

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**IDENTIFICATION DES COMPOSANTES DU SYSTÈME DE RÉGULATION DE
L'OPÉRON BIPHÉNYLE CHEZ LES BACTÉRIES GRAM NÉGATIF**

Par
Rémi Desaulniers

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

Jury d'évaluation

Examineur externe

Monsieur Claude Déry
Département de biologie
Université de Sherbrooke

Examineur interne

Monsieur François Shareck
INRS-Institut Armand-Frappier

Directeur de recherche

Monsieur Michel Sylvestre
INRS-Institut Armand-Frappier

RÉSUMÉ

Les biphényles polychlorés (BPC) constituent un ensemble de produits chimiques de synthèse qui ont longtemps été employés dans diverses applications, dont les transformateurs et les condensateurs. Malheureusement, ces produits engendrent une variété d'effets nocifs pour la santé et il importe donc de les éliminer. Compte tenu des désavantages inhérents associés aux méthodes conventionnelles d'élimination des BPC, le développement de méthodes microbiologiques représente une avenue importante.

À ce jour, très peu d'informations sont disponibles sur les mécanismes de régulation des gènes *bph*, responsables de la dégradation du biphényle. Dans la partie du génome qui renferme les gènes de la dégradation de ce composé, il existe un cadre de lecture identifié *orf0* qui code pour une protéine nommée Orf0. Il a été rapporté qu'à chaque opéron biphényle connu, un cadre de lecture ouvert homologue à *orf0* a été identifié. Par des études de la séquence prédite en acides aminés, il a été constaté que Orf0 possédait des homologies significatives avec plusieurs régulateurs de la famille GntR. Le prototype de la famille GntR, la protéine GntR elle-même, agit en tant que répresseur de la voie catabolique du gluconate chez *Bacillus subtilis*.

Dans le cas présent, les résultats des travaux précédents suggéreraient que la protéine Orf0 de *Comamonas testosteroni* B-356 agisse à titre de répresseur de la transcription des gènes responsables de la dégradation du biphényle, et que la présence de métabolites vienne supprimer cet effet en causant l'induction de la transcription de l'ADN. Au cours de ce travail, nous avons vérifié l'effet de différents métabolites sur la liaison de notre protéine avec quatre sondes d'ADN. Les essais de retardement sur gel nous ont démontré que la protéine Orf0 joue un rôle dans la régulation de la transcription des gènes *bph* puisqu'elle s'associe à trois des quatre régions potentiellement promotrices ciblées sur l'opéron biphényle. Les essais effectués avec le 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle, le 2,3-dihydroxybiphényle, le benzoate et le catéchol ont prouvé qu'il était possible de dissocier les complexes ADN-protéine précédemment formés. Il est donc possible d'avancer que ces métabolites sont impliqués dans la régulation des gènes *bph*. Par la suite, des essais de retardement sur gel avec neuf fragments plus courts (provenant des trois sondes mères utilisées précédemment) ont été réalisés, ce qui a permis de localiser plus précisément quatre régions possibles de fixation de la protéine. Les quatre fragments correspondants ont été ensuite employés pour des essais de protection à la DNase. Ces essais avaient pour but de déterminer la séquence exacte de fixation la protéine aux différentes sondes. Finalement, des essais de retardement sur gel ont été effectués avec de courtes séquences homologues à des séquences consensus pour les protéines de type GntR suggérées par Watanabe et *al.* (2000), Arai et *al.* (1999) et Ohtsubo et *al.* (2001). Lors de cette étude, il aura donc été possible d'établir que les quatre métabolites étudiés interféraient dans la liaison ADN-protéine et de mieux cibler quatre régions potentielles de fixation de la protéine aux différentes sondes.

Rémi Desaulniers



Michel Sylvestre



REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier très sincèrement mon directeur de recherche, Michel Sylvestre, pour toute l'aide apportée au cours de mes deux années de maîtrise. Sa grande disponibilité et sa patience ont permis de mieux orienter mes recherches et de mettre mon projet à terme. Bien sûr, je tiens aussi à remercier chacun des membres du laboratoire pour leur apport personnel. Merci à Diane pour sa patience et sa générosité, à Marie-Michèle qui m'a pris sous son aile dès mon arrivée, et à Catherine pour avoir été une confidente hors du commun avec qui j'ai pu partager mes meilleurs comme mes pires moments. Merci aussi à Julie pour tous ses conseils et pour avoir pris le temps de faire des échanges d'idées pour parvenir à trouver les solutions aux divers problèmes rencontrés, et merci à Kathleen pour son support moral.

Je tiens aussi à remercier la Fondation Armand-Frappier pour le soutien financier apporté au cours des deux années consécutives. Le support était à prime abord monétaire, mais aussi une motivation de dépassement de soi.

Par la même occasion, j'aimerais souligner les encouragements apportés par mes proches. Je tiens à remercier ma mère pour son soutien moral lors de nos nombreuses conversations téléphoniques et mon père, qui de là-haut, a veillé sur moi. De plus, je tiens à remercier mon doux amour pour avoir eu la patience de m'écouter et de me supporter à maintes reprises dans tout ce que j'ai entrepris.

Finalement, je tiens à remercier mes amies de Laval avec qui j'ai pu garder contact malgré la distance. J'ai su trouver en elles une présence et une écoute dont j'ai grandement eu besoin lors de certains épisodes moins heureux de ma vie et m'ont permis de tenir jusqu'au bout. Alors à Jacinthe, Myriam, Annie, Danielle, Anne-Sophie et Roxane, un gros merci.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	III
REMERCIEMENTS	IV
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES TABLEAUX	XV
INTRODUCTION	1
 CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE	 4
 1.1 Les biphényles polychlorés (BPC)	 4
1.1.1 Chimie des BPC	4
1.1.2 Historique des BPC	5
1.1.3 Applications des BPC	6
1.1.4 Propriétés physico-chimiques des BPC	7
1.1.5 Aspects toxicologiques des BPC.....	8
1.1.5.1 Effets toxicologiques	8
1.1.5.2 Facteurs de toxicité	9
1.1.6 Persistance environnementale et détection des BPC	9
1.1.6.1 Bioaccumulation	9
1.1.6.2 Détection dans l'environnement	9
1.1.7 Méthodes conventionnelles d'élimination des BPC	10
1.2 Biodégradation oxydative des BPC	11
1.2.1 Introduction	11
1.2.2 Facteurs influençant la biodégradation	12
1.2.3 Patron de dégradation des BPC chez les bactéries	12
1.2.3.1 Étapes de la dégradation du biphényle au niveau du tronçon supérieur ..	13
1.2.3.2 Étapes de la dégradation du biphényle au niveau du tronçon inférieur ..	16

1.2.4 Organisation génique de l'opéron biphényle	17
1.3 Régulation des voies cataboliques des composés aromatiques	19
1.3.1 Introduction	19
1.3.2 Protéines régulatrices à action positive	20
1.3.2.1 Famille LysR	22
1.3.2.1.1 Description des protéines LysR en domaines	22
1.3.2.1.2 BenM, CatR et ClcR: régulateurs impliqués dans la dégradation du benzoate/3-chlorobenzoate et catéchol/3- chlorocatéchol.....	24
1.3.2.1.3 Mode d'action de BenM	24
1.3.2.1.4 Mode d'action de CatR	25
1.3.2.1.5 Mode d'action de ClcR	26
1.3.2.2 Familles NtrC/XylR et AraC/XylS	28
1.3.2.2.1 Famille NtrC/XylR.....	28
1.3.2.2.2 Description des protéines NtrC/XylR en domaines.....	28
1.3.2.2.3 Famille AraC/XylS.....	29
1.3.2.2.4 Description des protéines AraC/XylS en domaines.....	29
1.3.2.2.5 XylR et XylS: régulateurs impliqués dans la dégradation du xylène/toluène et benzoate/toluate	29
1.3.2.2.5.1 La protéine XylR	30
1.3.2.2.5.2 La protéine XylS	30
1.3.2.2.6 Modes d'action de XylR et XylS	31
1.3.2.2.6.1 Boucle du patron inférieur	31
1.3.2.2.6.2 Boucle des patrons supérieur et inférieur	31
1.3.2.3 Famille IcIR	34
1.3.2.3.1 Description des protéines IcIR en domaines	34
1.3.2.3.2 PobR et PcaU: régulateurs impliqués dans la dégradation du <i>p</i> -hydroxybenzoate, du protocatéchuate, du quinate et du shikimate	34
1.3.2.3.3 Mode d'action de PobR	35
1.3.2.3.4 Mode d'action de PcaU	35

1.3.3 Protéines régulatrices à action négative	37
1.3.3.1 Famille GntR.....	37
1.3.3.1.1 Description de la sous-famille FadR	37
1.3.3.1.2 Description de la sous-famille HutC	39
1.3.3.1.3 Description de la sous-famille MocR	39
1.3.3.1.4 Description de la sous-famille YtrA	39
1.3.3.1.5 Description des protéines GntR en domaines	39
1.3.3.1.6 GntR: régulateur impliqué dans la dégradation du gluconate ...	40
1.3.3.1.7 Mode d'action de GntR	40
1.4 Régulation de la voie catabolique du biphenyle	41
1.4.1 <i>orf0</i> , régulateur positif impliqué dans la dégradation du biphenyle	41
1.4.1.1 <i>orf0</i> retrouvé chez <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> KF707	41
1.4.2 <i>orf0</i> , régulateur négatif impliqué dans la dégradation du biphenyle	42
1.4.2.1 <i>bphS</i> retrouvé chez <i>Pseudomonas</i> sp. KKS102	42
1.4.2.2 <i>orf0</i> retrouvé chez <i>Comamonas testosteroni</i> B-356	47
 CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES	44
 2.1 Souches bactériennes et plasmides	44
2.2 Milieux et conditions de culture	44
2.3 Expression, purification et quantification des enzymes de la voie catabolique du biphenyle	48
2.3.1 Expression	48
2.3.2 Purification	48
2.3.3 Quantification	48
2.4 Expression, purification et quantification de la protéine His-Orf0 en conditions non dénaturantes	49
2.4.1 Expression	49
2.4.2 Purification et quantification	49
2.5 Production, dosage et analyse des métabolites	50
2.5.1 Production de métabolites par voie enzymatique et dosage	50

2.5.1.1 Préparation du 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle	50
2.5.1.2 Préparation du 2,3-dihydroxybiphényle	51
2.5.1.3 Préparation de l'acide 2-hydroxy-6-oxo-6-phénylhexa-2,4- diénoïque (HOPDA)	51
2.5.1.4 Dosage des métabolites produits par voie enzymatique	52
2.5.1.5 Analyse des métabolites produits par voie enzymatique.....	52
2.5.1.5.1 Couplage à l'acide butyl boronique	53
2.5.1.5.2 Couplage au BSTFA	53
2.5.2. Production de métabolites à partir de mélanges commerciaux	53
2.5.2.1 Préparation et dosage du benzoate et du catéchol	53
2.6 Techniques de biologie moléculaire	53
2.6.1 Synthèse d'oligonucléotides	53
2.6.2 Amplification <i>in vitro</i> de fragments d'ADN (PCR)	54
2.6.2.1 Production des sondes 1, 2, 3 et 4 pour les essais préliminaires de retardement sur gel	54
2.6.2.2 Production des sondes A, B, C, D, E, F, G, H et I pour les essais secondaires de retardement sur gel	57
2.6.2.3 Production de sondes A*, B*, F* et G* pour les essais de protection à la DNase	57
2.6.3 Purification des produits PCR	59
2.6.3.1 Purification des sondes 1, 2, 3 et 4	59
2.6.3.2 Purification des sondes A, B, C, D, E, F, G, H et I	60
2.6.3.3 Purification des sondes A*, B*, F* et G*	60
2.6.4 Production des sondes « I » et « II » pour les essais tertiaires de retardement sur gel	60
2.6.5 Marquage des sondes d'ADN	61
2.6.5.1 Marquage des sondes pour les essais de retardement sur gel	61
2.6.5.2 Marquage des sondes pour les essais de protection à la DNase ...	62
2.6.5.2.1 Réaction d'endonucléase	62
2.6.5.2.2 Purification des sondes d'ADN suite à la digestion	62
2.6.5.2.3 Marquage au ³² P	62

2.6.5.2.4 Purification sur colonne des sondes marquées	63
2.6.5.2.5 Dosage des sondes marquées	63
2.7 Essais de retardement sur gel	63
2.7.1 Préparation du gel de polyacrylamide 5,0% non dénaturant	63
2.7.2 Préparation des mélanges réactionnels	63
2.7.3 Migration, transfert électrophorétique et détection de l'ADN	65
2.8 Essais de protection à la DNase	66
2.8.1 Préparation du gel 8,0 % acrylamide/7M urée	66
2.8.2 Étape de titration de la DNase	66
2.8.3 Étape de liaison et de séquençage	67

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS69

3.1 Essais de retardement sur gel	69
3.1.1 Essais avec les sondes 1, 2, 3 et 4	69
3.1.1.1 Choix des sondes 1 à 4	69
3.1.1.2 Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde 1.....	73
3.1.1.3 Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde 2	73
3.1.1.4 Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde 3	73
3.1.1.5 Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde 4	74
3.1.2 Essais avec les sondes A, B, C, D, E, F, G, H et I	86
3.1.2.1 Choix des sondes A, B, C, D, E, F, G, H et I	86
3.1.2.2 Essais de retardement sur gel effectués avec les sondes A, B et C	88
3.1.2.3 Essais de retardement sur gel effectués avec les sondes D, E et F	89
3.1.2.4 Essais de retardement sur gel effectués avec les sondes G, H et I	89
3.1.3 Essais avec les sondes « I » et « II »	93
3.1.3.1 Choix des sondes « I » et « II »	93
3.1.3.2 Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde « I »	94

3.1.3.3 Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde « II »	94
3.2 Essais de protection à la DNase	97
3.2.1 Choix des sondes A, B, F et G employées pour les essais de protection à la DNase	97
3.2.2 Titration de la DNase	97
3.2.3 Résultats de protection à la DNase pour les sondes A*, B*, F* et G* ..	99
CHAPITRE 4 : DISCUSSION	100
4.1 Essais primaires de retardement sur gel.....	100
4.2 Essais secondaires de retardement sur gel et essais de protection à la DNase	101
4.3 Essais tertiaires de retardement sur gel.....	102
4.4 Connaissances obtenues chez la souche B-356 en comparaison avec diverses souches bactériennes	103
CHAPITRE 5 : CONCLUSION	106
BIBLIOGRAPHIE	108

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Structure chimique des biphényles polychlorés	4
Figure 1.2	Composantes de la dioxygénase du biphényle.....	14
Figure 1.3	Voie catabolique du biphényle	15
Figure 1.4	Voie catabolique du 2,4-hydroxy-penta-2,4-dièneoate	16
Figure 1.5	Organisation génétique de différents opérons biphényle	18
Figure 1.6	Organisation des protéines régulatrices en domaines	23
Figure 1.7	Régulation des voies cataboliques du benzoate/chlorobenzoate chez <i>Acinetobacter</i> sp. souche ADP1, du catéchol chez <i>P. putida</i> et du 3-chlorocatéchol à partir du plasmide <i>pAC27</i> de <i>P. putida</i>	27
Figure 1.8	Régulation de la voie catabolique du toluène/xylène chez <i>P. putida</i> (plasmide pWWO)	33
Figure 1.9	Régulation de la voie catabolique du <i>p</i> -hydroxybenzoate, du protocatéchuate, du quinate et du shikimate chez <i>Acinetobacter</i> sp. souche ADP1	36
Figure 1.10	Régulation de la voie catabolique du gluconate chez <i>B. subtilis</i>	41
Figure 2.1	Localisation au sein de l'opéron biphényle des fragments d'ADN de 5,2 Kb et de 2,7 Kb servant à l'amplification génique	55

Figure 2.2	Localisation des sondes 1, 2, 3 et 4; A, B, C, D, E, F, G, H et I; « I » et « II », au sein de l'opéron biphényle56
Figure 3.1	Régions potentiellement promotrices de l'opéron biphényle.....71
Figure 3.2	Séquences nucléotidiques des sondes 1, 2, 3 et 4 employées pour les essais de retardement sur gel72
Figure 3.3	Démonstration des montages effectués avec la sonde 175
Figure 3.4	Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde 176
Figure 3.5	Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde 1 en présence et en absence de 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle ou de 2,3-dihydroxybiphényle77
Figure 3.6	Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde 1 en présence et en absence de benzoate ou de catéchol 78
Figure 3.7	Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde 2.....79
Figure 3.8	Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde 380
Figure 3.9	Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde 3 en présence et en absence de 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle ou de 2,3-dihydroxybiphényle81
Figure 3.10	Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde 3 en présence et en absence de benzoate ou de catéchol82

Figure 3.11	Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde 4	83
Figure 3.12	Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde 4 en présence et en absence de 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle ou de 2,3-dihydroxybiphényle	84
Figure 3.13	Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde 4 en présence et en absence de benzoate ou de catéchol	85
Figure 3.14	Patron de construction des sondes raccourcies A, B, C, D, E, F, G, H et I	86
Figure 3.15	Séquences nucléotidiques des sondes A, B, C, D, E et F employées pour les essais secondaires de retardement sur gel	87
Figure 3.16	Séquences nucléotidiques des sondes G, H et I employées pour les essais secondaires de retardement sur gel	88
Figure 3.17	Essais de retardement sur gel effectués avec les sondes A, B et C provenant de la sonde 1	90
Figure 3.18	Essais de retardement sur gel effectués avec les sondes D, E et F provenant de la sonde 3	91
Figure 3.19	Essais de retardement sur gel effectués avec les sondes G, H et I provenant de la sonde 4	92
Figure 3.20	Localisation et séquences des sondes « I » et « II »	93
Figure 3.21	Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde « I »	95

Figure 3.22	Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde « II »	96
Figure 3.23	Exemple de titration de la DNase avec la sonde B	98
Figure 4.1	Schéma des séquences consensus pour les protéines de type GntR	104

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	Producteurs, pays producteurs et marques déposées de mélanges commerciaux de BPC vendus à travers le monde	5
Tableau 1.2	Concentration en BPC dans la composition de divers matériaux	7
Tableau 1.3	Régulateurs appartenant à la famille LysR	20
Tableau 1.4	Régulateurs appartenant aux familles AraC/XylS et NtrC/XylR	21
Tableau 1.5	Régulateurs appartenant à la famille IclR	22
Tableau 1.6	Régulateurs appartenant à la famille GntR	38
Tableau 2.1	Description des génotypes des souches bactériennes utilisées	45
Tableau 2.2	Description des divers plasmides employés lors de cette étude	46
Tableau 2.3	Caractéristiques des vecteurs plasmidiques utilisés pour cette étude	47
Tableau 2.4	Description des oligonucléotides utilisés lors de l'amplification des fragments d'ADN pour la production des sondes 1, 2, 3 et 4	56
Tableau 2.5	Description des oligonucléotides utilisés lors de l'amplification des fragments d'ADN pour la production des sondes A, B, C, D, E, F, G, H et I	58
Tableau 2.6	Description des oligonucléotides utilisés lors de l'amplification des fragments d'ADN pour la production des sondes A*, B*, F* et G*	59

Tableau 2.7	Description des oligonucléotides utilisés lors de la production des sondes « I » et « II » par hybridation	61
Tableau 2.8	Mélanges réactionnels pour les essais de retardement sur gel..	64
Tableau 2.9	Mélange réactionnel pour les essais de titration.....	67
Tableau 2.10	Dilutions de la DNase pour les essais de titration.	67
Tableau 2.11	Mélanges réactionnels pour les essais de liaison	68

INTRODUCTION

Les biphényles polychlorés (BPC) sont des produits chimiques de synthèse qui furent tout d'abord commercialisés aux États-Unis sous la marque commerciale Aroclor® (Crine, 1986). Ces molécules sont composées de deux noyaux phényles sur lesquels se retrouvent des atomes de chlore et d'hydrogène. Au départ, les BPC étaient destinés à servir de réfrigérants et de lubrifiants dans des applications électriques fermées. Après avoir constaté que ces produits possédaient des propriétés physico-chimiques hors du commun, leur usage s'est largement répandu à travers le monde, et dans diverses applications.

Suite à une étude rapportant que les BPC étaient largement distribués dans l'environnement, plusieurs effets néfastes leur ont été associés, dont la chloracné et l'hyperpigmentation de la peau (Nriagu et Simmons, 1984). À cause de leur usage dispersif, de leur stabilité, de leur disposition inadéquate et de leur potentiel toxique, leur gestion est aujourd'hui un problème omniprésent (Davis et Bradlow, 1995; Safe, 1993; Safe, 1994; Stone, 1995), avec une estimation de 10 millions de tonnes de BPC relargués dans l'environnement (Eisenreich, 1987).

La fabrication des BPC a finalement été abandonnée (COMMISSION DE COOPÉRATION ENVIRONNEMENTALE (CCE), 1996) suite à de nombreuses réglementations sous divers paliers gouvernementaux. Aujourd'hui, pour remédier au problème engendré par l'accumulation substantielle de ces produits au cours des dernières années, plusieurs techniques ont été proposées: la seule approche retenue pour le moment est l'incinération à haute température. Si la combustion est incomplète, les produits chimiques résultants peuvent être des dioxines et des furanes hautement chlorés (Barton, Fergusson et Joseph, 1987), des produits encore plus toxiques que les BPC eux-mêmes.

De nos jours, une approche microbiologique a été apportée pour parvenir à la biorémédiation des BPC dans l'environnement. Il a déjà été démontré que quelques bactéries utilisant le biphényle sont capables de cométaboliser les BPC (Ahmed et Focht, 1973; Ballshmitter, Unglert et Neu, 1977; Catelani, Sorlini et Treccani, 1971), et leurs mécanismes cataboliques envers les BPC ont largement été étudiés (Furukawa, Tomizuka et Kamibayashi, 1979). Parmi les bactéries possédant l'opéron biphényle (*bph*) et aptes à cométaboliser les BPC, on peut citer *Burkholderia cepacia* LB400 (Haddock, Nadim et Gibson, 1993),

Pseudomonas pseudoalcaligenes KF707 (Taira et al., 1992), *Pseudomonas* sp. KKS102 (Fukuda et al., 1994) et *Comamonas testosteroni* B-356 (Ahmad, Massé et Sylvestre, 1990).

La minéralisation complète des BPC nécessite la présence de deux opérons distincts (Sylvestre et al., 1985): un opéron (*bph*) pour la transformation des BPC en chlorobenzoates (CBA) et un second pour la dégradation des CBA. Habituellement, les souches bactériennes aptes à dégrader les BPC ne possèdent pas les gènes nécessaires pour la dégradation des CBA. Par conséquent, dans un processus biodégradatif des BPC, les populations sélectionnées devraient aussi être mises en présence de bactéries dégradant les CBA (Fava et al., 1993). Des travaux ont démontré une dégradation plus efficace des biphényles monochlorés par un consortium bactérien comprenant des souches bactériennes capables de dégrader les CBA produits par les bactéries dégradant les BPC, soit directement (Sylvestre et al., 1985) ou par cométabolisme (Fava et Marchetti, 1991). Ceci peut suggérer que les CBA sont en général impliqués dans la régulation de la dégradation aérobie des BPC, et que par conséquent la présence des bactéries dégradant les CBA est essentielle pour leur minéralisation complète (Sondossi, Sylvestre et Ahmad, 1992).

Chez plusieurs microorganismes aptes à dégrader des composés chimiques, la transcription des gènes de dégradation est régulée (van der Meer et al., 1992). La régulation peut être médiée par des intermédiaires de dégradation et via une protéine régulatrice. Dans la plupart des cas, les gènes codant pour les régulateurs se retrouvent près des gènes structuraux, et leurs protéines activent la transcription en présence de leurs molécules inductrices. La régulation par des répresseurs est plus rare pour les gènes impliqués dans le catabolisme des composés aromatiques. Une famille de protéines régulatrices nommée GntR, regroupant divers régulateurs à action négative, a été largement caractérisée. Il a été rapporté que chez plusieurs bactéries Gram négatif aptes à dégrader les BPC dont *Burkholderia cepacia* LB400 (Erickson et Mondello, 1992), *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 (Taira et al., 1992) et *Comamonas testosteroni* B-356 (Sylvestre et al., 1996b), l'opéron *bph* semble être régulé par une protéine (Orf0) apparentée à la famille GntR. Par conséquent, il est envisageable d'associer une fonction répressive au produit génique de *orf0*.

La présente étude vise une meilleure connaissance du système de régulation de la dégradation du biphényle chez la bactérie *Comamonas testosteroni* B-356. Chez cette souche, le gène *orf0* a déjà été isolé et séquencé. D'autre part, dans une étude précédente (Bellemare,

2000), des mutants *orf0*-nuls potentiels ont été produits pour parvenir à mieux élucider l'implication de la protéine au sein de l'opéron biphényle. Finalement, le protocole de purification de la protéine His-Orf0 a été établi et des essais de retardement sur gel ont pu être réalisés. Les essais ont été effectués en employant des régions potentiellement promotrices ciblées à l'intérieur de l'opéron *bph*, et l'implication d'effecteurs possibles a été étudiée.

Le but du présent projet a été de poursuivre les essais de retardement sur gel pour parvenir à identifier de nouveaux métabolites du biphényle aptes à venir perturber la liaison ADN-Orf0. De plus, des régions plus précises de l'opéron *bph* ont été ciblées pour ces essais. En dernier lieu, des essais de protection à la DNase ont été effectués pour tenter de localiser les sites de liaison de la protéine His-Orf0 sur les sondes ADN répondant positivement aux essais de retardement sur gel.

Ce document donne un bref historique sur l'utilisation des BPC, leurs propriétés physico-chimiques, leur persistance environnementale et les moyens biodégradatifs. De plus, les voies cataboliques de divers composés aromatiques à actions positive et négative, ainsi que la régulation de la voie catabolique du biphényle chez différentes souches bactériennes seront détaillées. Par la suite suivront les informations sur la méthodologie du travail, les résultats obtenus, leur interprétation et une brève conclusion.

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Les biphényles polychlorés (BPC)

1.1.1 Chimie des BPC

Les BPC sont des produits chimiques de synthèse constitués de deux noyaux phényles, sur lesquels peuvent prendre place un nombre et une disposition variables d'atomes de chlore (Erickson et Mondello, 1992). La Figure 1.1 indique la numérotation des positions des atomes de chlore sur la molécule de biphenyle ainsi que les positions *ortho* (*o*), *meta* (*m*) et *para* (*p*). La formule chimique des BPC est $C_{12}H_{10-x}Cl_x$, (Erickson, 1986); le nombre d'atomes de chlore (*x*) est un nombre entier pouvant adopter des valeurs allant de un à dix. Ces composés organique sont obtenus par la réaction du biphenyle avec du chlore anhydre en présence de chlorure ferrique (ou autre catalyseur métallique). Dans d'autres situations, les BPC peuvent être conçus de façon involontaire lors de procédés chimiques divers tels que la synthèse de chlorobenzènes, de solvants chlorés, d'alcanes chlorés, de certains pigments, de silicone, etc. (Anliker et Clarke, 1980; Perdih et Jan, 1994).

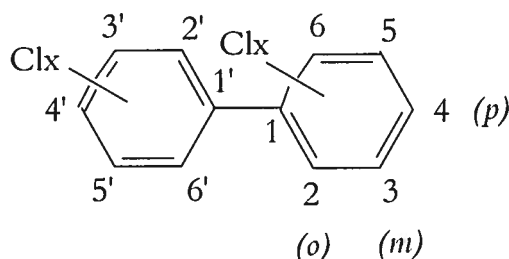


Figure 1.1 : Structure chimique des biphényles polychlorés.

Théoriquement, en faisant varier la quantité de chlore dans le milieu réactionnel au cours de la synthèse, il est possible de produire 209 congénères BPC différents, tout dépendant du nombre et de la position des atomes de chlore (Erickson et Mondello, 1992). En pratique, seulement la moitié d'entre eux peuvent être synthétisés dû à l'encombrement stérique causé par les atomes de chlore entre eux et à l'instabilité des certains congénères (Hutzinger, Safe et Zitko, 1974): seulement 130 se retrouvent dans les mélanges commerciaux

(Erickson, 1986; Mullin et *al.*, 1984). Ces mélanges ont été commercialisés à travers le monde sous différents noms, le Tableau 1.1 en indique quelques uns. Le principal producteur de BPC dans le nord de l'Amérique était la compagnie Monsanto Chemical, qui a commercialisé son produit sous le nom d'Aroclor[®] (Crine, 1986). Ces mélanges sont identifiés par un nombre composé de quatre chiffres. Les deux premiers indiquent le type de molécule en présence, et les deux derniers concernent le pourcentage en poids de chlore dans le mélange (Hutzinger, Safe et Zitko, 1974). Ainsi, les mélanges d'Aroclor[®] peuvent porter les nombres 1221, 1232, 1242, 1248 et 1268: le nombre 12 désignant qu'il s'agit d'une molécule de biphényle et les nombres 21, 32, 42, 48 et 68 indiquant le pourcentage en poids de chlore dans les différents mélanges.

Tableau 1.1 : Producteurs, pays producteurs et marques déposées de mélanges commerciaux de BPC vendus à travers le monde*.

Producteurs	Pays	Marques de Commerce
Monsanto	États-Unis et Grande Bretagne	Aroclor [®]
Bayer	Allemagne	Clophen [®]
Prodelec	France	Phenoclor et Pyralene [®]
Lanegafuchi	Japon	Kanechlor [®]
Mitsubishi-Monsanto	Japon	Sanotherm [®]
Caffaro	Italie	Fenclor [®]

* d'après Hutzinger, Safe et Zitko, 1974

1.1.2 Historique des BPC

Les BPC ont été synthétisés pour la première fois en 1881 et commercialisés en 1929. De 1929 à 1977, la compagnie Monsanto Chemical a été le seul fabricant de BPC aux États-Unis (CCE, 1996). De 1929 à 1957, les BPC étaient presque exclusivement utilisés dans les transformateurs et les condensateurs à titres de lubrifiants et de réfrigérants. Après 1957,

plusieurs applications ont prit profit des propriétés physico-chimiques des BPC et leur usage s'est très rapidement répandu.

En 1966, la découverte des BPC dans l'environnement (Jensen, 1966) a provoqué le déclenchement de nombreuses études. Celles-ci ont démontré que les BPC étaient désormais très répandus (van Emden et Peakall, 1996) et que ces derniers pouvaient avoir des effets néfastes sur la santé de l'homme et sur l'environnement; l'utilisation des BPC entama un déclin.

À cause des sérieux problèmes reliés à l'usage des BPC les plus chlorés, la compagnie Monsanto Chemicals a préparé de nouveaux mélanges commerciaux. Ceux-ci étaient constitués de congénères BPC contenant un maximum de trois molécules de chlore, comme le mélange désigné Aroclor 1016 (Callahan et *al.*, 1979). En 1972, Monsanto Chemical a volontairement cessé toute commercialisation de BPC dans des utilisations dispersives (encres, peinture, etc.), et la fabrication de BPC à toutes autres fins a été abandonnée en 1977 (CCE, 1996; ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA), 1987). Durant cette période, de 1972 à 1977, l'abolition internationale graduelle de la fabrication et de l'utilisation des BPC fut décrétée dans plusieurs pays (Carrier, 1986).

1.1.3 Applications des BPC

Les BPC ont été largement utilisés dans un grand nombre d'applications industrielles depuis 50 ans (Bédard et *al.*, 1986). Au départ, les BPC devaient servir de réfrigérants et de lubrifiants dans des systèmes électriques fermés comme les transformateurs et les condensateurs (Carrier, 1991; EPA, 1980); collectivement, les BPC employés dans les équipements électriques représentent 70 pour 100 (%) de tous ceux utilisés au Canada (CCMRE, 1986). Par la suite, leur usage s'est largement répandu dans la composition de divers autres produits comme les matières plastiques, les peintures, les encres, les scellants (Keeler et *al.*, 1993), les fluides caloriporateurs, les liquides hydrauliques, les fluides pour les pompes à vide ou pour les compresseurs, les matériaux ignifuges, les adhésifs, les papiers autocopiants (CCE, 1996), les colles, les cires, les produits de calfeutrage et les pesticides (Erickson, 1986). Le Tableau 1.2 indique la composition relative en BPC dans divers produits.

Tableau 1.2 : Concentration en BPC dans la composition de divers matériaux*.

Produits	Concentration en BPC (%)
Produits plastiques (composition optimale)	autour de 40%
Chloropolyvinyles (PVC) et peintures plastiques	5 à 8%
Peintures pour les bateaux	3 à 5%
Rubans adhésifs pour les câbles à hauts voltages	6 à 11%
Lubrifiants ignifuges pour les compresseurs	88%

* d'après Erickson, 1997

1.1.4 Propriétés physico-chimiques des BPC

Les BPC forment une famille de composés possédant une large variété de propriétés physiques et chimiques (Callahan et *al.*, 1979), et c'est pourquoi ils ont été utilisés dans diverses applications. Leur atout majeur est leur inertie au point de vue chimique (Gustafson, 1970) et leur grande stabilité thermique (EPA, 1980; Hutzinger, Safe et Zitko, 1974). Ils sont de plus résistants au feu, ont une faible conductivité, leur tension de vapeur est faible et se dissolvent facilement dans les hydrocarbures, les gras et les autres composés organiques. Les BPC ne sont pas très solubles dans l'eau: plus on augmente le taux de chloration, plus la solubilité diminue (D'Itri et Kamrin, 1983). De plus, ces composés démontrent une grande résistance à l'hydrolyse par des bases ou des acides (Gustafson, 1970), à l'oxydation chimique et aux hautes températures (Hutzinger, Safe et Zitko, 1974): ils sont par conséquent médiocrement métabolisés par les systèmes biologiques (D'Itri et Kamrin, 1983).

Lorsque pris individuellement, les BPC se retrouvent sous forme solide à température ambiante et sont souvent incolores; lorsque préparés pour un usage commercial, ces derniers peuvent être transparents ou jaunes (pâle ou foncé). Leurs propriétés varient en fonction du taux de chloration et de la position des atomes de chlore (Callahan et *al.*, 1979). Les BPC peuvent aussi se retrouver sous forme d'huiles (Aroclor 1221, 1232, 1242 et 1248), de

liquides visqueux (Aroclor 1254) ou de résines collantes (Aroclor 1260 et 1262) (Hutzinger, Safe et Zitko, 1974). Les congénères les moins chlorés sont des liquides huileux alors que les plus chlorés sont plus visqueux et résineux (EPA, 1980).

1.1.5 Aspects toxicologiques des BPC

1.1.5.1 Effets toxicologiques

Les BPC causent rarement une toxicité aiguë; la DL_{50} pour les animaux est assez élevée allant de 0,5 g/Kg à 11,3 g/Kg du poids corporel. Par contre, la plupart des effets néfastes attribués sont le résultat d'expositions chroniques et répétitives (Sullivan et Krieger, 1992): on note entre autres chez les individus exposés professionnellement aux BPC d'importants désordres respiratoires (Shigematsu et *al.*, 1978; Warshaw et *al.*, 1979). En industrie, l'absorption dermique est la voie majeure d'exposition à ces contaminants alors que l'ingestion est la voie primaire dans l'environnement. Les effets toxiques chez l'humain et les animaux peuvent varier en fonction de la voie d'entrée des BPC, de l'âge, du sexe et de l'endroit dans l'organisme où les BPC sont concentrés. Les scientifiques estiment que la demie-vie biologique des BPC dans le sérum chez l'homme est de 33 à 34 mois pour les congénères hautement chlorés, et de 6 à 7 mois pour les moins chlorés (Hoet et Lauwreys, 1993).

D'ordre général, le caractère lipophile des BPC leur permet de se bioaccumuler dans les tissus lipidiques des organismes vivants (incluant le cerveau) et de s'accumuler plus tard dans des niveaux supérieurs de la chaîne trophique dans la chaîne alimentaire (Tanabe, 1988). Puisque ces composés résistent à la biodégradation et qu'ils s'accumulent dans l'environnement, leur entrée dans la chaîne alimentaire de l'homme est facilitée (D'Itri et Kamrin, 1983. Une fois pénétrés dans l'organisme, les BPC possèdent un large éventail de propriétés biologiques et toxicologiques (Nebert, 1989; Seegal, 1996). Parmi les effets nocifs reliés à de fortes expositions aux BPC, on suspecte une altération des fonctions thyroïdiennes (Persky et *al.*, 2001), des troubles de comportement, des atteintes au niveau du système neurologique (Smith et Gangolli, 2002) ainsi que des dysfonctions cognitives et motrices (Tilson, Jacobson et Rogan, 1990).

1.1.5.2 Facteurs de toxicité

En général, les BPC deviennent plus toxiques en augmentant leur taux en chlore (Tanabe, 1988); leur diamètre et leur configuration moléculaire expliquent leur toxicité relative. Les congénères pouvant adopter une configuration coplanaire ont une toxicité plus élevée que ceux qui ne peuvent l'adopter (Abramowicz, 1994; Hutzinger, Safe et Zitko, 1974; Lang, 1992; McFarland et Clarke, 1989); cette configuration ne peut être obtenue que si la molécule de BPC ne contient pas d'atome de chlore en position *ortho*. Onze des 209 congénères BPC sont capables d'adopter une géométrie coplanaire semblable aux dibenzo-*p*-dioxines et dibenzofuranes polychlorés. À cause de cette similitude, quelques BPC peuvent démontrer une activité toxique semblable aux dioxines et furanes (Baird, 1995).

1.1.6. Persistance environnementale et détection des BPC

1.1.6.1 Bioaccumulation

La capacité de bioaccumulation des divers BPC est directement reliée au nombre d'atomes de chlore présents sur la molécule de biphényle pour deux raisons. Tout d'abord parce que les molécules les plus fortement chlorées ont un plus grand coefficient de partition octanol/eau, et en second lieu car les BPC les plus lourds sont plus résistants à la biodégradation (EPA, 1977; Metcalf et *al.*, 1975). Les évidences empiriques disponibles indiquent que les BPC, plus particulièrement ceux avec plus de quatre atomes de chlore, sont les plus persistants dans l'environnement (Callahan et *al.*, 1979).

1.1.6.2. Détection dans l'environnement

Au départ, les BPC n'étaient pas destinés à être relâchés dans l'environnement. Par contre, à cause des déchets industriels et municipaux et des fuites des équipements mécaniques (entre autres), les BPC ont laissé des traces dans l'environnement, l'air, l'eau et au sol (Hutzinger, Safe et Zitko, 1974). L'air semble être une des routes les plus importantes permettant une dispersion rapide et efficace des BPC (Phillips, 1986).

Idéalement, les technologies d'analyse d'échantillons provenant de l'environnement devraient détecter les différents congères à un seuil de quantification de l'ordre de 10^{-9} à 10^{-12}

g/L ou g/Kg. Actuellement, les technologies ne sont pas capables de détecter les BPC en dessous d'un seuil de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-6} g/L ou g/Kg. Par conséquent, l'analyse de congénères nécessite le développement de la chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse en tandem avec un second spectromètre de masse (GC-MS-MS). Dans le cas de la détection des isomères structuraux (BPC coplanaires et BPC mono ou di-*ortho* substitués), la spectrométrie de masse à haute résolution (GC-HRMS) doit être développée (Croteau, 1998).

Au Québec, plusieurs indications permettent de conclure que certains congénères BPC continuent d'être générés de façon involontaire par des procédés industriels (Maguire et Tkacz, 1990; Moore et *al.*, 1995), et que des charges significatives de BPC sont déversées dans les eaux usées municipales (Pham, 1993). Ces substances toxiques sont donc un sujet de préoccupation majeur pour plusieurs entreprises québécoises, puisque la détection de BPC dans les rejets des entreprises est fortement mise en évidence par des indices (exemples: Chimiotox et Beep) d'Environnement Canada afin de comparer le potentiel de toxicité des sources polluantes entre elles (Martel, 1995). Malgré ce, le dernier bilan de l'état de contamination indique qu'il existe encore d'importantes sources de BPC dans l'écosystème du St-Laurent (Environnement Canada, 1996).

1.1.7 Méthodes conventionnelles d'élimination des BPC

Il existe peu d'installations commerciales de stockage des BPC au Canada et ce, pour deux raisons. D'une part, les autorités sont peu enclines à approuver ces installations et d'autre part, le public s'oppose à l'implantation de sites permanents. Le Canada a donc pris très peu de mesures pour renforcer les activités liées aux BPC (CCE, 1996).

Pour parvenir à l'élimination des BPC stockés et de ceux qui vont graduellement terminer leur vie utile, il est d'usage d'envisager un moyen efficace d'élimination: plusieurs techniques physico-chimiques ont été développées (Anonyme, 1998; Chiarenzelli et *al.*, 1995; Korte et *al.*, 2002; Pittman et He, 2002). Jusqu'à maintenant, l'élimination des BPC se fait principalement par incinération à haute température. Il existe plusieurs méthodes d'incinération envisageables, la plus utilisée étant l'incinérateur rotatif qui permet tant l'élimination de déchets solides que liquides (Ackerman et *al.*, 1983).

Dû à leur stabilité thermique, les BPC nécessitent des températures au dessus de 1000°C pour leur combustion complète (Hutzinger, Safe et Zitko, 1974). Avec la technique d'incinération à haute température, il est estimé que 99,99% des contaminants sont éliminés (Anonyme, 1993). Si la combustion est incomplète, les produits chimiques résultants peuvent être des dioxines et des furanes chlorés, qui sont encore plus toxiques que les BPC (Barton, Fergusson et Joseph, 1987). L'incinération nécessitant une grande quantité de chaleur et des manipulations précises, des bris mécaniques ou des erreurs humaines peuvent survenir et entraîner le relâchement accidentel de BPC, de dioxines et de furanes.

1.2. Biodégradation oxydative des BPC

Un des moyens envisageables pour éliminer les BPC de l'environnement est la dégradation microbienne (Harkness et *al.*, 1993). Il existe un intérêt considérable dans le développement d'un tel type de processus biodégradatif pour détruire les BPC: son aspect sécuritaire (Asturias, Diaz, et Timmis, 1995).

