l'activité de transformation du phénol et du 4-OHB et la croissance de la souche LR 7.2. Ceci nous permet de suggérer l'hypothèse suivante : la réaction globale de transformation du phénol et du 4-OHB en benzoate génère l'énergie nécessaire à la croissance de la souche. Étant donné que tous les carbones sont conservés au cours de la transformation et que la souche n'utilise aucun des accepteurs d'électrons inorganiques testés (section 4.2.1.2), l'énergie ne peut être libérée suite à une fermentation ou à une respiration anaérobie utilisant un ou des accepteurs d'électrons inorganiques. L'hypothèse suggérée suite à ce projet de maîtrise est que la souche LR 7.2 utilise le 4-OHB et le phénol comme accepteurs d'électrons organiques dans un processus de respiration anaérobie. L'énergie générée suite à cette respiration permet ainsi l'utilisation de la source de carbone par la souche LR 7.2 et par le fait même sa croissance. Les exemples de transformation du 4-hydroxybenzoate et du phénol que l'on retrouve dans la littérature font appel à des réactions de fermentation ou de respiration anaérobie impliquant des accepteurs inorganiques d'électrons (section 1.6 et 1.7). Donc, la souche LR 7.2 se distingue de ces bactéries par son processus énergétique unique. La réaction permettant la libération d'énergie est discutée de façon plus approfondie à la section 4.2.2.

4.2.1.2 Accepteurs d'électrons inorganiques

Auparavant, il a été démontré par Duckett (2000) que la souche LR 7.2 utilisait peut-être le sulfite comme accepteur externe d'électrons. Une concentration inférieure à 2 mM avait un effet positif sur l'activité de la souche lorsque celle-ci était cultivée dans un milieu BM contenant du 4-hydroxybenzoate. Par contre, l'ajout de sulfite avait un effet négatif sur l'activité lorsque la souche était cultivée dans un milieu contenant du 4-hydroxybenzoate et du surnageant de *C. sporogenes* M55. Elle en était venue à la conclusion que la souche utilisait le sulfite à des concentrations inférieures à 2 mM et que l'effet négatif observé dans le milieu contenant le surnageant de *C. sporogenes* M55 était attribuable à la présence possible de sulfite dans le surnageant. À la suite de ces travaux, nous

avons voulu confirmer ce résultat avec la souche isolée sur milieu et cultivée dans les nouvelles conditions de culture établies. Dans un premier temps, une série d'accepteurs d'électrons ont été testés. Étant donné que nous savons que la souche utilise le 4-hydroxybenzoate comme accepteur organique d'électrons, nous avons effectué l'expérience en deux étapes : avec et sans 4-hydroxybenzoate. De plus, de la cystéine a été utilisée en remplacement du Na_2S comme agent réducteur, car ce dernier aurait pu agir comme accepteur d'électrons et ainsi fausser les résultats. Selon les Figures 23 et 24, aucun des accepteurs d'électrons testés aux concentrations énumérées à la section 2.4.10 n'est utilisé par la souche LR 7.2 à la fois en présence et en absence de 4-hydroxybenzoate. Si tel avait été le cas, il y aurait eu un effet positif sur l'activité et la croissance de la souche LR 7.2 en présence de 4-hydroxybenzoate, alors qu'elle aurait eu la capacité de croître en absence de 4-hydroxybenzoate.

Étant donné que 0,5 mM de sulfite semble réduire l'activité et la croissance de la souche cultivée en présence de 4-hydroxybenzoate, nous avons voulu tester un éventail de concentrations pour voir si elles avaient toutes un effet négatif. Encore une fois l'expérience a été réalisée en présence et en absence de 4-hydroxybenzoate. L'agent réducteur Na_2S a également été remplacé par de la cystéine. En présence de 4-hydroxybenzoate, aucune des concentrations testées n'a eu un effet positif sur la croissance et l'activité de la souche (Figures 25 a et b). En absence de 4-hydroxybenzoate, aucune croissance n'a été observée (Figure 25 c). Donc le sulfite ne semble pas être utilisé par la souche LR 7.2 cultivée dans les nouvelles conditions de culture. Ceci est similaire aux résultats de Duckett (2000) qui montraient que le sulfite n'était pas favorable à la croissance et à l'activité de la souche en présence du surnageant de *C. sporogenes* M55. La même expérience a été réalisée avec différentes concentrations en sulfate. D'après les résultats obtenus (Figure 26), la souche ne semble pas utiliser le sulfate comme accepteur externe d'électrons.

Ces résultats confirment le processus de respiration anaérobie décrit à la section 4.2.1.1 où le 4-hydroxybenzoate et le phénol sont utilisés comme accepteurs d'électrons. Contrairement à la souche LR 7.2, les espèces bactériennes faisant partie des genres se

rapprochant phylogéniquement de la souche LR 7.2 (*Desulfitobacterium, Desulfotomaculum, Moorella*) utilisent toutes plusieurs accepteurs inorganiques d'électrons (Bouchard et al., 1996; Utkin, Woese et Wiegel, 1994; Sanford et al., 1996; Niggemyer et al., 2001; Kuever et al., 1993; Newman et al., 1997; Pikuta et al., 2000; Kuever, Rainey et Hippe, 1999). Elles sont donc différentes de la souche LR 7.2 qui n'utilise aucun accepteur inorganique d'électrons. De plus, aucune des espèces contenues à l'intérieur de ces genres bactériens ne possède la capacité de transformer le phénol et le 4-hydroxybenzoate en benzoate. Les espèces bactériennes contenues à l'intérieur du genre *Sporotomaculum* n'utilisent aucun accepteur d'électrons pour croître et dégrader le 3-hydroxybenzoate. Dans ce cas, la bactérie utilise le 3-hydroxybenzoate à la fois comme source de carbone et comme donneur et accepteur d'électrons dans une réaction de fermentation (Müller et Schink, 2000). L'utilisation d'accepteurs d'électrons organiques (4-hydroxybenzoate et phénol) plutôt qu'inorganiques pour effectuer la respiration anaérobie est une des caractéristiques physiologiques qui suggère que la souche LR 7.2 serait un nouveau genre bactérien.

4.2.2 Lien entre croissance et activité

Comme il a été mentionné à la section 4.1.5, une concentration en 4-hydroxybenzoate de 3 mM permet le suivi de la croissance en fonction du temps par densité optique. Cette mesure de la croissance est un avantage important puisqu'elle a permis de comparer la cinétique de croissance à celle de l'activité de transformation du 4-hydroxybenzoate en benzoate. La Figure 19 montre que la courbe de croissance est similaire à celle de l'accumulation en benzoate. De plus, la vitesse de croissance maximale a lieu entre le jour 4 et le jour 6. Étant donné que les quatre premiers jours sont consacrés principalement à la décarboxylation du 4-hydroxybenzoate et à la carboxylation du phénol, on peut considérer que la période de croissance correspond à la déshydroxylation du 4-hydroxybenzoate en benzoate. Ce résultat suggère donc que la réaction de déshydroxylation serait la réaction énergétique permettant à la souche LR 7.2 de croître.

