

Université du Québec
INRS - Institut Armand-Frappier

**Étude protéomique de *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 lors de la
déshalogénation du 3,5-dichlorophénol**

Par
Marie Duguay

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

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur interne

Claude Dupont, INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Daniel Boismenu, Université McGill

Directeur de recherche

Réjean Beaudet, INRS-Institut Armand-Frappier

Codirecteur de recherche

François Lépine, INRS-Institut Armand-Frappier

Résumé

De toutes les bactéries isolées à ce jour, *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 est la seule capable d'effectuer la déshalogénation réductrice du pentachlorophénol jusqu'au 3-chlorophénol. Elle peut aussi déshalogéner aux positions *ortho*, *meta* et *para* des molécules aromatiques ayant un groupement hydroxyle, méthoxyle ou aminé. Cette caractéristique particulière est due à la présence d'au moins deux déshalogénases réductrices (I et II) associées à la membrane. Alors que la déshalogénase I est principalement responsable de la déshalogénation en *ortho*, l'activité de la déshalogénase II est surtout en *meta* et *para*. Afin de mieux comprendre le mécanisme de déshalogénation impliquant la déshalogénase II chez *D. frappieri* PCP-1, une étude protéomique comparative de la souche cultivée en absence et en présence de 3,5-DCP a été effectuée. Pour chaque culture, les protéines cytoplasmiques et membranaires recueillies ont été séparées par électrophorèse en deux dimensions. La déshalogénase II purifiée, ainsi que les protéines induites (57, 54, 53 et 42,5 kDa) et réprimées (31, 36,5 et 42 kDa) par le 3,5-DCP ont été digérées à la trypsine. Les peptides résultants ont été analysés avec un spectromètre de masse de type triple quadripôle et les séquences en acides aminés obtenues ont permis de procéder à l'identification des protéines par comparaison avec les banques de données. Ainsi, il a été déterminé que la déshalogénase II est similaire à plusieurs déshalogénases réductrices PceA. Cette dernière a été retrouvée dans le cytoplasme et la membrane sous différentes isoformes de 57 kDa. Alors que la protéine induite de 53 kDa retrouvée sous trois isoformes dans la membrane serait le précurseur de la grande sous-unité d'une hydrogénase Ni/Fe, la protéine induite de 42,5 kDa, retrouvée dans la membrane sous deux isoformes, serait la petite sous-unité de cette même hydrogénase. Pour ce qui est de la protéine de 54 kDa induite dans le cytoplasme, elle a été identifiée comme étant possiblement une uroporphyrinogène III synthase/ méthyltransférase, et il semble que la protéine cytoplasmique réprimée de 42 kDa soit, quant à elle, une D-3-phosphoglycérate déshydrogénase. Quant aux protéines de 31 et 36,5 kDa dont la répression a été observée autant dans le cytoplasme que dans la membrane, il n'a pas été possible de les identifier.

Remerciements

Au cours de ma maîtrise, j'ai eu la chance de bénéficier du support de nombreuses personnes. J'aimerais tout d'abord remercier monsieur Réjean Beudet pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, encouragée et soutenue financièrement tout au long de ce projet. Je voudrais aussi remercier plus particulièrement:

Monsieur François Lépine, pour m'avoir appris l'art de la spectrométrie de masse.

Madame Rita Alary, pour la production de lots de *D. frappieri* PCP-1, ainsi que pour toute l'aide apportée en laboratoire.

Madame Jacinthe Thibodeau, pour la production de déshalogénase II purifiée et également pour la production de lots de *D. frappieri* PCP-1.

Madame Rachel Pagé-Bélanger, pour m'avoir initiée à la technique d'électrophorèse en deux dimensions.

Monsieur Richard Villemur, pour m'avoir aidée à identifier des protéines à partir du génome partiel de *D. hafniense*.

Je veux finalement remercier tout le groupe de microbiologie de l'environnement pour son esprit de convivialité, ainsi que l'INRS-IAF pour son soutien financier.

Table des matières

Résumé	ii
Remerciements	iii
Table des matières	iv
Liste des figures	vi
Liste des tableaux	viii
Liste des abréviations	ix
1 Introduction	1
2 Revue de littérature	4
2.1 Les composés organiques halogénés	5
2.2 La déshalogénéation réductrice	5
2.2.1 Les macromolécules impliquées	7
2.3 Des bactéries capables de déshalogénéation réductrice	14
2.3.1 <i>Desulfitobacterium frappieri</i> PCP-1	17
2.4 La protéomique	20
2.4.1 Définitions	20
2.4.2 Les origines de la protéomique	20
2.4.3 De la génomique à la protéomique	21
2.4.4 La technique au cœur de la protéomique	22
3 Matériel et méthodes	39
3.1 Culture de <i>Desulfitobacterium frappieri</i> PCP-1 et production de la biomasse	40
3.1.1 Origine de la souche <i>Desulfitobacterium frappieri</i> PCP-1	40
3.1.2 Milieu de culture	40
3.1.3 Travail en conditions anaérobies	41
3.1.4 Production de la biomasse	42
3.1.5 Fractionnement cellulaire	43
3.1.6 Dosage des protéines	44
3.1.7 Dosage de l'activité de déshalogénéation	45
3.1.8 Analyse des chlorophénols par chromatographie liquide à haute performance (CLHP)	46
3.2 Électrophorèse en deux dimensions	46
3.2.1 Solubilisation des protéines membranaires	46
3.2.2 Isofocalisation	47
3.2.3 Équilibration	49
3.2.4 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)	49
3.2.5 Coloration des protéines	50
3.2.6 Conservation des gels	51
3.2.7 Analyse des gels	51
3.3 Analyse en spectrométrie de masse	52
3.3.1 Digestion des protéines à même le gel	52
3.3.2 Purification des peptides	54
3.3.3 Spectrométrie de masse	54
3.3.4 Analyse spectrale	55

4	Résultats.....	58
4.1	Activité de déshalogénation des différents lots produits.....	59
4.2	Analyse des gels après électrophorèse en deux dimensions.....	59
4.2.1	Point isoélectrique et masse moléculaire de la déshalogénase II purifiée de <i>D. frappieri</i>	59
4.2.2	Analyse des fractions cytoplasmique et membranaire après électrophorèse 2D.....	60
4.3	Identification des protéines d'intérêt par spectrométrie de masse.....	64
4.3.1	La protéine 57 kDa – déshalogénase II.....	64
4.3.2	La protéine 54 kDa.....	67
4.3.3	La protéine 31 kDa.....	70
4.3.4	La protéine 36,5 kDa.....	71
4.3.5	La protéine 42 kDa.....	73
4.3.6	La protéine 53 kDa.....	75
4.3.7	La protéine 42,5 kDa.....	79
4.3.8	Synthèse.....	82
5	Discussion.....	84
5.1	La protéine 57 kDa - Déshalogénase II.....	85
5.2	La protéine 54 kDa.....	88
5.3	Les protéines 31 et 36,5 kDa.....	90
5.4	La protéine 42 kDa.....	90
5.5	La protéine 53 kDa.....	93
5.6	La protéine 42,5 kDa.....	95
6	Conclusion.....	97
	Bibliographie.....	101
	Annexe A.....	121
	Annexe B.....	137
	Annexe C.....	141
	Annexe D.....	147
	Annexe E.....	150
	Annexe F.....	152
	Annexe G.....	159

Liste des figures

Figure 1: Exemples de déshalogénation réductrice.	6
Figure 2: Modèles suggérés pour le fonctionnement des déshalogénases avec cobalamine.....	11
Figure 3: Modèle d'halorespiration chez <i>D. tiedjei</i>	14
Figure 4: Structure de quelques surfactants zwitterioniques	27
Figure 5: Analyse en modes balayage et SM/SM avec un spectromètre de masse de type triple-quadrupôle.	34
Figure 6: Structure du «Isotope-Coded Affinity Tag» (ICAT).	36
Figure 7: Quantification différentielle et identification des protéines par marquage isotopique différentiel.....	37
Figure 8: Isoformes A, B, C, D et E de la déshalogénase II purifiée et séparée par électrophorèse 2D sur un gradient de pH allant de 4 à 7.	60
Figure 9: Protéines cytoplasmiques (800 µg) provenant de lots induit et non-induit pour la déshalogénation du 3,5-DCP en position <i>meta</i> , séparées par électrophorèse 2D sur un gradient de pH allant de 4 à 7	61
Figure 10: Protéines membranaires (800 µg) provenant de lots induit et non-induit pour la déshalogénation du 3,5-DCP en position <i>meta</i> , séparées par électrophorèse 2D sur un gradient de pH allant de 4 à 7	62
Figure 11: Protéines membranaires (800 µg) provenant de lots induit et non-induit pour la déshalogénation du 3,5-DCP en position <i>meta</i> , séparées par électrophorèse 2D sur un gradient de pH allant de 5,5 à 6,7	63
Figure 12: Spectre de masse des peptides tryptiques de la déshalogénase II purifiée chez <i>D. frappieri</i> , séparée par SDS-PAGE 12% (p/v) et digérée à même le gel.....	65
Figure 13: Séquence protéique de 61 kDa déduite du gène 192 du contig 2977 du génome partiel de <i>Desulfitobacterium hafniense</i>	65
Figure 14: Comparaison des spectres de masse obtenus pour la déshalogénase II	67
Figure 15: Spectre de masse des peptides tryptiques de la protéine de 54 kDa chez <i>D. frappieri</i> , séparée par électrophorèse 2D et digérée à même le gel	68
Figure 16: Séquence protéique déduite du gène 3824 du contig 3277 du génome partiel de <i>Desulfitobacterium hafniense</i>	68
Figure 17: Spectre de masse des peptides tryptiques de la protéine de 31 kDa chez <i>D. frappieri</i> , séparée par électrophorèse 2D et digérée à même le gel	71
Figure 18: Spectre de masse des peptides tryptiques de la protéine de 36,5 kDa chez <i>D. frappieri</i> , séparée par électrophorèse 2D et digérée à même le gel	72
Figure 19: Spectre de masse des peptides tryptiques de la protéine de 42 kDa chez <i>D. frappieri</i> , séparée par électrophorèse 2D et digérée à même le gel	73
Figure 20: Séquence protéique déduite du gène <i>Desu6767</i> du contig 2678 du génome partiel de <i>Desulfitobacterium hafniense</i>	75
Figure 21: Spectre de masse des peptides tryptiques des isoformes A et B de la protéine de 53 kDa chez <i>D. frappieri</i> , séparée par électrophorèse 2D et digérée à même le gel.....	76