1.2.1 Introduction

L'activité catabolique microbienne responsable de la dégradation des composés aromatiques constitue un maillon essentiel dans le cycle global du carbone. Cette activité est d'un grand intérêt dû à son potentiel de détruire les polluants toxiques persistants, ce qui constitue une stratégie nommée bioréhabilitation (Timmis, Steffan et Unterman, 1994). Le premier rapport de biodégradation des BPC est apparu en 1973 par Ahmed et Focht (Ahmed et Focht, 1973). Par la suite, plusieurs mécanismes de biodégradation ont été étudiés (Bédard et *al.*, 1987a; Berlin, Gage et Holm, 1975; Branson et *al.*, 1975; Furukawa, 1982; Furukawa et Matsumura, 1976; Hutzinger et *al.*, 1972; Kaiser et Wong, 1974) grâce à l'isolation et à la caractérisation d'une variété de microorganismes capables de cométaboliser les BPC provenant d'échantillons environnementaux (Layton et *al.*, 1994).

Il a été démontré que les bactéries utilisant le biphenyle sont omniprésentes dans l'environnement et qu'elles peuvent cométaboliser plusieurs congénères BPC via une voie oxydative (Furukawa, 1982; Furukawa et Chakrabarty, 1982; Furukawa, Matsumura et Tonomura, 1978; Yagi et Sudo, 1980). Ces organismes utilisent le biphenyle comme seule source de carbone et d'énergie (Bédard et *al.*, 1986; Bédard, 1987b; Waid, 1986) et entraînent

leur minéralisation complète en générant de l'acide chlorhydrique, du dioxyde de carbone et de l'eau (Neilson, 1990).

1.2.2 Facteurs influençant la biodégradation

Le taux de chloration des BPC influence l'efficacité de leur biodégradation. Les congénères les moins chlorés se dégradent lentement, alors que pour les plus chlorés leur dégradation est difficilement envisageable (EPA, 1987). Dans le cas des BPC les plus chlorés, le développement de la technologie de bioréhabilitation est limité par l'absence d'activité catabolique microbienne pour dégrader efficacement ces composés. Cette faille peut être due au fait que ces organismes ne se sont pas encore adaptés à dégrader de tels composés qui n'ont été introduits dans la biosphère que récemment (Timmis, Steffan et Unterman, 1994). L'efficacité de biodégradation dans le sol varie aussi largement tout dépendant de la disponibilité des nutriments, de la température, de la concentration de BPC (Callahan et *al.*, 1979), de leur solubilité dans l'eau et de leur volatilité, du pH, de la température, de l'oxygène disponible (Waid, 1986) et aussi, en fonction du microorganisme en présence. En fait, deux classes de bactéries dégradant les BPC ont été identifiées: les aérobies et les anaérobies. Les mécanismes de dégradation aérobies ont largement été étudiés, mais ces derniers se limitent à la dégradation des congénères les moins chlorés. Toutefois, les bactéries anaérobies sembleraient être aptes à attaquer les BPC les plus chlorés via une déchloration réductrice, un processus qui retire les atomes de chlore et laisse les anneaux phényles intacts (Abramowicz, 1994).

Les organismes ayant la capacité de dégrader les BPC ont cependant une spécificité étroite qui ne leur permet de dégrader qu'un faible nombre de congénères peu chlorés (Massé et *al.*, 1984; Shields, Hopper et Sayler, 1985; Sundstrom et Hutzinger, 1976). Par conséquent, il faut envisager la possibilité d'employer plusieurs souches bactériennes pour parvenir à la dégradation des différents congénères BPC (Unterman et *al.*, 1988), en bioréacteurs ou en biopiles.

1.2.3 Patron de dégradation des BPC chez les bactéries

L'étude de différents patrons de dégradation, principalement chez les pseudomonades du sol et autres bactéries Gram négatif, a démontré que ces bactéries transforment le

biphényle (BP) et les polychlorobiphényles (BPC) d'une manière similaire (Wang et *al.*, 1995). Les étapes enzymatiques impliquées dans la conversion du BP et des BPC en respectivement benzoate (BA) et chlorobenzoates (CBA) ont été étudiées chez plusieurs bactéries (Bergeron et *al.*, 1994; Khan et Walia, 1989; Kikuchi et *al.*, 1994; Parsons et Sijm, 1988). Ces mécanismes cataboliques sont pour la plupart similaires et peuvent être divisés en tronçons de dégradation supérieur et inférieur. Le tronçon supérieur se charge de convertir les BPC en 2,4-dihydroxy-penta-2,4-diénoate et en CBA, via la fission en *meta* d'un des deux noyaux phényle. Les enzymes du tronçon inférieur dégradent le 2,4-dihydroxy-penta-2,4-diénoate en acétyl-CoA et en pyruvate (Mouz et *al.*, 1999), alors que le CBA est métabolisé de diverses façons selon le nombre et la position des atomes de chlore sur la molécule.

1.2.3.1 Étapes de la dégradation du biphényle au niveau du tronçon supérieur

La première réaction impliquée dans la dégradation bactérienne du biphényle est catalysée par la biphényle 2,3-dioxygénase (BPDO), une enzyme multi-composante (Sylvestre et *al.*, 1996b). En présence d'un cofacteur, le NADH, l'enzyme catalyse l'oxygénation de la molécule de biphényle en positions *ortho* et *meta* de l'un des anneaux phényles, conduisant à la production d'un 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle (Haddock et Gibson, 1995; Hurtubise et *al.*, 1995). L'incorporation d'oxygène moléculaire en position 2,3 de la molécule de biphényle se fait sur l'anneau chloré ou le moins chloré des deux (Furukawa et Miyazaki, 1986; Haddock, Nadim et Gibson, 1993; Parsons, Veerkamp et Hutzinger, 1983; Safe, 1984). Dans certains cas, le choix de l'anneau attaqué peut dépendre de la souche bactérienne (Bédard et Haberl, 1990; Furukawa, Tomizuka et Kamibayashi, 1979).

La BPDO a été purifiée entre autres de *Comamonas testosteroni* B-356. Elle comprend trois constituants: l'oxygénase terminale, une protéine fer-soufre (ISP_{BPH}) constituée d'une sous-unité α ($M_r = 51\ 000$) et d'une sous unité β ($M_r = 22\ 000$); une ferrédoxine (FER_{BPH}; $M_r = 12\ 000$); et une ferrédoxine réductase (RED_{BPH}; $M_r = 43\ 000$) (Hurtubise, Barriault et Sylvestre, 1996; Hurtubise et *al.*, 1995). Les gènes codants sont *bphA* (ISP_{BPH} sous-unité α), *bphE* (ISP_{BPH} sous-unité β), *bphF* (FER_{BPH}) et *bphG* (RED_{BPH}) (Sylvestre et *al.*, 1996b) (Figure 1.2). BphAE constituent la composante sidérophile sulfureuse de l'oxygénase qui interagit directement avec le substrat pour incorporer la

molécule d'oxygène. BphF est une protéine ferrédoxine de type Rieske impliquée dans le transfert d'électrons de la ferrédoxine réductase réduite vers la composante sidérophile sulfureuse oxydée. Pour sa part, BphG, une flavoprotéine NADH dépendante, code pour la réductase qui interagit avec le cofacteur (NADH) (Bergeron et *al.*, 1994). BphF et BphG sont donc directement impliquées dans l'oxygénation catalytique de la molécule de biphényle via le transfert des électrons à partir du NADH vers l'ISP_{BPH} (Hurtubise et *al.*, 1995). Cette réaction de transfert d'électrons implique un centre Rieske de type fer-soufre [2Fe-2S] (Sylvestre et *al.*, 1996b), situé dans la sous-unité α (Hurtubise, Barriault et Sylvestre, 1996). Ce dernier sert au transfert de deux électrons provenant du NADH réduit à partir de la composante ferrédoxine vers le Fe⁺ mononucléaire, pour permettre l'activation de l'oxygène moléculaire et son insertion dans le substrat (Batie, Ballou et Correll, 1991; Mason et Cammack, 1992), le biphényle.

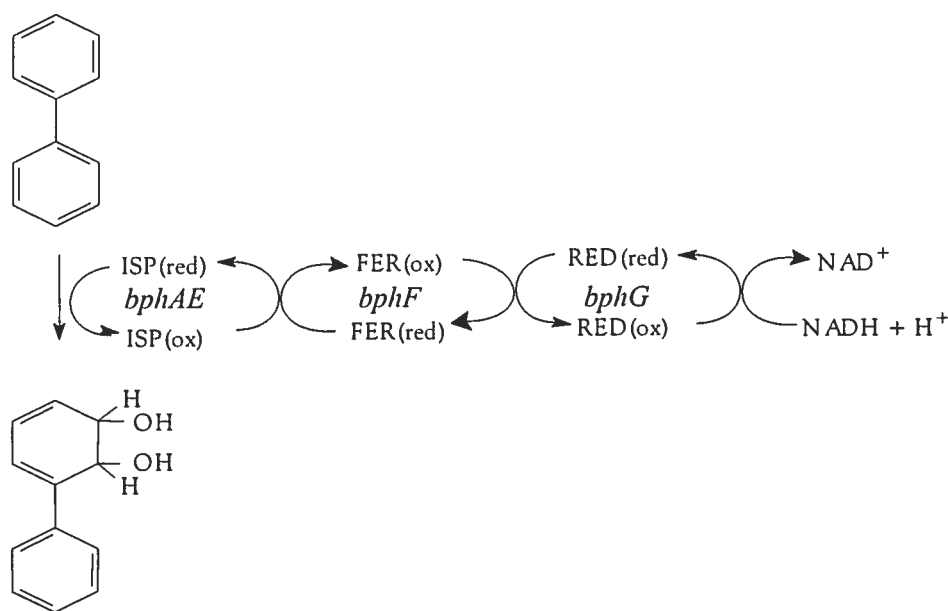


Figure 1.2 : Composantes de la dioxygénase du biphényle. RED: Ferrédoxine-réductase, FER: Ferrédoxine, ISP: Oxygénase (Protéine fer-soufre), red: réduite, ox: oxydée.

Suite à l'oxygénation de la molécule de biphényle, l'intermédiaire obtenu, le 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle, devient ensuite le substrat pour l'enzyme BphB (Bergeron

et *al.*, 1994), une déshydrogénase NAD⁺-dépendante qui produit un 2,3-dihydroxybiphényle (Barriault et *al.*, 1999). Ce métabolite hydroxylé est ensuite scindé en position *meta* par la 2,3-dihydroxybiphényle-1,2-dioxygénase codée par BphC. Le produit de *meta*-clivage ainsi produit, le 2-hydroxy-6-oxo-6-phénylhéxa-2,4-diénoate (HOPDA), est ensuite hydrolysé en acide benzoïque et 2,4-hydroxy-penta-2,4-diénoate par la HOPDA hydrolase codée par *bphD* (Bergeron et *al.*, 1994). Le tronçon de dégradation supérieur est schématisé à la Figure 1.3.

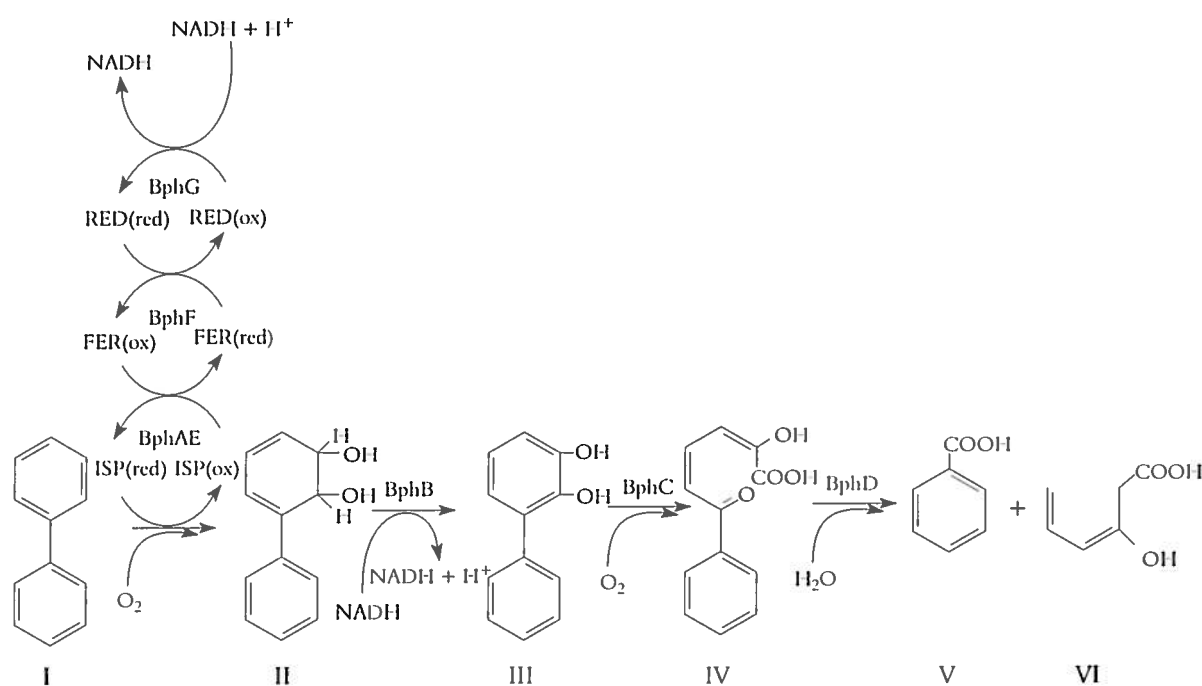


Figure 1.3 : Voie catabolique du biphenyle. Métabolites: I : biphenyle, II : 2,3-dihydroxybiphenyle, III : 2,3-dihydroxybiphenyle, IV : 2-hydroxy-6-oxo-6-phénylhéxa-2,4-diénoate (HOPDA), V : acide benzoïque, VI : 2-hydroxy-penta-2,4-diénoate. Enzymes: BphAEFG : biphenyle 2,3-dioxygénase (BPDO), BphB : 2,3-dihydrodiol déshydrogénase, BphC : 2,3-dihydroxybiphenyle-1,2-dioxygénase, BphD : HOPDA hydrolase.

1.2.3.2 Étapes de la dégradation du biphényle au niveau du tronçon inférieur

Au niveau du tronçon inférieur de dégradation, le 2,4-hydroxy-penta-2,4-dièneate est dégradé en acétyl-CoA et en pyruvate, puis transféré au cycle tricarboxylique (Kimura et *al.*, 1997) tel qu'illustré à la Figure 1.4. En ce qui concerne les chlorobenzoates (CBA), puisque les gènes codant pour les enzymes de dégradation ne sont habituellement pas joints aux gènes de dégradation du biphényle (Mouz et *al.*, 1999), ces derniers sont métabolisés par d'autres bactéries et microorganismes (Scholze et *al.*, 1988). En fait, les bactéries du sol qui cométabolisent les BPC tendent à accumuler les CBA parce qu'elles ne sont généralement pas aptes à croître sur ces substrats (Hickey et Focht, 1990). La minéralisation complète des BPC nécessite donc la présence de deux opérons: un pour la bioconversion des BPC en CBA, et un autre pour la dégradation des CBA (Shields, Hopper et Sayler, 1985; Sondossi, Sylvestre et Ahmad, 1992).

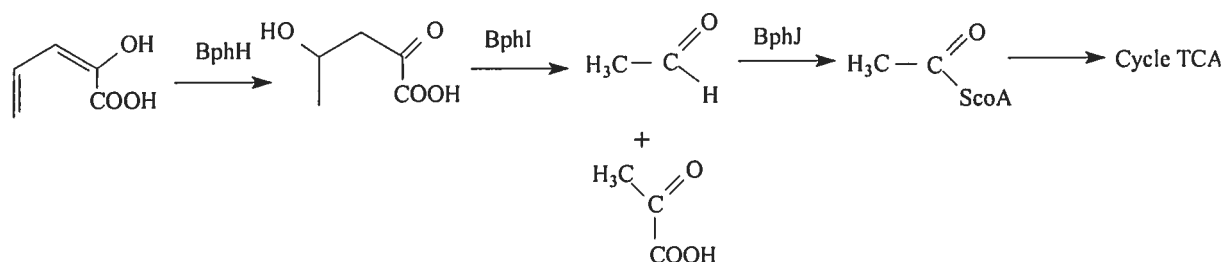


Figure 1.4 : Voie catabolique du 2,4-hydroxy-penta-2,4-dièneate. BphH : 2-hydroxy-penta-2,4-dièneate hydratase, BphI : 4-hydroxy-2-oxovalérate aldolase, BphJ: acétylaldéhyde déhydrogénase.

Plusieurs souches bactériennes capables de dégrader le 2-CBA (Engesser et Shulte, 1989; Fetzner, Müller et Lingens, 1989; Hartmann, et *al.*, 1989), le 3-CBA (Chatterjee et *al.*, 1981; Dorn et *al.*, 1974; Focht et Shelton, 1987) et le 4-CBA (Adriaens et *al.*, 1989; Klages et Lingens, 1979; Marks, Smith et Quirk, 1984) ont été isolées (Hickey et Focht, 1990). La dégradation oxydative des CBA par les microorganismes peut se faire soit par l'élimination d'atomes de chlore après la fission de l'anneau de phényle ou par substitution des atomes de

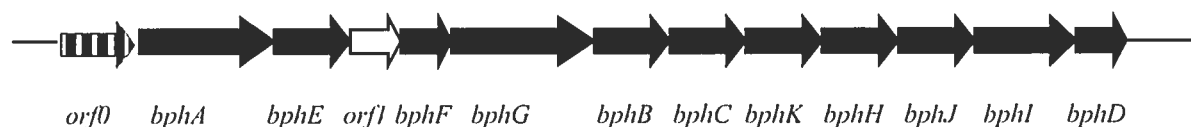
chlore avant l'ouverture du cycle (Sondossi, Sylvestre et Ahmad, 1992). Dans certains cas, le 2-CBA peut subir une déchlorination oxygénolytique durant l'étape initiale d'oxygénation en position 1,2, ce qui résulte en la dégradation complète du 2-CBA (Milne, Goldman et Holzman, 1968). Le 3-CBA peut quant à lui subir une dioxygénation par la 1,2-dioxygénase, entraînant la production d'un chlorocatéchol (Goldman, Milne et Pignataro, 1967). Par la suite, le chlorocatéchol peut être métabolisé via d'autres voies enzymatiques. Plusieurs souches bactériennes ont d'ailleurs fait l'objet d'études sur la dégradation des divers chlorocatéchols, dont *Pseudomonas* sp. souche B13 (Dorn et Knackmuss, 1978; Weisshaar, Franklin et Reineke, 1987), *Pseudomonas putida* (pAC27) (Chatterjee et al., 1981), et *Alcaligenes eutrophus* JMP134 (pJP4) (Don et al., 1985). Finalement, pour le 4-CBA, l'atome de chlore peut être remplacé par un groupe hydroxyl via une réaction d'hydroxylation. L'acide 4-hydroxybenzoïque généré est ensuite dégradé via la voie catabolique du β -cétoadipate (Keil, Klages et Lingens, 1981; Neilson, 1990).

1.2.4 Organisation génique de l'opéron biphényle

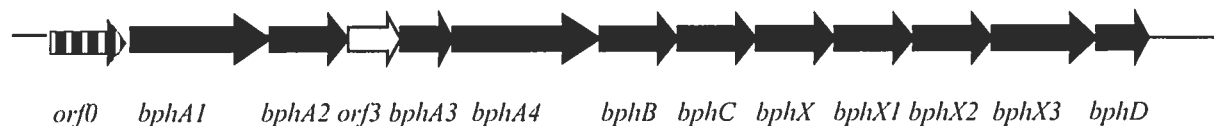
Les gènes responsables du catabolisme du biphényle sont reconnus pour être conservés chez plusieurs bactéries aptes à dégrader les BPC (Erickson et Mondello, 1992; Kimbara et al., 1989; Taira et al., 1992) et semblent tous être organisés en opérons. Les gènes ont été retrouvés à la fois dans les chromosomes bactériens et dans des plasmides (Springael, Kreps et Mergeay, 1993). Comme le démontre la Figure 1.5, il existe de grandes similitudes dans l'organisation en opérons entre différentes souches bactériennes aptes à cométaboliser les BPC.

L'organisation génique de l'opéron *bph* de la souche B-356 est légèrement différente des autres puisque le gène *bphG* est localisé approximativement 18 Kb en amont du gène *bphA* et se lit dans la même direction (Sylvestre et al., 1996b). Une organisation semblable est observée chez *Pseudomonas* sp. KKS102, pour qui le gène *bphG* est situé 1 Kb en amont de l'opéron *bph* (Kikuchi et al., 1994). La raison pour laquelle *bphG* est localisé à l'extérieur de l'opéron biphényle de B-356 est encore inconnue; la possibilité que l'opéron biphényle ait été réarrangé par transposition ne peut pas être exclue (Bergeron et al., 1994).

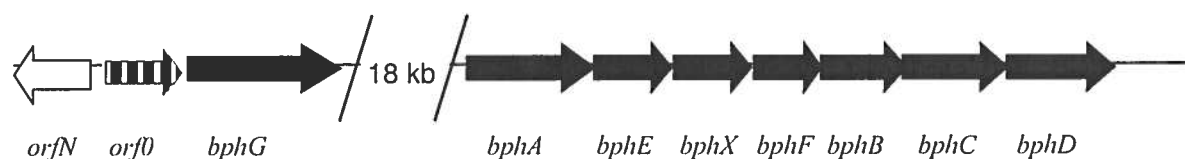
Burkholderia cepacia LB400 (Erickson et Mondello, 1992)



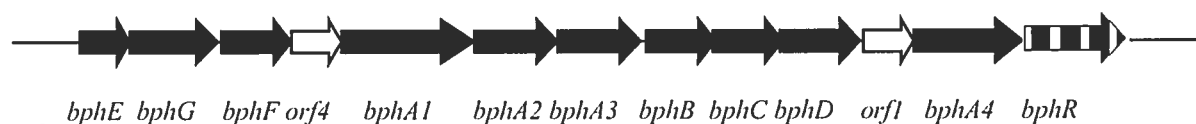
Pseudomonas pseudoalcaligenes KF707 (Taira et al., 1992)



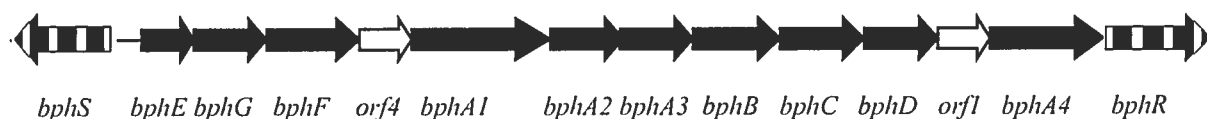
Comamonas testosteroni B-356 (Bellemare, 2000)



Ralstonia eutropha A5 (transposon Tn4371) (Merlin et al., 1997)



Pseudomonas sp. KKS102 (Fukuda et al., 1994)



Rhodococcus sp. M5 (Wang et al., 1995)

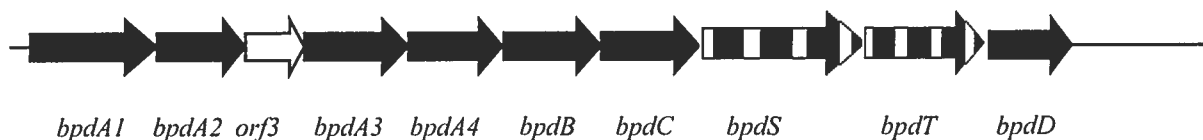


Figure 1.5 : Organisation génétique de différents opérons biphényle. Les flèches noires indiquent les gènes qui codent pour des enzymes de dégradation, les blanches pour des gènes de fonction inconnue, et les rayées pour des gènes (potentiellement) impliqués dans la régulation de l'opéron *bph*.

1.3 Régulation des voies cataboliques des composés aromatiques

1.3.1 Introduction

Un grand nombre de bactéries sont capables d'utiliser des composés aromatiques comme sources de carbone en employant diverses stratégies. Il est connu qu'un même composé aromatique peut être dégradé par des voies enzymatiques différentes et que des composés organiques différents peuvent être dégradés par des voies cataboliques similaires (Furukawa, 1994). Ce principe est aussi applicable pour les systèmes de régulation de l'expression des gènes cataboliques. Par conséquent, des voies cataboliques similaires peuvent être régulées par différents patrons de régulation alors que des voies cataboliques très différentes peuvent être régulées par le même mécanisme. Ainsi, l'étude de différents mécanismes de régulation connus peut parvenir à fournir de bons indices quant aux mécanismes de régulation de protéines régulatrices dont les fonctions sont moins bien établies.

Parmi les protéines régulatrices des composés aromatiques, une classification a été faite selon les similitudes au niveau de leur structure primaire. Les groupes de protéines régulatrices les plus communs sont les familles LysR, NtrC/XylR, AraC/XylS et IcIR (Tableaux 1.3, 1.4 et 1.5). Presque tous ces régulateurs agissent à titre d'activateurs de l'expression des gènes, à l'exception des protéines appartenant à la famille GntR, auxquelles sont associées des fonctions répressives (Gerischer, 2002). Plus particulièrement, les protéines de type GntR sont classifiées en quatre sous-familles: FadR, HutC, MocR et YtrA (Rigali et *al.*, 2002).

1.3.2 Protéines régulatrices à action positive

Les Tableaux 1.3, 1.4 et 1.5 décrivent les familles de protéines régulatrices à action positive.

Tableau 1.3 : Régulateurs appartenant à la famille LysR.

Famille et protéines	Souches	Fonctions cataboliques	Références
LysR			
BenM	<i>Acinetobacter</i> sp. souche ADP1	Benzoate	Collier, Gaines et Neidle, 1998.
BphR	<i>Ralstonia eutropha</i> A5 (Tn4371)	BP/4-BPC	Mouz et <i>al.</i> , 1999.
CatR	<i>Pseudomonas putida</i>	Benzoate	Rothmel, 1990.
ClcR	<i>Pseudomonas putida</i>	Chlorocatéchol	Coco et <i>al.</i> , 1993. McFall, Chugani et Chakrabarty, 1998.
HcaR	<i>Escherichia coli</i>	3-phénylpropionate	Turlin et <i>al.</i> , 2001.
NahR	<i>Pseudomonas</i>	Naphthalène	Cebolla, Sousa et de Lorenzo, 1997.
TcbR	<i>Pseudomonas</i> sp. souche P51	Chlorocatéchol	van der Meer et <i>al.</i> , 1991.
TdnR	<i>Pseudomonas putida</i> UCC22 (pTDN1)	Aniline	Fukumori et Saint, 1997.
TfdR	<i>Pseudomonas putida</i> (pEST4011)	Acide 2,4-dichloro-phénoxyacétique	Vedler, Koiv et Heinaru, 2000.
	<i>Pseudomonas putida</i> JMP134 (pJP4)	Acide 2,4-dichloro-phénoxyacétique	You et Ghosal, 1995.
TfdT	<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134 (pJP4)	Chlorocatéchol	Leveau et van der Meer, 1996.

Tableau 1.4 : Régulateurs appartenant aux familles AraC/XylS et NtrC/XylR.

Familles et protéines	Souches	Fonctions cataboliques	Références
AraC/XylS			
BenR	<i>Pseudomonas putida</i>	Benzoate, 4-HBA et méthylbenzoate	Cowles, Nichols et Harwoods, 2000.
ChnR	<i>Acinetobacter</i> sp. souche NCIMB 9871	Cyclohexanone	Iwaki et <i>al.</i> , 1999.
HpaA	<i>Escherichia coli</i> <i>Escherichia coli</i> W ATCC 11105	4-hydroxyphénylacétate 4-hydroxyphénylacétate	Prieto et Garcia, 1997. Prieto et Garcia, 1994.
PobR	<i>Azotobacter chroococcum</i>	<i>p</i> -hydroxybenzoate	Quinn, McKay et Entsch, 2001.
NtrC/XylR			
DmpR	<i>Pseudomonas</i> sp. souche CF600 (pV1150)	Phénol	Shingler, Bartilson et Moore, 1993. Shingler et Moore, 1994.
PhhR	<i>Pseudomonas putida</i> P35X (NCIB 9869)	(Méthyl)phénol	Ng, Poh et Shingler, 1995.
TbuT	<i>Pseudomonas pickettii</i> PX01	Toluène	Byrne et Olsen, 1996.
	<i>Ralstonia pickettii</i> PKO1	Toluène-benzène	Kahng et <i>al.</i> , 2000.
TouR	<i>Pseudomonas stutzeri</i> OX1	Toluène- <i>o</i> -xylène	Arengi et <i>al.</i> , 1999.
XylR	<i>Pseudomonas putida</i> mt-2 (pWWO)	Toluène-xylène	Inouye, Nakazawa et Nakazawa, 1988.

Tableau 1.5 : Régulateurs appartenant à la famille IcIR.

Famille et protéines	Souches	Fonctions cataboliques	Références
IcIR			
RexZ	<i>Erwinia carotovora</i>	Pectine	Thomson et <i>al.</i> , 1999.
MhpR	<i>Comamonas testosteroni</i> TA441	3-(3-hydroxyphényl) propionate	Hiroyuki et <i>al.</i> , 1999.
PobR	<i>Acinetobacter</i> Souche ADP	<i>p</i> -hydroxybenzoate	DiMarco, Averhoff et Ornston, 1993.

1.3.2.1 Famille LysR

La famille LysR de régulateurs transcriptionnels, premièrement décrite par Henikoff et *al.* en 1988, est largement distribuée chez les prokaryotes (Schell, 1993). Les membres les plus représentatifs sont impliqués dans la dégradation du catéchol, et quelques autres exemples contrôlent la dégradation du protocatéchuate (Gerischer, 2002). Ils ont plusieurs caractéristiques communes: ils codent pour des protéines d'activation transcriptionnelle; ils sont de grandeurs variant entre 276 et 324 résidus acides aminés; ils sont indépendants de la présence de co-inducteurs; ils sont transcrits à partir de leur propre promoteur qui souvent chevauche le promoteur du(des) gène(s) qu'ils régulent; la plupart répriment leur propre transcription (autorégulation négative) (Schell, 1993).

1.3.2.1.1 Description des protéines LysR en domaines

Ce groupe de régulateurs, décrit à la Figure 1.6, est très abondant et démontre une grande homologie dans la partie N-terminale qui contient un site de fixation à l'ADN de type hélice-tour-hélice (HTH). Les domaines impliqués dans la reconnaissance et/ou réponse de co-inducteurs se retrouvent dans la partie centrale. Les autres fonctions d'activation de la transcription, de liaison à l'effecteur et de multimérisation résident dans la partie C-terminale des protéines, et ont été moins bien caractérisées (Gerischer, 2002).

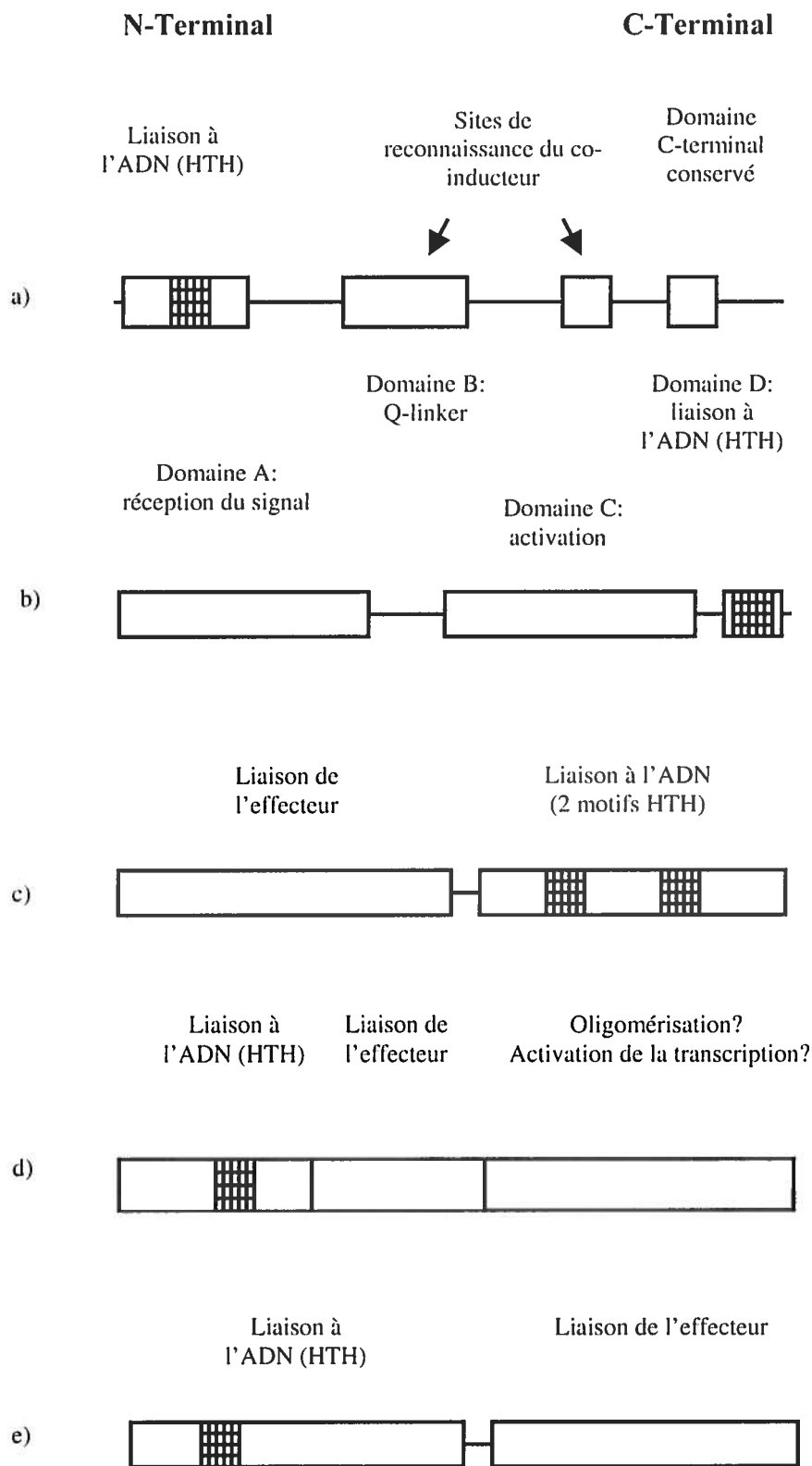


Figure 1.6 : Organisation des protéines régulatrices en domaines. a) LysR b) NtrC c) AraC d) IcIR e) GntR.

1.3.2.1.2 BenM, CatR et ClcR: régulateurs impliqués dans la dégradation du benzoate/3-chlorobenzoate et catéchol/3-chlorocatéchol

Chez *Acinetobacter* sp. souche ADP1 (anciennement *Acinetobacter calcoaceticus*), BenM est nécessaire pour la dégradation du benzoate/3-chlorobenzoate en catéchol/3-chlorocatéchol (Collier, Gaines et Neidle, 1998) en régulant l'expression des gènes *benABCDE*. CatR est retrouvée chez *P. putida* (Parsek et al., 1994a) et régule les étapes initiales de la conversion du catéchol en contrôlant l'opéron *catBCA*. Pour sa part, ClcR contrôle l'expression des gènes responsables de la dégradation du 3-chlorocatéchol localisés dans l'opéron *clcABD*; ces gènes ont entre autres été isolés à partir du plasmide *pAC27* chez *P. putida* (Frantz et Chakrabarty, 1987). Les voies cataboliques régulées par ces protéines ainsi que leurs patrons de régulation sont représentés à la Figure 1.7.

La dégradation complète du benzoate par les bactéries aérobies peut survenir via deux patrons de dégradation. Dans les deux cas, le benzoate est converti en un composé non aromatique (*cis*-diol), le 2-hydro-1,2-dihydroxybenzoate, puis transformé en catéchol (Reiner, 1971). Par la suite, le catéchol est clivé en position *ortho* produisant de l'acétyl-CoA et du succinate, ou en position *meta* entraînant la formation de pyruvate et d'acétaldéhyde (Neidle et al., 1991).

1.3.2.1.3 Mode d'action de BenM

La dégradation du benzoate/3-chlorobenzoate en catéchol/3-chlorocatéchol est régie par une protéine de 304 acides aminés: BenM. Le gène régulateur *benM* est situé immédiatement en amont du gène *benA* et est transcrit indépendamment. Un site potentiel de liaison à l'ADN pour BenM a été identifié entre *benM* et *benA*. L'action combinée de la protéine régulatrice et d'un inducteur, le *cis,cis*-muconate (CCM), permet l'activation de l'opéron catabolique adjacent; BenM répond aussi positivement au benzoate et au catéchol (Collier, Gaines et Neidle, 1998). Le CCM a une plus grande habileté à induire l'expression des gènes *ben* que le benzoate (Collier, Nichols et Neidle, 1997; Neidle, Shapiro et Ornston, 1987) et le catéchol (Collier, Gaines et Neidle, 1998). Le benzoate, en collaboration avec le CCM, augmente l'expression BenM-dépendante de l'opéron *benABCDE* de façon synergique.

La liaison de BenM à son site de promotion peut causer son autorégulation (Collier, Gaines et Neidle, 1998) .

1.3.2.1.4 Mode d'action de CatR

L'opéron *catBCA*, impliqué dans la dégradation du catéchol, code pour les trois enzymes de la voie catabolique du β -cétoadipate: la cycloisomérase du muconate (*catB*), l'isomérase du muconolactone (*catC*) et la dioxgénase I du catéchol (*catA*) (Houghton et *al.*, 1995). Le gène régulateur *catR*, codant pour la protéine CatR (32 KDa), est transcrit indépendamment de l'opéron *catBCA* et leurs promoteurs se chevauchent (Rothmel et *al.*, 1991). L'induction de l'expression de *catBCA* nécessite le CCM et la protéine CatR (Schell, 1993; Wheelis et Ornston, 1972). Le complexe CatR-promoteur ainsi formé entraîne une meilleure fixation de l'ARN polymérase et initie la transcription de l'opéron *catBCA*; le CCM augmente l'affinité de CatR pour le promoteur de *catBCA* par 20 fois (Parsek et *al.*, 1992). De plus, lorsque le benzoate est présent dans le milieu, l'expression de *catBCA* est induite par plus de 100 fois (Parsek et *al.*, 1994b). CatR est en mesure de s'autoréguler (Rothmel et *al.*, 1990).

CatR peut se lier à deux sites adjacents en amont du promoteur de l'opéron *catBCA* (Chugani, Parsek et Chakrabarty, 1998) en tant que dimère (Schell, 1993). Elle peut s'associer à une première région de 27 pb en amont du promoteur de l'opéron *catBCA* en présence ou en absence d'inducteur (Parsek et *al.*, 1992) au niveau du site RBS (Repression Binding Site), et cette liaison peut causer la répression de sa propre transcription (Rothmel et *al.*, 1991). Une autre région de 27 pb en amont du promoteur de *catBCA* et en aval du site RBS est protégée par CatR en présence de CCM: elle se nomme région ABS (Activating Binding Site) (Schell, 1993). La liaison CatR-ABS conduit à l'activation de la transcription à partir du promoteur des gènes *catBCA* en entraînant des changements dans le repliement de l'ADN au niveau de la région promotrice (McFall, Chugani et Chakrabarty, 1998).

En plus des sites RBS et ABS, un troisième site de liaison (de faible affinité) pour la protéine CatR a été repéré en aval du promoteur de *catBCA*, à l'intérieur du gène de structure *catB*: ce site est appelé IBS (Internal Binding Site) (McFall, Chugani et Chakrabarty, 1998). Lorsque CatR est fixée aux sites RBS et ABS, celle-ci peut se lier avec une haute affinité au site IBS. Le site IBS régule négativement l'expression à partir du promoteur de *catBCA* par

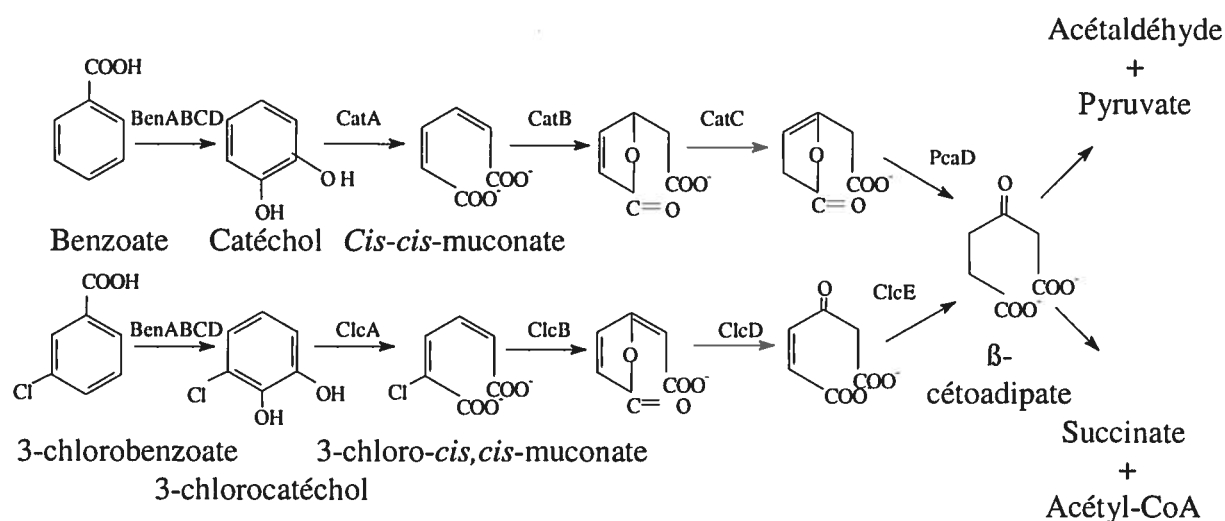
trois à quatre fois, et cette répression est médiée avec l'aide de CatR en formant une loupe d'ADN (Chugani, Parsek et Chakrabarty, 1998).

1.3.2.1.5 Mode d'action de ClcR

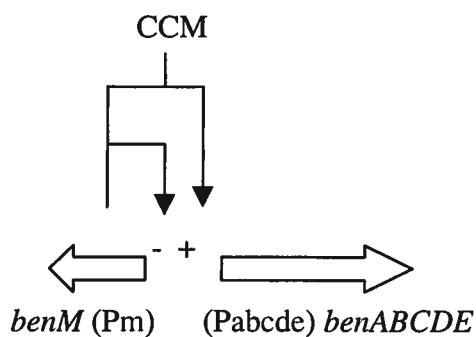
Il a été démontré que l'opéron *clcABD* est sous le contrôle de l'activateur transcriptionnel ClcR, une protéine de 32,5 KDa (Coco et *al.*, 1993) qui agit à titre de monomère (Coco, Parsek et Chakrabarty, 1994); le gène *clcR* est transcrit indépendamment de l'opéron que son produit génique régule. Les gènes appartenant à cet opéron codent respectivement pour les enzymes chlorocatéchol-1,2-dioxygénase (*clcA*), cycloisomérase (*clcB*) et hydrolase (*clcD*) (Coco et *al.*, 1993), et conduisent le chlorocatéchol vers le cycle tricarboxylique (Don et Pemberton, 1981; Frantz et Chakrabarty, 1987; van der Meer et *al.*, 1991).