Selon la littérature et les résultats obtenus précédemment, nous savons que la réaction de décarboxylation du 4-hydroxybenzoate est favorisée comparativement à celle de la carboxylation du phénol (Gallert et Winter, 1994; Zhang et Wiegel, 1994; Duckett, 2000). Ceci permet d'envisager que la réaction de décarboxylation soit énergétique et ainsi que l'équilibre de la réaction soit favorisé vers la gauche (Figure 9). Une hypothèse émise par Duckett était que la souche conservait une partie de l'énergie supplémentaire produite lors de la décarboxylation et qu'elle l'utilisait ensuite pour déplacer l'équilibre vers la droite et pour croître. L'autre hypothèse était que l'accumulation du 4-hydroxybenzoate générée par la carboxylation stimule les enzymes de déshydroxylation et que celles-ci permettent un déplacement de l'équilibre de la réaction vers la droite, soit vers le produit de carboxylation (4-OHB) et de déshydroxylation (benzoate). Cette déshydroxylation produirait de l'énergie permettant la croissance de la souche. D'après les résultats obtenus au cours de ce projet, l'hypothèse de l'induction des enzymes de déshydroxylation semble plus crédible puisque la courbe de croissance correspond à celle de l'accumulation du benzoate. Une troisième hypothèse pourrait être qu'une partie du 4-OHB initial soit déshydroxylée directement en benzoate pendant que la majeure partie du 4-hydroxybenzoate est décarboxylée en phénol. Si la réaction de déshydroxylation est énergétique comme il semble être le cas, l'énergie libérée par l'activité de déshydroxylation induirait la carboxylation du phénol. L'accumulation du 4-OHB résultante activerait alors les enzymes de déshydroxylation et l'énergie ainsi libérée permettrait alors la croissance de la souche LR 7.2. Par contre, cette dernière hypothèse n'a pas été vérifiée lors de ce projet de maîtrise. Elle pourrait être facilement confirmée par l'ajout au milieu de culture de 4-OHB marqué au ^{13}C au niveau du carbone de la fonction carboxyle. À ce moment, la présence de benzoate marqué indiquerait la formation directe de benzoate à partir du 4-hydroxybenzoate sans passer par l'étape de décarboxylation/carboxylation. Une absence de benzoate marqué signifierait que toutes les molécules de 4-OHB ont d'abord été décarboxylées et carboxylées avant d'être déshydroxylées.

4.2.3 Confirmation de la voie biochimique

Tout au long des expériences avec le phénol, le 4-hydroxybenzoate n'a jamais été détecté lors des analyses du milieu de culture par GC-FID. Cependant, il a été suggéré précédemment (Letowski, 2000; Duckett, 2000; Bisaillon et al., 1993) que la voie biochimique passe par la carboxylation du phénol en 4-hydroxybenzoate et que ce dernier est par la suite déshydroxylé en benzoate (Figure 9). Nous avons donc voulu confirmer la voie biochimique de la réaction de la transformation du phénol en benzoate effectuée par la souche LR 7.2. Premièrement, nous avons regardé s'il y avait présence de 4-hydroxybenzoate dans le milieu de culture au cours de la transformation par GC-MS, cette méthode ayant un seuil de détection plus sensible que le GC-FID. Il a été possible de détecter du 4-hydroxybenzoate par GC-MS, mais ce dernier ne se détachait pas assez du bruit de fond lors du suivi.

Dans la littérature, la majorité des auteurs travaillant sur la transformation du phénol n'a pas réussi à prouver la présence de 4-hydroxybenzoate dans leur milieu de culture. Zhang et Wiegel (1990) n'ont pu observer le 4-hydroxybenzoate comme intermédiaire de dégradation dans leurs cultures cellulaires enrichies convertissant le phénol en benzoate. Ils ont suggéré que la transformation du 4-hydroxybenzoate est extrêmement rapide, ce qui empêcherait son accumulation lors de la transformation en benzoate. De plus, la décarboxylation est favorisée par rapport à la carboxylation, ce qui pourrait expliquer la faible détection du 4-hydroxybenzoate. Comme les auteurs précédents, Gallert, Knoll et Winter (1991) n'ont pas observé de 4-hydroxybenzoate comme intermédiaire de dégradation du phénol au sein de leur culture mixte. Sharak Genthner, Townsend et Chapman (1991) ont été les premiers à observer la présence de 4-hydroxybenzoate comme intermédiaire de dégradation au cours de la transformation du phénol en benzoate par leur consortium méthanogène. Par contre, il leur a fallu une grande quantité de phénol (10 mM) et de CO_2 (10%) pour détecter 30 µM de 4-hydroxybenzoate. Li et al. (2000) avaient observé le même résultat que Sharak Genthner en utilisant soit des extraits cellulaires, soit l'enzyme 4-hydroxybenzoate décarboxylase purifiée. Étant donné que nous utilisons une plus faible concentration de phénol (3 mM) et que la déshydroxylation du 4-hydroxybenzoate en benzoate est plus rapide que la carboxylation du phénol en 4-

hydroxybenzoate, il semble normal que nous ne puissions détecter ce dernier. Cependant Gallert, Knoll et Winter (1991) ont pu observer du [D_4]-4-hydroxybenzoate en utilisant une faible concentration de [D_6]-phénol. Donc, nous avons effectué la même expérience que ces auteurs avec la souche LR 7.2 et de cette façon, nous avons réussi à détecter une faible concentration de [D_4]-4-hydroxybenzoate par GC-MS. La présence de [D_4]-4-hydroxybenzoate durant la transformation du [D_6]-phénol en [D_4]-benzoate confirme que la voie biochimique de transformation du phénol en benzoate passe par la carboxylation du 4-hydroxybenzoate, ce dernier étant l'intermédiaire de la réaction.

4.2.4 Spectre d'activité

Cette étude a démontré que la souche LR 7.2 utilise le 4-hydroxybenzoate et le phénol comme accepteurs d'électrons. Nous avons voulu vérifier si la souche pouvait utiliser d'autres composés similaires. D'abord, nous avons testé des composés ayant une structure similaire au phénol, car le consortium d'origine était capable de transformer ces composés (Bisaillon et al., 1993). Ensuite, nous avons testé des composés ayant une structure similaire au 4-hydroxybenzoate. Ces deux expériences ont été réalisées en absence de phénol et de 4-hydroxybenzoate afin de déterminer si chacun des composés peut être utilisé comme unique accepteur d'électrons. Le résultat attendu était une déshydroxylation des composés similaires au 4-hydroxybenzoate et une carboxylation/déshydroxylation des composés phénoliques. Dans la littérature, on retrouve plusieurs souches transformant un large spectre de substrats. Par exemple certaines bactéries (*Desulfitobacterium* souche GBFH, *D. chlororespirans*, *D. dehalogenans*) contenues dans le genre *Desulfitobacterium* transforment plusieurs chlorophénols (Niggemyer et al., 2001; Sandford et al., 1996; Utkin, Woese et Wiegel, 1994). De plus, *Sedimentibacter hydroxybenzoïcus*, bactérie ayant une activité de décarboxylation similaire à la souche LR 7.2, utilise en plus du 4-hydroxybenzoate, le 3-chloro-4-hydroxybenzoate. La souche LR 7.2 n'a transformé aucun des composés similaires au 4-hydroxybenzoate et au phénol. De plus, aucune croissance n'a pu être observée en présence des différents composés (Figures 27 et 28). La souche LR 7.2 a donc un spectre d'activité restreint se limitant au phénol et au 4-hydroxybenzoate. Le résultat concernant les composés phénoliques est surprenant, car le

consortium d'origine les utilisait (Bisaillon et al., 1993). Par contre, le phénol était présent dans les cultures transformant ces composés. Ceci semble indiquer que le consortium transformait ces composés par cométabolisme ou bien que l'activité de carboxylation était préalablement induite par le phénol. Les résultats pourraient donc être différents en présence de 4-hydroxybenzoate ou de phénol, ces derniers étant essentiels à la croissance de la souche LR 7.2. Dans une expérience réalisée avec le *o*-crésol, Bisaillon et al. (1991) avaient observé que ce dernier devait être ajouté après 14 jours d'incubation en présence de phénol. Il serait donc essentiel de vérifier si l'activité de carboxylation de la souche LR 7.2 doit être préalablement induite par le phénol en répétant cette expérience en présence de phénol et en suivant les composés sur une plus longue période de temps.