Figure 22: Séquence protéique déduite des gènes <i>Desu7176</i> du contig 2867 et <i>Desu6783</i> du contig 2687 du génome partiel de <i>Desulfitobacterium hafniense</i>	78
Figure 23: Comparaison des séquences protéiques déduites des gènes <i>Desu7176</i> du contig 2867 et <i>Desu6783</i> du contig 2687 du génome partiel de <i>Desulfitobacterium hafniense</i> avec la séquence du précurseur putatif de la grande sous-unité de l'hydrogénase Ni/Fe chez <i>Desulfitobacterium dehalogenans</i>	79
Figure 24: Spectre de masse des peptides tryptiques des isoformes A et B de la protéine de 42,5 kDa chez <i>D. frappieri</i> , séparée par électrophorèse 2D et digérée à même le gel.....	80
Figure 25: Séquence protéique déduite du gène <i>Desu6765</i> du contig 2677 du génome partiel de <i>Desulfitobacterium hafniense</i>	82
Figure 26: Sentier proposé pour le métabolisme du formate et de la sérine chez <i>D. hafniense</i>	92

Liste des tableaux

Tableau 1: Caractéristiques de différentes déshalogénases impliquées dans la déshalogénation réductrice chez des bactéries anaérobies.....	8
Tableau 2: Résumé des caractéristiques des souches bactériennes effectuant la déshalogénation réductrice.	16
Tableau 3: Protéases et composés chimiques utilisés pour digérer les protéines	31
Tableau 4: Comparaison du profil peptidique théorique de la protéine de 61 kDa chez <i>D. hafniense</i> avec celui obtenu expérimentalement pour la déshalogénase II de <i>D. frappieri</i>	66
Tableau 5: Comparaison du profil peptidique théorique de la protéine de 54,8 kDa chez <i>D. hafniense</i> avec celui obtenu expérimentalement pour la protéine de 54 kDa de <i>D. frappieri</i>	69
Tableau 6: Profil peptidique obtenu expérimentalement pour la protéine de 31 kDa chez <i>D. frappieri</i>	70
Tableau 7: Profil peptidique obtenu expérimentalement pour la protéine de 36,5 kDa chez <i>D. frappieri</i>	72
Tableau 8: Comparaison du profil peptidique théorique de la protéine de 42,3 kDa chez <i>D. hafniense</i> avec celui obtenu expérimentalement pour la protéine de 42 kDa de <i>D. frappieri</i>	74
Tableau 9: Comparaison du profil peptidique théorique des produits des gènes <i>Desu7176</i> et <i>Desu6783</i> de <i>D. hafniense</i> avec celui obtenu expérimentalement pour la protéine de 53 kDa de <i>D. frappieri</i>	77
Tableau 10: Comparaison du profil peptidique théorique de la protéine de 48,5 kDa chez <i>D. hafniense</i> avec celui obtenu expérimentalement pour la protéine de 42,5 kDa de <i>D. frappieri</i>	81
Tableau 11: Synthèse des résultats obtenus pour les protéines induites et réprimées lors de la déshalogénation du 3,5-DCP chez <i>D. frappieri</i> PCP-1.....	83

Liste des abréviations

acide trifluoroacétique	TFA
benzoate	bz
bromure de cyanogène	CNBr
charge	z
3-chlorobenzoate	3-CB
3-chlorobenzoate déshalogénase réductrice	Dclase
chlorohydroxybenzoate	CIHBZ
chlorohydroxybiphényle	CIHBP
3-chloro-4-hydroxyphénylacétate	3-Cl-4-HPA
chlorophénol	CP
3-[(3-cholamidopropyle)diméthylamonio]-1-propanesulfate	CHAPS
chromatographie liquide à haute pression	CLHP
cytochrome	Cyt
déshalogénase II	DII
deutérium	D
deux dimensions	2D
dichloroéthylène	DCE
dichlorophénol	DCP
dithioérythritol	DTE
dithiothreitol	DTT
électron	e ⁻
électrophorèse en gel de polyacrylamide avec SDS	SDS-PAGE
électrovaporisation	ESI
formade déshydrogénase	Fdh
«Human Genome Project Organisation»	HUGO
«Human Proteome Organization»	HUPO
hydrogénase	H ₂ ase
«isotope-coded affinity tags»	ICAT

lauryl sulfate de sodium	SDS
masse	m
«matrix-assisted laser desorption ionisation»	MALDI
ménaquinone	MQ
milieu liquide minimal anaérobie	MLA
N,N,N',N'-tétra-méthyl-éthylènediamide	TEMED
paires de bases	pb
pentachlorophénol	PCP
phénylméthylsulfonylfluoride	PMSF
point isoélectrique	pI
pyrroloquinoline quinone	PQQ
quadripôle	Q
quinone	q
spectromètre de masse	SM
tampon d'activité enzymatique	TAE
tétrachloroéthylène	PCE
tétrachlorophénol	TeCP
«time of flight»	TOF
tributylphosphine	TBP
trichloroéthylène	TCE
trichlorophénol	TCP
tris(hydroxyméthyl)-aminométhane	Tris
«twin-arginine translocation»	TAT

1 Introduction

Chaque année, des quantités importantes de composés organiques halogénés sont produites industriellement. Généralement toxiques et récalcitrants, ces composés se retrouvent parfois dans l'environnement où ils sont la cause de graves problèmes de pollution. Or, certaines bactéries ont acquis avec le temps la capacité de transformer et dégrader de tels composés, ce qui fait de la biorestauration une solution intéressante pour la décontamination. Les bactéries anaérobies, étant plus efficaces que leur homologues aérobies pour dégrader les composés polyhalogénés, sont considérées comme étant particulièrement prometteuses. De façon générale, le mécanisme de déshalogénéation utilisé par les bactéries anaérobies est la déshalogénéation réductrice, où l'addition d'électrons à la molécule permet l'enlèvement d'un ou plusieurs halogène(s). Parmi les mécanismes de déshalogénéation connus chez les bactéries, celui-ci est particulièrement efficace pour dégrader des composés fortement chlorés.

Des études menées sur des bactéries utilisant des mécanismes de déshalogénéation réductrice ont montré que les déshalogénases, ainsi que d'autres protéines membranaires, peuvent être impliquées dans un processus d'halorespiration (Louie et Mohn, 1999; Smidt *et al.*, 2000). Le composé halogéné est alors utilisé comme accepteur final d'électrons dans un processus de respiration anaérobie et un gradient d'oxydoréduction entraînant la production d'ATP est formé. À ce jour, nos connaissances sur les mécanismes impliqués lors de la déshalogénéation réductrice et l'halorespiration en conditions anaérobies sont très limitées. Il est essentiel d'aller de l'avant dans l'étude de ces mécanismes afin d'établir des biotraitements plus efficaces.

De toutes les bactéries isolées à ce jour, *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 est la seule capable d'effectuer la déshalogénéation réductrice en *ortho*, *meta* et *para* de molécules aromatiques substituées avec un groupement hydroxyle, méthoxyle ou aminé, et la seule à pouvoir dégrader le PCP jusqu'au 3-chlorophénol (Dennie *et al.*, 1998). C'est en 1996 que cette bactérie anaérobie a été isolée d'un consortium méthanogénique capable de dégrader le PCP dans des effluents contaminés.