Dans la région promotrice, entre les gènes *clcR-clcABD*, des régions comparables aux séquences RBS et ABS retrouvées chez *P. putida* ont été localisées. Contrairement à la liaison de CatR-ABS, ClcR se lie fortement à son fragment d'ADN, même en absence d'effecteur: la raison de cette différence demeure inconnue (Coco, Parsek et Chakrabarty, 1994). Pour exercer son rôle de régulateur, ClcR interagit avec l'ARN polymérase; la liaison d'un effecteur, comme le 2-chloro-*cis,cis*-muconate, vient activer l'induction de la transcription de l'opéron (Coco et *al.*, 1993). L'expression de cet opéron est aussi induite lorsque les cellules croissent en présence de 3-chlorobenzoate (McFall, Parsek et Chakrabarty, 1997), et la présence de fumarate vient agir à titre d'anti-inducteur (McFall, Chugani et Chakrabarty, 1998). ClcR a démontré la capacité de s'autoréguler (Coco et *al.*, 1993). Les mécanismes de régulation de cet opéron ressemblant beaucoup à celui du catéchol, il a été proposé que l'opéron chlorocatéchol puisse avoir évolué à partir de l'opéron catéchol (Frantz, Aldrich et Chakrabarty, 1987; Ngai et Ornston, 1988).

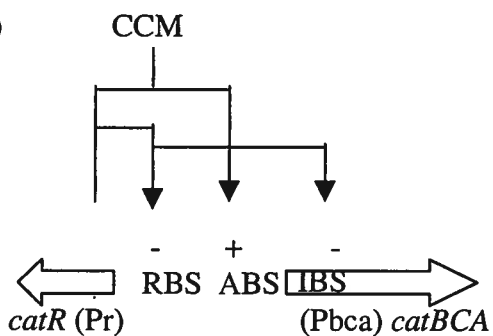
a)



b)



c)



d)

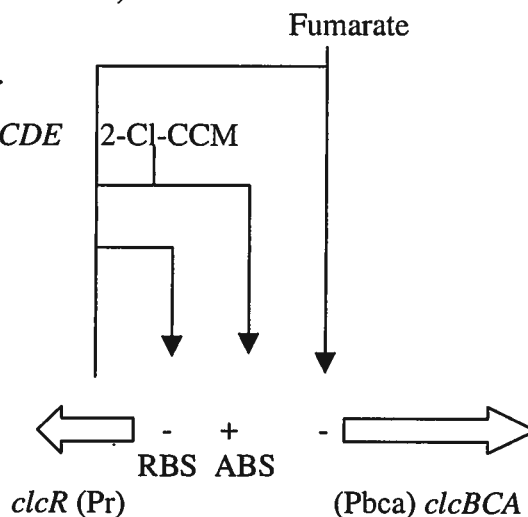


Figure 1.7 : Régulation des voies cataboliques du benzoate/chlorobenzoate chez *Acinetobacter* sp. souche ADP1, du catéchol chez *P. putida* et du 3-chlorocatéchol à partir du plasmide *pAC27* de *P. putida*. a) Voies cataboliques b) c) d) Patrons de régulation de la dégradation du benzoate, du 3-chlorocatéchol et du catéchol.

1.3.2.2 Familles NtrC/XylR et AraC/XylS

1.3.2.2.1 Famille NtrC/XylR

Les protéines régulatrices de la famille NtrC/XylR sont impliquées dans la régulation de la dégradation de divers composés aromatiques. Ces protéines contrôlent des promoteurs qui sont reconnus par l'ARN polymérase avec le facteur σ^{54} (σ^{54} -dépendants). L'ARN polymérase, associée à ce facteur, se lie aux promoteurs (Thöny et Hennecke, 1989) pour permettre l'initiation de la transcription; l'hydrolyse d'ATP est nécessaire comme source d'énergie (Weiss et *al.*, 1991).

La plupart des membres de la famille NtrC font partie d'un système à deux composantes qui consiste en une histidine kinase activant la protéine régulatrice et transférant un groupe phosphate au niveau du domaine régulateur. Dans le cas de la protéine XylR, il semble que cette dernière soit activée directement en présence d'un composé aromatique qui a été catabolisé via le produit du(des) gène(s) qu'elle régule (Byrne et Olsen, 1996; Delgado et Ramos, 1994; Inouye, Nakazawa et Nakazawa, 1988; Pavel, Forsman et Shingler, 1994; Shingler et Moore, 1994).

1.3.2.2.2 Description des protéines NtrC/XylR en domaines

Les régulateurs de cette famille, décrits à la Figure 1.6, possèdent quatre domaines dont trois sont hautement conservés (Kutsu et *al.*, 1989). Les deux premiers tiers du domaine A (N-terminal), qui est hétérologue, sont impliqués dans la réception de signal (liaison de l'effecteur) (North et *al.*, 1993; Ramos, Marques et Timmis, 1997), alors que le troisième tiers pourrait être impliqué dans un phénomène de répression (Perez-Martin et de Lorenzo, 1995; Perez-Martin et de Lorenzo, 1996). Le domaine B, ou « Q-linker », est une région courte et hydrophile qui sert probablement de lien entre les domaines A et C. Le domaine C (central) est impliqué dans l'hydrolyse d'ATP (Kutsu et *al.*, 1989), la dimérisation et l'interaction avec le facteur σ^{54} (Delgado et Ramos, 1994) pour l'activation de la transcription (Byrne et Olsen, 1996). Le rôle du domaine D (C-terminal) n'a pas encore été très détaillé. La fin de sa partie C-terminale démontre un haut taux de conservation en acides aminés, environ 100, qui semblent être impliqués dans la liaison à l'ADN avec un motif de type HTH (Ramos, Marques et Timmis, 1997).

1.3.2.2.3 Famille AraC/XylS

Les membres de cette famille ont trois grandes fonctions en commun: le métabolisme du carbone, la réponse au stress et la pathogénèse (Gallegos et *al.*, 1997). Tous les membres sont des activateurs transcriptionnels à l'exception des protéines CelD (Parker et Hall, 1990) et TetD (Gallegos, Michàn et Ramos, 1993) qui semblent agir à titre de répresseurs. La plupart sont d'une longueur d'environ 300 acides aminés (Gallegos et *al.*, 1997). Les protéines appartenant à cette famille ont été retrouvées dans 47 genres différents et 84 espèces microbiennes (Tobes et Ramos, 2002). Dans la plupart des cas, la transcription du gène régulateur se fait à partir d'un opéron différent de ceux qui sont régulés (Gallegos, Michàn et Ramos, 1993).

Deux types de protéines sont distinguées dans cette famille. Dans le premier groupe, le récepteur de signal est le même polypeptide que celui responsable de la fonction régulatrice, alors que dans le second, la transcription de la protéine régulatrice est contrôlée par un autre régulateur (Gallegos et *al.*, 1997).

1.3.2.2.4 Description des protéines AraC/XylS en domaines

Les protéines de cette famille, décrites à la Figure 1.6, sont constituées de deux domaines: un domaine conservé et un domaine non conservé reliés par un « linker » (Gallegos et *al.*, 1997). La partie N-terminale (non conservée) est la région qui reconnaît les signaux chimiques, et semble contenir des sites de liaison pour les molécules activatrices (Ramos et *al.*, 1990). Le domaine C-terminal renferme une région conservée de 99 acides aminés qui contient tous les éléments requis pour se lier à l'ADN cible et activer la transcription (Gallegos et *al.*, 1997). Cette région contient deux motifs de liaison à l'ADN de type HTH (Tobes et Ramos, 2002).

1.3.2.2.5 XylR et XylS: régulateurs impliqués dans la dégradation du toluène/xylène et benzoate/toluate

L'activité catabolique codée par le plasmide TOL de *P. putida* a été découverte il y a plus de 25 ans (Nakazawa et Yokota, 1973; Nozaki et *al.*, 1968). Les gènes *xyl* du plasmide TOL pWWO de *P. putida* codent pour l'information génétique conduisant à la minéralisation

du toluène/xylène (Worsey et Williams, 1975). Les gènes du patron catabolique sont organisés en quatre unités transcriptionnelles (Delgado et Ramos, 1994). L'opéron supérieur est constitué des gènes *xy/UWCAMBN* et s'occupe de la conversion du toluène/xylène en benzoate/toluate; les produits des gènes *xy/U*, *xy/W* et *xy/N* ne sont pas nécessaires pour la croissance sur xylène/toluène (Williams et *al.*, 1996). L'opéron inférieur, comprenant les gènes *xy/XYZLTEGFJQKIH*, code pour les enzymes de la conversion du benzoate/toluate en intermédiaires du cycle de Krebs. Cet opéron s'étend sur 11 Kb et constitue un des plus grands opérons chez les prokaryotes. Les deux dernières unités de transcription sont les gènes *xy/R* et *xy/S* qui ont des fonctions régulatrices au niveau transcriptionnel (Franklin et *al.*, 1983; Inouye et *al.*, 1990; Inouye, Nakazawa et Nakazawa, 1981; Worsey, Franklin et Williams, 1978). Ces gènes régulateurs sont transcrits à partir de promoteurs physiquement près mais fonctionnellement différents (Inouye, Nakazawa et Nakazawa, 1987; Ramos, Mermod et Timmis, 1987). Les voies cataboliques régulées par ces protéines ainsi que les patrons de régulation des protéines XylR et XylS sont décrits à la Figure 1.8.

1.3.2.2.5.1 La protéine XylR

La protéine XylR est constituée de 566 acides aminés (Inouye, Nakazawa et Nakazawa, 1988). Elle est exprimée à partir d'un tandem de promoteurs, un distal et un proximal (Pr1 et Pr2) (Inouye, Nakazawa et Nakazawa, 1985); l'expression à partir de Pr1 est plus forte que celle obtenue par Pr2 (Marques et *al.*, 1994). XylR active la transcription à partir d'un promoteur Pu (σ^{54} -dépendant) responsable de la transcription des gènes du patron supérieur de dégradation qui transforme le toluène/xylène en benzoate/toluate (Ramos, Marques et Timmis, 1997).

1.3.2.2.5.2 La protéine XylS

La protéine XylS est constituée de 321 acides aminés (Inouye, Nakazawa et Nakazawa, 1986; Mermod et *al.*, 1987; Spooner, Lindsay et Franklyn, 1986). Elle peut être produite à partir de deux promoteurs: Ps1 (σ^{54} -dépendant) et Ps2 (σ^{70} -dépendant). XylS est nécessaire pour l'expression des gènes responsables de la production des enzymes de conversion du benzoate/toluate vers le cycle de Krebs (Assinder et Williams, 1990) à partir du promoteur Pm (tronçon inférieur de dégradation).

1.3.2.2.6 Modes d'action de XylR et de XylS

Le contrôle génétique des opérons cataboliques est assuré par deux boucles régulatrices: la première fonctionnant lorsque les bactéries croissent en présence de benzoate/toluate (impliquant uniquement le tronçon inférieur de dégradation) et la seconde est un système en cascade fonctionnant lorsque les bactéries sont en présence de toluène/xylène (impliquant les tronçons de dégradation supérieur et inférieur) (Ramos, Marques et Timmis, 1997).

1.3.2.2.6.1 Boucle du patron inférieur

Pour les bactéries qui croissent en absence d'effecteur (benzoate/toluate), le gène *xylS* est exprimé à un faible niveau de façon constitutive à partir de son promoteur σ^{70} -dépendant nommé Ps2. En conséquence, une petite quantité de protéine XylS sous une forme inactive ($XylS_i$) est produite (Ramos, Marques et Timmis, 1997). Lorsqu'un effecteur est ajouté au milieu de culture, la protéine $XylS_i$ interagit avec cet effecteur et devient active ($XylS_a$) pour stimuler la transcription des gènes de la voie de dégradation inférieure à partir du promoteur Pm (Gallegos, Marques et Ramos, 1996); le processus d'interaction entre l'effecteur et la protéine conduisant à un régulateur actif n'a pas encore été élucidé. La possibilité de maintenir un haut taux d'expression du promoteur Pm au cours de la période de croissance des bactéries semble impliquer le facteur σ^{70} dans les premiers instants de la phase exponentielle de croissance et le facteur σ^S au cours des derniers instants de cette même phase et lors de la phase stationnaire (Ramos, Marques et Timmis, 1997).

1.3.2.2.6.2 Boucle des patrons supérieur et inférieur

L'élément clé de la régulation de cette boucle est la protéine XylR codée par le gène *xylR*. Ce gène est impliqué dans le contrôle transcriptionnel de la voie catabolique dans les cellules qui croissent en présence de toluène/xylène et il est transcrit à partir de deux promoteurs σ^{70} -dépendants agissant en tandem. Le gène *xylR* est exprimé de façon constitutive (Ramos, Marques et Timmis, 1997) et peut réprimer sa propre expression; le produit génique de *xylR* est en mesure d'entraîner l'activation de la transcription à partir des promoteurs Pu et Ps (Inouye, Nakazawa et Nakazawa, 1983; Inouye, Nakazawa et Nakazawa, 1987). Au départ, la protéine XylR est retrouvée sous forme inactive ($XylR_i$) et se lie à de

l'ADN dit « non actif » en absence d'effecteur (Ramos, Marques et Timmis, 1997): cette interaction ne permet pas d'entraîner l'activation de la transcription (Abril, Buck et Ramos, 1991; de Lorenzo et *al.*, 1991). Lorsque la protéine se lie à un effecteur (toluène/xylène) et à de l'ATP, elle devient alors active (XylR_a) et peut stimuler la transcription à partir du promoteur Pu. Ce processus nécessite une ARN polymérase σ^{54} et une protéine IHF (Integration Host Factor) permettant le repliement de l'ADN (Ramos, Marques et Timmis, 1997). Le site de liaison de l'IHF est situé entre celui de l'activateur et le promoteur. La liaison de l'IHF facilite la formation d'une loupe d'ADN, et permet la liaison de XylR_a à la région UPS (UPStream activation sequences) et l'interaction de l'ARN polymérase σ^{54} (Byrne et Olsen, 1996); la région UPS est aussi appelée « enhancer » (Shingler, Bartilson et Moore, 1993).

La protéine XylR_a peut aussi stimuler l'expression du gène *xylS* en induisant la transcription à partir d'un autre promoteur σ^{54} -dépendant, Ps1 (un des deux promoteurs du gène *xylS*), sans interférer l'expression à partir de Ps2. Ce processus est effectué avec la contribution d'une protéine nommée HU qui permet le repliement de l'ADN (Ramos, Marques et Timmis, 1997). L'activité de Ps est dépendante des effets combinés du repliement intrinsèque de l'ADN et de la formation de coudes d'ADN par la protéine HU (homologue à IHF), permettant ainsi la création de la structure nécessaire du promoteur pour permettre la transcription (Byrne et Olsen, 1996).

Comme résultat, chez les cellules qui croissent en présence de toluène/xylène, le gène *xylS* est exprimé à partir de deux promoteurs: le promoteur Ps2 (de *xylS*) qui est exprimé constitutivement, XylR-indépendant et σ^{70} -dépendant, et le promoteur Ps1 qui est XylR-dépendant et σ^{54} -dépendant. Lorsque le gène *xylS* est surexprimé, la protéine XylS est hyperproduite, et une certaine quantité de XylS devient active. Dans ces conditions, la transcription à partir de Pm est obtenue même en absence d'effecteur (Ramos, Marques et Timmis, 1997).

1.3.2.3 Famille IcIR

Ce groupe représente probablement la plus récente famille découverte parmi les protéines régulatrices régissant l'expression des mécanismes cataboliques pour les composés aromatiques, avec un nombre grandissant de membres représentés. IcIR de *E. coli* est le prototype de cette famille.

1.3.2.3.1 Description des protéines IcIR en domaines

Les études révèlent un site de liaison à l'ADN de type HTH dans le domaine N-terminal de la protéine (Gerischer, Segura et Ornston, 1998; Hugouvieux-Cotte-Pattat et *al.*, 1996; Romero-Steiner et *al.*, 1994; Smith et Chater, 1988; Sunnarborg et *al.*, 1990) et des résidus importants pour l'induction spécifique dans le domaine central (Kok, D'Argenio et Ornston, 1998). Le rôle de la partie C-terminale demeure à élucider: des fonctions d'oligomérisation et d'activation de la transcription ont été suggérées (Gerischer, 2002). Les domaines des protéines de type IcIR sont schématisés à la Figure 1.6.

1.3.2.3.2 PobR et PcaU: régulateurs impliqués dans la dégradation du *p*-hydroxybenzoate, du protocatéchuate, du quinate et du shikimate

La bactérie *Acinetobacter* sp. souche ADP1 (DiMarco, Averhoff et Ornston, 1993), initialement retrouvée dans le sol, est capable d'utiliser une grande variété de composés aromatiques comme sources de carbone et d'énergie (Trautwein et Gerischer, 2001). Cette bactérie possède l'information génétique codant pour les protéines régulatrices PobR et PcaU (Bernati, Kojic et Venturi, 2001); les voies cataboliques régulées par ces protéines ainsi que les patrons de régulation sont schématisés en Figure 1.9. Ces protéines sont des activateurs transcriptionnels qui se ressemblent étroitement au niveau de leur structure primaire, de leur domaine de liaison à l'ADN et de leur fonction physiologique (Kok, D'Argenio et Ornston, 1998). PobR agit à titre d'activateur pour le promoteur du gène *pobA* servant à la dégradation du *p*-hydroxybenzoate et PcaU active la transcription des opérons *pca* et *qui* pour la dégradation du protocatéchuate, du quinate et du shikimate.

1.3.2.3.3 Mode d'action de PcbR

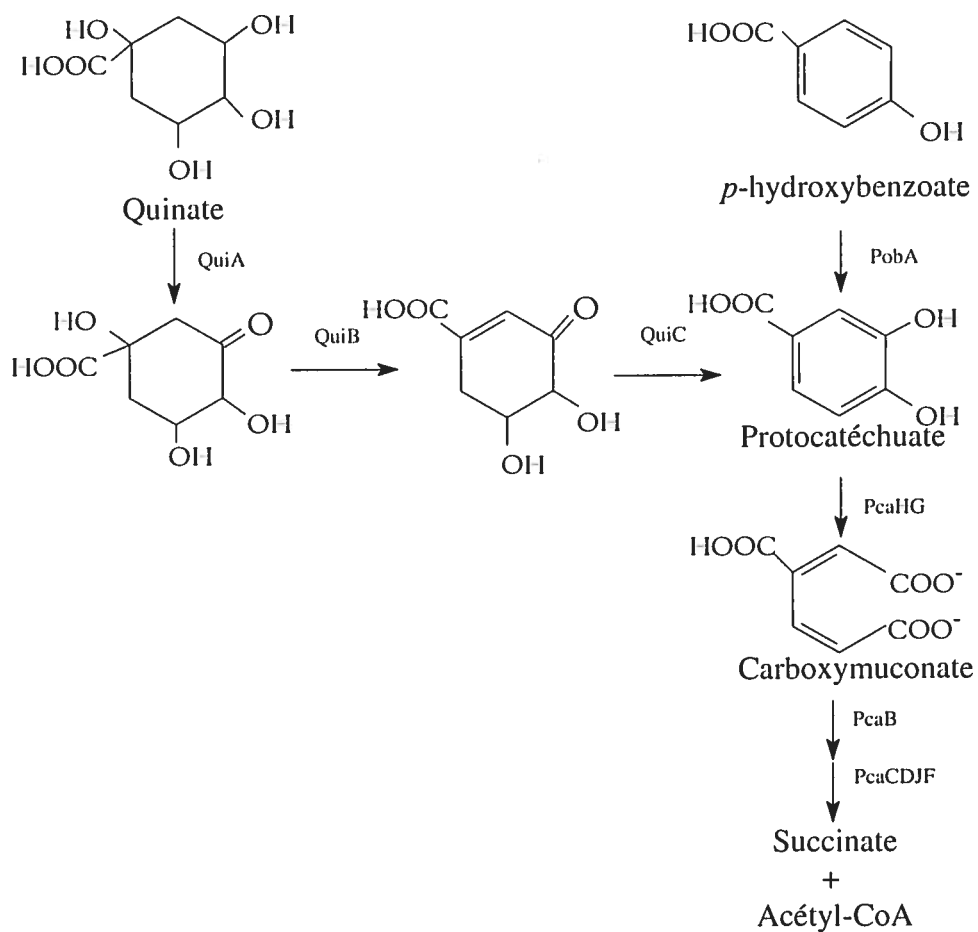
PcbR entraîne la transcription du gène *pobA* codant pour la *p*-hydroxybenzoate hydroxylase (Wong, Dilworth et Glenn, 1994). Pour exercer son action activatrice, PcbR se lie à l'ADN entre les gènes *pobA* et *pobR* (DiMarco et Ornston, 1994) en réponse à la présence d'un inducteur (*p*-hydroxybenzoate), menant à la conversion du *p*-hydroxybenzoate en protocatéchuate. Il a été observé que le protocatéchuate seul n'induit que faiblement (mais significativement) l'activité du promoteur *pobA* (Bernati, Kojic et Venturi, 2001). De plus, PcbR peut réguler négativement sa propre expression (Kok, D'Argenio et Ornston, 1998).

1.3.2.3.4 Mode d'action de PcaU

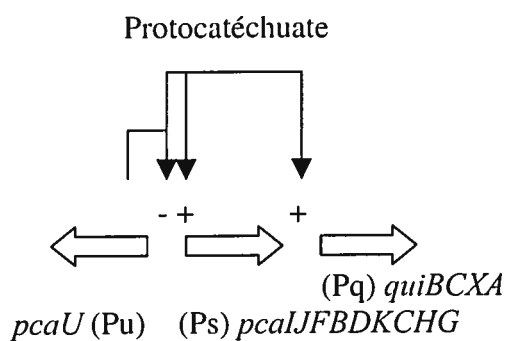
De son côté, PcaU est activée par le protocatéchuate (Bernati, Kojic et Venturi, 2001). Ce composé se fixe à la protéine régulatrice PcaU (Kok, D'Argenio et Ornston, 1998), et cette dernière peut entraîner l'expression des gènes *pcaIJFBDKCHG* impliqués dans le catabolisme du protocatéchuate en intermédiaires du cycle de Krebs (Gerischer, Segura et Ornston, 1998). À des niveaux élevés de protocatéchuate, PcaU permet l'activation de l'expression des gènes *pca*. Dans des conditions contraires, PcaU a un effet répresseur (Trautwein et Gerischer, 2001). Normalement, le promoteur des gènes *pca* a une haute activité de base: cette activité est ajustée à un niveau plus faible en raison de la fonction répressive du régulateur PcaU. PcaU serait en mesure d'exercer une fonction répressive sur son propre promoteur et au niveau du promoteur des gènes *pca*. Sa fonction activatrice ne prendrait place que lorsqu'il y aurait un haut niveau d'inducteur dans le milieu. PcaU se lie en amont de l'opéron *pca* (entre *pcaI* et *pcaU*) et en aval de *pcaU*.

PcaU serait aussi responsable du contrôle l'expression des gènes *qui*. Cet opéron est situé directement en aval des gènes *pca* et transforme le quinate et le shikimate en protocatéchuate (Gerischer, 2002; Gerischer, Segura et Ornston, 1998). Les gènes *qui* sont exprimés en réponse à la présence de protocatéchuate (Canovas et Stanier, 1967; Canovas, Wheelis et Stanier, 1968; Elsemore et Ornston, 1995). On suppose qu'un niveau d'expression de base du promoteur des gènes *qui* est nécessaire pour l'induction de leur transcription (Trautwein et Gerischer, 2001) et que la fixation de PcaU en amont de ces gènes entraîne une augmentation de la transcription.

a)



b)



c)

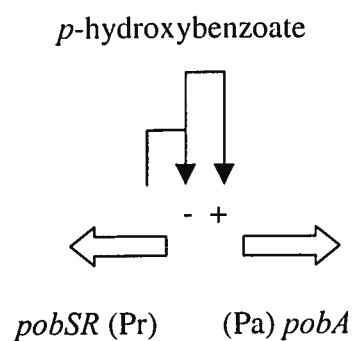


Figure 1.9 : Régulation de la voie catabolique du *p*-hydroxybenzoate, du protocatéchuate, du quinate et du shikimate chez *Acinetobacter* sp. souche ADP1. a) Voies cataboliques b) c) Patrons de régulations.

1.3.3 Protéines régulatrices à action négative

Le Tableau 1.6 décrit les protéines régulatrices à action négative qui sont impliquées dans la régulation de différentes voies cataboliques.

1.3.3.1 Famille GntR

Presque tous les régulateurs des voies cataboliques démontrent leurs effets à titre d'activateurs, à l'exception des protéines de type GntR qui sont exclusivement décrites comme répresseurs (Fujita, Fujita et Miwa, 1990). Le nom donné à cette famille a été choisi d'après le prototype GntR, le répresseur de l'opéron gluconate chez *Bacillus subtilis* (Fujita et al., 1986; Reizer et al., 1991). Aujourd'hui, cette grande famille comprend 270 membres, et les protéines sont classifiées en quatre grandes sous-familles: FadR, HutC, MocR et YtrA. La présence de quelques protéines échappant à la classification des sous-familles suggère que d'autres sous-familles pourraient être identifiées prochainement (Rigali et al., 2002).

1.3.3.1.1 Description de la sous-famille FadR

La sous-famille FadR est la plus représentée à l'intérieur de la famille GntR avec 40% des régulateurs (Rigali et al., 2002). FadR, le prototype, régule l'expression des gènes responsables de la biosynthèse et de la dégradation des acides gras chez *E. coli* (van Aalten et al., 2000); le rôle de FadR chez cette bactérie a tout d'abord été décrit dans les années 1960 (Overath, Pauli et Schraier, 1969). Entre autres, ce facteur de transcription régule négativement les gènes codant pour le transport des acides gras (*fadL* et *fadD*) et pour les enzymes du catabolisme des acides gras (codé par *fadEFGBAH*) (van Aalten et al., 2000).

La plupart des protéines de type FadR sont impliquées dans la régulation de substrats oxydés en lien avec le métabolisme des acides aminés ou dans le métabolisme de divers patrons métaboliques comme celui de l'aspartate (AsnR), du pyruvate (PdhR), du glycolate (ClcC), du galactonate (DgoR), du lactate (LdlR), du malonate (MatR) et du gluconate (GntR) (Rigali et al., 2002).

Tableau 1.6 : Régulateurs appartenant à la famille GntR.

Famille, sous-familles et protéines	Souches	Fonctions cataboliques	Références
GntR			
FadR			
AphS	<i>Comamonas testosteroni</i> TA441	Phénol	Arai et <i>al.</i> , 1999.
BphS	<i>Pseudomonas</i> sp. KKS102	BP/BPC	Ohtsubo et <i>al.</i> , 2001.
ExuR	<i>Escherichia coli</i>	Hexuronate	Robert-Baudouy, Portalier et Stoeber, 1981.
FadR	<i>Escherichia coli</i>	Acides gras	DiRusso, 1988.
GntR	<i>Bacillus subtilis</i>	Gluconate	Fujita et <i>al.</i> , 1986.
VanR	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	Vanillate	Morawski, Segura et Ornston, 2000.
HutC			
HutC	<i>Pseudomonas putida</i>	Histidine	Allison et Phillips, 1990.
TreR	<i>Bacillus subtilis</i>	Tréhalose	Schock et Dahl, 1996.
MocR			
MocR	<i>Rhizobium melilot</i>	Rhizopine	Rosbach et <i>al.</i> , 1994.
PdxR	<i>Streptomyces venezuelae</i>	Phosphate de piridoxal	Magarvey et <i>al.</i> , 2001.
Ytra			
YtrA*	<i>Bacillus subtilis</i>	Acétoïne	Yoshida, Fujita et Ehrlich, 2000.

* répresseur au niveau du transport de l'acétoïne (pas de fonction catabolique)

1.3.3.1.2 Description de la sous-famille HutC

La sous-famille HutC comprend 31% des protéines de type GntR (Rigali et *al.*, 2002). Le prototype, HutC, joue un rôle de répresseur régulant l'utilisation de l'histidine chez *Klebsiella aerogenes* (Schwacha et Bender, 1990; Schwacha et *al.*, 1990) et chez *P. putida* (Allison et Phillips, 1990). Les autres protéines de cette sous-famille peuvent avoir maintes autres fonctions: certaines protéines seraient impliquées dans le transfert de plasmides (par conjugaison) chez une variété de *Streptomyces* (Rigali et *al.*, 2002).

1.3.3.1.3 Description de la sous-famille MocR

La sous-famille MocR comprend 23% des protéines de type GntR (Rigali et *al.*, 2002). Le prototype MocR semble jouer un rôle de répresseur dans la dégradation de la rhizopine chez *Rhizobium meliloti* L5-30 (Rossbach et *al.*, 1994). En général, ces protéines peuvent catalyser le transfert réversible d'un groupe aminé vers un récepteur α -céto acide; les réactions de transamination ont une importance centrale dans le métabolisme des acides aminés et sont en lien avec le métabolisme des carbohydrates (Rigali et *al.*, 2002).

1.3.3.1.4 Description de la sous-famille YtrA

Cette sous famille est la moins peuplée, ne représentant que 6% de la famille GntR. Le prototype YtrA est indiqué comme étant un répresseur au sein du système de transport pour l'utilisation de l'acétoïne chez *Bacillus subtilis* (Yoshida, Fujita et Ehrlich, 2000). La plupart des autres protéines de cette sous-famille sont impliquées dans le même type de régulation (Rigali et *al.*, 2002).

1.3.3.1.5 Description des protéines GntR en domaines

Haydon et Guest (1991) ont été les premiers à décrire la famille GntR. Ils ont présenté les membres de celle-ci comme étant des facteurs de transcription partageant un domaine de liaison à l'ADN de type HTH très similaire en N-terminal; la portion C-terminale servant à la liaison de l'effecteur est plus hétérogène (Rigali et *al.*, 2002). L'organisation des domaines est illustrée à la Figure 1.6.

1.3.3.1.6 GntR: régulateur impliqué dans la dégradation du gluconate

La protéine GntR agit à titre de régulateur négatif au sein de l'opéron gluconate (*gnt*) (Figure 1.10); cette protéine constitue le seul membre de cette famille à être bien caractérisé (Miwa et Fujita, 1988). L'opéron *gnt* code pour les enzymes nécessaires pour la transformation du gluconate en gluconate-6-phosphate chez *Bacillus subtilis*. L'opéron inclue les gènes *gntR*, *gntK*, *gntP* et *gntZ*, codant respectivement pour la protéine GntR, la gluconate kinase, la gluconate perméase et un cadre de lecture ouvert (*gntZ*) de fonction inconnue (Fujita et *al.*, 1986). Des études comparatives ont permis de suggérer que le gène *gntZ* encoderait pour une 6-phosphogluconate déshydrogénase (Reizer et *al.*, 1991).

1.3.3.1.7 Mode d'action de GntR

L'opéron *gnt* est transcrit en un ARNm polycistronique de 5.1 Kb à partir d'un promoteur en amont du gène *gntR*, jusqu'en aval du gène *gntZ*; l'opéron *gnt* est le premier exemple d'un opéron de bactérie Gram positif à être transcrit en un ARNm polycistronique. Après être entré dans la bactérie, le gluconate est phosphorylé en gluconate-6-phosphate via l'opéron gluconate et est ensuite catabolisé via le cycle du pentose (Fujita et *al.*, 1986). La protéine GntR a démontré la capacité de se lier spécifiquement en amont du promoteur de l'opéron *gnt*, pour créer son action répressive. Cette liaison peut être réversible avec l'apport d'antagonistes (Fujita et Miwa, 1989) comme le gluconate ou le glucono- δ -lactone (Yasuhiko et Fujita, 1988). L'inactivation du répresseur GntR par un antagoniste permet ainsi la synthèse d'un long ARNm contenant l'information génétique pour la synthèse des enzymes de la dégradation du gluconate (Fujita, Fujita et Miwa, 1990); la dérégulation peut être contrecarrée par l'ajout de glucose dans le milieu (Miwa et Fujita, 1988) pour retourner à des conditions répressives.

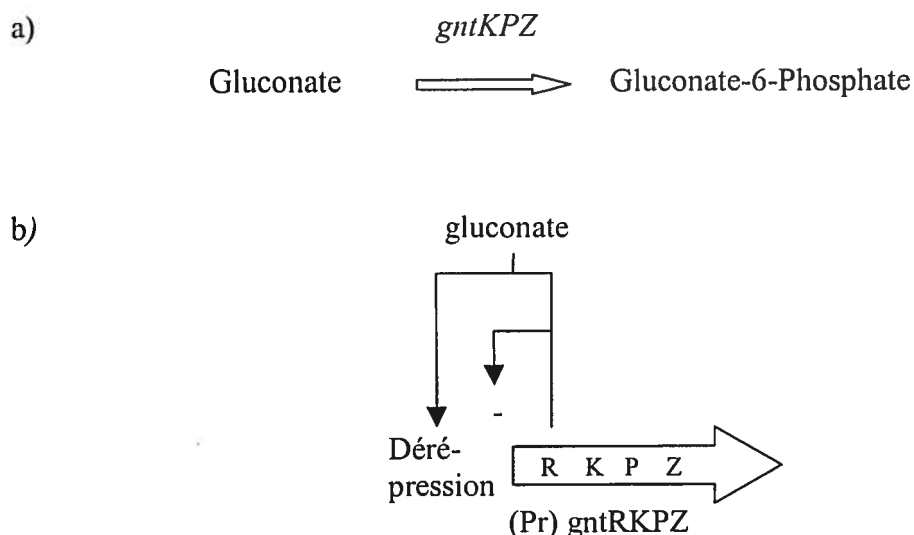


Figure 1.10 : Régulation de la voie catabolique du gluconate chez *B. subtilis*. a) Voie catabolique b) Patron de régulation.

1.4 Régulation de la voie catabolique du biphényle

Jusqu'à maintenant, très peu d'informations sont disponibles concernant les mécanismes de régulation de l'opéron *bph*. Ce dernier contient un gène nommé *orf0* qui code pour une protéine du même nom: Orf0. Par des études de séquences en acides aminés, il a été constaté que Orf0 possédait des homologies significatives avec des régulateurs négatifs appartenant à la famille GntR. Malgré les similitudes de base au niveau de la séquence, certaines études avancent que *orf0* aurait un rôle d'activateur sur l'opéron *bph*, alors que d'autres lui associent un rôle de répresseur (Ohtsubo et *al.*, 2001; Watanabe et *al.*, 2000).

1.4.1 *orf0*, régulateur positif impliqué dans la dégradation du biphényle

1.4.1.1 *orf0* retrouvé chez *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707

La bactérie *P. pseudoalcaligenes* KF707 possède l'opéron *bph* responsable de la dégradation du biphényle/BPC sur son chromosome. Cet opéron est constitué des gènes (*orf0*)*bphA1A2(orf3)bphA3A4BCX0X1X2X3D*. Il a été démontré que la production de Orf0 est induite en présence de biphényle, et que Orf0 a la capacité de se lier à son propre promoteur; cette liaison est améliorée par l'ajout de 2-hydroxy-6-oxo-6-phénylhexa-2,4-diénoate (HOPDA) (Watanabe et *al.*, 2000). Des expériences de mutants *orf0*-nuls ont

démontré une défaillance de cette souche à croître sur le biphényle et une accumulation d'une grande quantité de HOPDA. Ces résultats indiquent que *orf0*, *bphA1A2(orf3)bphA3A4BC* et *bphX0X1X2X3D* seraient transcrits indépendamment, et que Orf0 serait impliquée dans la régulation de l'opéron *bph* chez KF707 et qu'elle serait absolument nécessaire pour l'expression de *orf0* et *bphX0X1X2X3D* (Watanabe et al., 2000).

1.4.2 *orf0*, régulateur négatif impliqué dans la dégradation du biphényle

1.4.2.1 *bphS* retrouvé chez *Pseudomonas* sp. KKS102

La bactérie *Pseudomonas* sp. KKS102 possède aussi l'opéron *bph* pour procéder à la dégradation du biphényle/BPC. Chez cette souche, l'opéron biphényle est constitué des gènes *bphEGF(orf4)A1A2A3BCD(orf1)A4R*. Il a été démontré que l'expression de cet opéron est dépendante du promoteur *pE*, situé en amont du gène *bphE* (Ohtsubo et al., 2001). Un gène nommé *bphS* homologue à *orf0*, ayant de fortes homologues avec les régulateurs négatifs de la famille GntR, a été identifié en amont de *bphE*. Des expériences de retardement sur gel ont démontré que la protéine BphS avait la capacité de se fixer spécifiquement au promoteur *pE* et à quatre autres sites au niveau de l'opéron *bph*; la liaison de BphS peut être abolie en présence de HOPDA. Des expériences avec des mutants *bphS*-nuls ont démontré que l'opéron *bph* était exprimé de façon constitutive, attribuant ainsi un rôle de répresseur négatif à BphS au niveau du promoteur *pE* (Ohtsubo et al., 2001).

1.4.2.2 *orf0* retrouvé chez *Comamonas testosteroni* B-356

Chez *C. testosteroni* B-356, l'opéron *bph* est constitué des gènes suivants: *(orfN)(orf0)bphG**bph**AEorfXFBCD*. Le cadre de lecture ouvert, *orf0*, a été localisé et séquencé. Des essais de retardement sur gel ont démontré que le produit génique de *orf0* se fixait à des séquences potentiellement promotrices situées au sein de l'opéron biphényle (Bellemare, 2000). La présence de biphényle dans le milieu réactionnel n'influence pas la formation des complexes ADN-Orf0, tandis que le benzoate et le 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle en prévient la formation à des degrés divers. Des mutants *orf0*-nuls potentiels ont été produits et ces derniers ont démontré des divergences avec la souche sauvage quant à l'utilisation du biphényle comme seule source de carbone; tout comme *P. pseudoalcaligenes* KF707 (Watanabe et al., 2000), le mutant croît beaucoup plus lentement

que la souche sauvage en présence de biphényle et une grande quantité de HOPDA s'accumule dans le milieu de culture. Avec ces résultats, il est possible d'envisager que la transcription du gène *bphD*, responsable de la dégradation du HOPDA, soit effectuée indépendamment des gènes *bphAEXFBC* (Bellemare, 2000), tout comme *bphG* et *orf0*.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Souches bactériennes et plasmides

La souche *C. testosteroni* B-356 a été isolée à partir d'échantillons de sols contaminés aux BPC (Ahmad, Massé et Sylvestre, 1990) et peut être criblée par la technique de Sylvestre (1980). Grâce à la présence des gènes *bphAEFGBCD* formant l'opéron biphényle sur son chromosome, cette souche est apte à produire les enzymes de dégradation des BP/BPC en benzoate/chlorobenzoates (Sylvestre et *al.*, 1996b).

Pour cette étude, diverses souches bactériennes ont été utilisées. Les souches *E. coli* DH11S (Lin et *al.*, 1992), *E. coli* M15[pREP4] et *E. coli* SG13009[pREP4] (QIAGEN Inc., Chatsworth, Californie) ont servi d'hôtes pour procéder à la réplication des plasmides. Les génotypes des souches bactériennes utilisées se retrouvent au Tableau 2.1. Les plasmides employés sont décrits au Tableau 2.2 et les caractéristiques des vecteurs plasmidiques sont listées dans le Tableau 2.3.

2.2 Milieux et conditions de culture

Les cultures bactériennes pour la production des enzymes de dégradation du biphényle et pour la production de la protéine His-Orf0 étaient effectuées dans du milieu Luria-Bertani (LB) (Sambrook, Fritsch et Maniatis, 1989) sous forme de bouillons. Les différentes souches de *E. coli* étaient incubées à 37°C en aérobose sous agitation pour une période de 18 heures. Les antibiotiques ont été ajoutés aux milieux en fonction des plasmides insérés dans les souches de *E. coli*: ampicilline 100 µg/mL (pQE31), kanamycine 25 µg/mL (pDB31 ou pREP4).

Tableau 2.1 : Description des géotypes des souches bactériennes utilisées.

Souches	Caractéristiques*	Référence
<i>E. coli</i> DH11S	<i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsd RMS-mcrBC)$ $\Delta(lac-proAB)$ $\Delta(recA1398)$ <i>deoR</i> <i>rpsL srl thi supE</i> F' <i>proAB</i> ⁺ <i>lacIqZ</i> Δ M15	Lin et al., 1992.
<i>E. coli</i> M15[pREP4]	Nal ^S , Str ^S , Rif ^S , <i>lac</i> ⁻ , <i>ara</i> ⁻ , <i>gal</i> ⁻ , <i>mtl</i> ⁻ , F ⁻ , <i>recA</i> ⁺ , <i>uvr</i> ⁺	Zamenhof et Villarejo, 1972.
<i>E. coli</i> SG13009[pREP4]	Nal ^S , Str ^S , Rif ^S , <i>lac</i> ⁻ , <i>ara</i> ⁻ , <i>gal</i> ⁻ , <i>mtl</i> ⁻ , F ⁻ , <i>recA</i> ⁺ , <i>uvr</i> ⁺ , <i>lon</i> ⁺	Gottesman, Halpern et Trisler, 1981.

*Abréviations :

mcrA : Mutation empêchant les coupures par des enzymes de restriction aux séquences d'ADN méthylées en 5'-CmCGG-3'; *mrr* : Mutation empêchant les coupures par des enzymes de restriction aux séquences d'ADN méthylées en 5'-CmAG-3' ou 5'-GmAC-3'; *hsd* : Sans restriction aux sites *EcoK* I non méthylés et sans méthylation aux sites *EcoK* I; *mcrBC* : Mutation empêchant les coupures par des enzymes de restriction aux séquences d'ADN méthylées en 5'-GmC-3'; *lac* : Lactose; *pro* : Proline; *rec* : Recombinaison; *deo* : Mutant de régulation permettant la synthèse constitutive des gènes impliqués dans la synthèse de déoxyribose; *rpsL* : Résistance à la streptomycine via une mutation de la protéine ribosomale 30S; *srl* : Sorbitol; *thi* : Thiamine; *sup* : Suppression; Nal : Acide nalidixique; Str : Streptomycine; Rif : Rifampicine; *ara* : Arabinose; *gal* : Galactose; *mtl* : Mannitol; F : Facteur F (épisode); *uvr* : Résistance aux U.V.; *lon* : Expression de la protéase *lon*.