4.2.5 Effet de l'hydrogène

Les travaux de Letowski (2000) suggéraient que l'hydrogène était essentiel à la croissance et à l'activité de la souche LR 7.2. Il avait émis l'hypothèse que l'hydrogène gazeux était utilisé à titre de donneur d'électrons par la souche. Nous avons donc voulu confirmer le rôle possible de l'hydrogène comme donneur d'électrons chez la souche LR 7.2. C'est pourquoi nous avons testé plusieurs mélanges gazeux, avec et sans hydrogène, en présence de 4-hydroxybenzoate (Figure 15). Le Na_2S a été utilisé comme agent réducteur dans cette expérience. Contrairement aux résultats obtenus par Letowski, un pourcentage égal ou supérieur à 20% d'H_2 ralentit considérablement l'activité et la croissance de la souche LR 7.2. De plus, la souche croit et transforme le 4-hydroxybenzoate en absence totale d'hydrogène gazeux, ce qui signifie que l'hydrogène gazeux ne peut servir de donneur d'électrons. Dans la littérature, la croissance de quelques souches semble être inhibée par la présence d'hydrogène. Par exemple, la souche GBFH (Niggemyer et al., 2001) appartenant au genre *Desulfitobacterium* est cultivée sous une atmosphère gazeuse composé de N_2 : CO_2 (4 : 1). Lorsque 10% d'hydrogène est ajouté à l'atmosphère gazeuse, la croissance est totalement inhibée. Cet exemple montre que certaines souches n'utilisent pas l'hydrogène gazeux comme donneur d'électrons et que ce dernier peut également avoir un effet néfaste sur leur métabolisme.

4.2.6 pH et température optimaux

Avant le début de ce projet, Duckett (2000) avait trouvé que la température et le pH permettant la meilleure activité et croissance de la souche 7 (nom de la souche avant son isolement sur milieu) étaient respectivement de 37°C et de 7,5. Au cours de ce projet, nous avons voulu vérifier que la souche maintenant nommée LR 7.2 possède les mêmes valeurs de température et de pH optimaux. Les résultats de cette étude confirment ceux obtenus précédemment par Duckett. Parmi les espèces bactériennes contenues dans le genre *Desulfitobacterium* se rapprochant phylogéniquement de la souche LR 7.2, la plupart ont une température optimale autour de 37°C et un pH optimal se situant entre 7 et 7,5 (Bouchard et al., 1996 ; Utkin, Dalton et Wiegel, 1994 ; Niggemyer et al., 2001 ; Sanford et al., 1996). Les deux espèces contenues dans le genre *Moorella* (*M. thermoaceticum et M. thermoautotrophicum*) ayant une phylogénie similaire à la souche LR 7.2 (Fröstl, Seifritz et Drake, 1996) ont un pH optimal de 6,8 et une température optimale de 55°C. Ensuite, *Sedimentibacter hydroxybenzoïcus,* souche bactérienne transformant également le 4-OHB (Zhang et Wiegel, 1990) a un pH optimal entre 7,2-8,2 et une température optimale de 33-34°C.

4.2.7 Sporulation

La souche LR 7.2 ne semble pas former de spores même suite à un traitement à la chaleur. Pourtant, un traitement à la chaleur avait été appliqué au consortium méthanogène d'origine dans le protocole visant à isoler la souche responsable de l'activité de carboxylation. Suite à ce traitement, la souche responsable de la transformation du phénol en benzoate avait survécu, ce qui suggérait que la souche formait des spores (Létourneau et al., 1995). Il est possible que certaines bactéries du consortium fournissaient un élément déclenchant le mécanisme de thermorésistance et la formation de spores chez la souche. Cet élément est probablement absent du surnageant de *C. sporogenes* M55 et de celui de la souche 6, ce qui expliquerait l'absence de sporulation de la souche LR 7.2 en culture pure.

4.2.8 Acides gras membranaires

La composition en acides gras membranaires chez les bactéries est un élément déterminant pour leur identification. Suite à la comparaison de la composition en acides gras de la souche LR 7.2 avec les espèces contenues dans les banques de données, celle-ci n'est apparentée à aucune espèce bactérienne. De plus, elle possède une quantité importante d'acides gras 15 : 0 ANTE et ISO qui sont généralement retrouvés chez les bactéries Gram-positives (communication personnelle de Serge Messier). De plus, la souche possède un type d'acide gras contenant un groupement diméthyle acétal (16 :1 ω9c DMA) suite à la dérivation. Il s'agissait d'une fonction cétone avant la dérivation. Cette fonction est généralement retrouvée chez les bactéries anaérobies strictes (communication personnelle de Serge Messier). La composition en acides gras des bactéries se rapprochant phylogéniquement de la souche LR 7.2 soit celles appartenant aux genres *Desulfitobacterium* et *Moorella* n'est pas connue. Les acides gras membranaires dominants des espèces contenues dans le genre *Desulfosporosinus*, genre se rapprochant phylogéniquement de la souche LR 7.2, sont 16 : 0, 16 :1 ω9c, 14 : 0 et 18 : 1 ω11c (Robertson et al., 2001). Les trois premiers acides gras sont également présents dans la membrane de la souche LR 7.2, mais en moins grande quantité. La détermination des acides gras membranaires de certaines espèces des genres *Desulfitobacterium* et *Moorella* permettrait de savoir si certaines espèces ont une composition en acides gras similaires à celle de la souche LR 7.2.

4.2.9 Microscopie

La microscopie optique (résultats non-illustrés) et électronique (Figure 30) a permis de mettre en évidence que la souche LR 7.2 fait partie de la classe des bactéries Gram-positives. Elle se distingue des autres bactéries Gram-positives apparentées phylogéniquement par sa forme particulière (section 3.4.3).

4.3 Caractérisation génétique

4.3.1 Gène de l'ADNr 16S

La comparaison de l'ADNr 16S permet d'établir une relation phylogénique entre les bactéries. Letowski (2001) a déterminé la séquence de l'ADNr 16S de la souche 7 avant son isolement sur milieu . La séquence obtenue était apparentée soit à des bactéries non-isolées en culture pure (93% et 94% d'homologie avec les souches « spore A » et « spore B ») ou à des bactéries non-cultivables connues uniquement par leur séquence du gène de l'ADNr 16S (96% avec WCHB1-20 et 94% avec WCHB1-89).