Bouchard *et al.* (1996) ont suggéré qu'il y aurait au moins deux enzymes responsables de la déshalogénation chez *D. frappieri* PCP-1: la déshalogénase I, qui agit principalement en *ortho*, et la déshalogénase II, qui agit surtout aux positions *meta* et *para*. Il a été déterminé que ces deux protéines étaient membranaires et possédaient possiblement un cofacteur métallique (Boyer, 1999). La déshalogénase I a été purifiée et sa masse moléculaire a été évaluée à 37 kDa par SDS-PAGE. Le gène correspondant à la protéine a été cloné et séquencé, et cette enzyme ne montre aucune homologie avec les autres déshalogénases connues (Boyer, communication personnelle). Une étude protéomique de *D. frappieri* PCP-1 lors de la déshalogénation du 2,4,6-TCP a permis de démontrer que cette protéine est présente sous différentes isoformes de façon constitutive chez *D. frappieri* (Pagé-Bélanger, 2002). D'après les résultats obtenus, il semblerait également que la présence du 2,4,6-TCP entraîne la répression de deux protéines dont l'une est apparentée à la sous-unité β d'une ATP synthétase, et l'autre à la sous-unité d'une glycolate oxydase. Il a été avancé que ces protéines pourraient faire partie de voies métaboliques entrant en compétition avec la déshalogénation réductrice en position *ortho* (Pagé-Bélanger, 2002). Quant à la déshalogénase II, elle a également été purifiée et sa masse moléculaire est évaluée à 57 kDa par SDS-PAGE (Thibodeau, 2003).

Dans le but d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes impliqués lors de la déshalogénation réductrice et l'halorespiration chez *D. frappieri* PCP-1, nous avons effectué une étude protéomique de ce micro-organisme à partir de cultures induites pour la déshalogénation en position *meta* du 3,5-DCP en 3-CP. La déshalogénase II, ainsi que différentes protéines induites et réprimées par ce chlorophénol ont été caractérisées et identifiées par spectrométrie de masse.

2 Revue de littérature

2.1 Les composés organiques halogénés

Chaque année, des quantités importantes de composés organiques halogénés sont produites industriellement. Ces derniers sont employés comme pesticides, agents de transfert de chaleur, fluides hydrauliques, ou encore pour le nettoyage à sec, le dégraissage des machineries, la fabrication de composantes électroniques, etc. Ces composés, généralement toxiques et récalcitrants, se retrouvent inévitablement dans l'environnement et sont la cause de graves problèmes de pollution. En 1998, Fetzner estimait à 27 millions de tonnes la quantité d'organochlorés produite annuellement aux Etats-Unis. En mai 2001, un traité visant à éliminer 12 polluants organiques persistants représentant un risque significatif pour la santé et l'environnement a été adopté par le Programme environnemental des Nations Unies. Parmi les douze polluants ciblés, onze étaient des composés organiques chlorés (Krasotkina *et al.*, 2001).

Les composés organiques halogénés étant produits de façon naturelle par plusieurs organismes, leur présence dans l'environnement ne date pas d'hier (Gribble 1994, 1996). C'est pourquoi certaines bactéries ont acquis avec le temps la capacité de transformer et dégrader de tels composés. La biorestauration semble donc être une stratégie intéressante pour la décontamination (Krasotkina *et al.*, 2001).

2.2 La déshalogénation réductrice

Il existe à ce jour sept mécanismes connus de déshalogénation chez les bactéries: la déshalogénation oxygénolytique, la déshalogénation hydrolytique, la déshalogénation thiolitique, la substitution intramoléculaire, la déhydrohalogénation, l'hydratation et la déshalogénation réductrice (Fetzner et Lingens, 1994). De tous ces mécanismes, seulement le dernier permet de dégrader des composés fortement chlorés. Cette particularité fait de la déshalogénation réductrice une activité particulièrement prometteuse pour la biorestauration de sites contaminés.

La déshalogénation réductrice est le mécanisme généralement utilisé en conditions anaérobies, au cours de laquelle l'addition d'électrons à la molécule permet l'enlèvement d'un ou plusieurs halogène(s). Ceci peut être effectué de deux façons, soit par hydrogénolyse ou par réduction vicinale (**figure 1**). Lors de l'hydrogénolyse, un atome d'hydrogène remplace un halogène sur un groupement aryle ou alkyle. Lors de la réduction vicinale, deux halogènes situés sur des carbones adjacents d'un groupement alkyle sont enlevés, entraînant la formation d'une liaison double entre ces deux atomes de carbone (Mohn et Tiedje, 1992). La présence d'un agent réducteur est nécessaire dans chacun des cas.

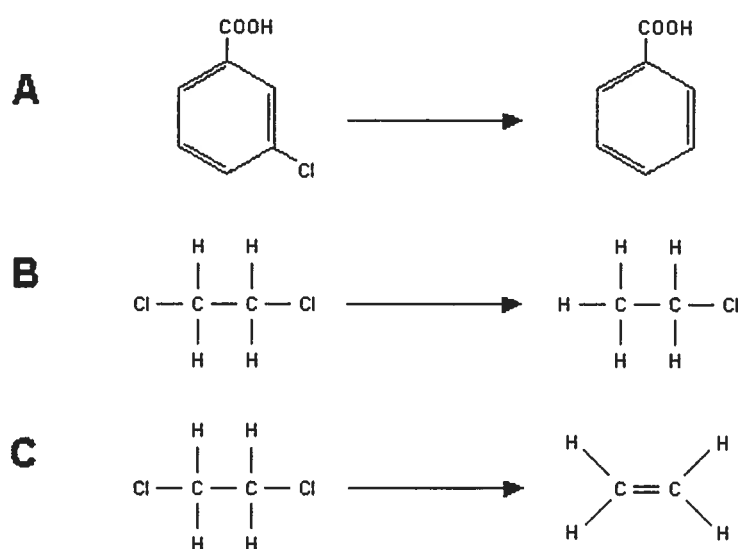


Figure 1: Exemples de déshalogénation réductrice.

- A)** Hydrogénolyse d'un groupement aryle (3-chlorobenzoate en benzoate);
- B)** Hydrogénolyse d'un groupement alkyle (1,2-dichloroéthane en chloroéthane);
- C)** Réduction vicinale d'un groupement alkyle (1,2-dichloroéthane en éthène).

Modifié de Mohn et Tiedje, 1992.

Chez les micro-organismes, la déshalogénation réductrice peut être le résultat d'un co-métabolisme, du métabolisme du carbone ou, comme c'est le plus souvent le cas, de l'halorespiration. Il y a co-métabolisme lorsque des enzymes ou des cofacteurs impliqués dans des voies métaboliques autres que la déshalogénation réductrice dégradent des composés halogénés. On parle alors d'une réaction fortuite. Puisqu'aucun apport en carbone n'est engendré et qu'il n'y a pas production d'ATP, le micro-organisme ne réalise

aucun bénéfice énergétique (Fantroussi, Naveau et Agathos. 1998). En plus d'être rare, ce type de réaction connaît des taux de déshalogénéation plutôt faibles. Chez certains micro-organismes, les atomes de carbone d'hydrocarbures halogénés sont utilisés comme sources de carbone et d'énergie. La déshalogénéation réductrice est alors liée au métabolisme du carbone. Finalement, on parle d'halorespiration lorsque le composé halogéné est utilisé comme accepteur final d'électrons dans un processus de respiration anaérobie et qu'il y a formation d'un gradient d'oxydoréduction entraînant la production d'ATP. Les taux de déshalogénéation très élevés des bactéries capables d'halorespiration font de ces dernières des candidats intéressants pour la biorestauration de sites contaminés par des composés halogénés.

2.2.1 Les macromolécules impliquées

La déshalogénéation réductrice implique trois grandes catégories de macromolécules. Il y a les déshalogénases, qui sont responsables de la déshalogénéation proprement dite, les transporteurs d'électrons et les réductases autres que les déshalogénases, dont le rôle est de maintenir le gradient d'oxydoréduction.

2.2.1.1 Les déshalogénases réductrices

Les déshalogénases réductrices sont des enzymes capables d'enlever un groupement halogène d'un composé organique halogéné. La purification de ces dernières à partir de différents micro-organismes capables d'halorespiration ainsi que leur caractérisation biochimique détaillée (voir **tableau 1**) a révélé que, à une exception près, toutes les enzymes possèdent un cofacteur similaire, soit un corrinoïde, généralement couplé à des centres Fe-S (Holliger, Wohlfarth et Diekert, 1999 ; Smidt *et al.* 2000). La déshalogénase 3-chlorobenzoate réductrice de *Desulfomonile tiedjei* DCB-1 est l'exception, possédant un hème de type chromophore au lieu d'un corrinoïde à son site actif.

Tableau 1: Caractéristiques de différentes déshalogénases impliquées dans la déshalogénéation réductrice chez des bactéries anaérobies.