Tableau 2.2 : Description des divers plasmides employés lors de cette étude.

Enzymes de la voie catabolique du biphényle

Insert	Provenance	Vecteur	Sites d'ancrage	Bactérie hôte
<i>bphAE</i>	LB400	pDB31	<i>Bam</i> HI- <i>Kpn</i> I	<i>E. coli</i> M15[pREP4]
<i>bphF</i>	B-356	pQE31	<i>Bam</i> HI- <i>Kpn</i> I	<i>E. coli</i> SG13009[pREP4]
<i>bphG</i>	B-356	pQE31	<i>Bam</i> HI- <i>Kpn</i> I	<i>E. coli</i> M15[pREP4]
<i>bphB</i>	B-356	pQE31	<i>Bam</i> HI- <i>Kpn</i> I	<i>E. coli</i> SG13009[pREP4]
<i>bphC</i>	B-356	pQE31	<i>Sac</i> I- <i>Kpn</i> I	<i>E. coli</i> M15[pREP4]

Production de la protéine Orf0

Insert	Provenance	Vecteur	Sites d'ancrage	Bactérie hôte
<i>orf0</i>	B-356	pQE31	<i>Bam</i> HI- <i>Kpn</i> I	<i>E. coli</i> M15[pREP4]

Production des sondes pour les essais de retardement sur gel et de protection à la DNase

Insert	Provenance	Vecteur	Sites d'ancrage	Bactérie hôte
<i>bphA</i>	B-356	pUC19	<i>Sma</i> I- <i>Sma</i> I	<i>E. coli</i> M15[pREP4]
<i>orf0-orfN</i>	B-356	pUC18	<i>Eco</i> R1- <i>Eco</i> R1	<i>E. coli</i> DH11S

Tableau 2.3 : Caractéristiques des vecteurs plasmidiques utilisés pour cette étude.

Vecteurs	Caractéristiques	Références
pUC18	Vecteur de clonage de 2,7 Kb, Amp ^R , promoteurs <i>lac</i> , <i>lacZ</i> et cassette de clonage.	ATCC
pUC19	Vecteur de clonage de 2,7 Kb, Amp ^R , promoteurs <i>lac</i> , <i>lacZ</i> et cassette de clonage.	Yanisch-Perron, Viera et Messing, 1985.
pDB31	Vecteur d'expression de 3,5 Kb, Kan ^R , promoteur phage T5, origine de réplication p15A, opérateur <i>lac</i> , étiquette histidine et cassette de clonage.	Barriault et Sylvestre, 1999.
pQE31	Vecteur d'expression de 3,4 Kb, Amp ^R , promoteur phage T5, origine de réplication ColE1, opérateur <i>lac</i> , étiquette histidine et cassette de clonage.	QIAGEN Inc.
pREP4	Vecteur de répression de 3,7 Kb, Kan ^R et répresseur <i>lac</i> .	QIAGEN Inc.

Amp^R : résistance à l'ampicilline; Kan^R : résistance à la kanamycine; *lac* : lactose.

2.3 Expression, purification et quantification des enzymes de la voie catabolique du biphényle

2.3.1 Expression

L'expression des enzymes de la voie catabolique fut effectuée en utilisant les constructions décrites au Tableau 2.2. Les souches *E. coli* M15[pREP4] et *E. coli* SG13009[pREP4] ont servi d'hôtes pour effectuer la réplication des plasmides. Les constructions plasmidiques permettaient l'expression des protéines, auxquelles une chaîne d'histidines (ht) était fixée. Toutes les constructions étaient telles que la queue ht ajoutait les mêmes 13 acides aminés (MRGSHHHHHHTDP) dans la portion N-terminale de la protéine (Barriault et *al.*, 2001). Les enzymes marquées à l'étiquette histidine étaient exprimées chez *E. coli* en suivant les protocoles déjà établis (Hurtubise et *al.*, 1995; Hurtubise, Barriault et Sylvestre, 1996).

2.3.2 Purification

Les purifications furent effectuées par chromatographie d'affinité sur une matrice de nickel-nitrilotriacétate (Ni-NTA) avec la trousse QIAexpress (QIAGEN Inc.). Chacune des enzyme était purifiée en suivant les procédures précédemment décrites (Chebrou et *al.*, 1999; Hurtubise et *al.*, 1995; Hurtubise, Barriault et Sylvestre, 1996).

2.3.3 Quantification

Les concentrations des préparations de ht-ISP_{BPH} ont été déterminées au spectrophotomètre en utilisant la valeur de $\epsilon_{455} = 8\,300\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Hurtubise, Barriault et Sylvestre, 1996). Les autres préparations de protéines ht employées dans cet ouvrage ont été quantifiées selon les valeurs des coefficients d'extinction molaire comme décrit précédemment (Hurtubise et *al.*, 1995; Vedadi et *al.*, 2000). La pureté des protéines était vérifiée sur gel SDS-PAGE 12,5% (Laemmli, 1970) coloré au bleu de Coomassie (Sambrook, Fritsch et Maniatis, 1989).

2.4 Expression, purification et quantification de la protéine His-Orf0 en conditions non dénaturantes

2.4.1 Expression

La protéine Orf0 fut exprimée en tant que protéine de fusion (ht) par des cultures de *E. coli* M15[pREP4] contenant *orf0* cloné dans vecteur pQE31, comme décrit au Tableau 2.2. À quatre litres de milieu de culture LB contenant les antibiotiques appropriés (ampicilline 100 µg/mL et kanamycine 25 µg/mL) étaient ajoutés 80 mL d'une pré-culture (16 heures à 37°C) cultivée dans un milieu identique avec les mêmes concentrations d'antibiotiques. Les quatre litres étaient mis sous agitation à 37°C jusqu'à l'obtention d'une densité optique de 1,2 à une longueur d'onde de 600 nm (le milieu LB stérile servait de blanc). Par la suite, de l'isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) était ajouté à une concentration de 1,5 mM pour permettre l'induction de la transcription dans les cellules. Les cultures étaient réincubées pour trois heures, à 37°C sous agitation constante.

2.4.2 Purification et quantification

Après le temps requis pour l'induction, les bactéries étaient récupérées par centrifugation à 4°C (rotor GSA, 10 minutes, 8000 rpm). Les culots obtenus étaient récupérés dans environ 150 mL de tampon de sonication (tampon sodium-phosphate 50 mM pH 8,0, imidazole 10 mM, glycérol 10%, NaCl 300 mM), puis recentrifugés dans les mêmes conditions; le culot final était congelé à -80°C jusqu'au lendemain. Le jour suivant, une fois dégelé sur glace, le culot était resuspendu dans 80 mL de tampon de sonication. Les cellules étaient ensuite soniquées pour libérer les protéines, et le lysat fut centrifugé à 4°C (rotor SS-34, 60 minutes, 18 000 rpm) pour en récupérer le surnageant qui contenait les protéines de fusion.

La purification était effectuée par chromatographie d'affinité sur une colonne de Ni-NTA (QIAGEN Inc.). Un volume de 400 µL de résine était préalablement équilibré avec le tampon de sonication pendant 30 minutes à 4°C. Par la suite, le lysat était mis en contact avec la résine lors d'une agitation circulaire à 4°C pour une période de trois heures; le mélange lysat-résine était ensuite déposé sur colonne. La matrice de Ni-NTA possède une grande sélectivité et affinité envers les molécules qui possèdent une queue d'histidines, et permet

ainsi de retenir la protéine d'intérêt et d'éluer les contaminants. Suite au passage du lysat dans la colonne, trois volumes de 15 mL de tampon de lavage (tampon sodium-phosphate 50 mM pH 6,0, imidazole 20 mM, glycérol 10%, NaCl 300 mM) étaient ajoutés. La protéine était ensuite récupérée en différentes fractions en effectuant une élution à l'imidazole. Puisque l'imidazole a une structure très similaire aux résidus histidine retrouvés sur la protéine, il peut lui aussi se lier aux ions nickels de la matrice et déloger la protéine d'intérêt. L'élution était faite en employant des concentrations croissantes d'imidazole en fractions de 500 μ L. Les trois premières fractions furent récupérées avec de l'imidazole 250 mM, suivi de l'imidazole 400 mM (fractions 4 et 5), puis de l'imidazole 500 mM pour les fractions suivantes (6 à 10). Les différentes fractions protéiques recueillies furent déposées sur un gel SDS-PAGE 12,5% pour analyse (Laemmli, 1970) et colorées au bleu de Coomassie (Sambrook, Fritsch et Maniatis, 1989). Les fractions d'intérêt étaient dosées selon le protocole de Lowry et *al.* (1951) en utilisant un standard d'albumine bovine.

2.5 Production, dosage et analyse des métabolites

2.5.1 Production de métabolites par voie enzymatique et dosage

Les métabolites 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle, 2,3-dihydroxybiphényle et 2-hydroxy-6-oxo-6-phénylhéxa-2,4-diénoate furent obtenus par transformation enzymatique du biphényle tel qu'illustré en Figure 1.3. Les réactions pouvaient nécessiter plusieurs enzymes dont les protéines BphAE, BphF, BphG, BphB et BphC, constituant dans l'ordre les composantes de l'oxygénase terminale du biphényle, la ferrédoxine, la ferrédoxine réductase, la 2,3-dihydrodiol déshydrogénase et la 2,3-dihydroxybiphényle-1,2-dioxygénase, toutes purifiées avec une étiquette de six histidines.

2.5.1.1 Préparation du 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle

Le milieu réactionnel était constitué de 10 μ mole de NADH, 54 nmole de FeSO₄ et de 30 nmole de chacune des composantes de la dioxygénase du biphényle. Du tampon d'acide 2-(4-morpholino)-éthane sulfonique (MES) 50 mM pH 6,0 a été ajouté pour compléter le volume de la réaction à 5 mL. La réaction de transformation du biphényle en 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle était initiée par l'ajout de 2,5 μ moles de biphényle (Aldrich Chemicals [Milwaukee, Wisconsin]) suspendus dans 50 μ L d'acétone. Le mélange réactionnel

était ainsi mis sous agitation à 37°C pour une durée de 20 minutes. Après incubation, le mélange était filtré sur laine de verre pour permettre d'éliminer toutes traces de biphenyle. Le métabolite était par la suite extrait à trois reprises dans un volume de 10 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique était recueillie et passée sur colonne de sulfate d'ammonium afin d'éliminer les traces d'eau non évaporée. Finalement, le métabolite était évaporé à sec pour être ensuite resolubilisé dans un volume moindre d'acétone (100 µL). À noter que dans les essais préliminaires de retardement sur gel, les métabolites étaient solubilisés dans du diméthylsulfoxyde (DMSO). Le DMSO entraînant des faux positifs, l'acétone a été choisie comme alternative valable pour remédier à ce problème.

2.5.1.2 Préparation du 2,3-dihydroxybiphényle

La méthode de préparation du 2,3-dihydroxybiphényle s'apparente à celle employée pour la production de 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle. Pour cette réaction, le mélange réactionnel était effectué dans une solution de bicine 50 mM, pH 9,0, et contenait 10 µmoles de NAD⁺ et 6 nmoles de l'enzyme BphB. Les autres composantes de la réaction étaient identiques à celles employées pour la production du 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle. L'extraction du métabolite était effectuée selon un protocole identique à celui utilisé pour le 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle.

2.5.1.3 Préparation de l'acide 2-hydroxy-6-oxo-6-phénylhéxa-2,4-diénoïque (HOPDA)

La production de l'acide 2-hydroxy-6-oxo-6-phénylhéxa-2,4-diénoïque était effectuée à partir du 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle dans une solution de bicine 50 mM, pH 9,0, avec l'ajout de 10 µmoles de NAD⁺ et de 6 nmoles de chacune des enzymes BphB et BphC. Pour ce métabolite, l'extraction était réalisée à pH acide (entre 4,5 et 5,5), nécessitant l'ajout de HCl. Cinq extractions à l'acétate d'éthyle étaient effectuées puisque ce métabolite était difficile à récupérer. Finalement, le HOPDA fut dissous dans un volume minimal d'acétone.

2.5.1.4 Dosage des métabolites produits par voie enzymatique

La concentration des métabolites était évaluée par leur transformation enzymatique en HOPDA. La réaction était effectuée dans du tampon bicine 50 mM pH 9,0 avec un volume final de 200 μ L. Pour la quantification du 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle, la réaction était réalisée en présence de 100 nmole de NAD⁺, 6 nmole de BphB, 6 nmole de BphC et 1 μ L de métabolite à quantifier. L'évaluation de la concentration de 2,3-dihydroxybiphényle s'effectuait de la même façon que pour son précurseur à l'exception que le NAD⁺ et l'enzyme BphB n'étaient pas ajoutés à la réaction; la quantification du HOPDA s'effectuait en ajoutant seulement 1 μ L du métabolite solubilisé dans 199 μ L du tampon bicine.

Les échantillons à doser étaient incubés pour une durée de deux minutes à une température de 37°C. Par la suite, 800 μ L de tampon bicine 50 mM pH 9,0 étaient ajoutés au mélange et les produits obtenus par conversion enzymatique étaient dosés par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 434 nm en employant la valeur déterminée pour le coefficient d'extinction molaire de 22 000 M⁻¹cm⁻¹ pour le HOPDA. Les concentrations de 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle et de 2,3-dihydroxybiphényle étaient ainsi évaluées en quantifiant le produit final (HOPDA), en assumant que le métabolite à quantifier était totalement converti en HOPDA, ce qui a déjà été établi (Barriault et *al.*, 1998).

2.5.1.5 Analyse des métabolites produits par voie enzymatique

La pureté des métabolites obtenus par voie enzymatique était vérifiée par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse (GC/MS) avec un chromatographe en phase gazeuse modèle HP 6890 de Hewlett-Packard, équipé d'un détecteur sélectif de masse HP5973 et d'une colonne capillaire Hewlett-Packard HP5, en utilisant les protocoles décrits précédemment (Hurtubise, Barriault et Sylvestre, 1998). Pour l'analyse, le 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle et le 2,3-dihydroxybiphényle étaient couplés à l'acide butyl boronique tandis que le HOPDA était traité au N,O-bis(triméthylsilyl)-trifluoroacétamide (BSTFA), pour générer des dérivés triméthylsilyl (TMS) (Bergeron et *al.*, 1994).

2.5.1.5.1 Couplage à l'acide butyl boronique

Dans un volume de 248 μL d'acétone, 2 μL du métabolite étaient solubilisés. Par la suite, 125 nmoles d'acide butyl boronique étaient ajoutés (à partir d'une solution de 25 mM diluée dans l'acétone). Le couplage était effectué à température ambiante pour une durée de 30 minutes. Le métabolite était ensuite évaporé à sec et redissous dans 100 μL d'hexane pour être analysé comme décrit précédemment (Sylvestre et *al.*, 1996a).

2.5.1.5.2 Couplage au BSTFA

Pour cette réaction, 5 μL d'échantillon étaient solubilisés dans 100 μL d'acétonitrile et 100 μL de la solution de BSTFA. Le couplage était effectué à 72°C pour une durée de 30 minutes. Le métabolite était ensuite évaporé à sec et redissous dans 100 μL d'hexane, puis analysé comme décrit par Hurbutise et *al.* (1995).

2.5.2 Production de métabolites à partir de mélanges commerciaux

2.5.2.1 Préparation et dosage du benzoate et du catéchol

Les métabolites ont été produits à partir de cristaux obtenus commercialement. Le benzoate provenait de la compagnie Aldrich Chemicals (Milwaukee, Wisconsin) alors que le catéchol provenait de Sigma Chemicals (St-Louis, Missouri). Ces derniers ont été solubilisés dans de l'acétone à diverses concentrations pour les essais de retardement sur gel, les concentrations s'échelonnant de 25 mM à 1 M. Les concentrations de benzoate et de catéchol étaient calculées à partir du poids des cristaux purifiés utilisés pour produire les solutions (Barriault et *al.*, 1999).

2.6 Techniques de biologie moléculaire

2.6.1 Synthèse d'oligonucléotides

Les différents oligonucléotides utilisés pour la production de sondes dans cette étude ont été synthétisés par le service de production d'oligonucléotides de l'INRS-Institut Armand-Frappier (Laval, Qc).

2.6.2 Amplification *in vitro* de fragments d'ADN (PCR)

2.6.2.1 Production des sondes 1, 2, 3 et 4 pour les essais préliminaires de retardement sur gel

Les sondes employées pour les essais de retardement sur gel étaient amplifiées avec la trousse Taq DNA Polymérase (Roche, Inc.). Le mélange réactionnel, préparé sur glace, était constitué du tampon PCR MgCl₂ 1X (Roche Inc.), 25 µmole de dNTP (Amersham Pharmacia Biotech Inc.), 50 pmole de chacune des amorces, 100 ng d'ADN cible, 1U de Taq polymérase (Roche, Inc.) et de 72 µL d'eau pour compléter le mélange réactionnel à un volume de 100 µL. Le mélange était par la suite recouvert de 70 µL d'huile minérale stérile pour éviter l'évaporation lors de la réaction de polymérisation en chaîne.

Les sondes 1 et 2 ont été amplifiées à partir d'un fragment de 5,2 Kb situé en amont du gène *bphG* inséré dans le vecteur pUC18, tandis que les sondes 3 et 4 sont produites à partir d'un fragment de 2,7 Kb situé en amont du gène *bphA* inséré dans le vecteur pUC19 (constructions décrites au Tableau 2.2); la localisation des fragments de 5,2 Kb et 2,7 Kb est schématisée en Figure 2.1. La position des sondes 1 à 4 au sein de l'opéron *bph* ainsi que celle des autres sondes qui seront ultérieurement décrites sont illustrées à la Figure 2.2. Les amorces utilisées pour procéder aux amplifications spécifiques sont décrites au Tableau 2.4.

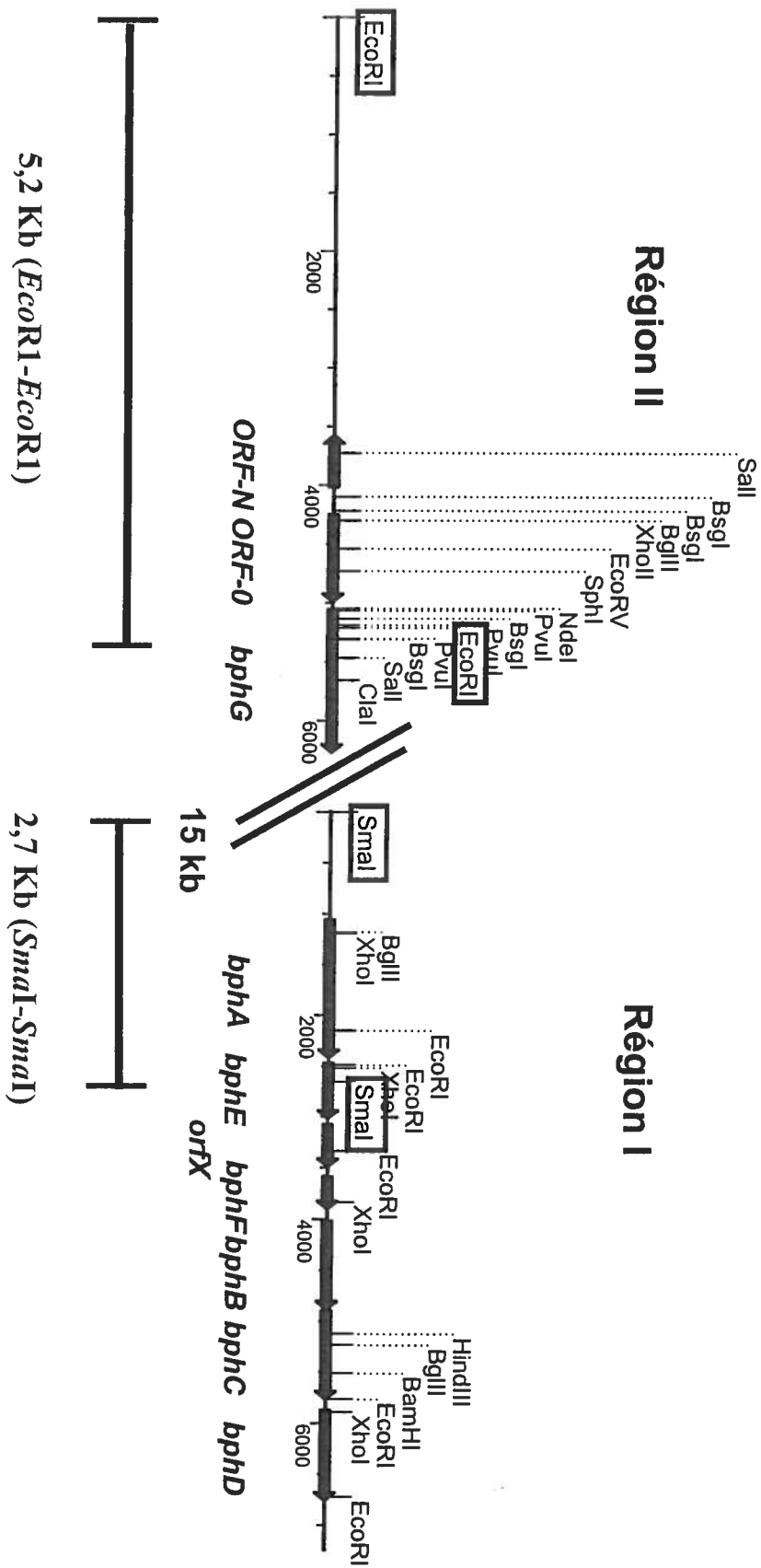


Figure 2.1 : Localisation au sein de l'opéron *bph* des fragments d'ADN de 5,2 Kb et de 2,7 Kb servants à l'amplification génique.

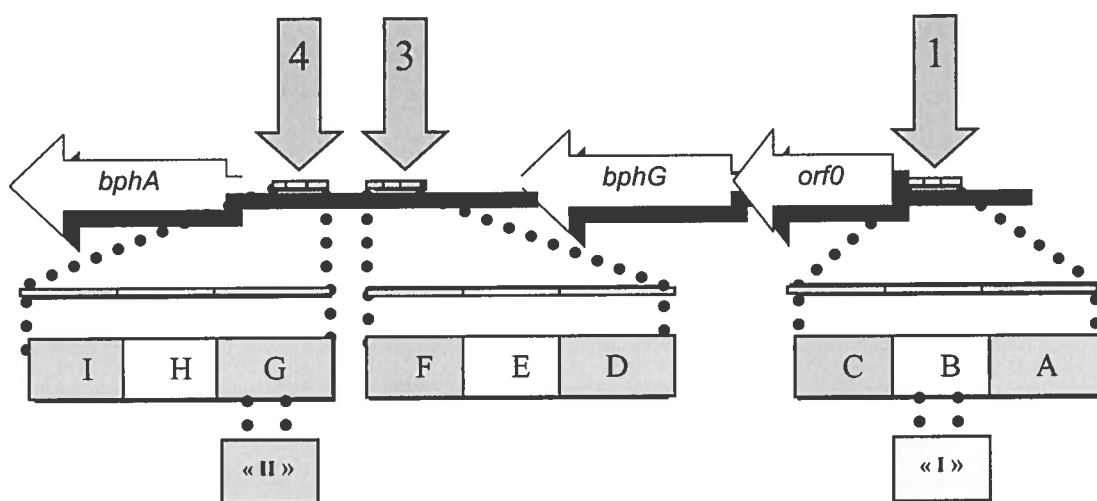


Figure 2.2 : Localisation des sondes 1, 2, 3 et 4; A, B, C, D, E, F, G, H et I; « I » et « II », au sein de l'opéron *bph*.

Tableau 2.4 : Description des oligonucléotides utilisés lors de l'amplification des fragments d'ADN pour la production des sondes 1, 2, 3 et 4.

Amorce	Séquence	Description
I	5' GTGATAGTTGGTGCGCAGCC 3'	Hybride en 5' de la sonde 1
II	5' GTGATAGGCGGATTCGATCA 3'	Hybride en 3' de la sonde 1
III	5' CATTGCGCGATCTTCGAGGC 3'	Hybride en 5' de la sonde 2
IV	5' GATCGTACGCTGGCTCAGTT 3'	Hybride en 3' de la sonde 2
V	5' TCGAACTCATGATTTCACTG 3'	Hybride en 3' de la sonde 4
VI	5' TAAGTAAGGCCGCGAGCATT 3'	Hybride en 5' de la sonde 4
VII	5' AATGCTCGCGGCCTTACTTA 3'	Hybride en 3' de la sonde 3
IX	5' CAGCAGCGGTCGAAGATGAT 3'	Hybride en 5' de la sonde 3

L'amplification des fragments était initiée par une dénaturation totale des fragments d'ADN pendant trois minutes à 95°C. Par la suite, le programme s'enchaînait avec une série de 30 cycles de dénaturation (une minute à 94°C), d'hybridation (une minute à 58°C) et d'élongation (deux minutes à 72°C), le tout se terminant par une élongation finale de dix minutes à 72°C.

2.6.2.2 Production des sondes A, B, C, D, E, F, G, H et I pour les essais secondaires de retardement sur gel

Ces sondes étant de plus petites tailles, l'utilisation de la trousse Expand High Fidelity PCR System (Roche Inc.), contenant un mélange des polymérases Taq et Pow, était justifiée puisqu'il était devenu nécessaire d'employer une trousse d'amplification enzymatique plus apte à produire les fragments avec un minimum d'erreurs. Le mélange réactionnel préparé sur glace contenait le tampon PCR MgCl₂ 1X (Roche Inc.), 25 µmole de dNTP (Amersham Pharmacia Biotech Inc.), 50 pmole de chacun des oligonucléotides, 100 ng d'ADN cible, 1 U d'Expand High Fidelity (Roche Inc.), le tout complété à 100 µL avec de l'eau stérile. 70 µL d'huile minérale ont été ajoutés au dessus du mélange réactionnel.

Les sondes A, B et C étaient amplifiées à partir du fragment de 5,2 Kb inséré dans le vecteur pUC18 tandis que les sondes D, E, F, G, H et I étaient produites à partir du fragment de 2,7 Kb inséré dans le vecteur pUC19. La position de ces sondes au sein de l'opéron *bph* est illustrée à la Figure 2.2. Les amorces utilisées pour procéder aux réactions de polymérisation sont listées au Tableau 2.5.

L'amplification des fragments était initiée par une dénaturation totale des fragments d'ADN pendant 15 minutes à 95°C. Par la suite, le programme s'enchaînait avec une série de 30 cycles de dénaturation (une minute à 94°C), d'hybridation (une minute à 58°C) et d'élongation (une minute à 72°C), le tout se terminant par une élongation finale de dix minutes à 72°C.

2.6.2.3 Production de sondes A*, B*, F* et G* pour les essais de protection à la DNase

Les sondes furent produites en utilisant la trousse d'amplification Cloned Pfu DNA Polymerase (Stratagene Inc.). Cette enzyme a été choisie dû au fait qu'elle permet la production d'extrémités à bouts francs, ce qui est nécessaire pour une étape ultérieure de marquage de l'ADN. Le mélange réactionnel, préparé sur glace, contenait le tampon PCR MgCl₂ 1X (Stratagene Inc.), 25 µmole de dNTP (Amersham Pharmacia Biotech Inc.), 50 pmole de chacun des oligonucléotides, 100 ng d'ADN cible, 5 U de Pfu DNA Polymerase

(Stratagene Inc.), le tout complété à 100 μ L avec de l'eau stérile. De l'huile minérale était ajoutée au dessus du mélange réactionnel.

Tableau 2.5 : Description des oligonucléotides utilisés lors de l'amplification des fragments d'ADN pour la production des sondes A, B, C, D, E, F, G, H et I.

Amorce	Séquence	Description
1a	5' GTGATAGTTGGTGCGCAGCC 3'	Hybride en 5' de la sonde A
1ac	5' CAAGGGTTCTGCACTTACTG 3'	Hybride en 3' de la sonde A
1b	5' CTAGGTGAGAATGGTTGATG 3'	Hybride en 5' de la sonde B
1bc	5' GGACAGATCTCATCGTTTCC 3'	Hybride en 3' de la sonde B
1c	5' CAGTAAGTGCAGAACCCTTG 3'	Hybride en 5' de la sonde C
1cc	5' GTGATAGGCGGATTCGATCA 3'	Hybride en 3' de la sonde C
3a	5' CAGCAGCGGTCTGAAGATGAT 3'	Hybride en 5' de la sonde D
3ac	5' ACCTGCTCAATCGCCATTTC 3'	Hybride en 3' de la sonde D
3b	5' GGAAACGAACTCACGAACGA 3'	Hybride en 5' de la sonde E
3bc	5' AGGTGAATTATCGACAGATG 3'	Hybride en 3' de la sonde E
3c	5' CGTTTCTCCGATCAGGCCGA 3'	Hybride en 5' de la sonde F
3cc	5' AATGCTCGCGGCCTTACTTA 3'	Hybride en 3' de la sonde F
4a	5' TAAGTAAGGCCGCGAGCATT 3'	Hybride en 5' de la sonde G
4ac	5' GTCTTCAATGGCGAAGCTGC 3'	Hybride en 3' de la sonde G
4b	5' TTATTACTTAGGAATGGTGG 3'	Hybride en 5' de la sonde H
4bc	5' TACTATCGTTTCGATACTAG 3'	Hybride en 3' de la sonde H
4c	5' CAGGCACACATCGAATCATC 3'	Hybride en 5' de la sonde I
4cc	5' TCGAACTCATGATTTCACTG 3'	Hybride en 3' de la sonde I

Les sondes A* et B* furent amplifiées à partir du fragment de 5,2 Kb inséré dans le vecteur pUC18 tandis que les sondes F* et G* furent produites à partir du fragment de 2,7 Kb inséré dans le vecteur pUC19. La liste des amorces pour ces réactions se retrouve au Tableau

2.6. La localisation des sondes A*, B*, F* et G* est la même que pour les sondes A, B, F et G produites précédemment et schématisées en Figure 2.2.

L'amplification des fragments était initiée par une dénaturation totale des fragments d'ADN pendant trois minutes à 95°C. Par la suite, le programme s'enchaînait avec une série de 30 cycles de dénaturation (une minute à 94°C), d'hybridation (une minute à 58°C) et d'élongation (une minute à 72°C), le tout se terminant par une élongation finale de dix minutes à 72°C.

Tableau 2.6 : Description des oligonucléotides utilisés lors de l'amplification des fragments d'ADN pour la production des sondes A*, B*, F* et G*.

Amorce	Séquence	Description
1aEcoR1	5' GGAATTCCGTGATAGTTGGTGCGCAGCC 3'	H. en 5' de la sonde A*
1ac	5' CAAGGGTTCTGCACTTACTG 3'	H. en 3' de la sonde A*
1bEcoR1	5' GGAATTCCCTAGGTGAGAATGGTTGATG 3'	H. en 5' de la sonde B*
1bc	5' GGACAGATCTCATCGTTTCC 3'	H. en 3' de la sonde B*
3cEcoR1	5' GGAATTCCCGTTTCTCCGATCAGGCCGA 3'	H. en 5' de la sonde F*
3cc	5' AATGCTCGCGGCCTTACTTA 3'	H. en 3' de la sonde F*
4aEcoR1	5' GGAATTCCTAAGTAAGGCCGCGAGCATT 3'	H. en 5' de la sonde G*
4ac	5' GTCTTCAATGGCGAAGCTGC 3'	H. en 3' de la sonde G*

H : hybride

2.6.3 Purification des produits PCR

2.6.3.1 Purification des sondes 1, 2, 3 et 4

Les produits d'amplification étaient déposés sur gel d'agarose 1,5%. La migration était effectuée dans du tampon TBE 1X à une intensité de 100V. La purification des

fragments était réalisée par élution sur gel avec la trousse QIAEX II® Gel Extraction System (QIAGEN Inc.) et était suivie d'une précipitation à l'éthanol 100% pour une période de 18 heures à -20°C. L'ADN était resolubilisé dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH 8,5.

2.6.3.2 Purification des sondes A, B, C, D, E, F, G, H et I

Les produits d'amplification étaient déposés sur gel d'agarose 2% et la migration était effectuée dans du tampon TBE 1X à une intensité de 100V. Les fragments obtenus furent purifiés par élution sur gel avec la trousse QIAEX II® Gel Extraction System (QIAGEN Inc.) et précipités à l'éthanol.

2.6.3.3 Purification des sondes A*, B*, F* et G*

Les produits d'amplification furent déposés sur gel d'agarose 2%. La migration était effectuée dans du tampon TBE 1X à une intensité de 100V. L'enzyme Pfu produisant des amplifications sans contaminant, les fragments obtenus étaient purifiés avec la trousse High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Inc.) et précipités à l'éthanol.

2.6.4 Production des sondes « I » et « II » pour les essais tertiaires de retardement sur gel

Les oligonucléotides constituant les sondes « I » et « II » provenaient de séquences retrouvées respectivement à l'intérieur des sondes 1 et 4 employées pour les essais de retardement sur gel. Ces séquences ont été choisies pour les essais puisqu'elles démontraient une forte homologie envers des séquences consensus répondant positivement à des essais de retardement sur gel (Ohtsubo et *al.*, 2001; Watanabe et *al.*, 2000). Les sondes « I » et « II » furent produites par hybridation de deux séquences d'oligonucléotides complémentaires (Tableau 2.7). Les fragments complémentaires, à quantité de 100 pmole chacun, étaient mélangés puis bouillis cinq minutes. Par la suite, ces derniers furent incubés à 22°C pour une durée de 30 minutes pour qu'ils puissent s'hybrider.

Tableau 2.7 : Description des oligonucléotides utilisés lors de la production des sondes « I » et « II » par hybridation.

Fragment	Séquence	Description
Oligo I_ORFO/ ORFO443	5' CATCGAGATTTATGCAGATTAGACTAAC 3'	Sonde I
Complément inverse I	5' GTTAGTCTAATCTGCATAAATCTCGATG 3'	Sonde I
Oligo II_ORFO/ BphA	5' TAAAATATCGAGATTATTACTTAGG 3'	Sonde II
Complément inverse II	5' CCTAAGTAATAATCTCGATATTTTA 3'	Sonde II

2.6.5 Marquage des sondes d'ADN

2.6.5.1 Marquage des sondes pour les essais de retardement sur gel

Les sondes 1, 2, 3 et 4 employées pour les essais préliminaires et les sondes A, B, C, D, E, F, G, H et I pour les essais secondaires, toutes produites par PCR, furent marquées à la digoxigénine-11-dUTP (DIG-dUTP) en suivant le protocole Random Primed DNA Labeling proposé par Boehringer Mannheim dans la trousse DIG DNA Labelling and Detection Kit (Roche Inc.). Les sondes « I » et « II », produites par hybridation de séquences, furent quant à elles marquées à la digoxigénine-11-ddUTP (DIG-ddUTP) par la trousse DIG Oligonucléotide 3'-End Labelling Kit (Roche Inc.) selon le protocole Oligonucleotide 3'-end labelling. L'efficacité du marquage de chacune des sondes était évaluée à l'aide de standards fournis avec les trousse.

2.6.5.2 Marquage des sondes pour les essais de protection à la DNase

Pour ces essais, les sondes furent marquées uniquement à une des deux extrémités. Pour ce faire, les amplifications ont été effectuées en utilisant des amorces qui inséraient un site de restriction unique à une des extrémités. Ces réactions étaient effectuées avec une polymérase produisant des bouts francs. Par la suite, les sondes ADN furent digérées avec une enzyme de restriction pour créer une extrémité à bout cohésif, permettant l'insertion de molécules radioactives.

2.6.5.2.1 Réaction d'endonucléase

La réaction d'endonucléase fut effectuée avec l'enzyme de restriction *EcoRI* et réalisée en fonction du protocole établi par le fournisseur (Amersham Pharmacia Biotech Inc.).

2.6.5.2.2 Purification des sondes d'ADN suite à la digestion

Une fois digérées, les sondes furent traitées avec un protocole de concentration de l'ADN pour éliminer les sels contenus dans le milieu provenant de la réaction d'endonucléase de restriction. Cette opération était effectuée en employant la trousse QIAEX II® Gel Extraction Kit (QIAGEN Inc.); l'ADN était transféré dans du tampon Tris-HCl 10 mM pH 8,5. Ce tampon était plus propice pour l'éventuelle réaction de marquage de l'ADN qui avait lieu avec l'emploi d'une enzyme de remplissage dont le tampon ne contenait aucun sel.

2.6.5.2.3 Marquage au ^{32}P

Les sondes furent marquées au ^{32}P (dATP) en effectuant une réaction de remplissage à l'aide du Fragment de Klenow (Amersham Pharmacia Biotech. Inc.) et en suivant le protocole proposé par le fournisseur, tel qu'indiqué dans la trousse SureTrack Footprinting Kit® (Amersham Pharmacia Biotech. Inc.).

2.6.5.2.4 Purification sur colonne des sondes marquées

L'ADN radioactif était purifié sur colonne de Sephadex afin d'éliminer les nucléotides non incorporés. La matrice de Sephadex G25 (Amersham Pharmacia Biotech. Inc.) était reconstituée dans du tampon TEN pH 8,0 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,1 M NaCl) puis déposée sur un filtre de laine de verre. L'ADN était ensuite déposé sur colonne et l'élution était effectuée avec le tampon TEN. Différentes fractions étaient récoltées et ces dernières furent déposées sur gel d'acrylamide 5,0% pour visualiser la pureté des bandes.

2.6.5.2.5 Dosage des sondes marquées

L'intensité du marquage de chacune des sondes était évaluée avec un compteur de radioactivité bêta, le 1217 Rackbeta Liquid Scintillation Counter de la compagnie Fisher.

2.7 Essais de retardement sur gel

2.7.1 Préparation du gel de polyacrylamide 5,0% non dénaturant

Les gels de polyacrylamide 5,0% utilisés pour effectuer les essais de retardement sur gel étaient non dénaturants (sans SDS) puisqu'il était nécessaire de visualiser les interactions ADN-protéines. Les gels étaient préparés le jour précédant les essais pour leur permettre une meilleure polymérisation. Deux gels étaient coulés simultanément à partir d'un mélange constitué de 3,27 mL d'eau distillée déminéralisée stérile, de 1,66 mL d'une solution d'acrylamide:bisacrylamide (29:1), de 5 mL de tampon Tris-Borate-EDTA (TBE) 0,5X, de 140 μ L de persulfate d'ammonium 10% et de 7 μ L de TEMED. Les gels étaient entreposés à 4°C pour une durée de 18 heures. Les vitres extérieures étaient soigneusement recouvertes de papiers humides et le montage était conservé dans un emballage de plastique pour permettre de conserver l'humidité du gel.

2.7.2 Préparation des mélanges réactionnels

Les essais de retardement sur gel ont été effectués avec la trousse DIG Gel Shift Kit (Roche Inc.). Pour effectuer ces expériences, trois réactions de base devaient être effectuées (Tableau 2.8). Au départ, un premier essai était réalisé en n'incluant que l'ADN dans le

mélange réactionnel pour qu'il soit possible de visualiser la distance de migration de l'ADN libre. Par la suite, une seconde réaction incluant la protéine servait à observer si cette dernière était en mesure de causer un retard dans la migration de l'ADN. Finalement, une troisième réaction était effectuée avec un excès d'ADN non marqué. Cette étape permettait de vérifier qu'il était bien possible de dissocier par compétition le complexe ADN-protéine précédemment constitué, prouvant que l'interaction de la protéine était spécifique à la séquence d'ADN marqué. Le rapport ADN-protéine optimal a été déterminé précédemment (Bellemare, 2000). Pour les essais, les sondes 1, 2, 3, 4 et les sondes A, B, C, D, E, F, G, H et I ont été employées à une concentration de 5 pg/μL, alors que les sondes « I » et « II » l'ont été à une concentration de 30 fmol/μL.

Tableau 2.8 : Mélanges réactionnels pour les essais de retardement sur gel.

Réactifs	Réaction 1	Réaction 2	Réaction 3
Tampon de liaison (5x)	4 μL	4 μL	4 μL
Poly dI-dC (50 ng/μL)	1 μL	1 μL	1 μL
Albumine (50 ng/μL)	1 μL	1 μL	1 μL
Sonde marquée (variable)	4 μL	4 μL	4 μL
Sonde non marquée (150 ng/μL)	---	---	2,5 μL
Orf0 (454 ng/μL)	---	0,5 μL	0.5 μL
H ₂ O	10 μL	9,5 μL	7,0 μL
Volume final	20 μL	20 μL	20 μL

Suite aux réactions de standardisation, il était possible d'effectuer les essais de retardement en présence des différents effecteurs potentiels qui pourraient venir perturber la liaison entre les sondes ADN et la protéine His-Orf0. Tout d'abord, un témoin a été fait avec l'ajout d'acétone (agent solubilisant des métabolites) dans le mélange réactionnel pour démontrer que ce dernier n'avait aucune influence sur la formation/dissociation du complexe ADN-Orf0. Une fois la preuve apportée, les métabolites étaient ajoutés aux expériences et le volume d'eau retrouvé dans le mélange réactionnel était réduit en conséquence. Différentes concentrations de métabolites ont été ajoutées aux réactions. Les métabolites produits par voie enzymatique se retrouvaient dans le mélange réactionnel à des concentrations autour de 7

et 8 mM, alors que les métabolites obtenus de source commerciale étaient présents à des concentrations entre 10 et 50 mM.

2.7.3 Migration, transfert électrophorétique et détection de l'ADN

Avant de charger les puits avec les échantillons, une pré-électrophorèse d'une durée d'une heure était effectuée dans du TBE 0,25X à 110 V. Pendant ce temps, les échantillons étaient préparés en incluant tous les réactifs nécessaires et étaient ensuite incubés pour une période de 15 minutes à température ambiante. Une fois incubés, 5 μ L de tampon de migration (TBE 0,25X:glycérol (60:40), 0,25% xylène cyanol) étaient ajoutés à chacun des échantillons, et ces derniers étaient maintenant prêts pour être déposés sur le gel de polyacrylamide non dénaturant 5,0%. La durée de migration variait en fonction de la longueur des sondes utilisées et se déroulait dans du tampon TBE 0,25X froid. Les sondes I à 4 nécessitaient une migration approximative de 75 minutes, les sondes A à I devaient migrer 45 minutes alors que 25 minutes étaient nécessaires pour les sondes « I » et « II »; la migration était effectuée à une intensité de 110 V à 4°C.