Maintenant que la souche a été isolée sur milieu semi-solide et que nous sommes certains de sa pureté, nous avons voulu confirmer l'identité de la souche LR 7.2 en faisant séquencer le gène de l'ADNr 16S de la souche pure. Les deux séquences se sont révélées être identiques à un nucléotide près. La souche LR 7.2 et la souche 7 sont donc identiques. La seule différence est le passage de la souche LR 7.2 sur un milieu semi-solide.

Parmi les bactéries cultivables, la séquence de l'ADNr 16S de la souche LR 7.2 se rapproche des genres *Desulfotomaculum, Desulfosporosinus* et des deux espèces suivantes : *M. thermoacetica* et *M. thermoautotrophicum* (voir Tableau 3). Par contre, le pourcentage d'homologie avec ces bactéries est inférieur ou égal à 94%, ce qui est très faible. Ceci semble indiquer que la souche LR 7.2 est un nouveau genre bactérien.

4.3.2 Pourcentage en G + C

Le contenu en G + C d'une bactérie est un élément déterminant pour son identification. La souche LR 7.2 a un faible contenu en G + C de 51.4 Mol% (section 3.2.1). Le contenu en G + C des genres bactériens se rapprochant phylogéniquement de la souche LR 7.2 est de 45-48 Mol% pour *Desulfitobacterium*, de 37-50 Mol% pour *Desulfotomaculum* et de 54-55 Mol% pour *Moorella* (Utkin, Woese and Wiegel, 1994; Brauman et al., 1998; Collins et al., 1994; Garrity, 2001).

4.4 Position taxonomique

Les résultats obtenus au cours de ce projet de maîtrise qui visait la caractérisation de la souche LR 7.2 ont permis de lui assigner une position taxonomique précise. Les études de phylogénie montrent que la souche LR 7.2 n'est apparentée à aucune espèce cultivable connue dans la littérature. De plus, parmi toutes les bactéries isolées en culture pure et connues dans la littérature, elle est la seule à transformer le phénol et le 4-hydroxybenzoate en benzoate via la voie de carboxylation. La souche LR 7.2 se distingue également des espèces qui lui sont apparentées phylogéniquement puisqu'elle n'utilise aucun des accepteurs inorganiques d'électrons testés. Contrairement à ces bactéries, la souche LR 7.2 utilise le phénol et le 4-hydroxybenzoate comme accepteur d'électrons dans un processus énergétique de respiration anaérobie. Son profil d'acides gras membranaires diffère également de celui des bactéries contenues dans les bases de données. En plus de lui assigner une position taxonomique particulière, l'ensemble de ces caractéristiques suggère que la souche LR 7.2 représente un nouveau genre bactérien. Une étude approfondie des enzymes et des gènes impliqués dans l'activité de transformation du 4-hydroxybenzoate en benzoate permettrait de compléter la caractérisation de la souche LR 7.2.

4.5 Confirmation de l'identité de *Clostridium sporogenes* M55

La souche *Clostridium sporogenes* M55 dont le surnageant est utilisé pour la culture de la souche LR7.2 a été obtenue de la collection du Dr Fredette de l'INRS-Institut Armand-Frappier. Elle a d'abord été déposée à l' « American Type Culture Collection » (ATCC) et à la « Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen » (DSMZ) sous le nom de *Clostridium butyricum* M55. Ensuite, Möller, Hippe et Gottschalk (1986) ont démontré qu'elle était plutôt similaire à *Clostridium sporogenes* M55. Avant de poursuivre l'étude de caractérisation, nous avons voulu confirmer l'identité de cette souche par l'analyse de son gène codant pour l'ARNr 16S. La séquence obtenue a une homologie de 99% avec celle de *Clostridium sporogenes* (Hutson et al., 1993) comparativement à seulement 94% d'homologie avec celle de *Clostridium butyricum* (Blast,

numéro d'accès : AJ458419). Ceci démontre que la souche utilisée pour la préparation du surnageant de culture fait partie de l'espèce *Clostridium sporogenes*.

Conclusion

Avant ce projet de maîtrise, plusieurs travaux ont été faits sur la souche LR 7.2 : isolement de la bactérie en milieu liquide à partir du consortium méthanogène, optimisation des conditions de culture et les premiers travaux de caractérisation. La stabilité et la maintenance de la souche au fil des repiquages ont été possibles en remplaçant le phénol par le 4-hydroxybenzoate ainsi que par l'ajout de 36% (v/v) d'un surnageant de culture de la souche 6 ou de *C. sporogenes* M55. Les premiers travaux de caractérisation physiologique ainsi que la position phylogénique de la souche semblaient déjà indiquer que la souche LR 7.2 appartenait certainement à une nouvelle espèce et peut-être même à un nouveau genre bactérien. L'isolement de la souche sur milieu semi-solide, qui était jusqu'alors impossible, a permis de confirmer la pureté de la souche. Les objectifs principaux de ce projet étaient donc de confirmer les premiers résultats de caractérisation avec la souche purifiée pour s'assurer qu'ils sont toujours vrais et d'effectuer des travaux de caractérisation plus poussés afin d'assigner une position taxonomique à la souche LR 7.2. De plus, il était primordial d'optimiser les conditions de culture afin d'augmenter la croissance de la souche qui était toujours très faible et ainsi faciliter les travaux de caractérisation.

Un résultat déterminant pour la continuité du projet a été l'augmentation de la croissance en augmentant la concentration en 4-hydroxybenzoate à 3 mM. Cette amélioration de la croissance a permis de mesurer la croissance par densité optique et ainsi d'établir la cinétique de croissance de la souche pour chacune des expériences de caractérisations suivantes. Cette méthode d'évaluation de la croissance est nettement plus précise et valable que celle du dénombrement microscopique utilisée lors des projets antérieurs sur la souche LR 7.2. De plus, une légère amélioration de l'activité a été observée suite à l'ajout de surnageant de culture de *C. sporogenes* M55 en remplacement de celui de la souche 6 utilisé antérieurement. L'ajout du surnageant de *C. sporogenes* M55 et de 4-hydroxybenzoate à une concentration de 3 mM dans les milieux de culture est devenu la norme pour la poursuite des travaux de caractérisation de la souche LR 7.2.

Avec ces nouvelles conditions de culture, il a été possible de maintenir la souche LR 7.2 en présence de phénol en remplacement du 4-hydroxybenzoate, ce qui n'était pas possible avec les anciennes conditions de culture. Par contre, la concentration optimum pour la croissance et l'activité est plus basse, ce qui suggère que le phénol a une action plus toxique que le 4-hydroxybenzoate sur la souche LR 7.2. Étant donné que la croissance et l'activité sont plus lentes en présence de phénol, le 4-hydroxybenzoate a été utilisé pour le maintient de la souche tout au long des travaux de caractérisation.

La souche LR 7.2 a une position phylogénique unique. En effet, la séquence du gène de l'ADNr 16S est similaire à celle de bactéries non-cultivables, uniquement connues par leur gène de l'ADNr 16S. Elle se rapproche également de bactéries sulfato-réductrices, mais de façon plus éloignée puisque le pourcentage de similaritité de leur ADNr 16S se situe entre 85 et 94%. De plus la souche LR 7.2 fait partie de la classe des bactéries Gram-positives ayant un faible contenu en G+C avec un pourcentage de 51.4 Mol%.