Déshalogénases	Souches	Sous-unités	Masse (KDa)	Centres Fe-S	Cofacteurs	Substrats	Types de substitution
3-chlorobenzoate déshalogénase réductrice (1)	<i>Desulfomonile tiedjei</i> DCB-1	2	37 64	ND	1 hème de type chromophore	3-CB PCE TCE	<i>Meta</i> <i>Cis</i>
Tétrachloroéthylène réductase (2)	<i>Dehalobacter restrictus</i>	1	60	2	2 corrinoïdes	Chloroalcènes	<i>Cis</i>
Tétrachloroéthylène déshalogénase réductrice (3,4,5)	<i>Dehalospirillum multivorans</i>	1	56	2	1 corrinoïde	PCE TCE	<i>Cis</i>
PCE déshalogénase réductrice (6,7)	<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> 195	ND	51	2	1 corrinoïde	PCE	<i>Cis</i> <i>Trans</i>
TCE déshalogénase réductrice (6,7)	<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> 195	2	61 110	ND	1 corrinoïde	Chloroalcènes	<i>Cis</i>
<i>Ortho</i> -chlorophénol déshalogénase réductrice (8)	<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i>	ND	48	2	1 corrinoïde	Chlorophénols Chlorohydroxy-phenylacétate	<i>Ortho</i>
Déshalogénase aryle-réductrice (9,10)	<i>Desulfitobacterium chlororespirans</i> Co23	1	50	2	1 corrinoïde	Chlorophénols Chlorohydroxy-benzoates	<i>Ortho</i> <i>Meta</i>
Déshalogénase 3-chloro-4-hydroxy-phénylacétate réductrice (11)	<i>Desulfitobacterium hafniense</i> DCB-2	ND	46,5	3	1 corrinoïde	3-Cl-4-OHPA	<i>Ortho</i>
Déshalogénase I réductrice (12,13)	<i>Desulfitobacterium frappieri</i> PCP-1	1	37	0	1 corrinoïde	Chlorophénols	<i>Ortho</i>
Déshalogénase II réductrice (12,14)	<i>Desulfitobacterium frappieri</i> PCP-1	1	58	ND	1 corrinoïde	Chlorophénols	<i>Meta</i> <i>Para</i>
Chlorophénol déshalogénase réductrice (15)	<i>Desulfitobacterium</i> sp. PCE1	1	48	ND	1 corrinoïde	Chlorophénols	<i>Ortho</i>
Tétrachloroéthylène déshalogénase réductrice (15)	<i>Desulfitobacterium</i> sp. PCE1	1	48	ND	1 corrinoïde	PCE	<i>Cis</i> <i>Trans</i>
Tétrachloroéthylène déshalogénase réductrice (16)	<i>Desulfitobacterium</i> sp. PCE-S	3	65	ND	1 corrinoïde	Chloroalcènes	<i>Cis</i>
PceA déshalogénase réductrice (17)	<i>Desulfitobacterium</i> sp. Y51	1	67	1	1 corrinoïde	PCE TCE	<i>Cis</i> <i>Trans</i>

Références: (1) Ni, Fredrikson et Xun, 1995; (2) Schumacher *et al.*, 1997; (3) Neumann, Wohlfarth et Diekert, 1996; (4) Neumann, Wohlfarth et Diekert, 1998; (5) Neumann *et al.*, 2002; (6) Magnuson *et al.*, 1998; (7) Magnuson *et al.*, 2000; (8) van de Pas *et al.*, 1999; (9) Löffler, Sanford et Tiedje, 1996; (10) Krasotkina *et al.*, 2001; (11) Christiansen et Ahring, 1998; (12) Bouchard *et al.*, 1996; (13) Boyer, 1999; (14) Thibodeau, 2003; (15) van de Pas *et al.*, 2001a; (16) Miller, Wohlfarth et Diekert, 1998; (17) Suyama *et al.*, 2002.

En 1997, des recherches effectuées par Shumacher *et al.* sur la PCE réductase de *D. restrictus* ont démontré que ce dernier ne pouvait croître qu'en présence de la vitamine B₁₂ dans un milieu de culture. Des essais en chromatographie et en spectrophotométrie sur des extraits de corrinoïde tendaient à confirmer l'hypothèse des auteurs selon laquelle la vitamine B₁₂ serait le cofacteur de la PCE réductase. La même hypothèse avait été soulevée quant à la nature du cofacteur de la déshalogénase PCE réductrice de *D. multivorans* (Neumann, Wohlfarth et Diekert, 1996). Cependant, il a récemment été démontré chez *D. multivorans* que le corrinoïde n'est pas une cyanocobalamine (vitamine B₁₂) (Neumann *et al.*, 2002). En ce qui concerne les déshalogénases réductrices des autres espèces, aucune hypothèse n'a été formulée quant à la nature de leur cofacteur corrinoïde.

Les gènes codant pour les déshalogénases réductrices de *Desulfitobacterium dehalogenans* (*cprA*; van de Pas *et al.*, 1999), *Dehalospirillum multivorans* (*pceA*; Neumann, Wohlfarth et Diekert, 1998) et *Dehalococcoides ethenogenes* (*tceA*; Magnuson *et al.*, 2000) ont été identifiés. Chez *Desulfitobacterium dehalogenans*, un fragment génomique de 11,5 kpb contenant le gène *cprA* a fait l'objet d'une caractérisation moléculaire détaillée. L'analyse de séquence a révélé la présence de huit gènes désignés *cprTKZEBACD*, où *cprB* code pour une protéine membranaire intégrale putative qui pourrait jouer un rôle de protéine d'ancrage à la membrane pour la déshalogénase. CprD, CprE et CprT affichent un fort pourcentage de similarité avec des chaperonnes moléculaires, tandis que CprC et CprK pourraient bien être impliquées dans la régulation de la transcription à différents niveaux. Aucune fonction n'a encore pu être assignée au produit de *cprZ*. Alors que l'halorespiration provoque l'induction de la transcription de la plupart de ces gènes, aucune expression significative n'a été relevée lors de la fermentation du pyruvate ou de la respiration sur nitrate ou fumarate (Smidt *et al.* 2000).

L'alignement des produits des gènes *cprA* et *pceA* connus avec d'autres déshalogénases décrites antérieurement a révélé la présence d'une région conservée dans la partie C-terminale de la protéine (Villemur *et al.*, 2002). Cette région couvre deux motifs de liaison à des centres fer/soufre (Smidt *et al.*, 2000; von Wintzingerode *et al.*,

2001). Le premier (FCXXCXXCXXXCP) est considéré comme celui qui permet la fixation d'un centre Fe_4S_4 (Bruschi et Guerlesquin, 1988). Le second ne contient que trois cystéines conservées (CXXCXXXC). Von Wintzingerode *et al.* (2001) ont suggéré que ce dernier pourrait être responsable d'une liaison avec un centre Fe_3S_4 , lorsqu'il est précédé d'une glycine (GXXCXXCXXXC). La majorité des déshalogénases réductrices, putatives ou caractérisées, possèdent une séquence consensus RRXFXXK en N-terminal propre au système de sécrétion TAT (twin arginine translocation). Ce système implique généralement des protéines capables de se lier à différents cofacteurs dans le cytoplasme où elles sont repliées avant d'être exportées. Ces dernières sont souvent impliquées dans des chaînes de transfert d'électrons associées à la membrane (Berks, Sargent et Palmer, 2000), comme on peut s'y attendre pour des protéines impliquées dans l'halorespiration.

Deux mécanismes ont été proposés pour les déshalogénases réductrices ayant des centres fer/soufre et des cofacteurs corrinoïdes (voir **figure 2**). Dans le premier (A), un électron provenant d'un transporteur d'électrons parvient à un premier centre Fe/S. Ce dernier l'achemine vers la cobalamine(II) pour la réduire en cobalamine(I). Le cobalt se lie alors directement au composé halogéné, ce qui provoque l'enlèvement de l'halogène. Un électron parvient alors au second centre Fe/S. Celui-ci l'achemine à la cobalamine(III) afin de la réduire en cobalamine(II). Avec l'ajout d'un proton, cette réduction permet de libérer le composé halogéné avec un halogène en moins (Neuman, Wohlfarth et Diekert, 1996). Dans le second mécanisme (B), un électron provenant d'un transporteur d'électrons parvient à un premier centre Fe/S qui l'achemine vers la cobalamine(II) afin de la réduire en cobalamine(I). Cette dernière donne un électron au composé halogéné, ce qui permet d'enlever un halogène au composé qui prend alors une forme radicalaire. Un électron provenant d'un transporteur d'électrons arrive ensuite au deuxième centre Fe/S. Ce dernier l'achemine au radical, ce qui permet à un atome d'hydrogène de prendre place. Puisque la présence du radical ou de l'organocobalt n'a pas encore été démontrée, il est impossible de savoir lequel des deux modèles illustre le mode d'action des déshalogénases réductrices ayant des centres fer/soufre et des cofacteurs corrinoïdes (van de Pas *et al.*, 1999).