Par la suite, l'ADN était transféré sur membrane de nylon grâce à l'appareil Mini Trans-Blot de BioRad (Mississauga, Ont.). Le transfert a été fait dans du TBE 0,25X à 4°C à une intensité de 400 mA. Après transfert, l'ADN était fixé sur membrane par un chauffage à 120°C d'une durée de 30 minutes. Finalement, la détection des bandes sur membrane était effectuée suite à des étapes de lavage et de fixation d'anticorps anti-digoxigénine auxquels était couplée la phosphatase alcaline. L'ajout d'un substrat chimio-luminescent (CSPD) fourni dans la trousse DIG Gel Shift Kit (Roche Inc.) permettait de visualiser les bandes d'ADN. L'image finale était obtenue par autoradiographie suite à une exposition de 18 heures et la révélation de l'image s'effectuait en employant les dilutions des solutions de développement et de fixation (Kodak) tel qu'indiqué par le fournisseur.

2.8 Essais de protection à la DNase

2.8.1 Préparation du gel 8,0% acrylamide/7M urée

Les gels étaient préparés la journée même de l'expérience pour éviter un assèchement du gel dans sa portion supérieure. Le mélange était constitué de 63,06 g d'urée, de 40 mL d'une solution d'acrylamide:bisacrylamide 30% (29:1), de 15 mL de TBE 10X et de 45 mL d'eau distillée déminéralisée stérile. Après dissolution complète de l'urée, 650 μ L de persulfate d'ammonium 10% et 100 μ L de TEMED étaient ajoutés quelques instants avant de couler le gel. Ce dernier devait polymériser pour un minimum d'une heure à 22°C, avec une légère inclinaison d'environ 30 degrés.

2.8.2 Étape de titration de la DNase

L'étape de titration de la DNase visait essentiellement à ajuster la concentration de DNase en fonction de la quantité d'ADN en présence. Une série de neuf échantillons identiques était préparée tel qu'indiqué au Tableau 2.9. À ces échantillons furent ajoutées des quantités de DNase variant selon une échelle de 0 U à 9 U. La solution mère de DNase était diluée avec une solution de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ fournie dans la trousse SureTrack Footprinting Kit® (Amersham Pharmacia Biotech. Inc.) et les dilutions furent effectuées selon le Tableau 2.10.

Après une minute de digestion, la DNase était inactivée et l'ADN était soumis à des étapes de purification et de concentration en suivant le protocole proposé par le fournisseur (Amersham Pharmacia Biotech. Inc.). Pendant la préparation des échantillons, le gel devait subir une pré-électrophorèse de 30 minutes à 40 Watts dans du TBE 1X.

Lorsque prêts, les échantillons étaient chargés à raison de 3 μ L par puits et migraient pour une durée de deux heures 45 minutes à 22°C dans du TBE 1X à une intensité de 40 Watts. Le gel était ensuite traité par une solution de fixation (10% méthanol et 10% acide acétique) durant 10 à 15 minutes, puis lavé à deux reprises dans le tampon de migration. Le gel était ensuite transféré sur papier Whatmann® puis séché à l'aide du Gel Dryer Model 583 et de la pompe HydroTech™ de BioRad (Mississauga, Ont.) pour une durée de 75 minutes à une température 80°C. Le gel était alors prêt pour être exposé pour l'autoradiographie d'une

durée de 4 jours dans un écran photomultiplicateur à -70°C . L'image était ensuite obtenue avec l'emploi des solutions de développement et de fixation (Kodak) en suivant les directions indiquées par le fournisseur.

Tableau 2.9 : Mélange réactionnel pour les essais de titration.

Réactifs	Réaction
Tampon de liaison (5x)	10 μL
Poly dI-dC (50 ng/ μL)	2,5 μL
Albumine (50 ng/ μL)	2,5 μL
Sonde marquée ($1,5 \times 10^6$ cpm)	10 μL
Orf0 (454 ng/ μL)	---
H ₂ O	25 μL
Volume final	50 μL

Tableau 2.10 : Dilutions de la DNase pour les essais de titration.

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Concentration finale de DNase (U)	9	3	1	0,33	0,11	0,037	0,012	0,0041	0

2.8.3 Étape de liaison et de séquençage

Lorsque la concentration idéale de DNase dans le milieu réactionnel a été déterminée, l'expérience était répétée en ajoutant la protéine d'étude dans le mélange réactionnel; un contrôle négatif était effectué en substituant à part égale la protéine d'intérêt par de

l'albumine bovine (Tableau 2.11). Les mélanges réactionnels étaient traités de la même façon que lors des essais de titration en suivant le protocole décrit précédemment.

Tableau 2.11 : Mélanges réactionnels pour les essais de liaison.

Réactifs	Contrôle	Réaction
Tampon de liaison (5x)	10 μ L	10 μ L
Poly dI-dC (50 ng/ μ L)	2,5 μ L	2,5 μ L
Albumine (50 ng/ μ L)	3,75 μ L	2,5 μ L
Sonde marquée (1,5 X 10 ⁶ cpm)	10 μ L	10 μ L
Orf0 (454 ng/ μ L)	----	1,25 μ L
H ₂ O	23,75 μ L	23,75 μ L
Volume final	50 μ L	50 μ L

En parallèle, dans le dernier puits, une réaction de séquençage était réalisée en effectuant une réaction de G + A selon le protocole fourni dans la trousse et tel que précédemment décrit (Maxam et Gilbert, 1977). Le contrôle, les réactions de protection à la DNase et la réaction G + A étaient ensuite déposés sur gel. Les autres étapes suivant la migration de l'ADN étaient les mêmes que celles décrites pour les essais de titration.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Essais de retardement sur gel

La technique de retardement sur gel permet d'observer la présence et la spécificité d'une interaction entre une protéine et une séquence d'ADN donnée. Par le fait même, il est possible de déterminer si une protéine est apte à se fixer à une région envers laquelle cette dernière exercerait une fonction régulatrice. Lors des essais effectués dans le cadre de ce projet, les interactions entre des régions potentiellement promotrices au sein de l'opéron biphényle et la protéine d'intérêt ont été étudiées. Par la suite, l'effet de différents métabolites du biphényle sur l'interaction ADN-His-Orf0 a été évalué; le 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle, le 2,3-dihydroxybiphényle, le benzoate et le catéchol ont été ajoutés aux mélanges réactionnels. Les essais prévus avec le 2-hydroxy-6-oxo-6-phénylhexa-2,4-dièneoate (HOPDA) n'ont pas été effectués faute d'avoir réussi à l'extraire convenablement.

3.1.1 Essais avec les sondes 1, 2, 3 et 4

3.1.1.1 Choix des sondes 1, 2, 3 et 4

Dans une première série d'expériences, quatre sondes portant des séquences potentiellement promotrices qui avaient été préalablement sélectionnées par Bellemare (2000) ont été utilisées. Basé sur le fait que l'opéron biphényle de *C. testosteroni* B-356 est constitué de deux régions assez éloignées l'une de l'autre, l'hypothèse selon laquelle il existerait plus d'un promoteur pour l'expression des enzymes de la voie catabolique du biphényle est fort plausible. De par ce fait, quatre régions potentiellement promotrices ont été amplifiées, à raison de deux sondes dans chacune des régions comme l'indique la Figure 3.1. Les sondes 1 et 2 (290 pb et 310 pb) se retrouvent respectivement en amont des gènes *orf0* et *bphG* dans la région II et les sondes 3 et 4 (429 pb et 410 pb) se

retrouvent dans la région I en amont du gène *bphA*; les séquences de ces sondes se retrouvent en Figure 3.2.

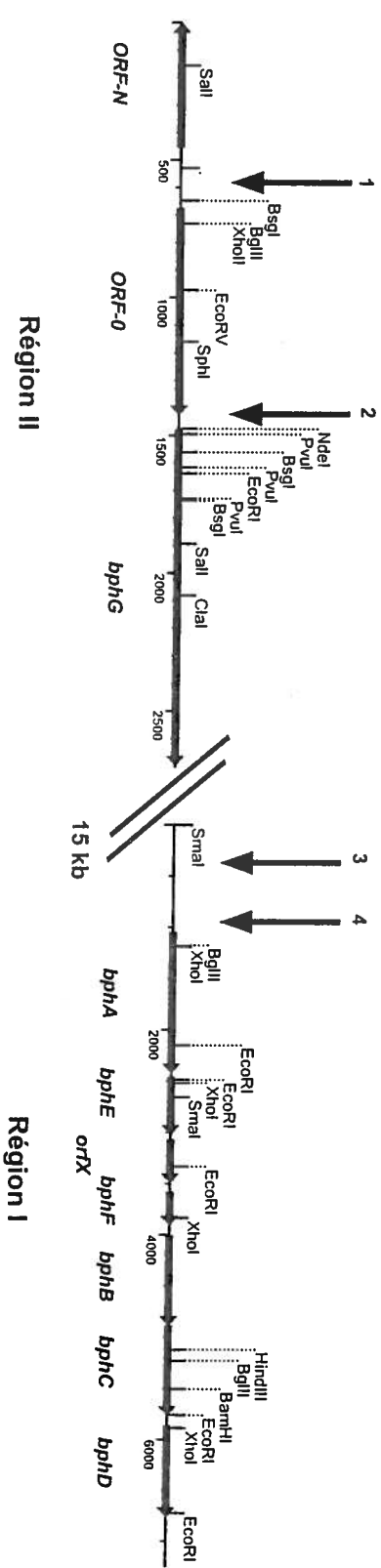


Figure 3.1 : Régions potentiellement promotrices de l'opéron biphenyle. Les flèches numérotées de un à quatre représentent respectivement une région en amont du gène *orf0*, une autre en amont de *bphG*, et deux en amont de *bphA* (Bellemare, 2000).

Sonde 1 (290 pb)

GTGATAGTTGGTGC GCAGCCCCGCGCAACGATGCTGTCACCGATTTCT
GGCGATTGGTCCATGATGCTCTAGGTGAGAATGGTTGATGGCAACGAA
TTTTCTCGATATTATTTGCTAAATAAGATTTTTTTTTCAGTAAGTGCAGA
ACCCTTGTAGCCATCGAGATTTATGCAGATTAGACTAACGCTTCGTACT
CAAAATAACATTTGTCTGGAAACGATGAGATCTGTCCTAAATGATCTGC
CGGTAGCCATGGAAACCCCTCGGACGCTGATCGAATCCGCCTATCAC

Sonde 2 (310 pb)

CATTGCGCGATCTTCGAGGCCGCGCTCGCGCGCAACGCCGACATGGCT
TGCGCGTTGCTGACAACTCACATTCACCGGGCCTTGTCTGGTTCATCGCCA
AAGATGGCCTGCTTCGTTGACATTCGCGCTTTGGTCTGCCGGCCAGGCG
CAAATTCCTTGGGATACGTACATATGGGAAACGAGGAGTCGATCGGGTC
CGTTCTCGTTGTAGGAGGAGGTCTCGCCTCCGTTTCGTTTCGTGAACCCG
CTGCGCGGTGCAGGTTTCTCAGGCGATGTGCGTGTGATTGAGGCCGAA
ACTGAGCCAGCGTACGATC

Sonde 3 (429 pb)

CAGCAGCGGTCTGAAGATGATGCGGCGCTCGGCCTCGAAGACGCTCTGG
TCAACGAACGACTGACGCGGCACCTTGAACAGCCTGCGGTCTCTGTCTG
ACGTGCAGTTGGATGGTCTTGGCGGGAAACGAACCTCACGAACGACTCC
TTACAGGCTGGCGTGCAATGTGTAGCCTCAGACACCGAAATGGCGATT
GAGCAGGTTACTGGCGCGGCGCAGCAAGACGCTCGACCCGAAGGCAAC
GCCGCCGTTTCTCCGATCAGGCCGAGAGAACGATCAAGCTCTACCACA
TCCTACATCTGTCTGATAATTCACCTCAATATAGTTAACCCCTATGCATAC
CCGATATTGGCAAATTGCCTTCAGGTCAAACCTGACACCGAGCGCCACT
CAGGTCTCGACTTGTCAAACCCCTCTAAGTAAGGCCGCGAGCATT

Sonde 4 (410 pb)

TAAGTAAGGCCGCGAGCATTTATTTTT GAGCCCCAA TCATCGGCGCCA
ACTTAAACGATGGGGGATTCCCCTAGTAGCAGACGTCCGGTCAACCAG
TAAAATATCGAGATTA TTA CTTAGGAATGGTGGCGCGCAGAGTGCAGC
CTGTGGCCACGAGCAGCTGAGGATGAATGCGTCGAGCAGCTTCGCCAT
TGAAGACTATCTGTCACCTCCCCGAGGCGCGGCGCTGTTGCAGGCACA
CATCGAATCATCGACCGAAGTAGCTCGACAATTCGGTTTCGTTGCGATA
GC GCTAGTATCGAAACGATAGTAACGAAA ACTCC CTCCCCCTATGTTT
GTCGGACTAGGTCCGGATTAATTAGAGGTCCCGACACGTGCAATTCAA
AGGAGCCAGTGAAATCATGAGTTCTGA

Figure 3.2 : Séquences nucléotidiques des sondes 1, 2, 3 et 4 employées pour les essais de retardement sur gel.

3.1.1.2 Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde 1

Afin de faciliter la présentation des travaux, plusieurs figures de cette section constituent des montages. Pour donner un aperçu des montages effectués avec la sonde 1, la Figure 3.3 représente la photo originale à partir de laquelle les Figures 3.4 et 3.5a) ont été réalisées. La réalisation des autres montages ne sera pas schématisée, mais tous ont été effectués selon le même principe.

Les expériences effectuées avec la sonde 1 (290 pb) située en amont du gène *orf0* ont permis d'évaluer la capacité de la protéine His-Orf0 à se lier à la sonde, et de voir l'effet de différents métabolites sur cette liaison. Il est ainsi possible d'affirmer qu'il y a effectivement une séquence nucléotidique à l'intérieur de la sonde 1 permettant la liaison avec la protéine (Figure 3.4). L'ajout de 156 μ moles de 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle ou de 126 μ moles de 2,3-dihydroxybiphényle entraîne la dissociation du complexe entre la protéine et la sonde 1 (Figure 3.5). De plus, lors des essais effectués avec 1 mmole de benzoate et 2 mmoles de catéchol, il est tout aussi possible de dissocier le complexe formé entre His-Orf0 et la sonde 1 (Figure 3.6).

3.1.1.3 Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde 2

La sonde 2 est une séquence de 310 pb retrouvée en amont du gène *bphG*. Les essais de liaison entre la sonde 2 et la protéine His-Orf0 n'ont pas été concluants. En fait, il a été possible d'obtenir une faible liaison entre ces deux intervenants, mais l'interaction est dite non spécifique puisqu'il a été nécessaire d'augmenter de 16 fois la concentration de protéine normalement ajoutée au mélange réactionnel (Figure 3.7). La faible affinité de la protéine pour cette sonde ADN suggère donc que cette région ne constitue pas un site de promotion. Par conséquent, les différents essais avec les métabolites n'ont pas été effectués.

3.1.1.4 Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde 3

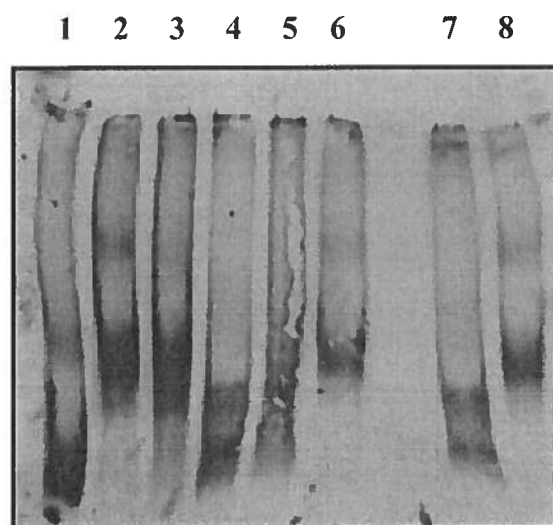
La sonde 3, constituant une région de 429 pb située en amont du gène *bphA*, a été évaluée quant à sa capacité de se lier à la protéine His-Orf0 et sur l'effet de différents métabolites sur cette liaison, tout comme l'a été la sonde 1. Les essais ont démontré que la

sonde 3 se liait effectivement à la protéine (Figure 3.8). L'ajout de 156 μ moles de 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle ou de 94,5 μ moles de 2,3-dihydroxybiphényle au mélange réactionnel a causé une dissociation des complexes formés entre la protéine et la sonde 3 (Figure 3.9). De plus, les essais effectués en présence de 0,2 mmole de benzoate ou de catéchol ont montré qu'à ces concentrations, les métabolites peuvent dissocier le complexe formé entre His-Orf0 et la sonde 3 (Figure 3.10).

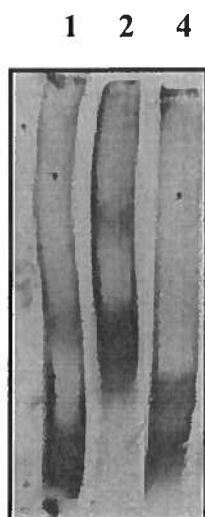
3.1.1.5 Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde 4

Pour ce qui est de la sonde 4 (410 pb) se situant directement en amont du gène *bphA*, les résultats indiquent que cette sonde possède une séquence qui permet sa liaison avec la protéine His-Orf0 (Figure 3.11). L'ajout de 156 μ moles de 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle ou de 81,9 μ moles de 2,3-dihydroxybiphényle entraîne une faible dissociation du complexe entre la protéine et la sonde 4 (Figure 3.12). Lors des essais effectués avec 2 mmoles de benzoate ou 2 mmoles de catéchol, il semble que ces métabolites soient incapables de parvenir à cette tâche (Figure 3.13). L'obtention de bandes moins franches lors des essais de retardement permettrait d'avancer que la liaison entre la sonde 4 et la protéine His-Orf0 soit moins spécifique que les liaisons obtenues avec les sondes 1 et 3.

a)



b)



c)

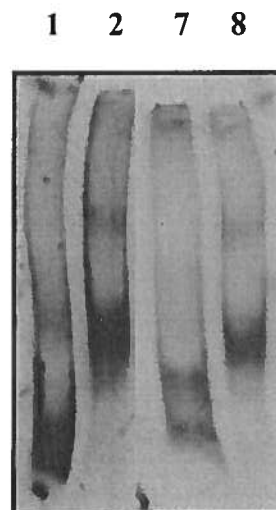


Figure 3.3 : Démonstration des montages effectués avec la sonde 1. a) Photo originale utilisée pour créer les montages des Figures 3.4 et 3.5 a) : le puits 1 contient la sonde seule, le puits 2 contient la sonde en présence de Orf0, le puits 4 contient la sonde, Orf0 et l'ADN non marqué, le puits 7 contient la sonde, Orf0 et 6 μ L de 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle à une concentration de 26 mM et le puits 8 contient le même mélange réactionnel que dans le puits 7 en substituant le 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle par un volume équivalent d'acétone. Les puits 3, 5 et 6 n'ont pas été utilisés puisque ces essais étaient effectués avec du DMSO. b) et c) Représentent les Figures 3.4 et 3.5 a) : leur description correspond à celle faite en Figure 3.3 a).

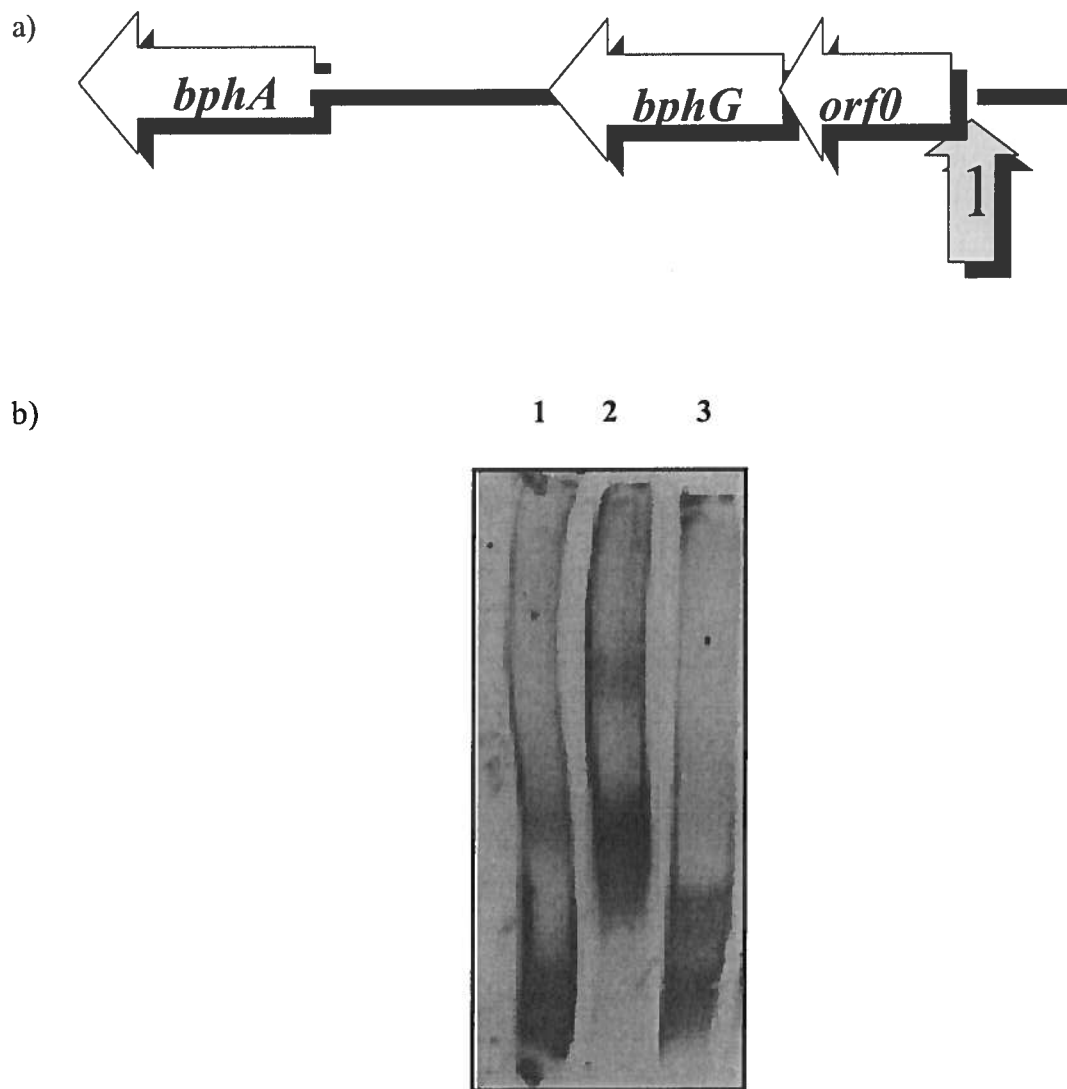


Figure 3.4: Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde 1. a) Localisation de la sonde 1 au sein de l'opéron *bph*. b) Essais de retardement sur gel en présence et en absence d'ADN non marqué: le puits 1 contient la sonde seule, le puits 2 contient la sonde en présence d'Orf0, le puits 3 contient la sonde, Orf0 et l'ADN non marqué en excès.

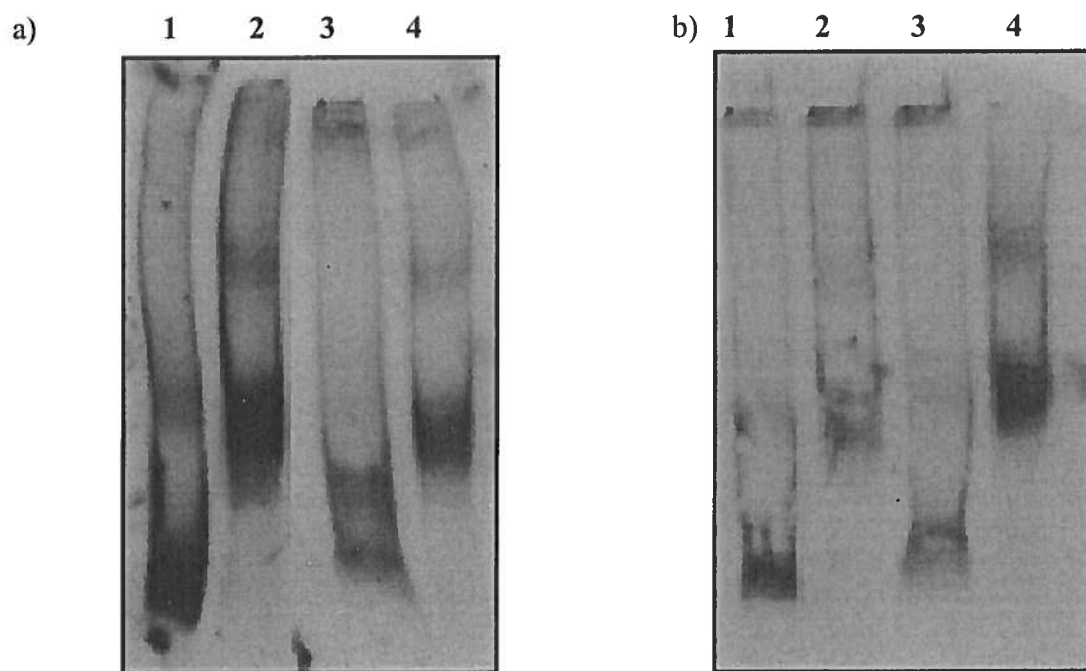


Figure 3.5: Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde 1 en présence et en absence de 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle ou de 2,3-dihydroxybiphényle. a) Essais effectués avec et sans 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle: le puits 1 contient la sonde seule, le puits 2 contient la sonde en présence de Orf0, le puits 3 contient la sonde, Orf0 et 6 μ L de 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle à une concentration de 26 mM. Le puits 4 contient le même mélange réactionnel que le puits 3, en substituant le 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle par un volume équivalent d'acétone. b) Essais effectués avec et sans 2,3-dihydroxybiphényle: le puits 1 contient la sonde seule, le puits 2 contient la sonde en présence d'Orf0, le puits 3 contient la sonde, Orf0 et 6 μ L de 2,3-dihydroxybiphényle à une concentration de 21 mM. Le puits 4 contient le même mélange réactionnel que le puits 3, en substituant le 2,3-dihydroxybiphényle par un volume équivalent d'acétone.

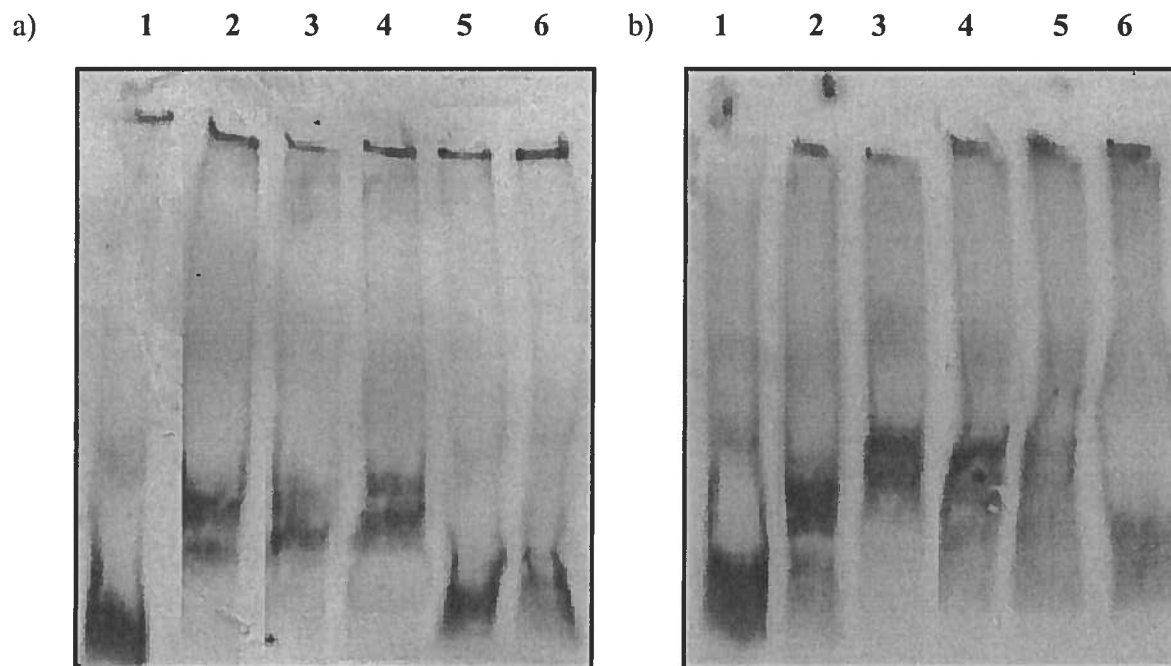


Figure 3.6 : Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde 1 en présence et en absence de benzoate ou de catéchol. a) Essais effectués avec et sans benzoate: le puits 1 contient la sonde seule, le puits 2 contient la sonde en présence de Orf0, le puits 3 contient la sonde, Orf0 et 2 μ L d'acétone et les puits 4, 5 et 6 contiennent le même mélange réactionnel que le puits 3, en substituant l'acétone par un volume équivalent de benzoate dans l'acétone à des concentrations de 100 mM, 500 mM et 1 M b) Essais effectués avec et sans catéchol: le puits 1 contient la sonde seule, le puits 2 contient la sonde en présence d'Orf0, le puits 3 contient la sonde, Orf0 et 2 μ L d'acétone et les puits 4, 5 et 6 contiennent le même mélange réactionnel que le puits 3, en substituant l'acétone par un volume équivalent de catéchol dans l'acétone à des concentrations respectives de 100 mM, 500 mM et 1 M.

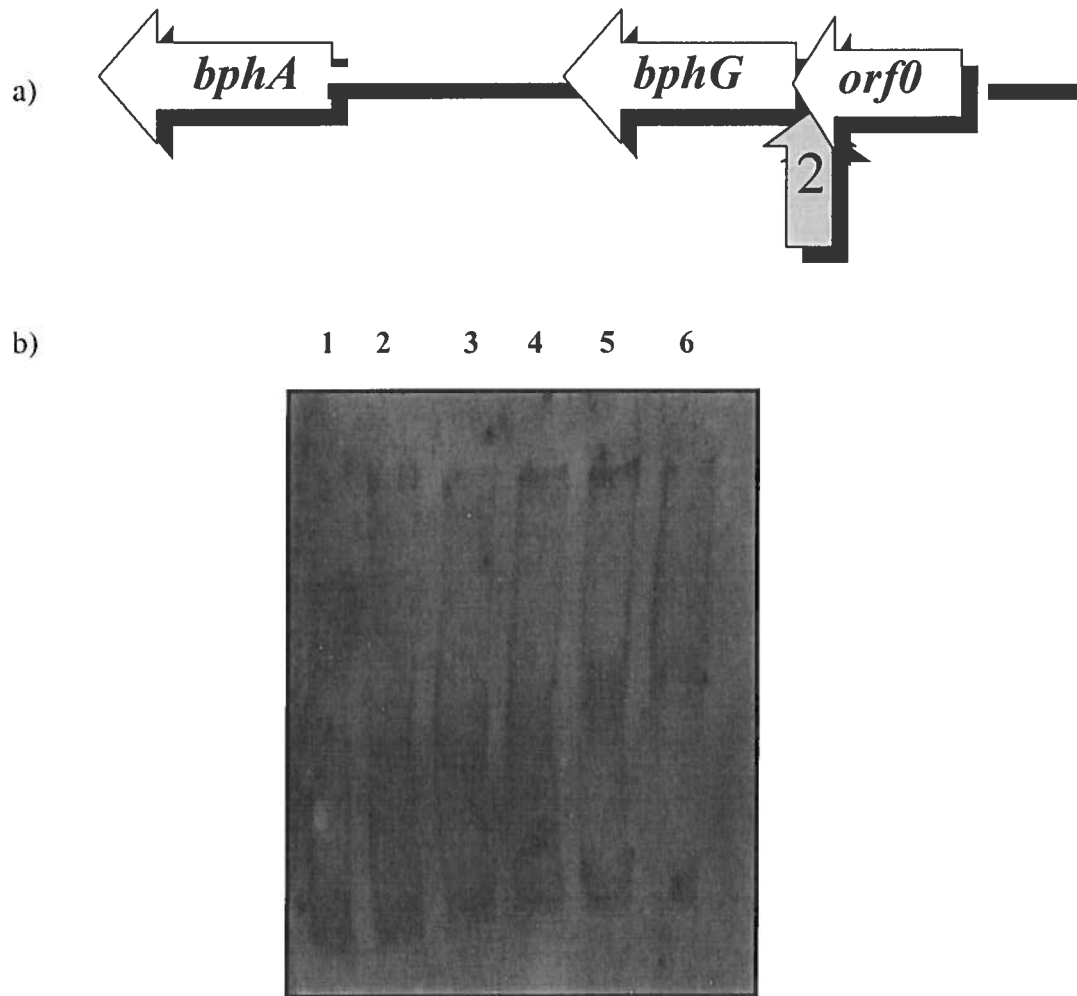


Figure 3.7 : Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde 2. a) Localisation de la sonde 2 au sein de l'opéron *bph*. b) Essais de retardement sur gel uniquement avec la sonde et la protéine His-Orf0: le puits 1 contient la sonde seule et le puits 2 contient la sonde en présence de la protéine Orf0. Les puits 3, 4, 5 et 6 contiennent la sonde et la protéine His-Orf0 à des concentrations 2, 4, 8 et 16 fois supérieures à celle employée dans le puits 2.

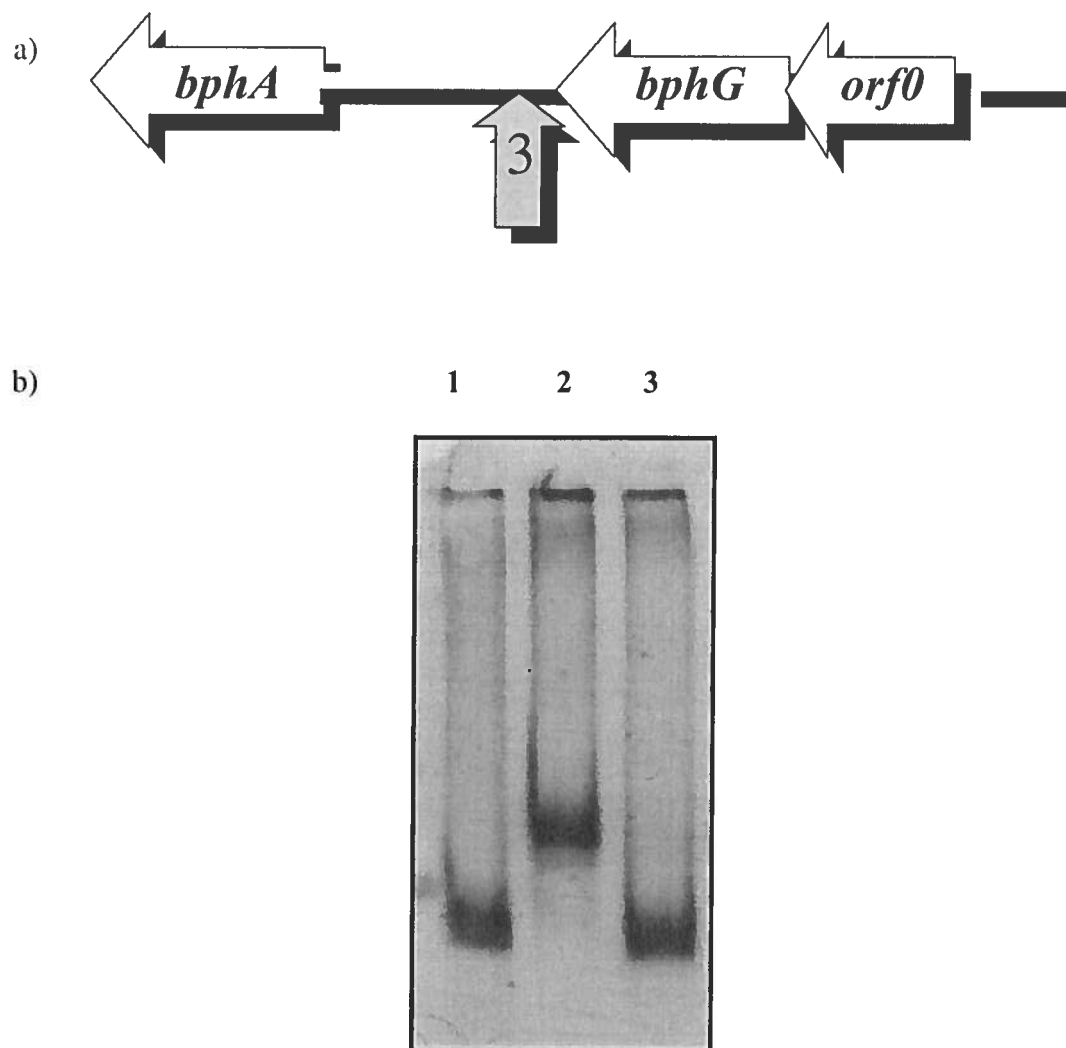


Figure 3.8 : Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde 3. a) Localisation de la sonde 3 au sein de l'opéron *bph*. b) Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde 3 en présence et en absence d'ADN non marqué: le puits 1 contient la sonde seule, le puits 2 contient la sonde en présence d'Orf0, le puits 3 contient la sonde, Orf0 et l'ADN non marqué en excès.

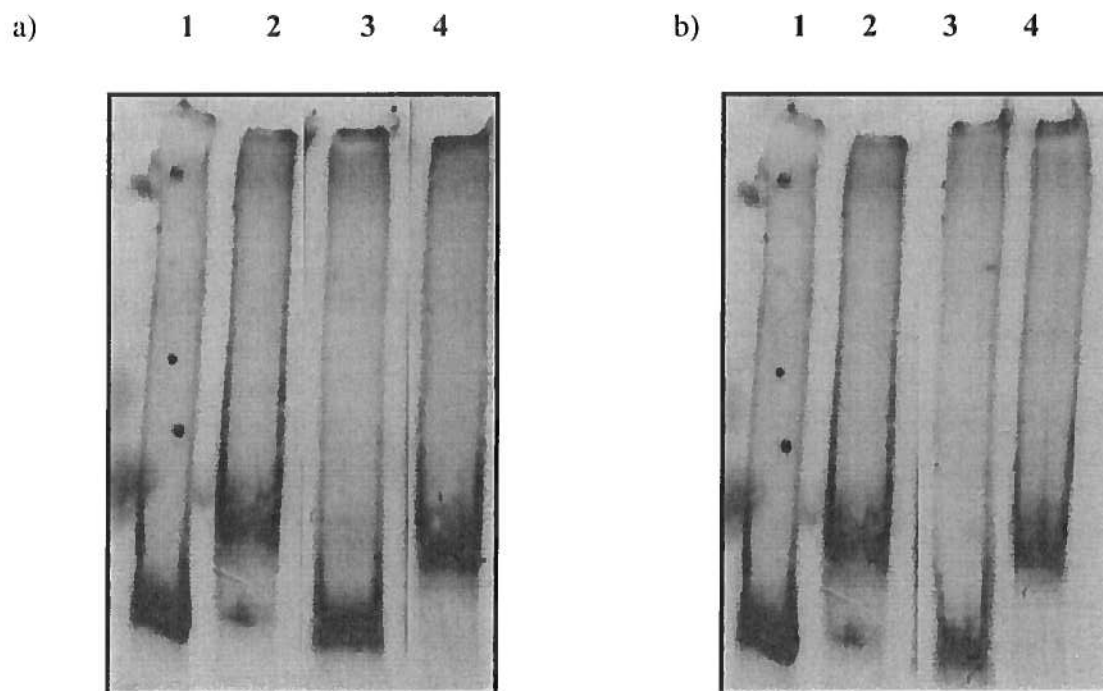


Figure 3.9 : Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde 3 en présence et en absence de 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle ou de 2,3-dihydroxybiphényle. a) Essais effectués avec et sans 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle: le puits 1 contient la sonde seule, le puits 2 contient la sonde en présence de Orf0, le puits 3 contient la sonde, Orf0 et 6 μ L de 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle à une concentration de 26 mM. Le puits 4 contient le même mélange réactionnel que le puits 3, en substituant le 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle par un volume équivalent d'acétone. b) Essais effectués avec et sans 2,3-dihydroxybiphényle: le puits 1 contient la sonde seule, le puits 2 contient la sonde en présence d'Orf0, le puits 3 contient la sonde, Orf0 et 4,5 μ L de 2,3-dihydroxybiphényle à une concentration de 21 mM. Le puits 4 contient le même mélange réactionnel que le puits 3, en substituant le 2,3-dihydroxybiphényle par un volume équivalent d'acétone.

a) 1 2 3 4 5 6 b) 1 2 3 4 5 6

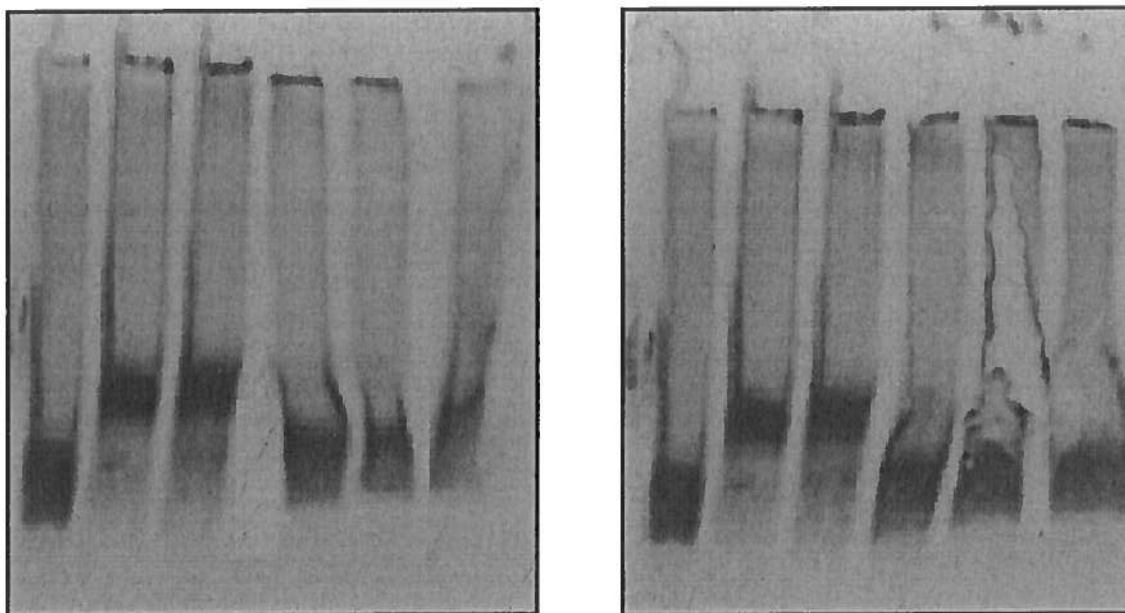


Figure 3.10 : Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde 3 en présence et en absence de benzoate ou de catéchol a) Essais effectués avec et sans benzoate: le puits 1 contient la sonde seule, le puits 2 contient la sonde en présence de Orf0, le puits 3 contient la sonde, Orf0 et 2 μ L d'acétone et les puits 4, 5 et 6 contiennent le même mélange réactionnel que le puits 3, en substituant l'acétone par un volume équivalent de benzoate dans des concentrations respectives de 100 mM, 500 mM et 1 M. b) Essais effectués avec et sans catéchol: le puits 1 contient la sonde seule, le puits 2 contient la sonde en présence d'Orf0, le puits 3 contient la sonde, Orf0 et 2 μ L d'acétone et les puits 4, 5 et 6 contiennent le même mélange réactionnel que le puits 3, en substituant l'acétone par un volume équivalent de catéchol dans des concentrations respectives de 100 mM, 500 mM et 1 M.