La souche LR 7.2 n'utilise aucun des accepteurs inorganiques d'électrons testés, ce qui confirme qu'elle ne fait pas partie des genres bactériens ayant une phylogénie rapprochée puisque les espèces contenues dans ces genres utilisent le sulfate et/ou le sulfite comme accepteur d'électrons.

La présence de 4-hydroxybenzoate ou de phénol dans le milieu de culture est essentielle à la croissance de la souche LR 7.2. De plus, il y a un lien très étroit entre la croissance et l'activité qui sont influencées par la concentration en 4-hydroxybenzoate et en phénol présente. En effet, pour des concentrations croissantes jusqu'à l'optimum, la croissance et l'activité augmentent. Étant donné que la souche n'utilise aucun accepteur externe d'électrons et que tous les carbones sont conservés lors de la transformation, ceci exclut la possibilité d'une fermentation ou d'une respiration anaérobie impliquant un ou des accepteurs d'électrons inorganiques. Tout semble alors indiquer que la souche LR 7.2 utilise le 4-hydroxybenzoate et le phénol comme accepteur d'électrons dans un processus de respiration anaérobie. L'énergie générée lors de leur transformation en benzoate per-

mettrait l'utilisation de la source de carbone et la croissance de la bactérie. Encore une fois, ce résultat suggère que cette bactérie est réellement différente des bactéries se rapprochant d'elle phylogéniquement.

Parmi les composés organiques similaires au phénol et au 4-hydroxybenzoate ajoutés au milieu de culture, aucun ne semblait être utilisé par la souche LR 7.2. La souche a donc un spectre d'activité limité au 4-hydroxybenzoate et au phénol. Des essais avec des concentrations inférieures s'avéreraient essentiels pour confirmer ce résultat. Il serait également intéressant d'essayer d'autres composés organiques similaires au phénol et au 4-hydroxybenzoate ou bien des composés monoaromatiques complètement différents.

Les donneurs d'électrons de la souche LR 7.2 demeurent inconnus. Il a été démontré au cours de ce projet que l'hydrogène était nuisible à la croissance et à l'activité de la souche. Il faudrait essayer d'autres donneurs d'électrons potentiels pour poursuivre la caractérisation.

L'analyse des acides gras membranaires suggère également que la souche LR 7.2 est complètement différente des bactéries connues. Son profil en acide gras membranaires ne correspond aucunement avec celui des bactéries contenues dans les bases de données. L'analyse des acides gras membranaires des bactéries proches de la souche LR 7.2 dans l'arbre phylogénique serait utile étant donné que ces données ne sont pas retrouvées dans la littérature.

Les travaux sur la détermination de la température (37°C) et du pH optimaux (7,5) confirment également ceux obtenus antérieurement. Finalement, la voie biochimique utilisée lors de la transformation du phénol en benzoate a également été confirmée. Le 4-hydroxybenzoate est réellement l'intermédiaire de la transformation.

Tous les résultats de caractérisation obtenus lors de ce projet de maîtrise suggèrent que la souche LR 7.2 est fort probablement plus qu'une nouvelle espèce, c'est-à-dire un nouveau genre bactérien. De plus, ils permettent d'assigner à la souche LR 7.2 une posi-

tion taxonomique unique se rapprochant phylogéniquement des espèces bactériennes incluent dans les genres *Desulfosporosinus, Desulfitobacterium, Desulfotomaculum et Moorella.*

Références

Anders, A., Kaetzke, A., Kämpfer, P., Ludwig, W., Fuchs, G. 1995. « Taxonomic position of aromatic degrading denitrifying pseudomonad strains K172 and KB740 and their description as new members of the genera *Thauera, T. aromatica* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of Proteobacteria ». Int. J. Syst. Bacteriol., vol. 45, p. 327-333.

Auburger, G., Winter, J. 1995. « Isolation and physiological characterization of *Syntrophus buswellii* strain GA from a syntrophic benzoate-degrading, strictly anaerobic coculture ». Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 44, p. 241-248.

Babich, H., Davis, D. L. 1981. « Phenol: A Review of Environmental and Health Risks ». Regul. Toxicol. Pharmacol., vol. 1, p. 90-109.

Bak, F., Widdel, F. 1986. « Anaerobic degradation of phenol and phenol derivatives by *Desulfobacterium phenolicum* sp. nov. ». Arch. Microbiol, vol.146, p. 177-180.

Bakker, G. 1977. « Anaerobic degradation of aromatic compounds in the presence of nitrate ». FEMS Microbiol. Letters, vol. 1, p. 103-108.

Balba, M. T., Clarke, N. A., Evans, W. C. 1979. « The methanogenic fermentation of plant phenolics ». Biochem. Soc. Trans., vol. 7, p. 1115-1116.

Balba, M. T., Evans, W. C. 1979. « The methanogenic fermentation of omega-phenylalkane carboxylic acids ». Biochem. Soc. Trans., vol. 7, p. 403-405.

Balba, M. T., Evans, W. C. 1977. « The methanogenic fermentation of aromatic substrates ». Biochem. Soc. Trans., vol. 5, p. 302-304.

Beaudet, R., Bisaillon, J.-G., Ishaque, M., Sylvestre, M. 1986. « Isolation of an anaerobic bacterial consortium degrading phenolic compounds—Assay in swine waste ». Agricultural Wastes, vol. 17, p. 131-140.

Béchard, G., Bisaillon, J.-G., Beaudet, R., Sylvestre, M. 1990. « Degradation of phenol by a bacterial consortium under methanogenic conditions ». Can J Microbiol, vol. 36, p. 573-578.

Berry, D. F., Francis, A. J., Bollag, J.-M. 1987. « Microbial metabolism of homocyclic and heterocyclic aromatic compounds under anaerobic conditions ». Microbiol. Rev., vol. 51, p. 43-59.

Bisaillon, J.-G., Beaudet, R., Lépine, F., Sylvestre, M. 1994. « Microbiological study of the carboxylation of phenols by methanogenic fermentation ». Water Poll. Res. J. Canada, vol. 29, p. 117-127.

Bisaillon, J.-G., Lépine, F., Beaudet, R., Sylvestre, M. 1993. « Potential for carboxylation-dehydroxylation of phenolic compounds by a methanogenic consortium ». Can. J. Microbiol., vol. 39, p. 642-648.

Bisaillon, J.-G., Lépine, F., Beaudet, R. 1991. « Study of the methanogenic degradation of phenol via carboxylation to benzoate ». Can. J. Microbiol., vol. 37, p. 573-576.

Bisaillon, J.-G., Lépine, F., Beaudet, R., Sylvestre, M. 1991 . « Carboxylation of *o*-cresol by an anaerobic consortium under methanogenic conditions ». Appl. Environ. Microbiol., vol. 57, p. 2131-2134.

Boopathy, R. 1997. « Anaerobic phenol degradation by microorganism of swine manure ». Curr Microbiol, vol. 35, p. 64-67.

Bouchard, B., Beaudet, R., Villemur, R., McSween, G., Lépine, F., Bisaillon, J.-G. 1996. « Isolation and characterization of *Desulfitobacterium frappieri* sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates pentachlorophenol to 3-chlorophenol ». Int. J. Syst. Bacteriol., vol. 46, p. 1010-1015.