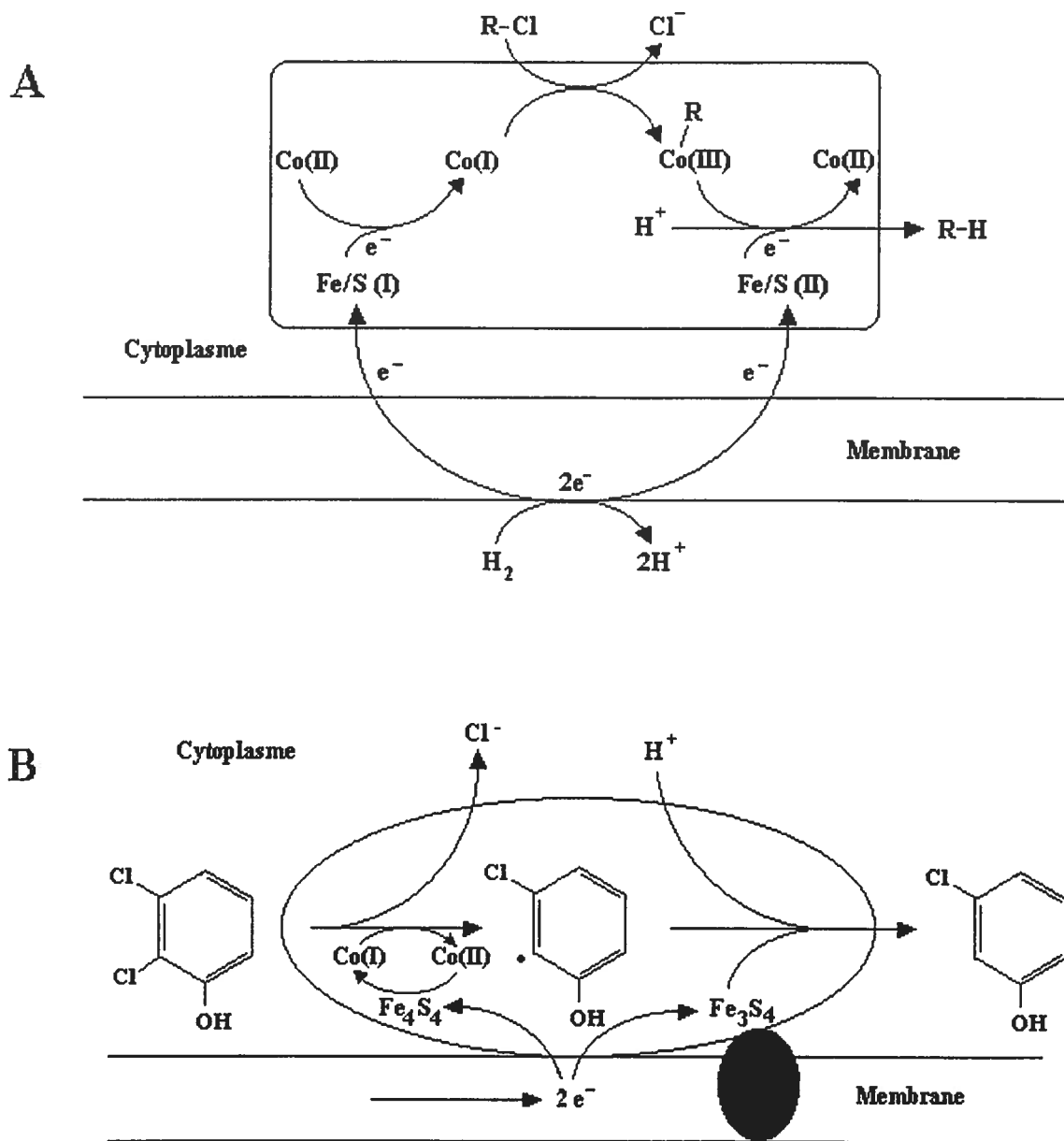


Figure 2: Modèles suggérés pour le fonctionnement des déshalogénases avec cobalamine.

A) Modèle impliquant un lien direct entre le cobalt et l'organochloré chez la tétrachloroéthylène déshalogénase réductrice de *D. multivorans* (modifié de Neuman, Wohlfarth et Diekert, 1996); **B)** Modèle impliquant la formation d'un radical libre chez la déshalogénase *ortho*-chlorophénol réductrice de *D. dehalogenans* (modifié de van de Pas et al., 1999).

2.2.1.2 Les transporteurs d'électron

En plus d'être essentiels au bon fonctionnement des déshalogénases, les transporteurs d'électrons jouent un rôle très important lors de l'halorespiration. En acheminant les électrons à la déshalogénase, ces derniers participent au maintien du gradient d'oxydoréduction nécessaire à la production d'ATP. Jusqu'à maintenant, trois types de transporteurs d'électrons ont été identifiés comme étant potentiellement impliqués dans la déshalogénéation réductrice. Il s'agit des cytochromes, quinones et ferrédoxines.

Les cytochromes sont des chromoprotéines dont le groupement prosthétique est un hème, c'est-à-dire une porphyrine ayant en son centre un ou plusieurs atomes de fer. Ce dernier peut osciller de l'état divalent à l'état trivalent, d'où leur rôle comme transporteurs d'électrons. En 1997, Louie *et al.* ont observé l'induction du cytochrome *c* lors de la déshalogénéation du 3-chlorobenzoate avec production d'ATP chez *D. tiedjei*. Le cytochrome *c* est donc fort probablement impliqué dans la chaîne de transport d'électrons pendant la déshalogénéation.

Les quinones sont des composés cycliques présentant dans leur cycle deux fonctions cétone susceptibles d'être réduites en fonctions phénol par la capture de 2 atomes d'hydrogène. Chez *D. multivorans*, des expérimentations ont démontré qu'une ménaquinone (MQ) liée à la membrane était réduite par l'oxydation de H₂ et réoxydée par la réduction du PCE, ce qui implique que la MQ joue un rôle au niveau du transport des électrons (Schumacher et Holliger, 1996). Il y a quelques années, De Weerd *et al.* (1990) ont découvert que la 1,4-naphtoquinone ou la ménadione était nécessaire pour obtenir une croissance optimale chez *D. tiedjei*. La structure de ces quinones étant similaire à celle des ménaquinones, il a été suggéré qu'il s'agissait peut-être de précurseurs de la ménaquinone. Cependant, la quinone isolée de *D. tiedjei* par Louie et Mohn (1999) n'est pas une ménaquinone. Bien que sa structure soit encore incertaine, il semblerait que cette dernière partage quelques similarités avec la pyrroloquinoline quinone (PQQ).

La ferrédoxine est une petite molécule contenant 2 Fe et 2 S_i (soufre inorganique), très réductrice sous sa forme réduite. Miller, Wohlfarth et Diekert (1997a) ont émis l'hypothèse que cette dernière serait le donneur d'électrons direct de la PCE réductase de *D. multivorans*.

À défaut d'avoir identifié et purifié le transporteur direct, c'est le méthyle viologène qui est utilisé lors d'essais enzymatiques *in vitro*. C'est avec ce donneur d'électrons artificiel que les meilleures activités spécifiques ont été obtenues pour toutes les déshalogénases.

2.2.1.3 Les réductases et l'halorespiration

Lors de l'halorespiration, le gradient d'oxidoréduction est maintenu en partie grâce à l'action de réductases. Selon un modèle suggéré pour *D. tiedjei* (**figure 3**), il s'agirait de l'hydrogénase (située dans le périplasme) et de la formate déshydrogénase (associée à la membrane et orientée vers le périplasme). Pendant que l'oxydation du formate ou de l'hydrogène libère des protons dans le périplasme, la réduction du composé halogéné par la déshalogénase consomme des protons dans le cytoplasme, ce qui génère une force protomotrice. Les électrons relâchés par les réductases sont transportés de l'autre côté de la membrane via le cytochrome *c* et la quinone, jusqu'à la déshalogénase. Lors du transfert des électrons par la quinone, la force protomotrice est accrue par la translocation de protons du cytoplasme vers le périplasme. La quinone, réduite par les électrons provenant du cytochrome *c* arrache deux protons au cytoplasme. Après avoir transmis ses électrons à la déshalogénase, la quinone relâche les protons dans le périplasme et le cycle recommence. Enfin, la force protomotrice générée par le processus entraîne la production d'ATP par une ATPase membranaire (Louie et Mohn, 1999).

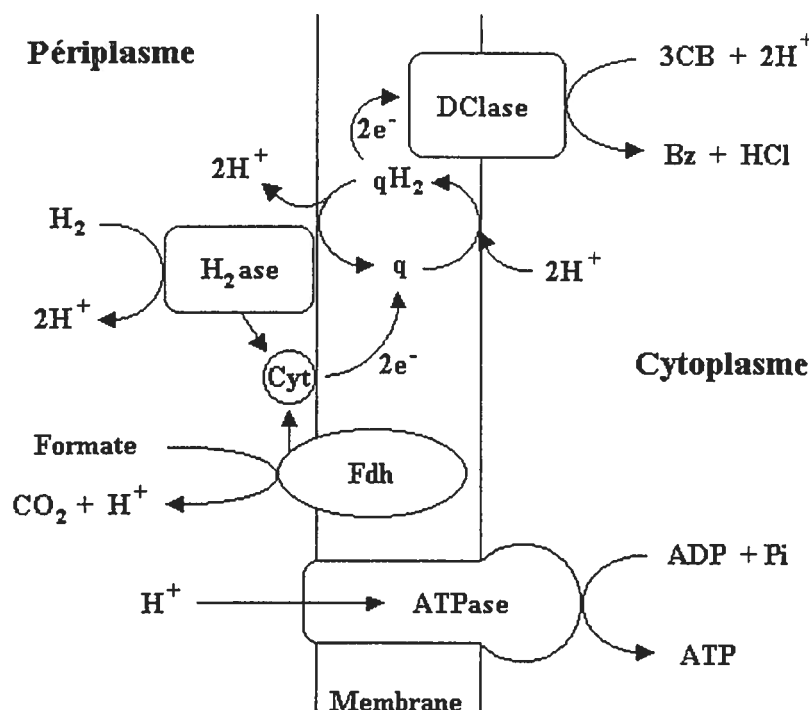


Figure 3: Modèle d'halorespiration chez *D. tiedjei*.