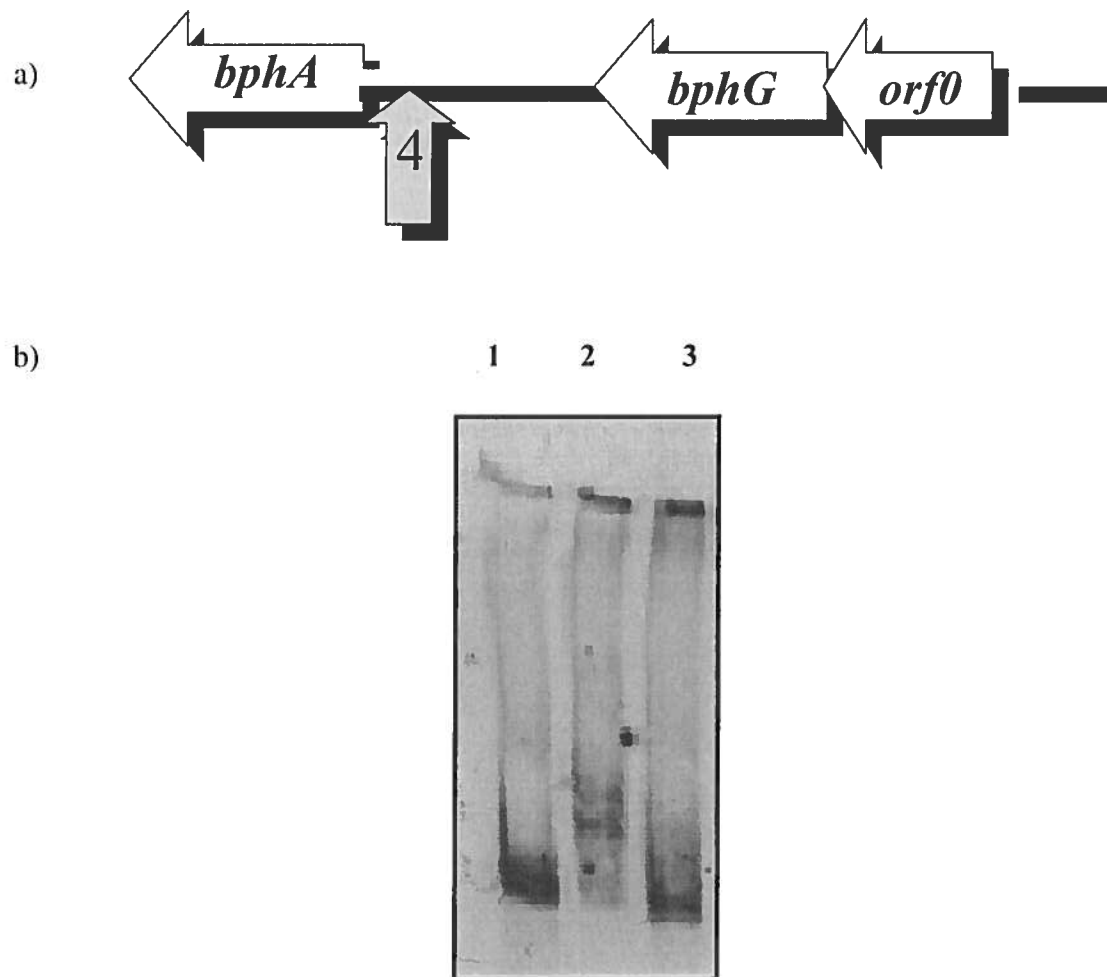


Figure 3.11 : Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde 4. a) Localisation de la sonde 4 au sein de l'opéron *bph*. b) Essais de retardement en présence et en absence d'ADN non marqué: le puits 1 contient la sonde seule, le puits 2 contient la sonde en présence d'Orf0, le puits 3 contient la sonde, Orf0 et l'ADN non marqué en excès.

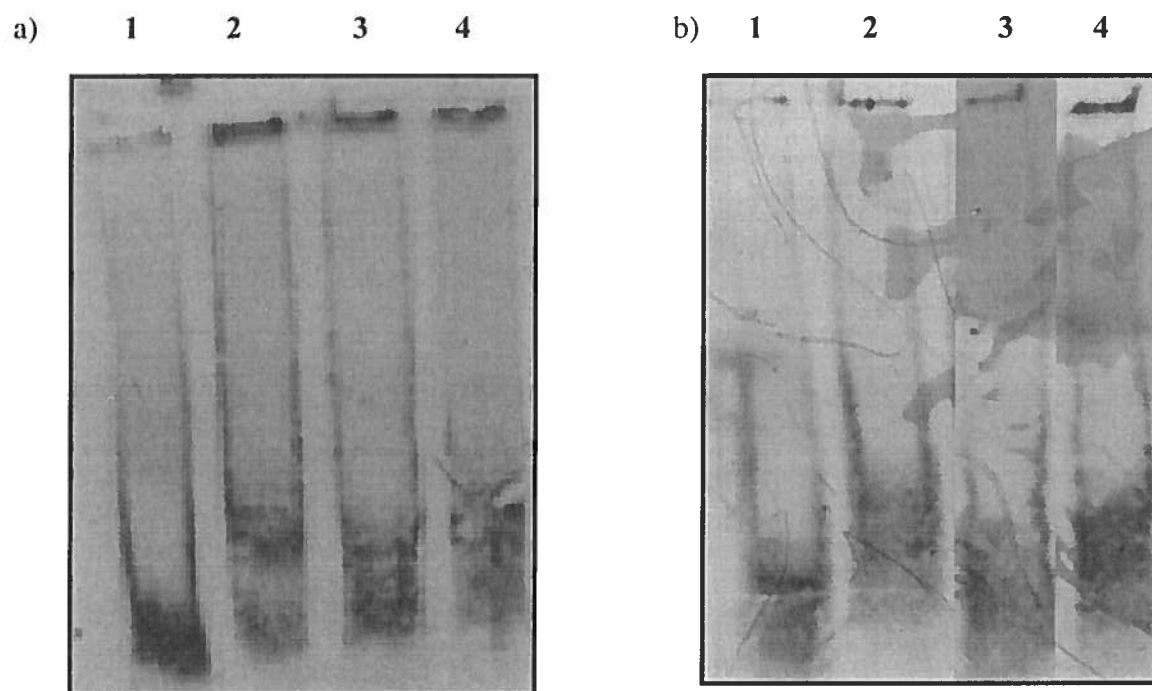


Figure 3.12 : Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde 4 en présence et en absence de 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle ou de 2,3-dihydroxybiphényle. a) Essais effectués avec et sans 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle: le puits 1 contient la sonde seule, le puits 2 contient la sonde en présence de Orf0, le puits 3 contient la sonde, Orf0 et 5,2 μ L de 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle à une concentration de 30 mM. Le puits 4 contient le même mélange réactionnel que le puits 3, en substituant le 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle par un volume équivalent d'acétone. b) Essais effectués avec et sans 2,3-dihydroxybiphényle: le puits 1 contient la sonde seule, le puits 2 contient la sonde en présence d'Orf0, le puits 3 contient la sonde, Orf0 et 3,9 μ L de 2,3-dihydroxybiphényle à une concentration de 21 mM. Le puits 4 contient le même mélange réactionnel que le puits 3, en substituant le 2,3-dihydroxybiphényle par un volume équivalent d'acétone.

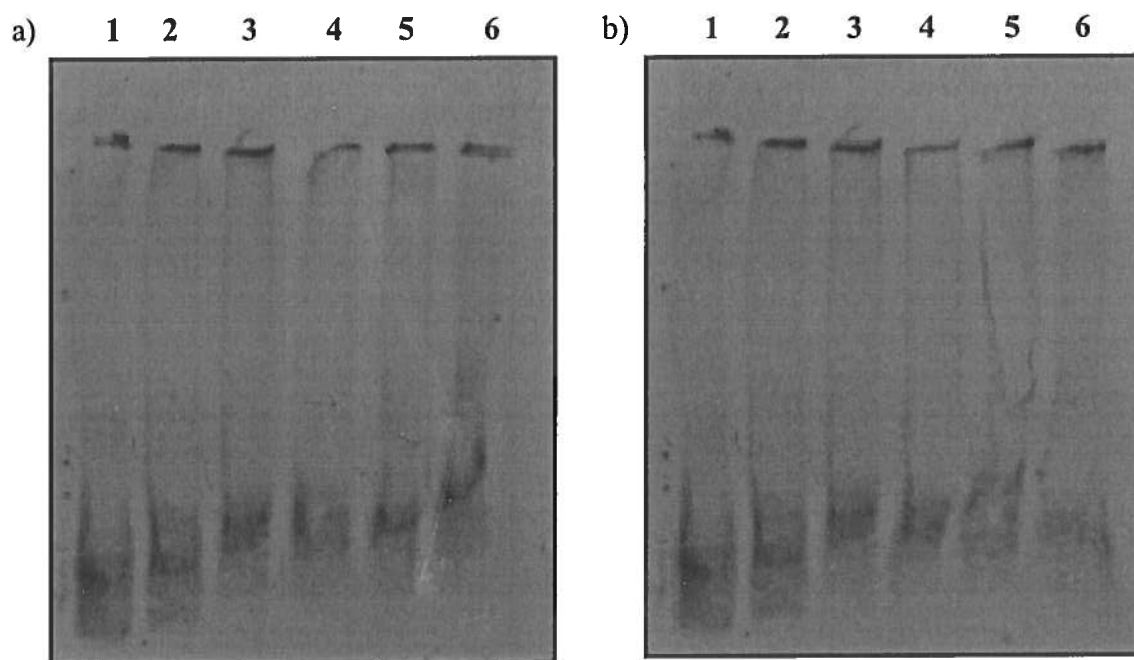


Figure 3.13 : Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde 4 en présence et en absence de benzoate ou de catéchol. a) Essais effectués avec et sans benzoate: le puits 1 contient la sonde seule, le puits 2 contient la sonde en présence de Orf0, le puits 3 contient la sonde, Orf0 et 2 μ L d'acétone et les puits 4, 5 et 6 contiennent le même mélange réactionnel que le puits 3, en substituant l'acétone pour un volume équivalent de benzoate dans des concentrations respectives de 100 mM, 500 mM et 1 M. b) Essais effectués avec et sans catéchol: le puits 1 contient la sonde seule, le puits 2 contient la sonde en présence d'Orf0, le puits 3 contient la sonde, Orf0 et 2 μ L d'acétone et les puits 4, 5 et 6 contiennent le même mélange réactionnel que le puits 3, en substituant l'acétone pour un volume équivalent de catéchol dans des concentrations respectives de 100 mM, 500 mM et 1 M.

3.1.2 Essais avec les sondes A, B, C, D, E, F, G, H et I

3.1.2.1 Choix des sondes A, B, C, D, E, F, G, H et I

Après avoir effectué les essais préliminaires de retardement sur gel avec les sondes 1, 2, 3 et 4, l'étape logique subséquente était de localiser et de déterminer les séquences nucléotidiques auxquelles s'était fixée la protéine au cours des essais préliminaires par des expériences de protection à la DNase. Puisque cette technique ne peut s'effectuer qu'avec des fragments d'ADN ayant une taille maximale autour de 200 pb, il s'avéra nécessaire de réduire la dimension des sondes; les sondes 1, 2, 3 et 4 sont d'une longueur entre 290 et 429 pb. À partir de trois des quatre sondes répondant positivement aux essais de retardement sur gel, neuf sondes raccourcies ont été produites (A, B, C, D, E, F, G, H et I). Le patron de construction des sondes raccourcies et leurs séquences sont illustrées aux Figures 3.14, 3.15 et 3.16. Ces séquences plus courtes ont été utilisées dans des essais de retardement sur gel. Par la suite, seules les sondes présentant une affinité pour la protéine Orf0 ont été sélectionnées pour les essais de protection à la DNase.

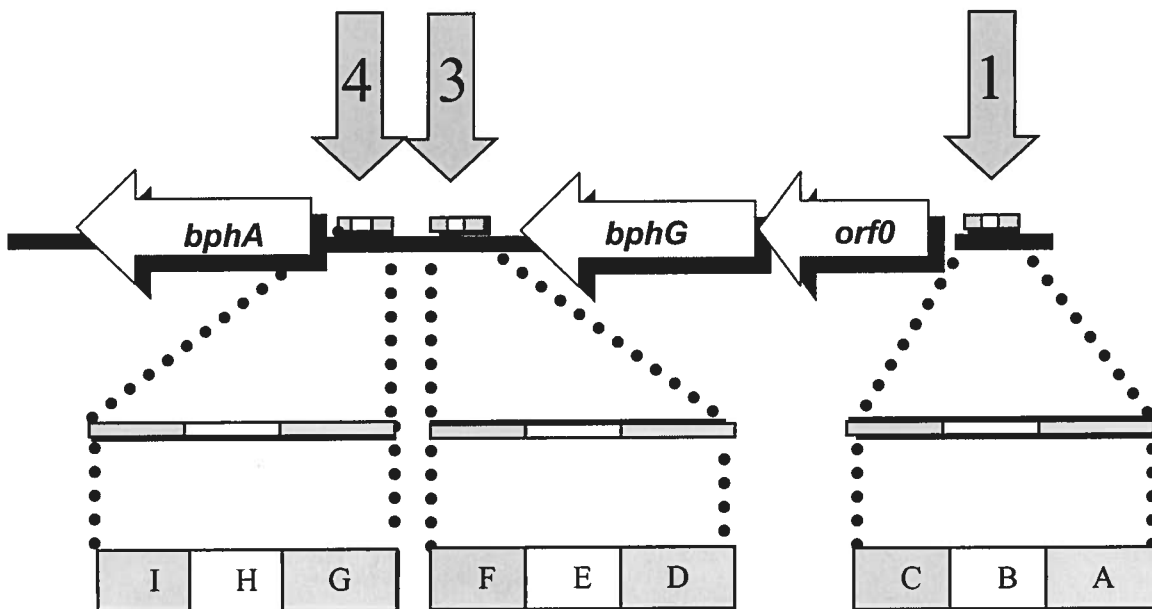


Figure 3.14 : Patron de construction des sondes raccourcies A, B, C, D, E, F, G, H et I.

Sonde A (154 pb)

GTGATAG TTG GTGCG CAGCCCCGCCGCAACGATGCTGTCACCGATTTC
TGGCGATTGGTCCATGATGCTCTAGGTGAGAATGGTTGATGGCAACGA
ATTTTCTCGATATTATTT GCTAAATAAGATTTTTTTTCAGTAAGTGCAG
AACCCCTTG

Sonde B (162 pb)

CTAGGTGAGAATGGTTGATGGCAACGAATTTTCTCGATATTATTTGCTA
AATAAGATTTTTTTTCAGTAAGTGCAGAACCCCTTGTAGCCATCGAGATT
TATGCAGATTAGACTAACGCTTCGTA CTCAAATAACATTTGTCTGGAAA
CGATGAGATCTGTCC

Sonde C (148 pb)

CAGAACC CTTGTAGCCATCGAGATTTATGCAGATTAGACTAACGCTTC
GTA CTCAAATAACATTTGTCTGGAAACGATGAGATCTGTCTAAATGA
TCTGCCGGTAGCCATGGAAACCCCTCGGACGCTGATCGAATCCGCCTAT
CAC

Sonde D (200 pb)

CAGCAGCGGTCTGAAGATGATGCGGCGCTCGGCCTCGAAGACGCTCTGG
TCAACGAACGACTGACGCGGCACCTTGAACAGCCTGCGGTCTCTGTCTG
ACGTGCAGTTGGATGGTCTTGGCGGGAAACGAACTCACGAACGACTCC
TTACAGGCTGGCGTGCAATGTGTAGCCTCAGACACCGAAATGGCGATT
GAGCAGGT

Sonde E (193 pb)

GGAAACGAACTCACGAACGACTCCTTACAGGCTGGCGTGCAATGTGTA
GCCTCAGACACCGAAATGGCGATTGAGCAGGTTACTGGCGCGGCGCAG
CAAGACGCTCGACCCGAAGGCAACGCCGCCGTTTCTCCGATCAGGCCG
AGAGAACGATCAAGCTCTACCACATCCTACATCTGTCGATAATTCACCT

Sonde F (184 pb)

CGTTTCTCCGATCAGGCCGAGAGAACGATCAAGCTCTACCACATCCTAC
ATCTGTCTGATAATTCACCTCAATATAGTTAACCCCTATGCATACCCGATA
TTGGCAAATTGCCTTCAGGTCAA ACTGACACCGAGCGCCACTCAGGTCT
CGACTTGTCAAACCCCTCTAAGTAAGGCCGCGAGCATT

Figure 3.15 : Séquences nucléotidiques des sondes A, B, C, D, E et F employées pour les essais secondaires de retardement sur gel.

Sonde G (199 pb)

```
TAAGTAAGGCCCGAGCATTTATTTTGTAGCCCCAATCATCGGCGCCAAC  
TTAAACGATGGGGGATTCCCCTAGTAGCAGACGTCCGGTCAACCAGTA  
AAATATCGAGATTATTACTTAGGAATGGTGGCGCGCAGAGTGCAGCCTG  
TGGCCACGAGCAGCTGAGGATGAATGCGTCGAGCAGCTTCGCCATTGA  
AGAC
```

Sonde H (202 pb)

```
TTATTACTTAGGAATGGTGGCGCGCAGAGTGCAGCCTGTGGCCACGAG  
CAGCTGAGGATGAATGCGTCGAGCAGCTTCGCCATTGAAGACTATCTG  
TCACCTCCCCGAGGCGCGGCGCTGTTGCAGGCACACATCGAATCATCG  
ACCGAAGTAGCTCGACAATTCGGTTCGTTGCGATAGCGCTAGTATCGA  
AACGATAGTA
```

Sonde I (178 pb)

```
CAGGCACACATCGAATCATCGACCGAAGTAGCTCGACAATTCGGTTTCG  
TTGCGATAGCGCTAGTATCGAAACGATAGTAACGAAAACCTCCCTCCCC  
CTATGTTTCGTCGGAAGTCCGGATTAATTAGAGGTCCCGACACGTGC  
AATTCAAAGGAGCCAGTGAAATCATGAGTTTCGA
```

Figure 3.16 : Séquences nucléotidiques des sondes G, H et I employées pour les essais secondaires de retardement sur gel.

3.1.2.2 Essais de retardement sur gel effectués avec les sondes A, B et C

Ces expériences ont permis d'évaluer la capacité de la protéine His-Orf0 à se lier aux sonde A, B et C situées à l'intérieur de la sonde 1 qui répondait positivement aux essais de liaison avec la protéine de fusion. Lors des essais avec ces sondes raccourcies, seules les sondes A et B ont été retardées (Figure 3.17). Ces dernières pourront donc être utilisées pour des essais ultérieurs de protection à la DNase. Puisque les sondes A et B se chevauchent au sein de la sonde mère 1, il se peut que ces dernières partagent le même site de fixation pour la protéine His-Orf0. Ces expériences ayant pour unique but de cibler des régions plus courtes à l'intérieur de la sonde 1 pour des essais de protection à la DNase, aucune expérience n'a été effectuée avec les métabolites de la voie de dégradation du biphényle. De plus, les tests de contrôle avec de l'ADN non marqué n'ont pas été effectués.

3.1.2.3 Essais de retardement sur gel effectués avec les sondes D, E et F

Les expériences de retardement sur gel effectuées avec les sondes D, E et F, produites à partir de la sonde mère 3, ont été réalisées dans le même but que pour les sondes A, B et C. Parmi ces trois sondes raccourcies, seule la sonde F a démontré sa capacité de se lier à la protéine His-Orf0 (Figure 3.18). Cette sonde pourra donc servir à des essais de protection à la DNase.

3.1.2.4 Essais de retardement sur gel effectués avec les sondes G, H et I

Finalement, les trois sondes raccourcies provenant de séquences retrouvées à l'intérieur de la sonde 4 ont aussi été évaluées quant à leur capacité de se lier à la protéine His-Orf0. Parmi les sondes G, H et I, seule la sonde G a été retardée lors de sa migration dans le gel, et a par conséquent été conservée pour des expériences ultérieures (Figure 3.19).

a)

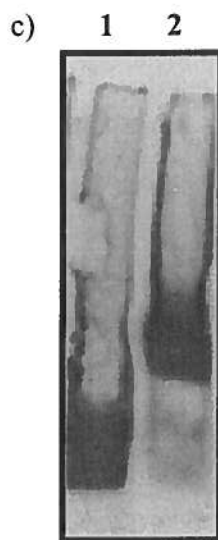
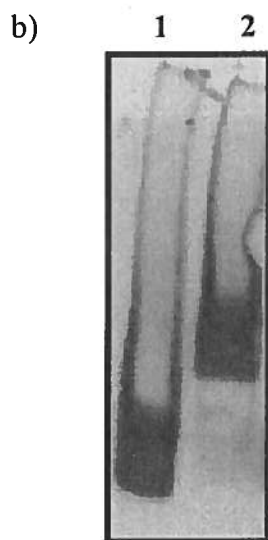
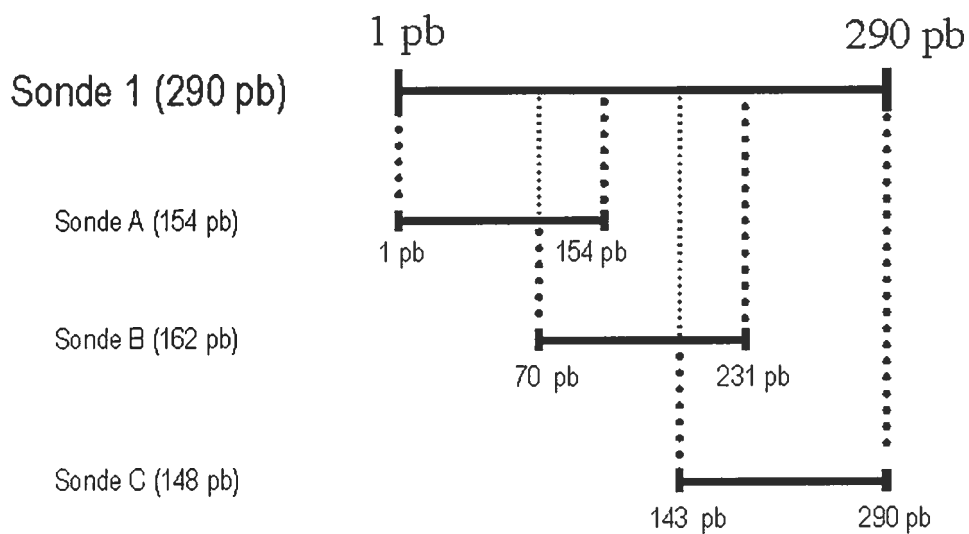
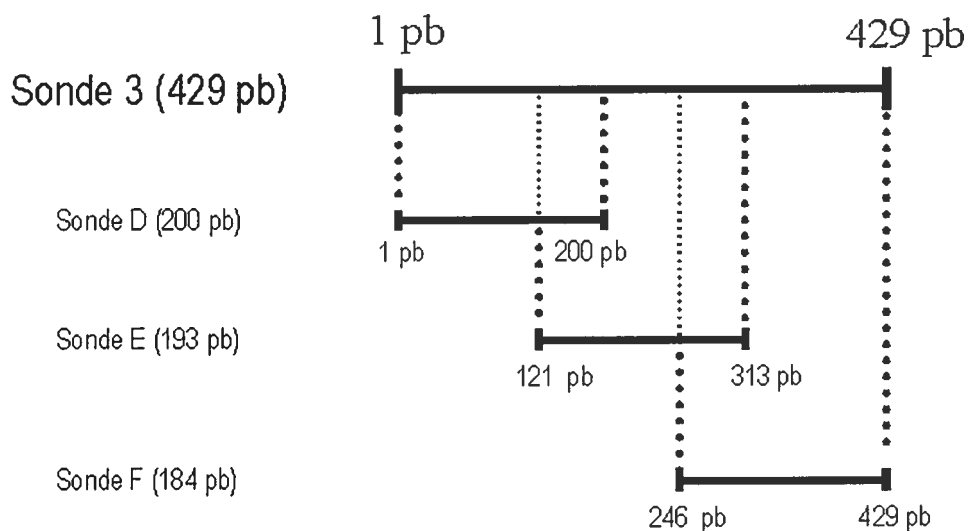


Figure 3.17: Essais de retardement sur gel effectués avec les sondes A, B et C provenant de la sonde 1. a) Localisation des sondes A, B et C à l'intérieur de la sonde 1. Pour les figures b), c) et d), le puits 1 représente la migration de l'ADN seul, tandis que le puits 2 correspond au mélange ADN et Orf0. Les images b), c) et d) correspondent respectivement aux sondes A, B et C.

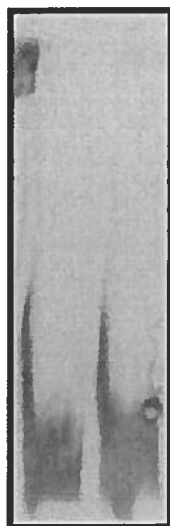
a)



b) 1 2



c) 1 2

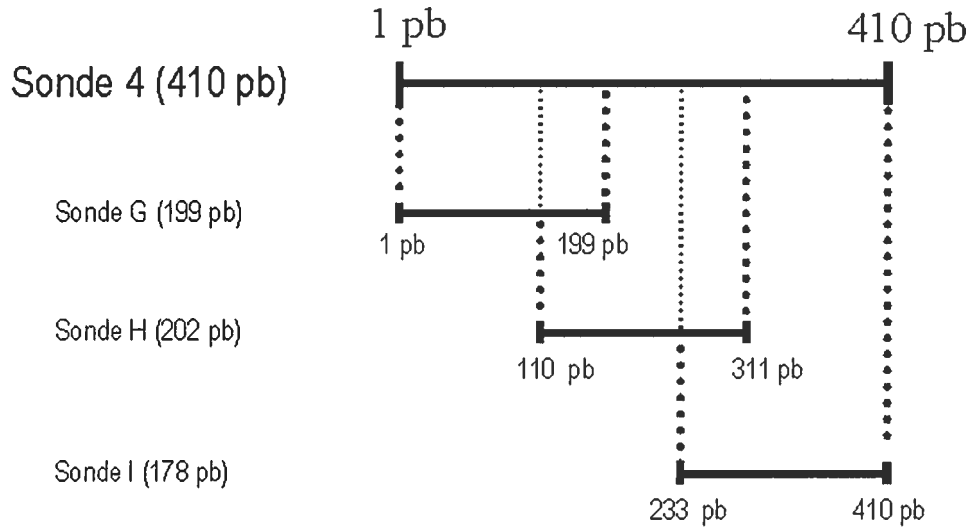


d) 1 2



Figure 3.18 : Essais de retardement sur gel effectués avec les sondes D, E et F provenant de la sonde 3. a) Localisation des sondes D, E et F à l'intérieur de la sonde 3. Pour les figures b), c) et d), le puits 1 représente la migration de l'ADN seul, tandis que le puits 2 correspond au mélange ADN et Orf0. Les images b), c) et d) correspondent respectivement aux sondes D, E et F.

a)



b)



c)



d)



Figure 3.19 : Essais de retardement sur gel effectués avec les sondes G, H et I provenant de la sonde 4. a) Localisation des sondes G, H et I à l'intérieur de la sonde 4. Pour les figures b), c) et d), le puits 1 représente la migration de l'ADN seul, tandis que le puits 2 correspond au mélange ADN et Orf0. Les images b), c) et d) correspondent respectivement aux sondes G, H et I.

3.1.3 Essais avec les sondes « I » et « II »

3.1.3.1 Choix des sondes « I » et « II »

Au cours des travaux, tel qu'expliqué dans la section 2.6.4, deux séquences spécifiques de l'opéron *bph* de *C. testosteroni* B-356 ont été évaluées quant à leur capacité de se lier à la protéine His-Orf0. Ces séquences ont été choisies en se basant sur des homologies avec des séquences consensus connues pour la liaison avec des protéines de type GntR (Ohtsubo et *al.*, 2001; Watanabe et *al.*, 2000). Ces séquences homologues sont identifiées « I » et « II », et se retrouvent respectivement à l'intérieur des sondes B (sonde 1) et G (sonde 4), tel qu'illustré à la Figure 3.20.

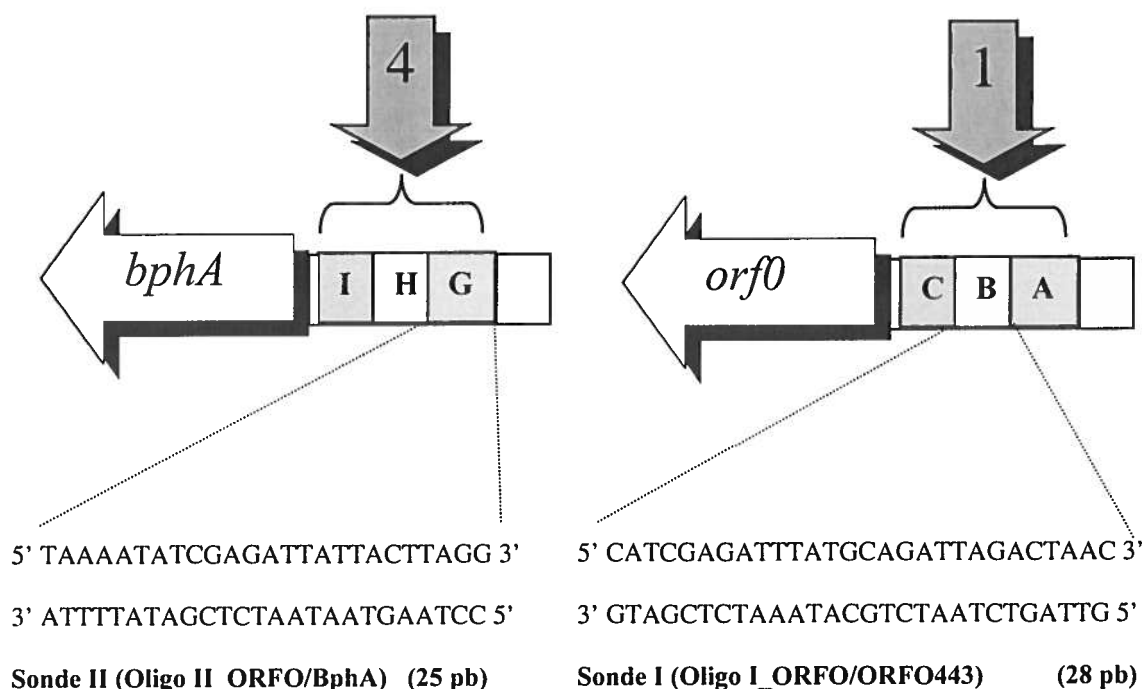


Figure 3.20 : Localisation et séquences des sondes « I » et « II ». La sonde « I » est située à l'intérieur de la sonde B, qui elle, est à l'intérieur de la sonde 1. La sonde « II » est retrouvée à l'intérieur de la sonde G, qui fait partie de la sonde 4.

3.1.3.2 Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde « I »

La sonde « I » d'une longueur de 28 pb a été évaluée quant à sa capacité de se lier à la protéine His-Orf0. Les essais ont démontré qu'il n'y avait pas de liaison entre les deux intervenants (Figure 3.21). Par conséquent, les essais avec les différents métabolites et avec l'ADN non marqué n'ont pas été effectués.

3.1.3.3 Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde « II »

La sonde « II » (25 pb) a aussi été évaluée pour déterminer son affinité avec la protéine d'étude. Avec les résultats obtenus, il semble que cette séquence possède un site de liaison pour la protéine His-Orf0. L'ajout de 156 μ moles de 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle ou de 126 μ moles de 2,3-dihydroxybiphényle entraîne la dissociation du complexe formé entre la protéine et la sonde « II » (Figure 3.22). Tout comme pour la sonde « I », l'expérience contrôle avec un excès d'ADN non marqué n'a pas été effectuée.

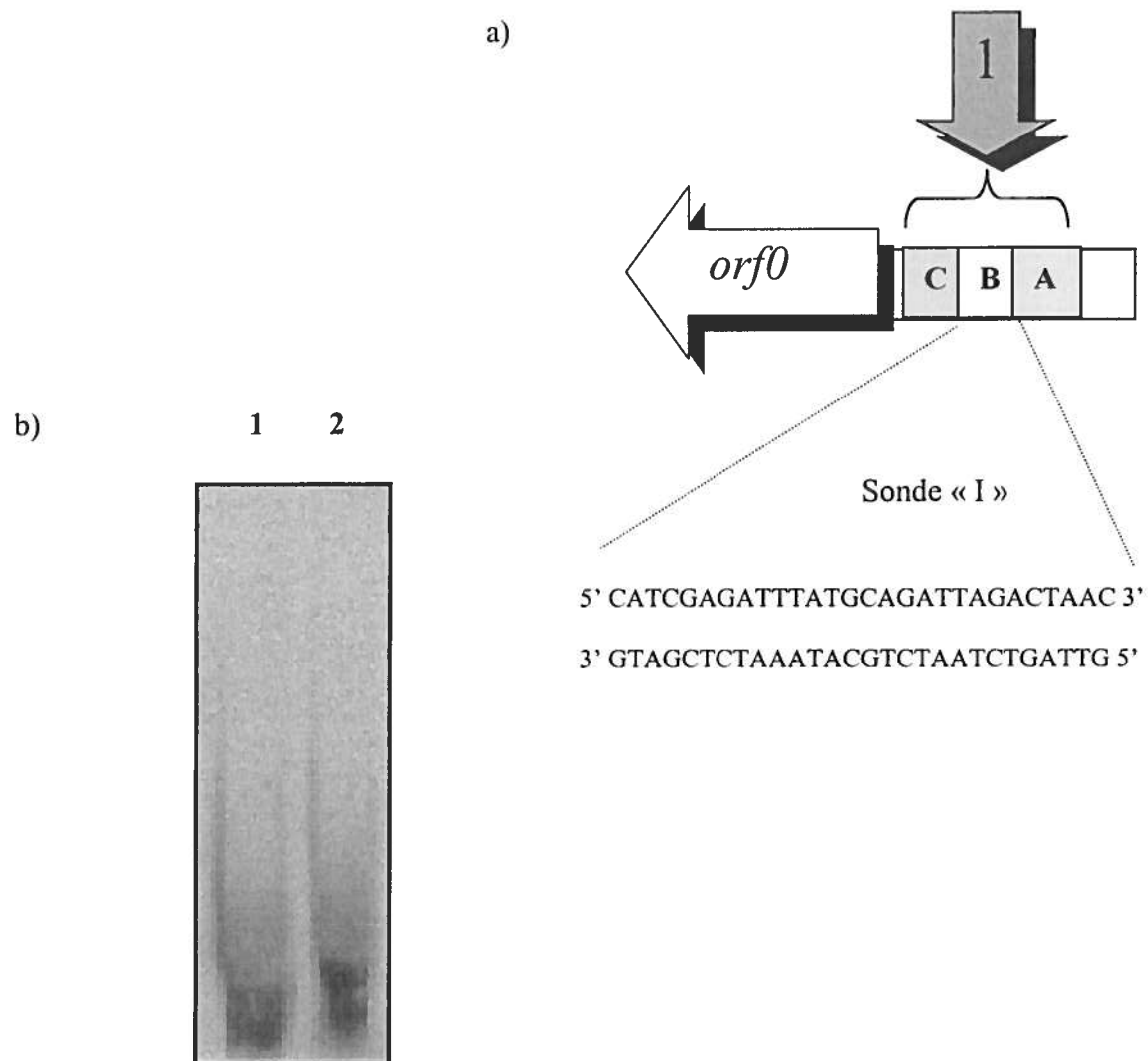


Figure 3.21 : Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde « I ». a) Localisation de la sonde « I » à l'intérieur de la sonde 1. b) Le puits 1 contient la sonde seule et le puits 2 contient l'ADN en présence de la protéine Orf0.

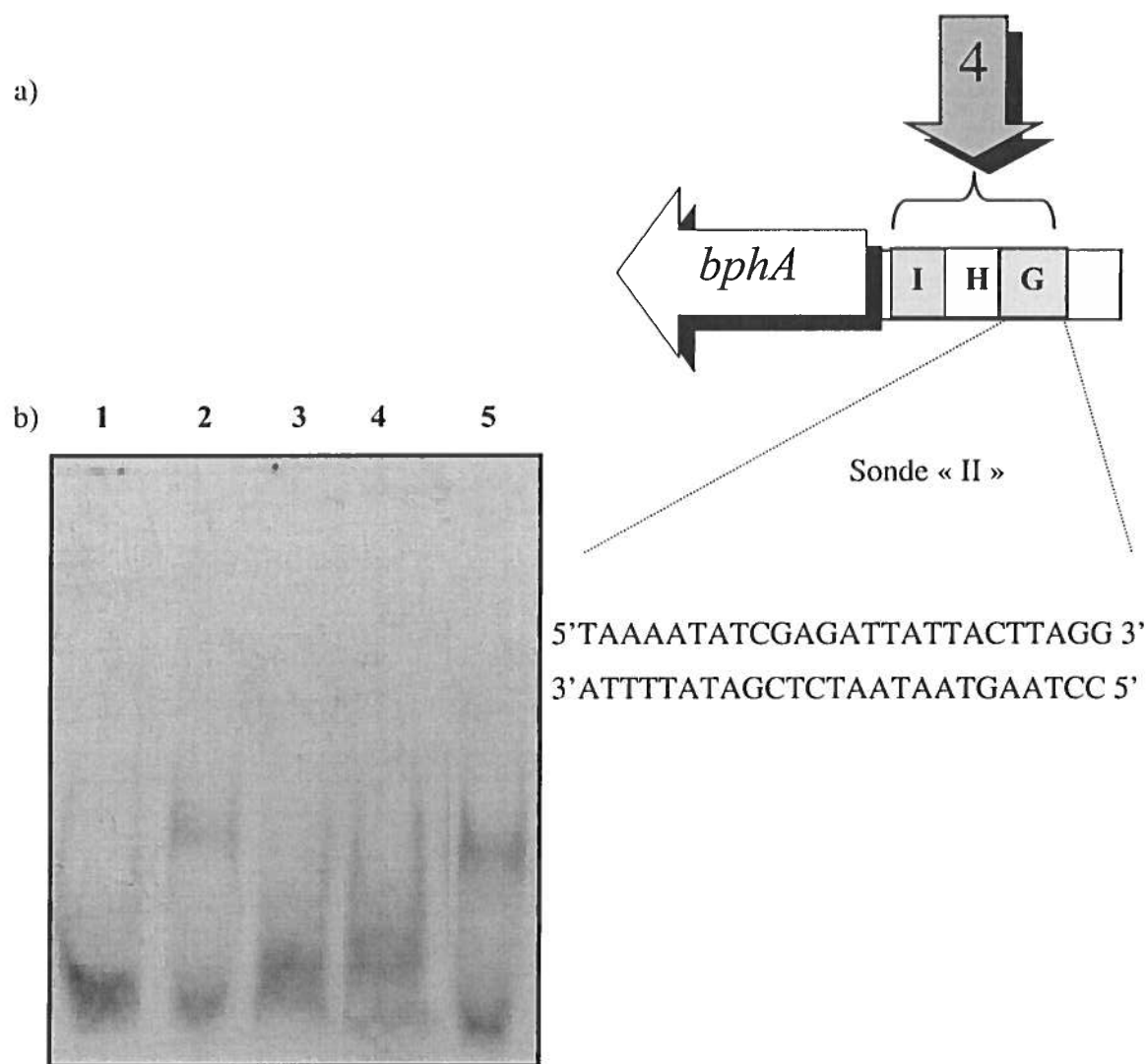


Figure 3.22: Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde « II ». a) Localisation de la sonde « II » à l'intérieur de la sonde 4. b) Essais de retardement sur gel effectués avec la sonde « II » en présence et en absence de 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle ou de 2,3-dihydroxybiphényle. Le puits 1 contient la sonde seule, le puits 2 contient la sonde en présence d'Orf0, le puits 3 contient la sonde, Orf0 et 6 μ L de 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle à une concentration de 26 mM. Le puits 4 contient la sonde, Orf0 et 6 μ L de 2,3-dihydroxybiphényle à une concentration de 21 mM. Le puits 5 contient le même mélange réactionnel que les puits 3 et 4, en substituant les métabolites par un volume équivalent d'acétone.