Boyd, S. A., Shelton, D. R., Berry, D., Tiedje, J. M. 1983. « Anaerobic biodegradation of phenolic compounds in digested sludge ». Appl. Environ. Microbiol., vol. 46, p. 50-54.

Brauman, A., Müller, J. A., Garcia, J.-L., Brune, A., Schink, B. 1998. « Fermentative degradation of 3-hydroxybenzoate in pure culture by a novel strictly anaerobic bacterium, *Sporotomaculum hydroxybenzoicum* gen. nov., sp. nov. ». Int. J. Syst. Bacteriol., vol. 48, p. 215-221.

Breinig, S., Schiltz, E., Fuchs, G. 2000. « Genes involved in anaerobic metabolism of phenol in the bacterium *Thauera aromatica* ». J. Bacteriol., vol. 182, p. 5849-5863.

Breitenstein, A., Wiegel, J., Haertig, C., Weiss, N., Andreesen, J. R., Lechner, U. 2002. «Reclassification of *Clostridium hydroxybenzoïcum* gen. nov., comb. nov., and descrip-

tion of *Sedimentibacter saalensis* sp. nov. ». Int. J. Syst. Evol. Microbiol, vol. 52, p. 801-807.

Colberg, P. J., Young, L. Y. 1982. « Biodegradation of lignin-derived molecules under anaerobic conditions ». Can. J. Microbiol., vol. 28, p. 886-889.

Davi, M. L., Gnudi, F. 1999. « Phenolic compounds in surface water ». Wat. Res., vol. 33, p. 3213-3219.

Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J. Hippe, H., Farrow, J. A. 1994. « The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations ». Int. J. Syst. Bacteriol., vol. 44, p. 812-826.

Cord-Ruwisch, R., Kleinitz, W., Widdel, F. 1987. « Sulfate reducing bacteria and their activities in oil production ». J. Pet. Technol., p. 97-106.

Dangel, W., Brackmann, R., Lack, A., Mohamed, M., Koch, J., Oswald, B., Seyfried, B., Tschech, A., Fuchs, G. 1991. « Differential expression of enzyme activities initiating anoxic metabolism of various aromatic compounds via benzoyl-CoA ». Arch. Microbiol., vol. 155, p. 256-262.

Drzyzga, O., Gerritse, J., Dijk, J. A., Elissen, H., Gottschal, J. C. 2001. « Coexistence of a sulfate-reducing *Desulfovibrio* species and the dehalorespiring *Desulfitobacterium frappieri* TCE1 in defined chemostat cultures grown with various combinations of sulfate and tetrachloroethene ». Environ. Microbiol., vol. 3, p. 92-99.

Drzyzga, O., Kuver, J. Blotevogel, K. H. 1993. Complete oxidation of benzoate and 4-hydroxybenzoate by a new sulfate-reducing bacterium resembling *Desulfoarculus* ». Arch. Microbiol., vol. 159, p. 109-113.

Duckett, M. 2000. « Étude d'une souche bactérienne anaérobie capable de transformer le phénol et l'acide 4-hydrozybenzoïque en acide benzoïque ». Mémoire de maîtrise en microbiologie appliquée, Sainte-Foy. Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique, 124 p.

Dutton, P. L., Evans, W. C. 1969. « The Metabolism of aromatic compounds by *Rhodopseudomonas palustris* ». Biochem. J., vol. 113, p. 525-536.

Elder, D. J. E., Kelly, D. J. 1994. « The bacterial degradation of benzoic acid and benzenoid compounds under anaerobic conditions: Unifying trends and new perspectives». FEMS Microbiol. Rev., vol. 13, p. 441-468.

EPA. 1998. Envirofacts warehouse chemical references. Phenol CAS # 108-95-2. Environmental Protection Agency.

Evans, W.C. 1997. « Biochemistry of the bacterial catabolism of aromatic compounds in anaerobic environments ». Nature, vol. 270, p.17-22.

Evans, W. C. Fuchs, G. 1988. « Anaerobic degradation of aromatic compounds ». Ann. Rev. Microbiol., vol. 42, p.289-317.

Evans, W. C. 1977. « Biochemistry of the bacterial catabolism of aromatic compounds in anaerobic environments ». Nature, vol. 270, p.17-22.

Ferry, J. G., Wolfe, R. S. 1976. « Anaerobic degradation of benzoate to methane by a microbial consortium ». Arch. Microbiol., vol. 107, p. 33-40.

Fröstl, J. M., Seifritz, C., Drake, H. L. 1996. « Effect of nitrate on the autotrophic metabolism of the acetogens *Clostridium thermoautotrophicum* and *Clostridium thermoaceticum* ». J. Bacteriol., vol. 178, p. 4597-4603.

Fuchs, G., Mohamed, M. E. S., Altenschmidt, U., Koch, J., Lack, A., Brackmann, R., Lochmeyer, C., Oswald, B. 1994. Biochemistry of microbial degradation. Colin Ratledge. Dordrecht. Kluwer Academic Publishers. P. 513-553.

Gallert, C., Winter, J. 1994. « Anaerobic degradation of 4-hydroxybenzoate : reductive dehydroxylation of 4-hydroxybenzoyl-CoA and ATP formation during 4-hydroxybenzoate decarboxylation by the phenol-metabolizing bacteria of a stable, strictly anaerobic consortium ». Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 42, p.408-414.

Gallert, C., Winter, J. 1993. « Uptake of phenol by the phenol-metabolizing bacteria of a stable, strictly anaerobic consortium ». Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 39, p. 627-631.

Gallert, C., Knoll, G., Winter, J. 1991. « Anaerobic carboxylation of phenol to benzoate: use of deuterated phenols revealed carboxylation exclusively in the C4-position ». Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 36, p. 124-129.

Garrity, G. M. (Éditeur en chef). 2001. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2, 2nd ed. New York, Springer.

Gibson, J., Dispensa, M., Harwood, C. S. 1997. « 4-Hydroxybenzoyl coenzyme A reductase (Dehydroxylating) is required for anaerobic degradation of 4-hydroxybenzoate by *Rhodopseudomonas palustris* and shares features with molybdenum-containing hydroxylases ». J. Bacteriol., vol. 179, p. 634-642.

Gibson, K. J., Gibson, J. 1992. « Potential early intermediates in anaerobic benzoate degradation by *Rhodopseudomonas palustris* ». Appl. Environ. Microbiol., vol. 58, p. 696-698.

Glöckler, R., Tschech, A., Fuchs, G. 1989. « Reductive dehydroxylation of 4-hydroxybenzoyl-CoA to benzoyl-CoA in a denitrifying, phenol-degrading *Pseudomonas* species ». FEBS Letters, vol. 251, p. 237-240.

Grant, D. J. W., Patel, J. C. 1969. « The non-oxidative decarboxylation of *p*-hydroxybenzoic acid, gentisic acid, protocatechuic acid and gallic acid by *Klebsiella aerogenes* (*Aerobacter aerogenes*) ». Antonie van Leeuwenhock, vol. 35, p. 325-343.

Harwood, C. S., Burchhardt, G., Herrmann, H., Fuchs, G. 1999. « Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway ». FEMS Microbiol. Rev., vol. 22, p. 439-458.