H₂ase: hydrogénase inductible; Fdh: formate déshydrogénase inductible; Cyt: cytochrome *c* inductible; q: une quinone; 3CB: 3-chlorobenzoate; Bz: benzoate; Dclase: 3-chlorobenzoate déshalogénase réductrice (modifié de Louie et Mohn, 1999).

2.3 Des bactéries capables de déshalogénéation réductrice

La dégradation complète des composés toxiques requiert généralement une association entre différentes communautés bactériennes (Dolfing and Tiedje, 1986). L'étude de ces consortiums ne permettant pas d'élucider les mécanismes fondamentaux et les exigences physiologiques de la déshalogénéation, il a fallu axer la recherche sur l'identification et la caractérisation des souches impliquées. En raison des difficultés rencontrées lors de la culture de bactéries anaérobies, les souches étudiées dans le passé ont surtout été aérobies (Slater, 1994; Slater, Bull et Hardman, 1995). Cependant, depuis quelques années, les bactéries anaérobies attirent de plus en plus l'attention. Ces dernières étant plus efficaces que leur homologues aérobies pour déshalogéner des composés polyhalogénés, elles sont

Tableau 2: Résumé des caractéristiques des souches bactériennes effectuant la déshalogénéation réductrice.

Bactéries	Caractéristiques	Accepteurs d'électrons	Spectre d'activité
<i>Desulfomonile tiedjei</i> souche DCB-1 (1,2,3,4,5)	bâtonnet Gram-, non mobile non sporulant, anaérobie strict	sulfate, sulfite thiosulfate	3-CB, PCE CPs en <i>meta</i>
<i>Dehalobacter restrictus</i> souche PER-K23 (6,7)	bâtonnet Gram- anaérobie	PCE DCE	PCE, TCE, DCE Chloroéthylène
<i>Dehalospirillum multivorans</i> (8)	spirillum Gram- non sporulant, anaérobie strict	nitrate, fumarate PCE	PCE TCE
<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> souche 195 (9,10)	coque anaérobie	PCE H ₂	PCE, TCE, DCE 1,2-dichloroéthylène
<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> souche TT4B (11)	bâtonnet Gram- non sporulant, anaérobie	fumarate TCE	PCE, TCE, fumarate nitrilacétate ferrique
<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> souche 2-CP1 (12)	bâtonnet Gram- anaérobie facultative	fumarate PCE	CPs en <i>ortho</i>
<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i> (13,14,15,16)	bâtonnet Gram+, mobile non sporulant, anaérobie	sulfite, thiosulfate nitrate, fumarate	3-Cl-4-HPA, ClHBPs, CPs en <i>ortho</i>
<i>Desulfitobacterium chlororespirans</i> (17)	bâtonnet Gram+, mobile sporulant, anaérobie	sulfite, soufre thiosulfate	ClHBZs, 3-Cl-4-HPA CPs en <i>ortho</i>
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> souche DCB-2 (18)	bâtonnet Gram+ mobile, sporulant anaérobie strict	soufre, sulfite, nitrate thiosulfate, fumarate, MnO ₂ As(V), Fe(III), Se(VI)	CPs en <i>ortho</i> et <i>meta</i>
<i>Desulfitobacterium frappieri</i> souche PCP-1 (19,20,21)	bâtonnet Gram+ non mobile, sporulant anaérobie strict	soufre, sulfite, nitrate thiosulfate, fumarate, MnO ₂ As(V), Fe(III), Se(VI)	PCE CPs en <i>ortho</i> , <i>meta</i> et <i>para</i>
<i>Desulfitobacterium frappieri</i> souche TCE-1 (22)	bâtonnet Gram+ mobile, non sporulant anaérobie strict	PCE, TCE sulfite, nitrate thiosulfate, fumarate	PCE TCE
<i>Desulfitobacterium frappieri</i> souche TCP-A (23)	bâtonnet Gram+, mobile sporulant, anaérobie	nitrate fumarate	PCE CPs en <i>ortho</i> et <i>meta</i>
<i>Desulfitobacterium frappieri</i> souche DP7 (24)	bâtonnet Gram+, mobile non sporulant, anaérobie	sulfite, nitrate thiosulfate, fumarate	aucun chloroéthylène ou CP
<i>Desulfitobacterium sp.</i> souche PCE-1 (25)	bâtonnet Gram+, mobile non sporulant, anaérobie	sulfite, thiosulfate fumarate	CPs en <i>ortho</i>
<i>Desulfitobacterium sp.</i> souche PCE-S (26,27)	Gram+ anaérobie strict	PCE, TCE fumarate	PCE TCE
<i>Desulfitobacterium sp.</i> souche Y51 (28)	bâtonnet Gram+, mobile non sporulant, anaérobie strict	fumarate	PCE polychloroéthanes
<i>Desulfitobacterium sp.</i> souche GBFH (20)	bâtonnet sporulant	soufre, fumarate sulfite, thiosulfate, MnO ₂ , As(V) Fe(III), Se(VI).	N.D.

Références: (1) Shelton et Tiedje, 1984; (2) Ni, Fredrickson et Xun, 1995; (3) Mohn et Kennedy, 1992; (4) Cole, Fathpure et Tiedje, 1995; (5) Fathpure, Nengu et Boyd, 1987; (6) Holliger *et al.*, 1998; (7) Schumacher et Holliger, 1996; (8) Neumann, Wohlfarth et Diekert, 1998; (9) Maymó-Gatell *et al.*, 1997; (10) Maymó-Gatell, Anguish

considérées comme étant très prometteuses en biorestauration, notamment pour le développement de procédés *in situ*. De plus, les biotraitements anaérobies s'avèrent plus avantageux puisque les sols sont anoxiques à une profondeur de quelques centimètres seulement. Ainsi, les biotraitements anaérobies sont plus simples et moins coûteux que les biotraitements aérobies, ces derniers ne pouvant fonctionner sans système d'aération.

Jusqu'à présent, aucune étude protéomique sur les microorganismes anaérobies stricts impliqués dans la déshalogénéation réductrice n'a été reportée dans la littérature. Plusieurs bactéries anaérobies capables de dégrader des composés halogénés ont cependant été isolées en culture pure et caractérisées. Un résumé des caractéristiques, accepteurs d'électrons et spectres d'activité de ces souches est présenté dans le **tableau 2**. Comme on peut le constater, le genre *Desulfitobacterium* apparaît comme l'un des plus importants au niveau de la déshalogénéation réductrice. On retrouve des bactéries appartenant au genre *Desulfitobacterium* un peu partout sur la planète (Sanford *et al.*, 1996; Christiansen et Ahring, 1998; Gerritse *et al.*, 1996; Lanthier *et al.*, 2001), ces dernières étant isolées de sols pollués, de sédiments en eaux vives, de boues d'égout et de sol composté (Breitenstein *et al.*, 2001). Leur capacité à utiliser une vaste gamme d'accepteurs d'électrons, allant des composés halogénés tant aromatiques qu'aliphatiques à des composés plus simples tels que le sulfite, le thiosulfate, le sulfure, le nitrate et le fumarate, leur a permis de s'implanter dans plusieurs types d'environnements et de compétitionner avec les autres micro-organismes (Dambosky, 1999; Dennie *et al.*, 1998).

et Zinder, 1999; (11) Krumholz, Sharp et Fishbain, 1996; (12) Cole *et al.*, 1994; (13) Utkin, Woese et Wiegel, 1994; (14) Utkin, Dalton et Wiegel, 1995; (15) Mackiewicz et Wiegel, 1998; (16) van de Pas *et al.*, 2001b; (17) Sanford *et al.*, 1996; (18) Madsen et Licht, 1992; (19) Bouchard *et al.*, 1996; (20) Niggemyer *et al.*, 2001; (21) Dennie *et al.*, 1998; (22) Gerritse *et al.*, 1999; (23) Breitenstein *et al.*, 2001; (24) van de Pas *et al.*, 2001c; (25) Gerritse *et al.*, 1996; (26) Miller *et al.*, 1997b; (27) Miller *et al.*, 1998; (28) Suyama *et al.*, 2001.

2.3.1 *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1

De toutes les bactéries isolées à ce jour, *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 est la seule capable d'effectuer la déshalogénation réductrice en *ortho*, *meta* et *para* de molécules aromatiques substituées avec un groupement hydroxyle, méthoxy ou aminé, ce qui en fait un candidat de choix pour la biorestauration des sites contaminés. De plus, elle dégrade le tétrachloroéthylène et le pentachloropyridine, et peut *ortho*-déméthyliser et réduire les groupements nitro en groupements aminé sur des molécules aromatiques (Dennie *et al.*, 1998). *D. frappieri* PCP-1 ne peut par contre déshalogéner les monochlorophénols, le 3,4-dichlorophénol, le 2,3-dichlorophénol, le 2,5-dichlorophénol et le 3-chloro-4-hydroxy-phenylacétate.