3.2 Essais de protection à la DNase

Le principe de protection à la DNase est fort simple et consiste en la localisation précise de la région de fixation de la protéine sur les sondes ADN. Sommairement, cette expérience consiste à comparer les patrons de digestion entre deux sondes identiques, l'une ayant été incubée en présence de la protéine d'étude, et l'autre sans. En effectuant une réaction de séquençage de type G +A en parallèle, il devient alors possible de repérer la région de liaison de la protéine sur la sonde ADN.

3.2.1 Choix des sondes A, B, F et G employées pour les essais de protection à la DNase

Les essais de protection à la DNase ont été effectués avec les sondes sélectionnées lors des essais de retardement sur gel; les sondes A, B, F et G étaient les seules à démontrer un potentiel de liaison avec la protéine His-Orf0.

3.2.2 Titration de la DNase

Les essais de titration visaient uniquement à déterminer la concentration optimale de DNase à ajouter dans les mélanges réactionnels en fonction de la quantité d'ADN. Suite aux expériences, il s'est avéré que la concentration idéale était de 0,67 U. Cette valeur constitue la moyenne entre les quantités de DNase retrouvées dans les puits 3 et 4 (Figure 3.23), soit la moyenne entre 1 U et 0,33 U.

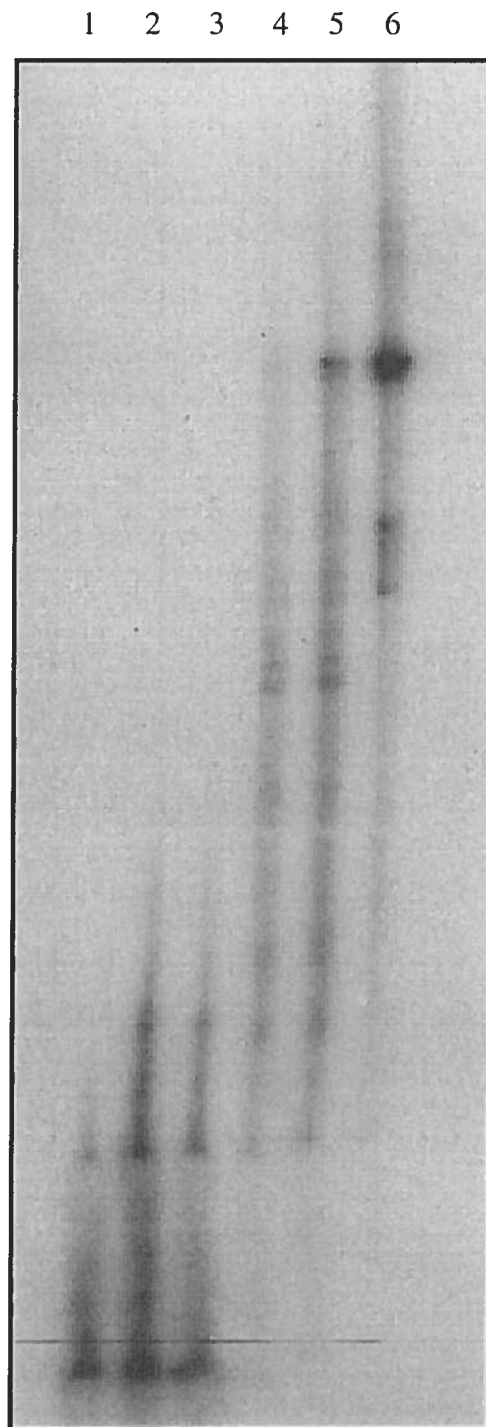


Figure 3.23 : Exemple de titration de la DNase avec la sonde B. Tous les puits contiennent le même mélange réactionnel (Tableau 2.8), la seule différence étant la concentration de DNase ajoutée dans chacune des réactions (Tableau 2.9). Puits 1: 9 U; Puits 2: 3U ; Puits 3: 1 U; Puits 4: 0,33 U; Puits 5: 0,11 U; et Puits 6: 0,037 U.

3.2.3 Résultats de protection à la DNase pour les sondes A*, B*, F* et G*

Dans des conditions idéales, suite aux essais de titration, il aurait été possible de procéder aux essais de protection à la DNase avec les quatre sondes sélectionnées. Par contre, pour des raisons qui demeurent encore à élucider, aucun résultat concluant ne peut ressortir de ces expériences. Comme il a été possible de le constater à la Figure 3.22, les bandes obtenues suite à la digestion à la DNase ne sont pas assez fines pour permettre le séquençage. De plus, lorsqu'est venu le temps d'effectuer les essais de protection à la DNase, il n'a pas été possible de localiser avec certitude une région d'ADN protégée. Plusieurs changements au protocole ont été apportés pour parvenir à pallier à ce problème. Dans l'ordre séquentiel des étapes, les modifications suivantes ont été apportées: choix de l'enzyme pour la réaction de polymérisation en chaîne, quantité de sel retrouvée dans le tampon servant à solubiliser l'ADN avant l'étape de marquage, type de marquage (DIG, ^{35}S et ^{32}P) et de purification de l'ADN, concentration d'ADN et de protéines dans le mélange réactionnel, temps d'exposition et moyen d'inactiver la DNase, volume d'échantillon à charger dans chacun des puits, constitution du gel, temps de migration des échantillons, intensité du voltage lors de la migration, nécessité de fixer ou non l'ADN dans le gel et temps d'exposition avant de développer les photos. Dû aux contraintes de temps, les dernières étapes de mise au point du protocole n'ont pas pu être réalisées.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

4.1 Essais primaires de retardement sur gel

Les essais de retardement sur gel ont en premier lieu été effectués avec les quatre sondes potentiellement promotrices (1, 2, 3 et 4) ciblées par Bellemare (2000) dans la région de l'opéron *bph*. Les sondes 1 et 2 proviennent de la région II en amont des gènes *orf0* et *bphG* et les sondes 3 et 4 ont toutes deux été ciblées en amont de *bphA* à l'intérieur de la région I, tel qu'illustré à la Figure 3.1. Lors des essais de retardement effectués avec la protéine de fusion His-Orf0, les résultats de la présente étude sont venus confirmer ceux obtenus par Bellemare (2000), à l'exception des résultats obtenus avec la sonde 2. La protéine His-Orf0 a démontré sa capacité de se fixer de façon spécifique aux sondes 1, 3 et 4, mais il a été impossible de retarder la migration de la sonde 2 sur gel. En fait, un faible retard a été observable, mais uniquement lors de l'ajout d'une concentration 16 fois supérieure en protéines.

De plus, les essais de retardement sur gel ont permis de déterminer quels étaient les inducteurs ou molécules effectrices impliqués dans la régulation de la dégradation du biphényle chez *C. testosteroni* B-356; l'effet de différents métabolites sur l'interaction ADN-His-Orf0 a été évalué pour les sondes 1, 3 et 4. En se basant sur les résultats de Bellemare (2000), nous savions déjà que le biphényle n'était pas un effecteur. Lors des essais effectués avec le 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle et le 2,3-dihydroxybiphényle, il s'est avéré que ces deux métabolites parvenaient à dissocier les complexes ADN-Orf0; les essais préliminaires effectués par Bellemare (2000) avec la sonde 3 et le 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle ont pu être confirmés. En contraste, chez la bactérie *Pseudomonas* sp. KKS102, l'ajout de 2,3-dihydroxybiphényle ne permet pas de dissocier le complexe ADN-Orf0 (Ohtsubo et al., 2001); chez *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707, le 2,3-dihydroxybiphényle est reconnu pour renforcer le complexe ADN-Orf0 formé (Watanabe et al., 2000).

Lors des essais effectués avec le benzoate et le catéchol, il était toujours possible de dissocier les complexes ADN-Orf0 formés, mais des concentrations 10 fois supérieures en

métabolites étaient nécessaires pour parvenir à cette fin. Il est donc possible d'avancer que les quatre métabolites pourraient être des effecteurs, mais qu'ils n'auraient pas nécessairement le même rôle dans le mécanisme de régulation de l'opéron *bph*. Pour les essais effectués avec la sonde 4, il semble que le benzoate et le catéchol ne soient pas des effecteurs. Des concentrations plus élevées en métabolites ont été évaluées, mais la trop forte concentration en sel résultante dans les mélanges réactionnels est venue perturber la migration des bandes, empêchant de visualiser les résultats.

L'effet du métabolite HOPDA n'a pas été étudié chez la souche B-356 puisque ce dernier n'a pas pu être convenablement extrait suite à sa production enzymatique. Chez les souches KF707, KKS102 et le transposon Tn4371, le HOPDA agirait à titre d'inducteur. Chez les souches KKS102 et le transposon Tn4371, il y aurait formation d'un complexe BphS-HOPDA entraînant la dissociation du complexe ADN-BphS et permettant la transcription des gènes de la dégradation du biphenyle (Ohtsubo et *al.*, 2001; Ohtsubo et *al.*, 2000). Chez la souche KKS102, quatre sites de liaison pour BphS ont été identifiés (BS I, BS II, BS III et BS IV): la présence de HOPDA a entraîné la disparition presque totale des bandes de retardement. Ce système permet à la souche KKS102 d'activer l'expression des gènes *bph* seulement lorsque le biphenyle est assez abondant pour que le HOPDA s'accumule dans le milieu (Ohtsubo et *al.*, 2000); un patron similaire pourrait être envisageable pour le transposon Tn4371 laissant croire que les inducteurs pourraient être 2,3-dihydroxybiphenyle et le HOPDA (Mouz et *al.*, 1999). Chez la souche KF707, Orf0 pourrait changer de conformation en présence de HOPDA et se lier fortement à la région opératrice pour permettre la transcription de son propre gène (Watanabe et *al.*, 2000). Finalement, chez la souche *Burkholderia* sp. LB400, il est connu que le 3-Cl-HOPDA et le 4-Cl-HOPDA inhibent tous deux de façon compétitive l'enzyme BphD et qu'ils s'accumulent dans le milieu de culture (Omori et *al.*, 1986; Seah et *al.*, 2000).

4.2 Essais secondaires de retardement sur gel et essais de protection à la DNase

Suite aux essais de retardement sur gel, d'autres essais ont été effectués avec des sondes raccourcies: A, B, C, D, E, F, G, H et I. Ces essais ont été effectués dans le but de localiser plus précisément les sites de fixation de la protéine His-Orf0 l'intérieur des sondes 1, 3 et 4 pour des essais de protection à la DNase. Il a été possible d'identifier quatre sondes répondant positivement aux essais de retardement sur gel: les sondes A, B, F et G. Par

conséquent, il est possible d'avancer qu'il existe au moins un site de fixation de la protéine His-Orf0 à l'intérieur de chacune des sondes raccourcies.

Le protocole de protection à la DNase n'est pas encore tout à fait mis au point. Néanmoins, les lignes directrices du protocole ont été tracées et les essais de titration ont permis de déterminer la concentration de DNase nécessaire dans le mélange réactionnel. Comme mentionné à la section 3.2.3, plusieurs variables ont été modifiées pour parvenir à l'établissement du protocole, et la résolution des bandes demeure à être améliorée.

4.3 Essais tertiaires de retardement sur gel

Mis à part le fait que les séquences nucléotidiques exactes qui permettent la fixation de la protéine à chacune des sondes ne soient pas encore connues, nous avons ciblé des régions spécifiques d'ADN de la souche B-356 en se basant sur des résultats obtenus par d'autres équipes de recherche. Watanabe et *al.* (2000) et Arai et *al.* (1999) ont suggéré que la séquence consensus pour les protéines de type GntR était **TATCGATA** alors que Ohtsubo et *al.* (2001) ont suggéré que la séquence consensus était plutôt une séquence inversée répétée plus ou moins parfaite qui suit la règle de AN₁₂T (Figure 4.1 a et b). Basé sur ces hypothèses, nous avons ciblé des sections de séquences qui se conformaient au moins partiellement à l'un ou l'autre de ces critères en amont de *orf0* et de *bphA* chez la souche B-356, tel qu'illustré à la Figure 4.1 c.

Lors des essais de retardement sur gel effectués avec la sonde « I », cette dernière a démontré son incapacité de se lier à la protéine His-Orf0. Il aurait été fort possible que cette séquence soit en mesure d'être retardée par la protéine d'étude puisque cette séquence se retrouve à l'intérieur de la sonde B, qui elle, répondait positivement aux essais de retardement sur gel. La sonde « I » avait été choisie parce qu'elle correspondait à la région de la sonde B qui ressemblait le plus aux deux types de séquences consensus décrites ci-haut. En ce qui concerne la sonde « II », retrouvée à l'intérieur de la région I, il a effectivement été possible de causer un retard lors de sa migration. La sonde « II » se retrouve à l'intérieur de la sonde G qui elle aussi était retardée par la protéine His-Orf0 lors de sa migration. Comparativement à la sonde « I », la sonde « II » démontre de plus fortes homologies avec les deux types de séquences consensus. La sonde « II » possède une séquence **TATCGATA** qui est presque parfaite et une séquence AN₁₂T inversée répétée plus ou moins parfaite. L'effet de deux

métabolites a été évalué; le 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle et le 2,3-dihydroxybiphényle ont tous deux permis de dissocier les complexes précédemment formés. Nous pouvons donc proposer que la séquence de la sonde « II » (Figure 4.1 c) serve de point de fixation de la protéine Orf0 sur l'ADN en amont de l'opéron *bph* pour réguler son expression. Cependant, à ce jour, le rôle fonctionnel de Orf0 chez la souche B-356 reste à établir.

4.4 Connaissances obtenues chez la souche B-356 en comparaison avec diverses souches bactériennes

Les travaux de Bellemare (2000) et les nôtres portent à conclure que Orf0 jouerait un rôle dans la régulation de l'opéron *bph* de *C. testosteroni* B-356. Cette protéine a été classée parmi les régulateurs de type GntR (à fonction répressive) suite à l'analyse de la séquence en acides aminés et à la présence d'un motif de liaison de type HTH dans sa partie N-terminale.

Chez la souche B-356, suite à des expériences effectuées avec des mutants *orf0*-nuls, il a été possible d'émettre l'hypothèse selon laquelle il existerait quatre sites d'initiation de la transcription au sein de l'opéron biphényle; les gènes *bphAEorfXFBC* seraient transcrits indépendamment de *bphD*, tout comme *bphG* et *orf0* (Bellemare, 2000). Comparativement à la souche B-356, la souche KF707 posséderait six sites d'initiation de la transcription (Watanabe et al., 2000) et trois pour LB400 (Beltrametti et al., 2001). Chez la souche B-356 (Bellemare, 2000) et KF707 (Watanabe et al., 2000), les mutants *orf0*-nuls ne peuvent croître sur le biphényle comme seule source de carbone, alors que la souche LB400 (Beltrametti et al., 2001) en est capable. Chez les souches sauvages LB400, KF707, KKS102 et B-356, les gènes *bph* sont tous induits en présence de biphényle.

Chez les bactéries *Pseudomonas* sp. KKS102, *Burkholderia* sp. LB400 et *Acaligenes eutrophus* A5 (transposon Tn4371), il a été démontré que Orf0 agirait à titre de répresseur, tout comme la plupart des membres de la famille GntR. Par contre, un rôle d'activateur aurait été attribué à la protéine correspondante chez *P. pseudoalcaligenes* KF707 (Watanabe et al., 2000).

a)

Orf0 de *P. pseudoalcaligenes* KF707 : ATATAAA**TATCGATT**ATC
 AphS de *C. testosteroni* TA441 (site I) : ATAAAAC**TATCGATA**AAA
 AphS de *C. testosteroni* TA441 (site II) : ATGAAAA**TATCGATA**AAT

b)

Orf0 du plasmide Tn4371	:	TTAGAA A AATGTC		GTTTTT T TTCTAA
Orf0 de <i>Pseudomonas</i> sp. KKS102 (BS I)	:	ATGCAT A TAATCT		ATTTTA T ATAAAA
Orf0 de <i>Pseudomonas</i> sp. KKS102 (BS II)	:	ATATAAA A AATAAC		GTTATT T AAAATC
Orf0 de <i>Pseudomonas</i> sp. KKS102 (BS III)	:	AAAATC A ATGGCA		ACAATA T GTTCAA
Orf0 de <i>Pseudomonas</i> sp. KKS102 (BS IV)	:	ATGTTCA A AAAAAA		GATTGT T CGCGCA

c)

Sonde « I » :	CATCG A GATT TATGCAGA T TAGACTAAC
Sonde « II » :	TAA A TATCGAGATT T TA T ACTTAGG

Figure 4.1 Schéma des séquences consensus pour les protéines de type GntR. a) Séquence consensus des souches de KF707 et TA441 selon Watanabe *et al.* (2000) et Arai *et al.*, (1999) avec la séquence **TATCGATA**. Les bases ombragées à l'intérieur des encadrés représentent les homologies avec la séquence décrite. b) Séquence consensus de la souche KKS102 et du plasmide Tn4371 selon Ohtsubo *et al.*, (2001) selon le modèle: AN₁₂T. Les lettres en caractère gras représentent les bases inversées répétées composant une séquence inversée répétée plus ou moins parfaite. c) Comparaison des séquences « I » et « II » de *C. testosteroni* B-356 avec les séquences proposées pour les protéines de type GntR.

En se basant sur ces travaux, il semble que le système de régulation de la voie du biphényle chez les bactéries ait évolué différemment chez les bactéries dépendant de l'hôte chez lequel les gènes *bph* se sont intégrés. Cette constatation est aussi appuyée par le fait que le système de régulation de l'opéron *bph* de *Rhodococcus* sp. M5 est constitué d'un système à deux composantes similaire à celui de l'opéron *tol* de *Pseudomonas putida* F1 (Lau et *al.*, 1996). Les données de la littérature ainsi que les résultats de nos travaux ne nous permettent donc pas de spéculer sur le rôle fonctionnel de Orf0 chez la souche B-356. Notre étude a cependant permis d'identifier une courte séquence d'ADN qui forme un complexe avec Orf0 en l'absence des effecteurs possibles de la voie du biphényle. Cette séquence pourrait donc servir à construire des systèmes de gènes reporteurs qui permettront de préciser le rôle de cette protéine de régulation chez la souche B-356.

CHAPITRE 5

CONCLUSION

Les présents travaux avaient pour but d'améliorer les connaissances actuelles sur le système de régulation de la dégradation du biphényle chez la bactérie *C. testosteroni* B-356. Au départ, la séquence du gène *orf0* était déjà connue, et le protocole de purification de la protéine His-Orf0 par chromatographie d'affinité (ht) avait été établi. Des expériences de mutants potentiels *orf0*-nuls préalablement effectuées ont permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle il existerait quatre sites d'initiation de la transcription au sein de l'opéron biphényle chez cette même souche. Finalement, des essais de liaison de la protéine avec des régions potentiellement promotrices ciblées sur l'opéron *bph* ont été effectués et ont permis de conclure que la protéine Orf0 avait un rôle à jouer dans la régulation de l'opéron *bph*. Les effets du biphényle et deux de ses métabolites sur la liaison ADN-Orf0 ont aussi été étudiés.

Le projet actuel avait pour premier objectif de poursuivre et de terminer les expériences de retardement sur gel. Ces dernières ont été effectuées avec les sondes précédemment sélectionnées (1, 2, 3 et 4) et avaient pour but d'évaluer l'effet de différents métabolites sur l'interaction ADN-Orf0. Avec les résultats obtenus, il est possible d'avancer que la protéine His-Orf0 peut se fixer à trois des quatre sondes prélevées au sein de l'opéron biphényle. De plus, des métabolites comme le 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle, le 2,3-dihydroxybiphényle, le benzoate et le catéchol peuvent empêcher la formation du complexe ADN-protéine (à l'exception de la sonde 4 pour laquelle le catéchol et le benzoate n'auraient pas d'influence). Il aurait été bonifiant d'être en mesure d'évaluer l'effet du métabolite HOPDA, mais les essais d'extraction de ce composé étaient infructueux d'après les analyses effectuées au GC/MS.

Suite à ces essais, des régions plus courtes à l'intérieur des sondes répondant positivement aux essais préliminaires ont été aussi analysées quant à leur capacité de se lier à la protéine His-Orf0. Neuf sondes de tailles réduites (A, B, C, D, E, F, G, H et I) ont été étudiées et quatre d'entre elles ont été retenues (A, B, F et G). Ces sondes raccourcies ont été conservées pour être employées dans des essais de protection à la DNase, processus nécessitant de courts fragments d'ADN.

En cours d'expérimentation, deux autres sondes (« I » et « II ») se sont ajoutées au projet suite à des résultats apportés par d'autres équipes de recherche (Arai et *al.*, 1999; Ohtsubo et *al.*, 2001; Watanabe et *al.*, 2000); leurs séquences se retrouvent à l'intérieur de deux des sondes évaluées précédemment (B et G). Ces régions ont été choisies parce que leur séquence était similaire à celles rapportées pour les souches KKS102 et KF707 (Ohtsubo et *al.*, 2001; Watanabe et *al.*, 2000). Avec ces essais, seule la sonde « II » a été retardée par la protéine His-Orf0 lors de sa migration.

En dernier lieu, des essais de protection à la DNase ont été effectués pour parvenir à localiser de façon exacte les sites de liaison de la protéine His-Orf0 sur les sondes A*, B*, F* et G*. Malheureusement, comme mentionné dans la section 3.2.3, aucun résultat concluant n'a pu être apporté avec ces expériences. De nombreuses modifications ont été apportées pour la mise au point du protocole et d'autres améliorations doivent être apportées pour parvenir à l'obtention d'une meilleure résolution des bandes.

Dans une perspective d'avenir, il s'agirait de terminer la mise au point du protocole de protection à la DNase et d'effectuer des essais avec les sondes A, B, F, G et « II ». Il est possible que plus d'un site de fixation pour la protéine puisse se retrouver à l'intérieur d'une même sonde. Dans de telles circonstances, il serait envisageable d'effectuer à nouveau les essais de retardement sur gel avec les séquences spécifiques pour vérifier l'effet de chacun des métabolites, et de tenter d'extraire à nouveau le HOPDA pour l'inclure dans ces expériences. Mais encore, des expériences *in vivo* visant la quantification des ARNm exprimés par la bactérie, lorsque celle-ci est en présence/absence de métabolites, pourraient être un bon moyen de mieux caractériser les mécanismes transcriptionnels chez *C. testosteroni* B-356. Finalement, comme mentionné à la section 4.4, la construction de systèmes de gènes reporteurs pourrait permettre de préciser le rôle du produit génique de *orf0* au niveau de la régulation de la dégradation du biphenyle chez la souche B-356.

BIBLIOGRAPHIE

van AALTEN D. M., C. C. DiRusso, J. Knudsen et R. K. Wierenga. 2000. « Crystal structure of FadR, a fatty acid-responsive transcription factor with a novel acyl coenzyme A-binding fold ». EMBO J., vol. 19, p. 5167-5177.

ABRAMOWICZ, D. A. 1994. « Aerobic PCB biodegradation and anaerobic PCB dechlorination in the environment ». Res. Microbiol., vol. 145, p. 42-46.

ABRIL M.-A., M. Buck et J. L. Ramos. 1991. « Activation of the *Pseudomonas* TOL plasmid upper pathway operon. Identification of binding sites for the positive regulator XylR and for the integration host factor protein ». J. Biol. Chem., vol. 266, p. 15832-15838.

ACKERMAN D.G., L. L. Scinto, P. S. Bakshi, R. G. Delumyea, R. J. Johnson, G. Richard, A. M. Takata et E. M. Sworzyn. 1983. Destruction and disposal of PBCs by thermal and non-thermal methods. New Jersey : Noyes Data Corporation.

ADRIAENS P., H.-P. E. Kohler, D. Kohler-Staub et D. D. Focht. 1989. « Bacterial dehalogenation of chlorobenzoates and coculture biodegradation of 4,4'-dichlorobiphenyl ». Appl. Env. Microbiol., vol. 55, p. 887-892.

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

AHMED M. et D. D. Focht. 1973. « Degradation of polychlorinated biphenyls by two species of *Achromobacter* ». Can. J. Microbiol., vol. 19, p. 47-52.

ALLISON S. L. et A. T. Phillips. 1990. « Nucleotide sequence of the gene encoding for the histidine utilization genes of *Pseudomonas putida* ». J. Bacteriol., vol. 172, p. 5470-5476.

ANLIKER R. et E. A. CLARKE. 1980. « The ecology and toxicology of synthetic organic pigments ». Chemosphere, vol. 9, p. 595-609.

ANONYME. 1993. Selecting remediation techniques for contaminated sediments. Environmental Protection Agency, EPA-823-B93-001.

ANONYME. 1998. Behavior of polychlorinated biphenyls (PBCs); final rule. Environmental Protection Agency. 40 CFR. Parts 750-761. 92p.

ARAI H. S. Akahira, T. Ohishi et T. Kudo. 1999. « Adaptation of *Comamonas testosteroni* TA441 to utilization of phenol by spontaneous mutation of the gene for a trans-acting factor ». Mol. Microbiol., vol. 33, p. 1132-1140.

ARENGHI F. L., M. Pinti, E. Galli et P. Barbieri. 1999. « Identification of the *Pseudomonas stutzeri* OX1 toluene-*o*-xylene monooxygenase regulatory gene (*touR*) and of its cognate promoter ». Appl. Env. Microbiol., vol. 65, p. 4057-4063.

ASSINDER S. J. et P. A. Williams. 1990. « The TOL plasmids : determinants of the catabolism of toluene and the xylenes ». Adv. Microb. Physiol., vol. 31, p. 1-69.

ASTURIAS J. A., E. Diaz et K.N. Timmis. 1995. « The evolutionary relationship of biphenyl dioxygenase from gram-positive *Rhodococcus globuliferus* P6 to multicomponent dioxygenases from gram-negative bacteria ». Gene, vol. 156, p. 11-18.

BAIRD, Colin. 1995. Environmental chemistry. États-Unis : W.H. Freeman and Company.

BALLSHMITTER L., L. C. Unglert et H. T. Neu. 1977. « Abbau von chlorierten Aromaten : Microbiologischer Abbau der polychlorierten Biphenyle (PCB). III. Chlorierte Benzoesäuren als Metabolite der PCB ». Chemosphere, vol. 1, p. 51-56.

BARRIAULT D. J. Durand, H. Maaroufi L. D. Eltis et M. Sylvestre. 1998. « Degradation of polychlorinated biphenyl metabolites by naphthalene-catabolizing enzymes ». Appl. Environ. Microbiol., vol. 64, p. 4637-4642.

BARRIAULT D., C. Simard, H. Chatel et M. Sylvestre. 2001. « Characterization of hybrid biphenyl dioxygenases obtained by recombining *Burkholderia cepacia* strain LB400 *bphA* with the homologous gene of *Comamonas testosteroni* strain B-356 ». Can. J. Microbiol., vol. 47, p. 1025-1032.

BARRIAULT D. et M. Sylvestre. 1999. « Functionality of biphenyl 2,3-dioxygenase components in naphthalene 1,2-dioxygenase ». Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 51, p. 592-597.

BARRIAULT D. M. Vedadi, J. Powlowski et M. Sylvestre. 1999. « *cis*-2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphenyl dehydrogenase and *cis*-1,2-dihydro-1,2-dihydroxynaphthalene dehydrogenase catalyse dehydrogenation of the same range of substrates ». Biochem. Biophys. Res. Comm., vol. 260, p. 181-187.

BARTON Dr. T.G., Dr. S. Fergusson et Dr. M. F. Joseph. 1987. Industry and PCBs practical solutions to PCB problems. Pickering (ONT) : The Canadian Electricity Forum Inc.

BATIE C. J., D. P. Ballou et C. J. Correll. 1991. Phtalate dioxygenase reductase and related flavin-iron-sulfur containing electron transferases. Boca Raton (FL) : F. Müller, CRC Press.

BEDARD D. L. et M. L. Haberl. 1990. « Influence of chlorine substitution pattern on the degradation of polychlorinated biphenyls by eight bacterial strains ». Microbial Ecology, vol. 20, p. 87-102.

BEDARD D. L., M. L. Haberl, R. J. May et M. J. Brennan. 1987a. « Evidence for novel mechanisms of polychlorinated biphenyl metabolism in *Alcaligenes eutrophus* H850 ». Appl. Env. Microbiol., vol. 53, p. 1103-1112.

BEDARD D. L., R. Unterman, L. H. Bopp, M. J. Brennan, M. L. Haberl et C. Johnson. 1986. « Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade polychlorinated biphenyls ». Appl. Env. Microbiol., vol. 51, p. 761-768.

BEDARD D. L., R. E. Wagner, M. J. Brennan, M. L. Haberl et J. F. Brown Jr. 1987b. « Extensive degradation of Aroclors and environmentally transformed polychlorinated biphenyls by *Alcaligenes eutrophus* H850 ». Appl. Env. Microbiol., vol. 53, p. 1094-1102.

BELLEMARE, Annie. 2000. « Étude fonctionnelle d'une protéine de type GntR potentiellement impliquée dans la biodégradation du biphényle chez les bactéries Gram négatives ». Mémoire de maîtrise, Montréal, Institut National de Recherche Scientifique - Institut Armand-Frappier, 112p.

BELTRAMETTI F., D. Reniero, S. Backhaus et B. Hofer. 2001. « Analysis of transcription of the *bph* locus of *Burkholderia* sp. strain LB400 and evidence that the ORF0 gene product acts as a regulator of the *bphA1* promoter ». Microbiology, vol. 147, p. 2169-2182.

BERGERON J., D. Ahmad, D. Barriault, A. Larose, M. Sylvestre et J. Powlowski. 1994. « Identification and mapping of the gene translation products involved in the first steps of the *Comamonas testosteroni* B-356 biphenyl/polychlorobiphenyl degradation pathways ». Can. J. Microbiol., vol. 40, p. 743-753.

BERLIN M., J. Gage et S. Holm. 1975. « The distribution and metabolism of 2,4,5,2',5'-pentachlorobiphenyl ». Arch. Environ. Health, vol. 30, p. 141-147.

BERNATI I, M. Kojic et V. Venturi. 2001. « Regulation of the *p*-hydroxybenzoic acid hydroxylase gene (*pobA*) in plant-growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358 ». Microbiology, vol. 147, p. 1611-1620.

BRANSON D. R., G. E. Blau, H. C. Alexander et W. B. Neely. 1975. « Bioconcentration of 2,2',4,4'-tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test ». Trans. Am. Fish. Soc., vol. 4, p.785-792.

BYRNE A. M et R. H. Olsen. 1996. « Cascade regulation of the toluene-3-monooxygenase operon (*tbuA1UBVA2C*) of *Burkholderia pickettii* PK01 : role of the *tbuA1* promoter (*PtbuA1*) in the expression of its cognate activator, TbuT ». J. Bacteriol., vol. 178, p. 6327-6337.

CALLAHAN M. A., M. W. Slimak, N. W. Gabel, I. P. May, C. F. Fowler, J. R. Freed, P. Jennings, R. L. Durfee, F. C. Whitmore, B. Maestri, W. R. Mabey, B. R. Holt et C. Gould. 1979. Water-related environmental fate of 129 priority pollutants, Vol. 1 : Introduction and technical background, metals and inorganics, pesticides and PCBs. Washington (DC) : Office of water planning and standards.

CANOVAS J. L. et R. Y. Stanier. 1967. « Regulation of the enzymes of the β -ketoadipate pathway in *Moraxella calcoacetica*. I. General aspects ». Eur. J. Biochem., vol. 1, p. 289-300.

CANOVAS J. L., M. L. Wheelis et R. Y. Stanier. 1968. « Regulation of the enzymes of the β -ketoadipate pathway in *Moraxella calcoacetica*. II. The role of protocatechuate as inducer ». Eur. J. Biochem., vol. 3, p. 293-304.

CARRIER, G. 1986. Toxicité des BPC, de leurs contaminants et de leurs produits de combustion chez les êtres vivants et persistance des BPC dans l'environnement. Service Programmes de Santé, Hydro-Québec.

CARRIER, G. 1991. Réponse de l'organisme humain aux BPC, dioxines et furannes et analyses des risques toxiques. Québec : Éd. Le Pasteur.

CATELANI D., C. Sorlini et V. Treccani. 1971. « The metabolism of biphenyl by *Pseudomonas putida* ». Experientia, vol. 27, p. 1173-1174.

CCMRE. 1986. « La question des BPC ». In État de la gestion des BPC en Amérique du Nord. Greenpeace International. ISBN 0-921894-29-5.

CEBOLLA A., C. Sousa et V. de Lorenzo. 1997. « Effector specificity mutants of the transcriptional activator NahR of naphthalene degrading *Pseudomonas* define protein sites involved in binding of aromatic inducers ». J. Biol. Chem., vol. 272, p. 3986-3992.

CHATTERJEE D. K., S. T. Kellogg, S. Hamada et A. M. Chakrabarty. 1981. « Plasmid specifying total degradation of 3-chlorobenzoate by a modified *ortho* pathway ». J. Bacteriol., vol. 146, p. 639-646.

CHEBROU H., Y. Hurtubise, D. Barriault et M. Sylvestre. 1999. « Heterologous expression and characterization of the purified oxygenase component of *Rhodococcus globulus* P6 biphenyl dioxygenase and of chimeras derived from it ». J. Bacteriol., vol. 181, p. 4805-4811.

CHIARENZELLI J., R. Scrudato, M. Wunderlich et D. Rafferty. 1995. « Photodecomposition of PCB absorbed on sediments and industrial wastes : implication for photocatalytic treatment of contaminated solids ». Chemosphere, vol. 31, p. 3259-3272.

CHUGANI S. A., M. R. Parsek et A. M. Chakrabarty. 1998. « Transcriptional repression mediated by LysR-type regulator CatR bound at multiple binding sites ». J. Bacteriol., vol. 180, p. 2376-2372.

COCO W. M., M. R. Parsek et A. M. Chakrabarty. 1994. « Purification of the LysR family regulator, ClcR, and its interaction with the *Pseudomonas putida clcABD* chlorocatechol operon promoter ». J. Bacteriol., vol. 176, p. 5530-5533.

COCO W. M., R. K. Rothmel, S. Henikoff et A. M. Chakrabarty. 1993. « Nucleotide sequence and initial functional characterization of the *clcR* gene encoding a LysR family activator of the *clcABD* chlorocatechol operon in *Pseudomonas putida* ». J. Bacteriol., vol. 175, p. 417-427.

COLLIER L. S., G. L. Gaines 3^e et E. L. Neidle. 1998. « Regulation of benzoate degradation in *Acinetobacter* sp. strain ADP1 by BenM, a LysR-type transcriptional activator ». J. Bacteriol., vol. 180, p. 2493-2501.

COLLIER L. S., N. N. Nichols et E. L. Neidle. 1997. « *benK* encodes a hydrophobic permease-like protein involved in benzoate degradation by *Acinetobacter* sp. strain ADP1 ». J. Bacteriol., vol. 179, p. 5943-5946.

COMMISSION DE COOPÉRATION ENVIRONNEMENTALE (CCE), 1996. État de la gestion des BPC en Amérique du Nord. Greenpeace International. ISBN 0-921894-29-5.

COWLES, C. E. N. N. Nichols et C. S. Harwoods. 2000. « BenR, a XylS homologue, regulates three different pathways of aromatic acid degradation in *Pseudomonas putida* ». J. Bacteriol., vol. 182, p. 6339-6346.

CRINE, J.-P. 1986. Hazards, decontamination, and replacement of PCB, environmental science research. New York : Plenum Press.

CROTEAU, Gérard. 1998. « Problématique du dosage et de l'interprétation des teneurs en biphényles polychlorés (BPC) ». Mémoire de maîtrise, Québec, Université Sherbrooke, 53p.

DAVIS D. L. et H. L. Bradlow. 1995. « Can environmental estrogen cause breast cancer? » Sci. Am., vol. 273, p. 166-172.

DELGADO A. et J. L. Ramos. 1994. « Genetic evidence for activation of the positive transcriptional regulator XylR, a member of the NtrC family of regulators, by effector binding ». J. Biol. Chem., vol. 269, p. 8059-8062.

DiMARCO A. A., B. Averhoff et L. N. Ornston. 1993. « Identification of the transcriptional activator *pobR* and characterization of its role in the expression of *pobA*, the structural gene for *p*-hydroxybenzoate hydroxylase in *Acinetobacter calcoaceticus* ». J. Bacteriol., vol. 175, p. 4499-4506.

DiMARCO A. A. et L. N. Ornston. 1994. « Regulation of *p*-hydroxybenzoate hydroxylase synthesis by PobR bound to an operator in *Acinetobacter calcoaceticus* ». J. Bacteriol., vol. 176, p. 4277-4284.

DiRUSSO, C. C. 1988. « Nucleotide sequence of the *fadR* gene, a multifunctional regulator of fatty acid metabolism in *Escherichia coli* ». Nucleic Acids Res. vol. 16, p. 7995-8009.

D'ITRI, M. F. et M. A. Kamrin. 1983. PCBs : Human and environmental hazards. Woburn (MA) : Éditions Butterworth.

DON R. H. et J. M. Pemberton. 1981. « Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes eutrophus* and *Alcaligenes paradoxus* ». J. Bacteriol., vol. 145. p. 681-686.

DON R. H., A. J. Weightman, H.-J. Knackmuss et K. N. Timmis. 1985. « Transposon mutagenesis and cloning analysis of the pathways for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 3-chlorobenzoate in *Alcaligenes eutrophus* JMP134 (pJP4) ». J. Bacteriol., vol. 161, p. 85-90.

DORN E. et H.-J. Knackmuss. 1978. « Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Two catechol 1,2-dioxygenases from a 3-chlorobenzoate-grown pseudomonad ». Biochem. J., vol. 174, p. 73-84.

DORN E., M. Hellwig, W. Reineke et H.-J. Knackmuss. 1974. « Isolation and characterization of a 3-chlorobenzoate degrading Pseudomonad ». Arch. Microbiol., vol. 99, p.61-70.

EISENREICH, S. J. 1987. « The chemical limnology of nonpolar organic contaminants : polychlorinated biphenyls in Lake Superior ». Adv. Chem. Ser., vol. 216, p. 394-469.

ELSEMORE D. A. et L. N. Ornston. 1995. « Unusual ancestry of dehydratases associated with quinate catabolism in *Acinetobacter calcoaceticus* ». J. Bacteriol., vol. 177, p. 5971-5978.

van EMDEN H. F. et D. B. Peakall. 1996. Beyond silent spring : integrated pest management and chemical safety. New York : Éditions Chapman & Hall.

ENGESSER K. H. et P. Shulte. 1989. « Degradation of 2-bromo-2-chloro- and 2-fluorobenzoate by *Pseudomonas putida* CLB 250 ». FEMS Microbiol. Lett., vol. 60, p. 143-148.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). 1977. Review of the environmental fate of selected chemicals. Washington (DC) : Office of Toxic Substances. EPA 560/5-77-003.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). 1980. Ambient water quality criteria for polychlorinated biphenyls. Office of water regulations and standards, Office of research and development et Carcinogen assessment group. EPA/440/5-80-068.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). 1987. Locating and estimating air emissions from sources of polychlorinated biphenyls (PCB). Office of air quality planning and standards. EPA-450/4-84-007n.

ENVIRONNEMENT CANADA. 1996. Rapport synthèse sur l'état du St-Laurent : vol. 1 : L'écosystème du St-Laurent (aspects physico-chimiques, biologiques, socio-économiques). Ste-Foy (QC) : Édition Multimondes. ISBN 2-921146-26-6.

ERICKSON, M. 1986. Analytical Chemistry of PCBs. Londres : Édition Butterworth.

ERICKSON, M. 1997. Analytical Chemistry of PCBs. (2^e éd.) New York : Éditions Lewis.

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

FAVA F., D. Di Gioia, L. Marchetti, G. Quattroni et V. Marraffa. 1993. « Aerobic mineralization of chlorobenzoates by a natural polychlorinated biphenyl-degrading mixed bacterial culture ». 1993. Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 40, p. 541-548.

FAVA F. et L. Marchetti. 1991. « Degradation and mineralization of 3-chlorobiphenyl by mixed aerobic bacterial culture ». Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 36, p. 240-245.

FETZNER S., R. Müller et F. Lingens. 1989. « A novel metabolite in the degradation of 2-chlorobenzoate ». Biochem. Biophys. Res. Comm., vol. 161, p. 700-705.

FOCHT D. D. et D. Shelton. 1987. « Growth kinetics of *Pseudomonas alcaligenes* C-O relative to inoculation and 3-chlorobenzoate metabolism in soil ». Appl. Env. Microbiol., vol. 53, p. 1846-1849.

FRANKLIN F. C. H., P. R. Lehrbach, R. Lurz, B. Rueckert, M. Bagdasarian et K. N. Timmis. 1983. « Localization and functional analysis of transposon mutations in regulatory genes of the TOL catabolic pathway ». J. Bacteriol., vol. 154, p. 676-685.

FRANTZ B., T. Aldrich et A. M. Chakrabarty. 1987. « Microbial degradation of synthetic recalcitrant compounds ». Biotech Adv., vol. 5, p. 85-99.

FRANTZ B. et A. M. Chakrabarty. 1987. « Organization and nucleotide sequence determination of a gene cluster involved in 3-chlorocatechol degradation ». Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 84, p. 4460-4464.

FUJITA Y., T. Fujita et Y. Miwa. 1990. « Evidence for post-transcriptional regulation of synthesis of the *Bacillus subtilis* Gnt repressor ». FEBS Lett., vol. 267, p. 71-74.

FUJITA Y. T. Fujita, Y. Miwa, J.-I. Nihashi et Y. Aratani. 1986. « Organization and transcription of the gluconate operon, *gnt*, of *Bacillus subtilis* ». J Biol Chem., vol. 261, p. 13744-13753.

FUJITA Y. et Y. Miwa. 1989. « Identification of an operator sequence for the *Bacillus subtilis* *gnt* operon ». J. Bacteriol., vol. 264, p. 4201-4206.

FUKUDA M., Y. Yasukochi, Y. Kikuchi, Y. Nagata, K. Kimbara, H. Horiuchi, M. Takagi et K. Yano. 1994. « Identification of the *bphA* and *bphB* genes of *Pseudomonas* sp. strain KKS102 involved in degradation of biphenyl and polychlorinated biphenyls ». Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 202, p. 850-856.

FUKUMORI F. et C. P. Saint. 1997. « Nucleotide sequences and regulational analysis of genes involved in conversion of aniline to catechol in *Pseudomonas putida* UCC22(pTDN1) ». J. Bacteriol., vol. 179, p. 399-408.