He, Z., Wiegel, J. 1995. « Purification and characterization of an oxygen-sensitive reversible 4-hydroxybenzoate decarboxylase from *Clostridium hydroxybenzoicum* ». Eur. J. Biochem., vol. 229, p.77-82.

Heider, J., Boll, M., Breese, K., Breinig, S., Ebenau-Jehle, C., Feil, U., Gad'on, N., Laempe, D., Leuthner, B., El-Said Mohamed, M., Schneider, S., Burchhardt, G., Fuchs, G. 1998. « Differential induction of enzymes involved in anaerobic metabolism of aromatic compounds in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* ». Arch. Microbiol., vol. 170, p. 120-131.

Heider, J., Fuchs, G. 1997. « Anaerobic metabolism of aromatic compounds » Eur J Biochem, vol. 243, p. 577-596.

Hsu, T., Daniel, S. L., Lux, M. F., Drake, H. L. 1990. « Biotransformation of carboxylated aromatic compounds by the acetogen *Clostridium thermoaceticum*: generation of growth-supportive CO_2-limited conditions ». J. Bacteriol., vol. 172, p. 212-217.

Huang, J., He, H., Wiegel, J. 1999. « Cloning, characterization and expression of a novel gene encoding a reversible 4-hydroxybenzoate decarboxylase from *Clostridium hydroxybenzoicum* ». J. Bacteriol., vol. 181, p. 5119-5122.

Hutson, R. A., Thompson, D. E. Lawson, P. A., Schocken-Itturino, R. P., Böttger E. C., Collins, M. D. 1993. « Genetic interrelationships of proteolytic *Clostridium botulinum* types A, B, and F and other members of the *Clostridium botulinum* complex as revealed by small-subunit rRNA gene sequences ». Antonie van Leewenhock, vol. 64, p. 273-283.

Karlsson, A., Ejlertsson, J., Svensson, B. H. 2000. « CO_2-dependent fermentation of phenol to acetate, butyrate and benzoate by an anaerobic, pasteurized culture ». Arch Microbiol, vol. 173, p. 398-402.

Knoll, G., Winter, J. 1989. « Degradation of phenol via carboxylation to benzoate by a defined, obligate syntrophic consortium of anaerobic bacteria ». Appl Microbiol Biotechnol, vol. 30, p. 318-324.

Knoll, G., Winter, J. 1987. « Anaerobic degradation of phenol in sewage sludge ». Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 25, p. 384-391.

Koch, J., Eisenreich, W., Bacher, A., Fuchs, G. 1993. « Products of enzymatic reduction of benzoyl-CoA, a key reaction in anaerobic aromatic metabolism ». Eur. J. Biochem., vol. 211, p. 649-661.

Koch, J., Fuchs, G. 1992. « Enzymatic reduction of benzoyl-CoA to alicyclic compounds, a key reaction in anaerobic aromatic metabolism ». Eur. J. Biochem., vol. 205, p. 195-202. 0.

Kuever, J., Konneke, M., Galushko, A., Drzyzga, O. 2001. « Reclassification of *Desulfotobacterium phenolicum* as *Desulfobacula phenolica* comb. nov. and description of strain SaxT as *Desulfotignum balticum* gen. nov., sp. nov. ». Int. J Syst. Evol. Microbiol., vol. 51, p. 171-177.

Kuever, J. Rainey, F. A., Hippe, H. 1999. « Description of *Desulfotomaculum* sp. Groll as *Desulfotomaculum gibsoniae* sp. nov. ». Int. J. Syst. Bacteriol., vol. 49, p. 1801-1808.

Kuever, J. Kulmer, J., Jannsen, S. Fischer, U., Blotevogel, K. H. 1993. « Isolation and characterization of a new spore-forming sulfate-reducing bacterium growing by complete oxidation of catechol ». Arch. Microbiol., vol. 159, p. 282-288.

Lack, A., Fuchs, G. 1994. « Evidence that phenol phosphorylation to phenylphosphate is the first step in anaerobic phenol metabolism in a denitrifying *Pseudomonas* sp. » Arch. Microbiol., vol. 161, p. 132-139.

Lack, A., Fuchs, G. 1992. « Carboxylation of phenylphosphate by phenol carboxylase, an enzyme system of anaerobic phenol metabolism ». J. Bacteriol., vol. 174, p. 3629-3636.

Lack, A., Tommasi, I., Aresta, M., Fuchs, G. 1991. « Catalytic properties of phenol carboxylase. *In vitro* study of CO_2: 4-hydroxybenzoate isotope exchange reaction ». Eur. J. Biochem., vol. 197, p. 473-479.

Létourneau, L., Bisaillon, J.-G., Lépine, F., Beaudet, R. 1995. « Spore-forming bacteria that carboxylate phenol to benzoic acid under anaerobic conditions ». Can J Microbiol, vol. 41, p. 266-272.

Letowski, J., Juteau, P., Villemur, R., Duckett, M.-F., Beaudet, R., Lépine, F., Bisaillon, J.-G. 2001. « Separation of a phenol carboxylating organism from a two member, strict anaerobic co-culture ». Can. J. Microbiol., vol. 47, p.373-381.

Letowski, J. 2000. « Isolement et étude d'une souche bactérienne transformant le phénol en benzoate en conditions anaérobies ». Thèse de doctorat, Montréal, Université de Montréal, 183 p.

Li, T., Juteau, P., Beaudet, R., Lépine, F., Villemur, R., Bisaillon, J.-G. 2000. «Purification and characterization of a 4-hydroxybenzoate decarboxylase from an anaerobic coculture ». Can J. Microbiol., vol. 46, p.856-859.

Li, T., Bisaillon, J.-G., Villemur, R., Létourneau, L., Bernard, K., Lépine, F., Beaudet, R. 1996. « Isolation and characterization of a new bacterium carboxylating phenol to benzoic acid under anaerobic conditions ». J. Bacteriol., vol. 178, p. 2551-2558.

Lovley, D. R., Lonergan, D. J. 1990. « Anaerobic oxidation of toluene, phenol, and *p*-cresol by the dissimilatory iron-reducing organism, GS-15 ». Appl. Environ. Microbiol., vol. 56, p. 1858-1864.

Massol-Deya, A. A., Whallon, J., Hickey, R. F., Tiedje, J. M. 1995. « Channel structures in aerobic biofilm of fixed film reactors treating contaminated groundwater ». Appl. Environ. Microbiol., vol 61, p. 769-777.

Meckenstock, R. U. 1999. « Fermentative toluene degradation in anaerobic defined syntrophic cocultures ». FEMS Microbiol. Letters., vol.177, p. 67-73.

Merkel, S. M., Eberhard, A. E., Gibson, J., Harwood, C. 1989. « Involvement of coenzyme A thioesters in anaerobic metabolism of 4-hydroxybenzoate by *Rhodopseudomonas palustris* ». J. Bacteriol., vol.171, p. 1-7.

Mesbah, M., Premachandran, U., Whitman, W. B. 1989. « Precise measurement of the G + C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography ». Int. J. Syst. Bacteriol., vol. 39, p. 159-167.

Möller, B., Hippe, H., Gottschalk, G. 1986. « Degradation of various amine compounds by mesophilic clostridia ». Arch. Microbiol., vol. 145, p. 85-90.