D. frappieri PCP-1 a été isolée par Bouchard *et al.* (1996) d'un consortium méthanogène effectuant la dégradation du PCP (Juteau *et al.*, 1995a, 1995b; Beaudet *et al.* 1997). Ce bâtonnet de 2,2 à 4,5 µm de longueur par 0,7 µm de largeur, anaérobie strict, possédant une paroi de type Gram positif (bien qu'il se colore comme une bactérie Gram négative), sporulant, non mobile et asaccharolytique (Bouchard *et al.*, 1996) utilise une variété d'accepteurs d'électrons tels le sulfite, le thiosulfate, le nitrate et plusieurs métaux tels l'As(V), le Fe(III), le Se(VI) et le Mn(IV) (Niggemyer *et al.*, 2001). Du pyruvate et de l'extrait de levures sont nécessaires à sa croissance, qui est optimale à un pH de 7,5 et une température de 38°C. Le contenu en G+C de son ADN génomique est de 46%, et d'après l'analyse de séquence de l'ARN ribosomal (ARNr) 16 S, il aurait 95% d'homologie avec *Desulfitobacterium dehalogenans* (Bouchard *et al.*, 1996). Récemment, Niggemyer *et al.* (2001) ont suggéré, en se basant sur les propriétés physiologiques et des

tests d'hybridation ADN-ADN, que *D. hafniense* et *D. frappieri* devraient être unies en une seule et même espèce.

D. frappieri PCP-1 s'est révélé un outil puissant pour la biorestauration de sols contaminés au PCP et le biotraitement anaérobie d'effluents contaminés. Il s'est montré efficace pour la dégradation du PCP en 3-chlorophénol après son inoculation dans des microcosmes de type «slurry» constitués de sols contaminés provenant d'une industrie de traitement du bois (Beaudet *et al*, 1998). Des études en bioréacteur anaérobie ont aussi démontré que la souche PCP-1 peut dégrader efficacement jusqu'à 200 mg de PCP/kg de sol en moins de neuf jours (Lanthier *et al.*, 2000). Utilisant une technique de réaction compétitive de polymérisation en chaîne (RcPCR), il a été possible de déterminer la présence des bactéries PCP-1 au cours des biotraitements (Beaudet *et al*, 1998, Lanthier *et al*, 2000). Dans ces derniers bioréacteurs, la souche PCP-1 a été détectée pendant plus de 21 jours dans les réacteurs contenant 500 mg/kg de sol alors qu'elle était éliminée durant la même période dans les réacteurs contenant 750 mg/kg de sol (Lanthier *et al* 2000). Il a également été démontré que l'incorporation de *D. frappieri* PCP-1 à la communauté bactérienne mixte d'un réacteur en continu à boue granulaire (de type UASB) dégradant le PCP augmentait l'efficacité de ce dernier (Tartakovsky *et al.*, 1999). Sur une période de 70 jours, sa population a augmenté de 10^6 à 10^{10} cellules/g de solides en suspension volatiles (VSS) et la charge de PCP dégradée est passée de 5 à 80 mg/L de volume de réacteur par jour.

Une étude sur la distribution géographique de *D. frappieri* PCP-1 dans 48 échantillons de sols prélevés dans des sites variés a montré que 31 sites différents ont présenté une réaction positive au PCR pour des amorces visant l'ARNr 16 S des séquences des gènes de *Desulfitobacterium* et *D. frappieri* PCP-1 (Lanthier *et al*, 2001). Ces microorganismes se retrouvaient principalement dans la vallée du St-Laurent et la partie sud du Québec. *D. frappieri* a été retrouvé autant dans des sols contaminés que non contaminés, suggérant qu'il n'existe pas de relation entre la présence de ces microorganismes et la présence de polluants.

La souche PCP-1 dégrade le PCP en 3-CP selon la voie suivante: PCP → 2,3,4,5-TeCP → 3,4,5-TCP → 3,5-DCP → 3-CP. Au moins deux enzymes seraient responsables de ces réactions: la déshalogénase I, qui agit principalement en *ortho*, et la déshalogénase II, qui agit surtout aux positions *meta* et *para* (Bouchard *et al.*, 1996). Ces deux enzymes d'origine membranaire sont sensibles à l'oxygène. La déshalogénase I a été purifiée et sa masse moléculaire a été évaluée à 37 kDa par SDS-PAGE. L'inhibition de son activité de déhalogénéation par l'iodopropane et sa restauration de son activité en présence de lumière suggère que cette protéine contiendrait une cobalamine. La séquence NH₂-terminale de même que des séquences peptidiques internes après traitement à la trypsine ont été déterminées. Le gène correspondant à la protéine a été cloné et séquencé, et cette enzyme ne montre aucune homologie avec les autres déshalogénases connues (Boyer, communication personnelle). Une étude protéomique de *D. frappieri* PCP-1 lors de la déshalogénéation du 2,4,6-TCP a permis de démontrer que cette protéine est présente sous différentes isoformes et se retrouverait de façon constitutive chez *D. frappieri* (Pagé-Bélanger, 2002). D'après les résultats obtenus, il semblerait également que la présence du 2,4,6-TCP entraîne la répression d'une protéine de 45 kDa qui serait apparentée (81% de similarité) à la sous-unité β d'une ATP synthétase de *Moorella thermoacetica*, ainsi que d'une protéine de 55 kDa partageant 71% de similarité avec la sous-unité d'une glycolate oxydase de *Bacillus halodurans*. Il a été avancé que ces protéines pourraient faire partie de voies métaboliques entrant en compétition avec la déshalogénéation réductrice en position *ortho* (Pagé-Bélanger, 2002). Quant à la déshalogénase II, elle a également été purifiée et sa masse moléculaire est évaluée à 57 kDa par SDS-PAGE. Les résultats d'inhibition par l'iodopropane et le cyanure suggèrent la présence d'une cobalamine (Thibodeau, 2003).

2.4 La protéomique

2.4.1 Définitions

Le mot «protéomique» a été utilisé pour la première fois en 1995, afin de définir la caractérisation à grande échelle du complément protéique d'une lignée cellulaire, d'un tissu ou d'un organisme (Anderson et Anderson, 1996; Wasinger *et al.*, 1995; Wilkins *et al.*, 1995). Aujourd'hui, il existe deux définitions de la protéomique. La première, et aussi la plus classique, restreint l'analyse à grande échelle des produits des gènes à l'étude des protéines. La seconde combine l'étude des protéines avec d'autres analyses reliées à la génétique, telles que les analyses d'ARN messenger (ARNm) (Pandey et Mann, 2000). Cependant, le but de la protéomique demeure toujours le même: obtenir une vue globale et intégrale de la biologie par l'étude de toutes les protéines d'une cellule, plutôt que de chacune individuellement.

Le protéome d'une cellule reflète l'environnement immédiat dans lequel il est étudié. En réponse à certains stimuli internes ou externes, des protéines peuvent subir des modifications post-traductionnelles ou des translocations, être synthétisées ou dégradées. En considérant toutes les possibilités, n'importe quel génome pourrait potentiellement engendrer un nombre infini de protéomes. La protéomique permet donc de suivre dans le temps et dans l'espace l'expression des gènes sous forme de protéines et par conséquent, donne une description moléculaire précise et surtout représentative du caractère dynamique de la cellule (Lottspeich, 1999).

2.4.2 Les origines de la protéomique

Pendant de nombreuses années, les protéines ont été étudiées individuellement ou par complexes, sans qu'il ne soit possible d'avoir une véritable vue d'ensemble de l'état physiologique de la cellule (VanBogelen *et al.*, 1999). C'est avec l'arrivée de

l'électrophorèse en deux dimensions (2D), mise au point par O'Farrell (1975), Klose (1975) et Scheele (1975), que la protéomique prend ses racines. Au départ, les protéines séparées par électrophorèse 2D ont été séquencées par la dégradation d'Edman (Edman, 1949). Par la suite, des techniques d'immunoempreinte ont été mises au point (Aebersold *et al.*, 1986; Aebersold *et al.*, 1987) afin d'identifier les protéines. Un des événements les plus importants dans l'identification des protéines a été le développement de la spectrométrie de masse (Andersen et Mann, 2000). Au cours de la dernière décennie, la sensibilité de l'analyse et l'acuité des résultats pour l'identification des protéines par spectrométrie de masse ont considérablement augmenté (Andersen et Mann, 2000; Pandey et Mann, 2000). C'est donc la spectrométrie de masse qui a fini par s'imposer, puisqu'en plus de permettre une identification plus rapide des protéines, cette technologie offre la possibilité de voir les modifications qu'elles peuvent acquérir dans un contexte cellulaire (Roepstorff, 1997).

2.4.3 De la génomique à la protéomique

Au cours des vingt dernières années, le séquençage du génome de divers organismes a été lancé. La majorité de l'information disponible actuellement sur les séquences d'acides nucléiques a été accumulée au cours des 5 à 10 dernières années (Broder et Venter, 2000). En 1995, le premier génome complet d'un organisme, soit *Haemophilus influenzae*, a été séquencé (Fleischmann *et al.*, 1995). Au moment de la rédaction de ce mémoire, le séquençage du génome de 45 micro-organismes a été complété et 170 autres sont en voie d'être complétés.