FURUKAWA, K. 1982. « Microbial degradation of polychlorinated biphenyls ». In Biodegradation and detoxification of environmental pollutants. Boca Raton (FL) : A. M. Chakrabarty, CRC Press.

FURUKAWA, K. 1994. « Molecular genetics and evolutionary relationship of PCB-degrading bacteria ». Biodegradation, vol. 5, p. 289-300.

FURUKAWA K. et A. M. Chakrabarty. 1982. « Involvement of plasmids in total degradation of chlorinated biphenyls ». Appl. Env. Microbiol., vol. 44, p. 619-626.

FURUKAWA K. et F. Matsumura. 1976. « Microbial metabolism of polychlorinated biphenyls. Studies on the relative degradability of polychlorinated biphenyl components by *Alcaligenes* sp. ». J. Agric. Food Chem., vol. 24, p. 251-256.

FURUKAWA K., F. Matsumura et K. Tonomura. 1978. « *Alcaligenes* and *Acinetobacter* strains capable of degrading polychlorinated biphenyls ». Agric. Biol. Chem., vol. 42, p. 543-548.

FURUKAWA K. et T. Miyazaki. 1986. « Cloning of a gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* ». J. Bacteriol., vol. 166, p. 392-398.

FURUKAWA K., N. Tomizuka et A. Kamibayashi. 1979. « Effect of chlorine substitution on the bacterial metabolism of various polychlorinated biphenyls ». Appl. Env. Microbiol., vol. 38, p. 301-310.

GALLEGOS M. T., S. Marques et J. L. Ramos. 1996. « Expression of the TOL plasmid *xylS* gene in *Pseudomonas putida* occurs from a σ^{70} -dependant promoteur or from σ^{70} - and σ^{54} -dependant tandem promoteurs according to the aromatic compound used for growth ». J. Bacteriol., vol. 178, p. 2356-2361.

GALLEGOS M.-T., C. Michàn et J. L. Ramos. 1993. « The XylS/AraC family of regulators ». Nucl. Acids Res., vol. 21, p. 807-810.

GALLEGOS M. T., R. Schleif, A. Bairoch, K. Hofmann et J. L. Ramos. 1997. « AraC/XylS family of transcriptional regulators ». Microbiol. Mol. Biol., vol. 61, p. 393-410.

GERISCHER, U. 2002. « Specific and global regulation of genes associated with degradation of aromatic compounds in bacteria ». J. Mol. Microbiol. Biotechnol., vol. 4, p. 111-121.

GERISCHER U., A. Segura et L. N. Ornston. 1998. « PcaU, a transcriptional activator of genes for protocatechuate utilization in *Acinetobacter* ». J. Bacteriol., vol. 180, p. 1512-1524.

GOLDMAN P., G. W. A. Milne et M. T. Pignataro. 1967. « Fluorine containing metabolites formed from 2-fluorobenzoic acid by *Pseudomonas* species ». Arch. Biochem. Biophys., vol. 118, p. 178-184.

GOTTESMAN, S., E. Halpern et P. Trisler. 1981. « Role of *sulA* and *sulB* in filamentation by *Ion* mutants of *Escherichia coli* K-12 ». J. Bacteriol., vol. 148, p. 265-273.

GUSTAFSON, C. G. 1970. « PCB's-prevalent and persistent ». Environ. Sci. Technol., vol. 4, p. 814-819.

HADDOCK J. D., D. T. Gibson. 1995. « Purification and characterization of the oxygenase component of biphenyl 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain LB400 ». J. Bacteriol., vol. 177, p. 5834-5839.

HADDOCK J. D., L. M. Nadim et D. T. Gibson. 1993. « Oxidation of biphenyl by a multicomponent enzyme system from *Pseudomonas* sp. strain LB400 ». J. Bacteriol., vol. 175, p. 395-400.

HARKNESS M. R., J. B. McDermott, D. A. Abramowicz, J. J. Salvo, W. P. Flanagan, M. L. Stephens, F. J. Mondello, R. J. May, J. H. Lobos, K. M. Carroll, M. J. Brennan, A. A. Bracco, F. M. Fish, G. L. Warner, R. R. Wilson, D. K. Dierich, D. T. Lin, C. B. Morgan et W. L. Gately. 1993. « *In situ* stimulation of aerobic PCB biodegradation in Hudson River sediments. Science, vol. 259, p. 503-507.

HARTMANN J., K. Engleberts, B. Nordhaus, E. Schmidt et W. Reineke. 1989. « Degradation of 2-chlorobenzoate by *in vivo* constructed hybrid pseudomonads ». FEMS Microbiol. Lett., vol. 61, p. 17-22.

HAYDON D. J. et J. R. Guest. 1991. « A new family of bacterial regulatory proteins ». FEMS Microbiol. Lett., vol. 63, p. 291-295.

HENIKOFF S., G. W. Haughn, J. M. Calvo, J. C. Wallace. 1988. « A large family of bacterial activator proteins ». Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 85, p. 6602-6606.

HICKEY W. J. et D. D. Focht. 1990. « Degradation of mono-, di-, and trihalogenated benzoic acids by *Pseudomonas aeruginosa* JB2 ». Appl. Env. Microbiol., vol. 56, p. 3842-3850.

HIROYUKI A., T. Yamamoto, T. Ohishi, T. Shimizu, T. Nakata et T. Kudo. 1999. « Genetic organization and characteristics of the 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid degradation pathway of *Comamonas testosteroni* TA441 ». Microbiology, vol. 145, p. 2813-2820.

HOET P. et R. Lauwreys. 1993. Industrial chemical exposure. Londres : Éditions Lewis.

HOUGHTON J. E., T. M. Brown, A. J. Appel, E. J. Hughes et L. N. Ornston. 1995. « Discontinuities in the evolution of *Pseudomonas putida cat* genes ». J. Bacteriol., vol. 177, p. 401-412.

HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT N., G. Condemine, W. Nasser et S. Reverchon. 1996. « Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi* ». Ann. Rev. Microbiol., vol. 50, p. 213-257.

HURTUBISE, Y., D. Barriault et M. Sylvestre. 1998. « Involvement of the terminal oxygenase β subunit in the biphenyl dioxygenase reactivity pattern toward chlorobiphenyls ». J. Bacteriol., vol. 180, p. 5828-5835.

HURTUBISE, Y., D. Barriault et M. Sylvestre. 1996. « Characterization of active recombinant His-tagged oxygenase component of *Comamonas testosteroni* B-356 biphenyl dioxygenase ». J. Biol. Chem., vol. 271, p. 8152-8156.

HURTUBISE Y., D. Barriault, J. Powlowski et M. Sylvestre. 1995. « Purification and characterization of the *Comamonas testosteroni* B-356 biphenyl dioxygenase components ». J. Bacteriol., vol. 177, p. 6610-6618.

HUTZINGER O., D. M. Nash, S. Safe, A. S. W. DeFreitas, R. J. Norstrom, D. J. Wildish et V. Zitko. 1972. « PCB's : Metabolic behavior of pure isomers in pigeons, rats, and brook trout ». Science, vol. 178, p. 312-318.

HUTZINGER O., S. Safe et V. Zitko. 1974. The chemistry of PBCs. Cleveland, Ohio : CRC Press.

INOUE S. M. Gomada, U. M. X. Sangodar, A. Nakazawa et T. Nakazawa. 1990. « Upstream regulatory sequence for transcriptional activator XylR in the first operon of xylene metabolism on the TOL plasmid ». J. Mol. Biol., vol. 216, p. 251-260.

INOUE S., A. Nakazawa et T. Nakazawa. 1981. « Molecular cloning of gene *xylS* of the TOL plasmid : evidence for positive regulation of the *xylDEGF* operon by *xylS* ». J. Bacteriol., vol. 148, p. 413-418.

INOUE S., A. Nakazawa et T. Nakazawa. 1983. « Molecular cloning of regulatory gene *xylR* and operator-promoter regions of the *xylABC* and *xylDEGF* operons of the TOL plasmid ». J. Bacteriol., vol. 155, p. 1192-1199.

INOUE S., A. Nakazawa et T. Nakazawa, 1985. « Determination of the transcription initiation site and identification of the protein product of the regulatory gene *xylR* for *xyl* operons on the TOL plasmid ». J. Bacteriol., vol. 163, p. 863-869.

INOUE S., A. Nakazawa et T. Nakazawa. 1986. « Nucleotide sequence of the regulatory gene *xylS* on the *Pseudomonas putida* TOL plasmid and identification of the protein product ». Gene, vol. 44, p. 235-242.

INOUE S., A. Nakazawa et T. Nakazawa. 1987. « Expression of the regulatory gene *xylS* on the TOL plasmid is positively controlled by the *xylR* gene product ». Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 84, p. 5182-5186.

INOUE S., A. Nakazawa et T. Nakazawa. 1988. « Nucleotide sequence of the regulatory gene *xylR* of the TOL plasmid from *Pseudomonas putida* ». Gene, vol. 66, p. 301-306.

IWAKI H., Y. Hasegawa, M. Teraoka, T. Tokuyama, H. Bergeron et P. C Lau. 1999. « Identification of a transcriptional activator (ChnR) and a 6-oxohexanoate dehydrogenase (ChnE) in the cyclohexanol catabolic pathway in *Acinetobacter* sp. strain NCIMB 9871 and localization of the genes that encode them ». Appl. Env. Microbiol., vol. 65, p. 5158-5162.

JENSEN, S. 1966. « Report of a new chemical hazard ». New Scientist, vol. 32, 612p.

KAHNG H. Y., A. M. Byrne, R. H. Olsen et J. J. Kukor. 2000. « Characterization and role of *tbuX* in utilisation of toluene by *Ralstonia pickettii* PK01 ». J. Bacteriol., vol. 182, p. 1232-1242.

KAISER K. L. E. et P. T. S. Wong. 1974. « Bacterial degradation of PCBs : I. Identification of some metabolic products from Aroclor 1242 ». Bull. Environ. Contam. & Toxicol., vol. 11, p. 291-296.

KEELER G. J., J. M. Pacyna, T. F. Bidleman et J. O. Nriagu. 1993. Identification of sources contributing to the contamination of the Great Waters (revised). Environmental Protection Agency. EPA/453/R-94/087.

KEIL H., V. Klages et F. Lingens. 1981. « Degradation of 4-chlorobenzoate by *Pseudomonas* sp. CBS-3 : induction of catabolic enzymes ». FEMS Microbiol. Lett., vol. 10, p. 213-215.

KHAN A. et S. Walia. 1989. « Cloning of bacterial genes specifying degradation of 4-chlorobiphenyl from *Pseudomonas putida* OU83 ». Appl. Env. Microbiol., vol 55, p. 798-805.

KIKUCHI Y., Y. Nagata, M. Hinata, K. Kimbara, M. Fukuda, K. Yano et M. Takagi. 1994. « Identification of *bphA4* gene encoding ferredoxin reductase involved in biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation in *Pseudomonas* sp. strain KKS102 ». J. Bacteriol., vol. 176, p. 1689-1694.

KIMBARA K., T. Hashimoto, M. Fukuda, T. Koana, M. Takagi, M. Oishi et K. Yano. 1989. « Cloning and sequencing of two tandem genes involved in degradation of 2,3-dihydroxybiphenyl to benzoic acid in the polychlorinated biphenyl-degrading soil bacterium *Pseudomonas* sp. strain KKS102 ». J. Bacteriol., vol. 171, p. 2740-2747.

KIMURA N., A. Nishi, M. Goto et K. Furukawa. 1997. « Functional analyses of a variety of chimeric dioxygenases constructed from two biphenyl dioxygenases that are similar structurally but different functionally ». J. Bacteriol., vol. 179, p. 3936-3943.

KLAGES U. et F. Lingens. 1979. « Degradation of 4-chlorobenzoic acid by a *Nocardia* species ». FEMS Microbiol. Lett., vol. 6, p. 201-203.

KOK R. G., D. A. D'Argenio et L. N. Ornston. 1998. « Mutation analysis of PcbR and PcaU, closely related transcriptional activators in *Acinetobacter* ». J. Bacteriol., vol. 180, p. 5058-5069

KORTE N. E., O. R. West, L. Liang, B. Gu, J. L. Zutman et Q. Fernando. 2002. « The effect of solvent concentration on the use of palladized-iron for the step-wise dechlorination of polychlorinated biphenyls in soil extracts ». Waste Manag., vol. 22, p. 343-349.

KUTSU S., E. Santero, J. Keener, D. Popham, D. Weiss. 1989. « Expression of sigma -54 (*ntxA*)-dependent genes is probably united by a common mechanism ». Microbiol. Rev., vol. 53, p. 367-376.

LAEMMLI, U. K. 1970. « Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 ». Nature, vol. 227, p. 680-685.

LANG, V. 1992. « Polychlorinated biphenyls in the environment ». J. Chromatogr., vol. 595, p. 1-43.

LAU P. C. K., Y. Wang, D. Labbé, H. Bergeron, et J. Garnon. 1996. « Two-component signal transduction systems regulating toluene and biphenyl-polychlorinated-biphenyl degradations in a soil pseudomonad and actinomycetes ». In Molecular Biology of Pseudomonads, (T. Nakazawa et al. éd.). ASM Press, Washington, D.C.

LAYTON A. C., C. A. Lajoie, J. P. Easter, R. Jernigan, M. J. Beck et G. S. Sayler. 1994. « Molecular diagnostics for polychlorinated biphenyl degradation in contaminated soils ». Annals New York Acad. Sc., vol. 721, p. 407-422.

LEVEAU J. H. et J. R. van der Meer. 1996. « The *tfdR* gene product can successfully take over the role of the insertion element-inactivated TfdT protein as a transcriptional activator of the *tfdCDEF* gene cluster, which encodes chlorocatechol degradation in *Ralstonia eutropha* JMP134(pJP4) ». J. Bacteriol., vol. 178, p. 6824-6832.

LIN J., M. Smith, J. Jessee et F. Bloom. 1992. « DH11S : an *Escherichia coli* strain for preparation of single-stranded DNA from phagemid vector ». Biotechniques. vol. 12, p. 718-721.

de LORENZO V., M. Herrero, M. Metzke et K. N. Timmis. 1991. « An upstream XylR- and IHF-induced nucleoprotein complex regulates the σ^{54} -dependent Pu promoter of TOL plasmid ». EMBO J., vol. 10, p. 1159-1167.

LOWRY O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr et R. J. Randal. 1951. « Protein measurement with the Folin phenol reagent ». J. Biol. Chem., vol. 193, p. 265-275.

McFALL S. M., S. A. Chugani et A. M. Chakrabarty. 1998. « Transcriptional activation of the catechol and chlorocatechol operons : variations on a theme ». Gene, vol. 223, p. 257-267.

McFALL S. M., M. R. Parsek et A. M. Chakrabarty. 1997. « 2-chloromuconate and ClcR-mediated activation of the *clcABD* operon : *in vitro* transcriptional and Dnase I footprint analyses ». J. Bacteriol., vol. 179, p. 3655-3663.

McFARLAND V. A. et J. U. Clarke. 1989. « Environmental occurrence, abundance, and potential toxicity of polychlorinated biphenyl congeners: considerations for a congener specific analysis ». Environ. Health Perspect., vol. 81, p. 225-239.

MAGARVEY N., J. He, K. A. Aidoo et L. C. Vining. 2001. « The *pdx* genetic marker adjacent to the chloramphenicol biosynthesis gene cluster in *Streptomyces venezuelae* ISP5230: functional characterization ». Microbiology, vol. 147, p. 2103-2112.

MAGUIRE R. J. et R. J. Tkacz. 1990. Determination of dyes and chlorinated hydrocarbons in wastewater treatment plant influents and effluents in Granby and Magog, Québec. Burlington (ONT) : Environnement Canada.

MARKS T. S., A. R. W. Smith et A. V. Quirk. 1984. « Degradation of 4-chlorobenzoic acid by *Arthrobacter* sp. ». Appl. Env. Microbiol., vol. 48, p. 1020-1025.

MARQUES S., A. Holtel, K. N. Timmis, J. L. Ramos. 1994. « Transcriptional induction kinetics from the promoters of the catabolic pathways of TOL plasmid pWWO of *Pseudomonas putida* for metabolism of aromatics ». J. Bacteriol., vol. 176, p. 2517-2524.

MARTEL, P. 1995. « Le St-Laurent est moins pollué : 50 industries ont réduit de 96% leurs rejets liquides toxiques ». Journal Le Soleil (Québec), 20 septembre 1996, p. B1.

MASON J. R. et R. Cammack. 1992. « The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases ». Ann. Rev. Microbiol., vol. 46, p. 277-305.

MASSE R., F. Messier, L. Péloquin, C. Ayotte et M. Sylvestre. 1984. « Microbial biodegradation of 4-chlorobiphenyl, a model compound of chlorinated biphenyls ». Appl. Env. Microbiol., vol. 47, p. 947-951.

MAXAM A. M. et W. Gilbert. 1977. « A new method for sequencing DNA ». Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 74, p. 560-564.

van der MEER J. R., A. C. Frijters, J. H. Leveau, R. I. Eggen, A. J. Zehnder et W. M. de Vos. 1991. « Characterization of the *Pseudomonas* sp. strain P51 gene *tcbR*, a LysR-type transcriptional activator of the *tcbCDEF* chlorocatechol oxidative operon, and analysis of the regulatory region ». J. Bacteriol., vol. 173, p. 3700-3708.

van der MEER J. R., W. M. de Vos, S. Harayama, A. J. Zehnder. 1992. « Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds ». Microbiol. Rev., vol. 56, p. 677-694.

MERLIN C., D. Springael, M. Mergeay et A. Toussaint. 1997. « Organization of the *bph* gene cluster of transposon Tn4371, encoding enzymes for the degradation of biphenyl and 4-chlorobiphenyl compounds ». Mol. Gen. Genet., vol. 253, p. 499-506.

MERMOD N., J. L. Ramos, A. Bairoch et K. N. Timmis. 1987. « The XylS gene positive regulator of TOL plasmid pWWO : identification, sequence analysis and overproducing leading to constitutive expression of *meta* cleavage operon ». Mol. Gen. Genet., vol. 207, p. 349-354.

METCALF R., J. R. Sanborn, P.-Y. Lu et D. Nye. 1975. « Laboratory model ecosystem studies of the degradation and fate of radiolabeled tri, tetra and penta chlorobiphenyl compared to DDE ». Arch. Environ. Contam. Toxicol., vol. 3, p. 151-165.

MILNE G. W. A., P. Goldman et J. L. Holzman. 1968. « The metabolism of 2-fluorobenzoic acid. II. Studies with $^{18}\text{O}_2$ ». J. Biol. Chem., vol. 243, p. 5374-5376.

MIWA Y. et Y. Fujita. 1988. « Purification and characterization of a repressor for the *Bacillus subtilis* *gnt* operon ». J. Biol. Chem., vol. 263, p. 13252-13257.

MOORE S., M. Gignac, N. Laham, L. Levert, S. Levesque, N. Raymond. 1995. Guide de caractérisation des échantillons contaminés par les biphényles polychlorés : document décrivant la problématique de l'analyse des BPC au Québec et proposant des éléments de solution. Ministère de l'environnement et de la faune, Direction des laboratoires.

MORAWSKI B, A. Segura et L. N. Ornston. 2000. « Repression of *Acinetobacter* *vanillate* demethylase synthesis by VanR, a member of the GntR family of transcriptional regulators ». FEMS Microbiol. Lett., vol. 187, p. 65-68.

MOUZ S., C. Merlin, D. Springael et A. Toussaint. 1999. « A GntR-like negative regulator of the biphenyl degradation genes of the transposon Tn4371 ». Mol. Gen. Genet., vol. 262, p. 790-799.

MULLIN M. D., C. M. Pochini, S. Mc Crindle, M. Romkes, S. H. Safe et L. M. Safe. 1984. « High-Resolution PCB analysis : synthesis and chromatographic properties of all 209 PCB congeners ». Environ. Sci. Technol., vol. 18, p. 468-476.

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

NEBERT, D. W. 1989. « The Ah-locus: genetic differences in toxicity, cancer, mutation and birth defects ». Crit. Rev. Toxicol., vol. 20, p. 153-154.

NEIDLE E. L., C. Hartnett, L. N. Ornston, A. Bairoch, M. Rekik et S. Harayama. 1991. « Nucleotide sequences of the *Acinetobacter calcoaceticus* *benABC* genes for benzoate 1,2-dioxygenase reveals evolutionary relationship among multicomponent oxygenases ». J. Bacteriol., vol. 173, p. 5385-5395.

NEIDLE E. L., M. K. Shapiro et L. N. Ornston. 1987. « Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Acinetobacter calcoaceticus* genes for benzoate degradation ». J. Bacteriol., vol. 169, p. 5496-5503.

NEILSON, A. H. 1990. « The biodegradation of halogenated organic compounds ». J. Appl. Bacteriol., vol. 69, p. 445-470.

NG L. C., C. L. Poh et V. Shingler. 1995. « Aromatic effector activation of the NtrC-like transcriptional regulator PhhR limits the catabolic potential of the (methyl)phenol degradative pathway it controls ». J. Bacteriol., vol. 177, p. 1485-1490.

NGAI K.-L. et L. N. Ornston. 1988. « Abundant expression of *Pseudomonas* genes for chlorocatechol metabolism ». J. Bacteriol., vol. 170, p. 2412-2413

NORTH A. K., K. E. Klose, K. M. Stedman et S. Kustu. 1993. « Prokaryotic enhancer-binding proteins reflect eukaryote-like modularity : the puzzle of nitrogen regulatory protein C ». J. Bacteriol., vol. 175, p. 4267-4273.

NOZAKI M., K. Ono, T. Nakazawa, S. Kotani et O. Hayaishi. 1968. « Metapyrocatechase. II. The role of iron and sulfhydryl groups ». J. Biol. Chem., vol. 243, p. 2682-2690.

NRIAGU O. J. et M. S. Simmons. 1984. Toxic contaminants in Great Lakes. Toronto (ONT) : Éditions John Wiley et Fils.

OHTSUBO Y., M. Delawary, K. Kimbara, M. Takagi, A. Ohta et Y. Nagata. 2001. « BphS, a key transcriptional regulator of *bph* genes involved in polychlorinated biphenyl/biphenyl degradation in *Pseudomonas* sp. KKS102 ». J. Biol. Chem., vol. 276, p. 36146-36154.

OHTSUBO Y., Y. Nagata, K. Kimbara, M. Takagi, A. Ohta. 2000. « Expression of the *bph* genes involved in biphenyl/PCB degradation in *Pseudomonas* sp. KKS102 induced by the biphenyl degradation intermediate, 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid ». Gene, vol. 256, p. 223-228.

OMORI T., K. Sugimura, H. Ishigooka et Y. Minoda. 1986. « Purification and some properties of a 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid (HOPDA) reducing enzyme from *Pseudomonas cruciviae* S93 B1 involved in the degradation of biphenyl ». Agric. Biol. Chem., vol. 50, p. 931-937.

OVERATH P., G. Pauli et H. U. Schraier. 1969. « Fatty acid degradation in *Escherichia coli*, an inducible acyl-CoA synthetase, the mapping of *old* mutants and isolation of regulatory mutants ». Eur. J. Biochem., vol. 7, p. 559-574.

PARKER L. L. et B. G. Hall. 1990. « Characterization and nucleotide sequence of the cryptic *cel* operon of *Escherichia coli* K12 ». Genetics, vol. 124, p. 455-471.

PARSEK M. R., D. L. Shinabarger, R. K. Rothmel et A. M. Chakrabarty. 1992. « Roles of CatR and *cis,cis*-muconate in activation of the *catBC* operon, which is involved in benzoate degradation in *Pseudomonas putida* ». J. Bacteriol., vol. 174, p. 7798-7806.

PARSEK M. R., S. M. McFall, D. L. Shinabarger et A. M. Chakrabarty. 1994a. « Interaction of two LysR-type regulatory proteins CatR and ClcR with heterologous promoters : functional and evolutionary implications ». Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 91, p. 12393-12397

PARSEK M. R., R. W. Ye, P. Pun et A. M. Chakrabarty. 1994b. « Critical nucleotides in the interaction of a LysR-type regulator with its target promoter region ». J. Biol. Chem., vol. 279, p. 11279-11284.

PARSONS J. R. et D. T. H. M. Sijm. 1988. « Biodegradation kinetics of polychlorinated biphenyls in continuous cultures of *Pseudomonas* strain ». Chemosphere, vol. 17, p. 1755-1766.

PARSONS J., W. Veerkamp et O. Hutzinger. 1983. « Microbial metabolism of chlorobiphenyls ». Toxicol. Environ. Chem., vol. 6, p. 327-350.

PAVEL H., M. Forsman et V. Shingler. 1994. « An aromatic-effector specificity mutant of the transcriptional regulator DmpR overcomes the growth constraints of *Pseudomonas* sp. strain CF600 on *para*-substituted methyl-phenols ». J. Bacteriol., vol. 176, p. 7550-7557.

PERDIH A. et J. Jan. 1994. « Formation of polychlorobiphenyls in silicone rubber ». Chemosphere, vol. 18, p. 2197-2202.

PEREZ-MARTIN J. et V. de Lorenzo. 1995. « The amino-terminal domain of the prokaryotic enhancer-binding protein XylR is a specific intramolecular repressor ». Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 92, p. 9392-9396.

PEREZ-MARTIN J. et V. de Lorenzo. 1996. « Identification of the repressor subdomain within the signal reception module of the prokaryotic enhancer-binding protein XylR of *Pseudomonas putida* ». J. Biol. Chem., vol. 271, p. 7899-7902.

PERSKY V., M. Turyk, H. A. Anderson, L. P. Hanrahan, C. Falk, D. N. Steenport, R. Jr. Chatterton et S. Freels. 2001. « The effects of PCB exposure and fish consumption on endogenous hormones ». Environ. Health Perspect., vol. 109, p. 11275-11283.

PHAM T.-T. 1993. Caractérisation de l'eau traitée de la station d'épuration de la communauté urbaine de Montréal en 1993. Montréal (QC) : Environnement Canada.

PHILLIPS, D. J. H. 1986. PCBs and the environment. États-Unis: CRC Press.

PITTMAN C. U. et J. He. 2002. « Dechlorination of PCBs, CAHs, herbicides and pesticides neat and in soils at 25 degrees C using Na/NH(3) ». J. Hazard Mater., vol. 92, p. 51-62.

PRIETO M. A. et J. L. Garcia. 1994. « Molecular characterization of 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase of *Escherichia coli*. A two-protein component enzyme ». J. Biol. Chem., vol. 269, p. 22823-22829.

PRIETO M. A. et J. L. Garcia. 1997. « Identification of a novel positive regulator of the 4-hydroxyphenylacetate catabolic pathway of *Escherichia coli* ». Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 232, p.759-765.

QUINN J. A., D. B. McKay et B. Entsch. 2001. « Analysis of the *pobA* and *pobR* genes controlling expression of *p*-hydroxybenzoate hydroxylase in *Azotobacter chroococcum* ». Gene, vol. 264, p. 77-85.

RAMOS J. L., N. Mermoud, K. N. Timmis. 1987. « Regulatory circuits controlling transcription of TOL plasmid operon encoding *meta*-cleavage pathway for degradation of alkylbenzoates by *Pseudomonas* ». Mol. Microbiol., vol. 1, p. 293-300.

RAMOS J. L., S. Marques et K. N. Timmis. 1997. « Transcriptional control of the *Pseudomonas* TOL plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid-encoded regulators ». Ann. Rev. Microbiol., vol. 51, p. 341-373.

RAMOS J. L., F. Rojo, L. Zhou et K. N. Timmis. 1990. « A family of positive regulators related to the *Pseudomonas putida* TOL plasmid XylS and the *Escherichia coli* AraC activators ». Nucl. Acids Res., vol. 18, p. 2149-2152.

REINER A. M., 1971. « Metabolism of benzoic acid by bacteria : 3,5-cyclohexadiene-1,2-diol-1-carboxylic acid is an intermediate in the formation of catechol ». J. Bacteriol., vol. 108, p. 89-94.

REIZER A., J. Deutscher, M. H. Saier et J. Reizer. 1991. « Analysis of the gluconate (*gnt*) operon of *Bacillus subtilis* ». Mol. Microbiol., vol. 5, p. 1081-1089.

RIGALI S., A. Derouaux, F. Giannotta et J. Dusart. 2002. « Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC MocR, and YtrA subfamilies ». J. Biol. Chem., vol. 277, p. 12507-12515.

ROBERT-BAUDOUY J., R. Portalier et F. Stoeber. 1981. « Regulation of hexuronate system genes in *Escherichia coli* K-12: multiple regulation of the *exu* operon by *exuR* and *uxuR* gene products ». J. Bacteriol. vol. 145, p. 211-220.

ROMERO-STEINER S., R. E. Parales, C. S. Harwood et J. E. Houghton. 1994. « Characterisation of the *pcaR* regulatory gene from *Pseudomonas putida*, which is required for the complete degradation of *p*-hydroxybenzoate ». J. Bacteriol., vol. 176, p. 5771-5779.

ROSSBACH S. D. A. Kulpa, U. Rossbach, F. J. de Bruijn. 1994. « Molecular and genetic characterization of the rhizopine catabolism (*mocABRC*) genes of *Rhizobium meliloti* L5-30 ». Mol. Gen. Genet., vol. 245, p. 11-24.

ROTHMEL R. K., T. L. Aldrich, J. E. Houghton, W. M. Coco, L. N. Ornston et A. M. Chakrabarty. 1990. « Nucleotide sequencing and characterization of *Pseudomonas putida catR* : a positive regulator of the *catBC* operon is a member of the LysR family ». J. Bacteriol., vol. 172, p. 922-931.

ROTHMEL R. K., D. L. Shinabarger, M. R. Parsek, T. L. Aldrich et A. M. Chakrabarty. 1991. « Functional analysis of the *Pseudomonas putida* regulatory protein CatR : transcriptional studies and determination of the CatR DNA-binding site by hydroxyl-radical footprinting ». J. Bacteriol., vol. 173, p. 4717-4724.

SAFE, S. 1984. Microbial degradation of polychlorinated biphenyls. In Microbial degradation of organic compounds. New York : Marcel Dekker.

SAFE, S. 1993. « Toxicology, structure-function relationship, and human and environmental health impacts of polychlorinated biphenyls : Progress and problems ». Environ. Health Perspect., vol. 100, p. 259-268.

SAFE, S. 1994. « Polychlorinated biphenyls (PCBs) : environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment ». Crit. Rev. Toxicol., vol. 24, p. 87-149.

SAMBROOK J., E. F. Fritsch et T. Maniatis. 1989. Molecular cloning : a laboratory manual. 2^e éd. Cold Spring Harbor Laboratory. New-York: Cold Spring Harbor.

SCHELL M. A. 1993. « Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators » Ann. Rev. Microbiol., vol. 47, p. 597-626.

SCHOCK F. M. K. Dahl. 1996. « Analysis of DNA flanking the *treA* gene of *Bacillus subtilis* reveals genes encoding a putative specific IITre and a potential regulator of the trehalose operon ». Gene, vol. 175, p. 59-63.

SCHOLZE R. J., E. D. Smith, Y. C. Bandy, Y. C. Wu et J. V. Basilio. 1988. Biotechnology for degradation of toxic chemicals in hazardous wastes. Park Ridge (NJ) : Noyes Data Corporation.

SCHWACHA A., R. A. Bender. 1990. « Nucleotide sequence of the gene encoding the repressor for the histidine utilization genes of *Klebsiella aerogenes* ». J. Bacteriol., vol. 172, p. 5477-5481.

SCHWACHA A., J. A. Cohen, K. B. Gehrig et R. A. Bender. 1990. « Tn1000-mediated insertion mutagenesis of the histidine utilization (*hut*) gene cluster from *Klebsiella aerogenes*: genetic analysis of *hut* and unusual target specificity of Tn1000 ». J. Bacteriol., vol. 172, p. 5991-5998.

SEAH S. Y., G. Labbé G, S. Nerdinger, M. R. Johnson, V. Snieckus et L. D. Eltis. 2000. « Identification of a serine hydrolase as a key determinant in the microbial degradation of polychlorinated biphenyls ». J. Biol. Chem., vol. 275, p. 15701-15708.

SEEGAL, R. F. 1996. « Epidemiological and laboratory evidences of PCB-induced neurotoxicity ». Crit. Rev. Toxicol., vol. 26, p. 709-737.

SHIELDS M. S., S. W. Hopper et G. S. Sayler. 1985. « Plasmis mediated mineralization of 4-chlorobiphenyl ». J. Bacteriol., vol. 163, p. 882-889.

SHIGEMATSU N., S. Ishimaru, R. Saito, T. Ikeda, K. Matsuba, K. Suginuma et Y. Masuda. 1978. « Respiratory involvement in polychlorinated biphenyl poisoning ». Environ. Res., vol. 16, p. 92-100.

SHINGLER V., M. Bartilson et T. Moore. 1993. « Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the positive regulator (DmpR) of the phenol catabolic pathway encoded by pV1150 and identification of DmpR as a member of the NtrC family of transcriptional activators ». J. Bacteriol., vol. 175, p. 1596-1604.

SHINGLER V. et T. Moore. 1994. « Sensing of aromatic compounds by the DmpR transcriptional activator of phenol-catabolizing *Pseudomonas* sp. strain CF600 ». J. Bacteriol., vol. 176, p. 1555-1560.

SMITH C. P. et K. F. Chater. 1988. « Structure and regulation of controlling sequences for the *Streptomyces coelicolor* glycerol operon ». J. Mol. Biol., vol. 204, p. 569-580.

SMITH A. G. et S. D. Gangolli. 2002. « Organochlorine chemicals in seafood : occurrence and health concerns ». Food. Chem. Toxicol., vol. 40, p. 767-769.

SONDOSSI M., M. Sylvestre et D. Ahmad. 1992. « Effects of chlorobenzoate transformation of the *Pseudomonas testosteroni* biphenyl and chlorobiphenyl degradation pathway ». Appl. Env. Microbiol., vol. 58, p. 485-495.

SPOONER R. A., K. Lindsay et F. C. H. Franklyn. 1986. « Genetic, functional and sequence analysis of the *xylR* and *xylS* regulatory genes of the TOL plasmid pWWO ». J. Gen. Microbiol., vol. 132, p. 1347-1358.

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

STONE, R. 1995. « Environmental toxicants under scrutiny at Baltimore meeting ». Science, vol. 267, p. 1770-1771.

SULLIVAN Jr. et G. Krieger. 1992. Hazardous Materials Toxicology. Baltimore : Éd. Williams and Wilkins Publishing Corporation.

SUNDSTROM. G. et O. Hutzinger. 1976. « The metabolism of chlorobiphenyls – a review ». Chemosphere, vol. 5, p. 267-298.

SUNNARBORG A., D. Klumpp, T. Chung et D. C. LaPorte. 1990. « Regulation of the glyoxylate bypass operon: cloning and characterization of *iclR* ». J. Bacteriol., vol. 172, p. 2642-2649.

SYLVESTRE, M. 1980. « Isolation methods for bacterial isolates capable of growth on *p*-chlorobiphenyl ». Appl. Environ. Microbiol., vol. 39, p. 1223-1224.

SYLVESTRE M., R. Massé, C. Ayotte, G. Messier et J. Fauteux. 1985. « Total biodegradation of 4-chlorobiphenyl (4-CB) by a two membered bacterial culture ». Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 21, p. 192-195.

SYLVESTRE M., Y. Hurtubise, D. Barriault, J. Bergeron et D. Ahmad. 1996a. « Characterization of active recombinant 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphenyl dehydrogenase from *Comamonas testosteroni* B-356 and sequence of the encoding gene (*bphB*) ». Appl Environ Microbiol., vol. 62, p. 2710-2715.

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

TANABE, S. 1988. « PCB problems in the Future : Foresight from current knowledge ». Environmental Pollution, vol. 50, p. 5-28.

TAIRA, L., J. Hirose, S. Hayashida, et K. Furukawa. 1992. « Analysis of *bph* operon from the polychlorinated biphenyl-degrading strain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 ». J. Biol. Chem., vol. 267, p. 4844-4853.

THOMSON N. R., W. Nasser, S. McGowan, M. Sebaihia et G. P. Salmond. 1999. « *Erwinia carotova* has two KdgR-like proteins belonging to the IciR family of transcriptional regulators : identification and characterization of the RexZ activator and the KdgR repressor of pathogenesis ». Microbiology, vol. 145, p. 1531-1545.

THÖNY B. et H. Hennecke. 1989. « The -24/-12 promotor comes of age ». FEMS Microbiol. Rev., vol. 63. p.341-358.

TILSON H. A., J. L. Jacobson et W. J. Rogan. 1990. « Polychlorinated biphenyls and the developing nervous system : Cross species comparison ». Neurotoxicol. Teratol., vol. 12, p. 239-248.

TIMMIS K. N., R. J. Steffan et R. Unterman. 1994. « Designing microorganisms for the treatment of toxic wastes ». Ann. Rev. Microbiol., vol. 48, p. 525-557.

TOBES R. et J. L. Ramos. 2002. « AraC-XylS database : a family of positive transcriptional regulators in bacteria ». Nucl. Acids Res., vol. 30, p. 318-321.

TRAUTWEIN G. et U. Gerischer. 2001. « Effects exerted by transcriptional regulator PcaU from *Acinetobacter* sp. strain ADP1 ». J. Bacteriol., vol. 183, p. 873-881.

TURLIN E., M. Perrotte-piquemal, A. Danchin et F. Biville. 2001. « Regulation of the early steps of 3-phénylpropionate catabolism in *Escherichia coli* ». J. Mol. Microbiol. Biotechnol., vol. 3, p. 127-133.

UNTERMAN R., M. J. Brennan, R. E. Brooks et C. Johnson. 1988. Biological degradation of polychlorinated biphenyls, biological degradation of polychlorobiphenyls. Schenectady (NY) : Biological sciences branch general electric corporate reasearch and development. p. 376-385.

VEDADI M., D. Barriault, M. Sylvestre et J. Powlowski. 2000. « Active site residues of *cis*-2,3-dihydroxybiphenyl dehydrogenase from *Comamonas testosteroni* strain B-356 ». Biochemistry. vol. 39, p. 5028-5034.

VEDLER E., V Koiv et A. Heinaru. 2000. « TfdR, the Lys-R-type transcriptional activator, is responsible for the activation of the *tfdCB* operon of *Pseudomonas putida* 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradative plasmid pEST4011 ». Gene, vol., 245, p. 161-168.

WAID, J. S. 1986. PCBs and the Environment Volume II. Floride : CRC Press.

WANG Y., J. Garnon, D. Labbé, H. Bergeron et P. C. K. Lau. 1995. « Sequence and expression of the *bpdC1C2BADE* genes involved in the initial steps of biphenyl/chlorobiphenyl degradation by *Rhodococcus* sp. M5 ». Gene, vol. 164, p. 117-122.

WARSHAW R., A. Fischbein, J. Thornton, A. Miller et I. J. Selikoff. 1979. « Decrease in vital capacity in PCB-exposed workers in a capacitor manufacturing facility ». Ann. N. Y. Acad. Sci., vol. 320, p. 277-283.

WATANABE T. R. Inoue, N. Kimura et K. Furukawa. 2000. « Versatile transcription of biphenyl catabolic *bph* operon in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 ». J. Biol. Chem., vol. 275, p. 31016-31023.

WEISS D. S., J. Batut, K. E. Klose, J. Keener et S. Kustu. 1991. « The phosphorylated form of the enhancer-binding protein NTRC has an ATPase activity that is essential for activation of transcription ». Cell, vol. 67, p. 155-167.

WEISSHAAR M.-P., F. C. H. Franklin et W. Reineke. 1987. « Molecular cloning and expression of the 3-chlorobenzoate-degrading genes from *Pseudomonas* sp. strain B13 ». J. Bacteriol., vol. 169, p. 394-402.

WHEELIS M. L. et L. N. Ornston. 1972. « Genetic control of enzyme induction in the β -ketoadipate pathway of *Pseudomonas putida*: deletion mapping of *cat* mutation ». J. Bacteriol., vol 109, p. 790-795.

WILLIAMS P. A., L. M. Shaw, C. W. Pitt et M. Vreel. 1996. « *xylUW*, two genes at the start of the upper pathway operon of TOL plasmid pWWO, appear to play no essential part in determining its catabolic phenotype ». Microbiology, vol. 143, p. 101-107.

WONG C. M., M. J. Dilworth, et A. R. Glenn. 1994. « Cloning and sequencing show that 4-hydroxybenzoate hydroxylase (PobA) is required for uptake of 4-hydroxybenzoate in *Rhizobium leguminosarum* ». Microbiology, vol. 140, p. 2775-2786.

WORSEY M. J., F. C. H. Franklin et P. A. Williams. 1978. « Regulation of the degradative pathway enzymes coded by the TOL plasmid (pWWO) from *Pseudomonas putida* mt-2 ». J. Bacteriol., vol. 134, p. 757-764.

WORSEY M. J. et P. A. Williams. 1975. « Metabolism of toluene and xylenes by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for a new function of the TOL plasmid ». J. Bacteriol., vol. 124, no. 1, p. 7-13.

YAGI O. et R. Sudo. 1980. « Degradation of polychlorinated biphenyls by microorganisms ». J. Water Poll. Control. Fed., vol. 52, p. 1035-1043.

YASUHIKO M. et Y. Fujita. 1988. « Purification and characterization of a repressor for the *Bacillus subtilis* gnt operon ». J. Bacteriol., vol. 263, p. 13252-13257.

YANISCH-PERRON C., J. Viera et J. Messing. 1985. « Improved M13 phage cloning vectors and host strains : nucleotide sequences of the M13 mp18 and pUC19 vectors ». Gene, vol. 33, p. 103-119.

YOSHIDA K. I., Y. Fujita et S. D. Ehrlich. 2000. « An operon for a putative ATP-binding cassette transport system involved in acetoin utilization of *Bacillus subtilis* ». J. Bacteriol., vol. 182, p. 5454-5461.

YOU I. S. et D. Ghosal. 1995. « Genetic and molecular analysis of a regulatory region of the herbicide 2,3-dichlorophenoxyacetate catabolic plasmid pJP4 ». Mol. Microbiol., vol. 16, p. 321-331.

ZAMENHOF, P. J. et M. Villarejo. 1972. « Construction and properties of *Escherichia coli* strains exhibiting alpha-complementation of β -galactosidase fragments *in vivo* ». J. Bacteriol., vol. 110, p. 171-178.