Montizaan, G. K. 1994. Environmental Health Criteria 161: Phenol. International program on chemical safety (IPCS), world health organization, Geneva, 151 p.

Müller, J. A., Schink, B. 2000. « Initial steps in the fermentation of 3-hydroxybenzoate by *Sporotomaculum hydroxybenzoicum* ». Arch. Microbiol., vol. 173, p. 288-295.

Newman, D. K., Kennedy, E. K., Coates, J. D., Ahmann, D., Ellis, D. J., Lovley, D. R., Morel, F. M. 1997. « Dissimilatory arsenate and sulfate reduction in *Desulfotomaculum auripigmentum* sp. nov. ». Arch. Microbiol., vol. 168, p. 380-388.

Niggemyer, A. Spring, S., Stackebrandt, E., Rosenzweig, R. F. 2001. « Isolation and characterization of a novel As (V)-reducing bacterium: implications for arsenic mobilization and the genus *Desulfitobacterium* ». Appl. Environ. Microbiol., vol. 67, p. 5568-5580.

Paula, M., Schie, V., Young, L. Y. 1998. « Isolation and characterization of phenol-degrading denitrifying bacteria ». Appl. Environ. Microbiol., vol. 64, p. 2432-2438.

Philipp, B., Schink, B. 2000. « Two distinct pathways for anaerobic degradation of aromatic compounds in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* strain AR-1 ». Arch. Microbiol., vol. 173, p.91-96.

Pikuta, E. Lysenko, A., Suzina, N., Osipov, G., Kuznetsov, B., Tourova, T., Akimenko, V., Laurinavichius, K. 2000. « *Desulfotomaculum alkaliphilum* sp. nov., a new alkaliphilic, moderately thermophilic, sulfate-reducing bacterium ». Int. J. Syst. Evol. Microbiol., vol. 50, p. 25-33.

Powlowski, J., Shingler, V. 1994. « Genetics and biochemistry of phenol degradation by *Pseudomonas* sp. CF600 ». Biodegradation, vol. 5, p. 219-236.

Robertson, W. J., Bowman, J. P., Franzmann, P. D., Mee, B. J. 2001. « *Desulfosporosinus meridiei* sp. nov., a spore-forming sulfate-reducing bacterium isolated from gasolene-contaminated groundwater ». Int. J. Syst. Evol. Microbiol., vol. 51, p. 133-140.

Sandford, R. A., Cole, J. R., Löffler, F. E., Tiedje, J. M. 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., vol. 62, p. 3800-3808.

Schink, B., Philipp, B., Müller, J. 2000. « Anaerobic degradation of phenolic compounds». Naturwissenschaften, vol. 87, p. 12-23.

Schink, B. 1997. « Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation ». Microbiol. Mol. Biol. Rev., vol. 61, p. 262-280.

Schink, B., Brune, A., Schnell, S. 1992. Anaerobic degradation of aromatic compounds. Microbial degradation of natural products, G. Winkelmmann, VCH Verlagsgesellschaft Publisher, p. 219-242.

Sharak Genthner, B. R., Townsend, G.T., Chapman, P. J. 1991. « *para*-Hydroxybenzoate as an intermediate in the anaerobic transformation of phenol to benzoate » FEMS Microbiology Letters, vol. 78, p. 265-270.

Sharak Genthner, B. R., Townsend, G. T., Chapman, P. J. 1990. « Effect of fluorinated analogues of phenol and hydroxybenzoates on the anaerobic transformation of phenol to benzoate ». Biodegradation, vol. 1, p. 65-74.

Sharak Genthner, B. R., Townsend, G. T., Chapman, P. J. 1989. « Anaerobic transformation of phenol to benzoate via *para*-carboxylation: use of fluorinated analogues to elucidate the mechanism of transformation ». Biochem. biophys. res. com.., vol. 162, p. 945-951.

Shinoda, Y., Sakai, Y., Ué, M., Hiraishi, A., Kato, N. 2000. « Isolation and characterization of a new denitrifying spirillum capable of anaerobic degradation of phenol » Appl Environ Microbiol, vol. 66, p. 1286-1291.

Tardy-Jacquenod, C., Caumette, P., Matheron, R., Lanau, C., Arnauld, O., Magot, M. 1996. « Characterization of sulfate-reducing bacteria isolated from oil-field waters ». Can. J. Microbiol., vol. 42, p. 259-266.

Taylor, B. F., Campbell, W. L., Chinoy, I. 1970. « Anaerobic degradation of the benzene nucleus by a facultatively anaerobic microorganism ». J. Bacteriol., vol. 102, p. 430-437.

Tschech, A., Fuchs, G. 1989. « Anaerobic degradation of phenol via carboxylation to 4-hydroxybenzoate: in vitro study of isotope exchange between $^{14}CO_2$ and 4-hydroxybenzoate ». Arch. Microbiol., vol. 152, p. 594-599.

Tschech, A., Fuchs, G. 1987. « Anaerobic degradation of phenol by pure cultures of newly isolated denitrifying pseudomonads ». Arch. Microbiol., vol. 148, p. 213-217.

Tschech, A., Schink, B. 1986. « Fermentative degradation of monohydroxybenzoates by defined syntrophic cocultures ». Arch. Microbiol., vol. 145, p. 396-402.

Utkin, I., Dalton, D. D., Wiegel, J. 1995. « Specificity of reductive dehalogenation of substituted *ortho*-chlorophenols by *Desulfitobacterium dehalogenans* JW/IU-DC1 ». Appl. Environ. Microbiol., vol. 61, p. 346-351.

Utkin, I., Woese, C., Wiegel, J. 1994. « Isolation and characterization of *Desulfitobacterium dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates chlorophenolic compounds ». Int. J. Syst. Bacteriol., vol. 44, p. 612-619.

Wolin, E. A., Wolin, M. J., Wolfe, R. S. 1963. « Formation of methane by bacterial extracts ». J. Biol. Chem., vol. 238, p. 2882-2886.

Widdel, F., Kohring, G.-W., Mayer, F. 1983. « Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids ». Arch. Microbiol., vol. 134, p. 286-294.

Williams, R. J., Evans, W. C. 1975. « The metabolism of benzoate by *Moraxella* species through anaerobic nitrate respiration. Evidence for a reductive pathway ». Biochem. J., vol. 148, p. 1-10.

Zhang, X., Wiegel, J. 1994. « Reversible Conversion of 4-Hydroxybenzoate and Phenol by *Clostridium hydroxybenzoicum* ». Appl Environ Microbiol, vol. 60, p. 4182-4185.

Zhang, X., Wiegel, J. 1990. « Isolation and partial characterization of a *Clostridium* species transforming *para*-hydroxybenzoate and 3,4-dihydroxybenzoate and producing phenols as the final transformation products ». Microbial Ecology, vol. 20, p. 103-121.

Zhang, X., Morgan, T. V., Wiegel, J. 1990. « Conversion of ^{13}C-1 phenol to ^{13}C-4-benzoate, an intermediate step in the anaerobic degradation of chlorophenols ». FEMS Microbiol. Letters, vol. 67, p. 63-66.

Zinder, S. H. 1984. « Microbiology of anaerobic conversion of organic wastes to methane: recent developments ». ASM News, vol. 50, p. 294-298.