Les gènes, étant constitutifs, ne donnent qu'une information statique de la biologie de l'organisme. À partir d'un gène, il est impossible de déduire quelles seront les modifications sur la séquence en acides aminés d'une protéine, ni l'endroit ou le moment où elles se produiront. Contrairement à la génomique, la protéomique a l'avantage de pouvoir suivre l'expression des différents isoformes d'une protéine dans la cellule. Un autre atout important de la protéomique est sa capacité à mesurer l'abondance relative des

différentes protéines et de leurs isoformes. Ce type de renseignement ne peut pas être fourni par les gènes, et l'abondance relative des ARNm ne donne qu'une évaluation approximative de l'expression des protéines. En effet, plusieurs études montrent qu'il n'y a pas (ou très peu) de corrélation entre l'abondance relative en ARNm et l'abondance relative de certaines protéines dans la cellule (Anderson et Seilhamer, 1997; Skidmore et Beebe, 1990). La protéomique s'impose donc pour le suivi des protéines dans la cellule. Cependant, il ne faut pas oublier que cette discipline dépend directement des progrès effectués dans le séquençage des génomes à grande échelle, puisque l'identification des protéines (par SM ou dégradation d'Edman) requiert tout d'abord la présence d'une banque de données (Pandey et Lewitter, 1999; Shevchenko *et al.*, 1996).

2.4.4 La technique au cœur de la protéomique

2.4.4.1 Généralités

L'étude protéomique typique se fait généralement selon les étapes suivantes: la séparation des protéines par électrophorèse 2D, la digestion de protéines à l'aide d'une endoprotéase, l'analyse des peptides et de leurs fragments par spectrométrie de masse, et finalement, l'identification des protéines par comparaison entre les données obtenues en spectrométrie de masse et celles retrouvées dans les banques de données. Au cours des prochaines pages, les avantages et les limites de cette méthode seront abordés. Quelques alternatives, ainsi que les derniers outils mis au point afin de repousser les limites de l'électrophorèse 2D seront également discutés. Il sera également question des différentes façons d'utiliser la protéomique, que ce soit pour la création de banques de données ou pour l'étude de systèmes biologiques précis.

2.4.4.2 L'électrophorèse en deux dimensions

En protéomique, l'électrophorèse 2D est le moyen privilégié pour la séparation des protéines. Deux facteurs en particulier sont responsables de cette popularité. Premièrement, cette technique permet de séparer de façon relativement simple et uniforme jusqu'à 10 000 polypeptides par gel selon leur point isoélectrique (pI) et leur masse moléculaire (MW) (Klose et Kobalz, 1995). La combinaison de ces deux techniques de séparation offre une vue d'ensemble des protéines exprimées et facilite la compréhension des relations complexes entre protéines (Haynes et Yates III, 2000). Ainsi, deux « patrons protéiques » d'un état cellulaire normal et anormal peuvent être comparés afin d'étudier les altérations dans l'expression des protéines (apparition ou disparition de protéines, changement d'intensité dans leur coloration).

Deuxièmement, l'électrophorèse 2D demeure le meilleur moyen de séparer et de visualiser différents isoformes d'une même protéine (Harry *et al.*, 2000). Les principales sources de la formation d'isoformes sont l'épissage alternatif du produit d'un même gène, la troncation en N ou en C terminal, et les modifications co-traductionnelles ou post-traductionnelles incluant l'acétylation en N terminal, la glycosylation, la méthylation, la myristoylation, la palmitoylation, la phosphorylation et l'ubiquitination (Celis *et al.*, 1996; Celis *et al.*, 2000). Par ce type d'analyse directe, le suivi de l'état de maturation des protéines, de leur transcription à leur dégradation en passant par leur forme active, se voit grandement facilité.

2.4.4.2.1 Des problèmes rattachés à l'électrophorèse 2D

Malgré tous les avantages qu'elle procure, la technique d'électrophorèse 2D telle que pratiquée aujourd'hui n'est pas une technique optimale pour la protéomique. La réalisation des gels d'acrylamide nécessite beaucoup de temps, ce qui limite la possibilité de travailler à grande échelle. De plus, leur nature fragile limite l'automatisation de la technique (Quadroni et James, 1999). Cependant, la critique la plus sévère est reliée au fait qu'il soit encore impossible de visualiser et de quantifier l'ensemble des protéines

exprimées par un génome, alors que la protéomique se veut la meilleure discipline pour ce genre d'étude.

Les limites de séparation par électrophorèse 2D font en sorte qu'il y a toujours masquage entre les protéines de masse moléculaire et de pI rapprochés. Sur la base d'algorithmes, il a été déterminé que 20% des taches après coloration correspondent à plus d'une protéine chez les procaryotes. Ce pourcentage passe à 40% chez les eucaryotes (Parker *et al.*, 1998; Link *et al.*, 1997). De plus, la faible expression de certaines protéines rend difficile leur visualisation sur gel 2D. En général, les protéines les plus abondantes, telles que les enzymes métaboliques et les protéines de régulation, sont détectées au détriment des protéines plus faiblement exprimées, telles que les facteurs de transcription (Gygi, Rist et Aebersold, 2000; Gygi et Aebersold, 2000). L'analyse des protéines de levures par gel 2D a permis de démontrer qu'aucune protéine dont valeur de biais du codon («bias codon value») est inférieure à 0,1 ne pouvait être visualisée sur gel (Gygi *et al.*, 1999) même si plus de la moitié des 6000 gènes de la levure codent pour de telles protéines (Goffeau *et al.*, 1996). Cependant, la plus grande part du problème vient des propriétés physico-chimiques des protéines. En effet, il est très difficile de séparer adéquatement des protéines ayant des propriétés physico-chimiques extrêmes par électrophorèse 2D. Ici, l'expression «propriétés physico-chimiques extrêmes» désigne des masses moléculaires très élevées ou très faibles, des pI très bas ou très hauts, ou une très grande hydrophobicité.

Pour être séparées par électrophorèse 2D, les protéines doivent avant tout être solubilisées (Chambers *et al.*, 2000). Les protéines hydrophobes, incluant la plupart des protéines membranaires, sont particulièrement réfractaires à la solubilisation. Wilkins *et al.* (1998) ont examiné les protéines présentes sur les gels 2D de trois espèces (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Saccharomyces cerevisiae*), et les ont associées avec les protéines théoriques de leur génome. Ils ont constaté que les protéines hydrophobes, qui constituent près de 30% de certains protéomes cellulaires (Paulsen *et al.*, 1998 ; Fey et Larsen, 2001), étaient presque toutes absentes des gels 2D. Ce rapport a été une importante découverte pour la protéomique, mettant en évidence la faiblesse des

méthodes de solubilisation actuelles. Les protéines hydrophobes sont par conséquent très peu étudiées en protéomique, malgré l'importance de leurs rôles biologiques. Cependant, puisque l'industrie pharmaceutique s'intéresse davantage aux récepteurs et aux enzymes, et que ces deux types de protéines sont souvent de nature hydrophobe, il devient primordial de résoudre ce problème (Schindler, Van Dorsselaer et Falick, 1993; Cutler *et al.*, 1999).

Après avoir été bien solubilisées, les protéines doivent pouvoir entrer dans le gradient de pH immobilisé pour y migrer lors de l'isofocalisation. Les protéines de masse moléculaire élevée (>200 kDa) pénètrent difficilement le gel lors de sa réhydratation en présence de l'échantillon. De surcroît, ces protéines ainsi que les protéines basiques (pI > 8) et les protéines hydrophobes ont tendance précipiter pendant l'isofocalisation et sont, par conséquent, difficiles à visualiser sur gel 2D. Les protéines très basiques provoquent quant à elles de l'électro-osmose, ce qui fait varier indûment le courant lors de l'isofocalisation. Il s'en suit généralement une moins bonne résolution de l'ensemble des protéines (Harry *et al.*, 2000).

Au cours du passage à la deuxième dimension, le problème de pénétration se répète avec les protéines dont la masse est supérieure à 200 kDa. Les protéines dont la masse est inférieure à 8 kDa migrent quant à elles avec le front. Il devient alors impossible de visualiser ces protéines par SDS-PAGE (Harry *et al.*, 2000).

2.4.4.2.2 Des solutions aux problèmes rattachés à l'électrophorèse 2D

Conscients des problèmes rattachés à l'électrophorèse 2D, mais aussi de la valeur de cette technique pour la protéomique, plusieurs chercheurs tentent d'améliorer cet outil. Les techniques de préfractionnement et la solubilisation des protéines constituent les deux principaux axes de recherche dans ce domaine.

2.4.4.2.2.1 L'optimisation de la solubilisation

Au cours des dernières années, plusieurs progrès ont été faits dans le domaine de la solubilisation des protéines et ce, grâce à l'introduction de nouveaux chaotropes, surfactants et agents réducteurs.

Le rôle des chaotropes est de briser les liens hydrogènes, menant au dépliement et à la dénaturation des protéines. L'urée, n'étant pas chargée, est le chaotrope standard utilisé pour l'électrophorèse 2D. En 1996, lors de la conférence de Sienne sur l'électrophorèse 2D, Rabilloud mentionnait que la solubilisation des protéines membranaires pouvait être améliorée en additionnant un second chaotrope: la thiourée. L'effet bénéfique de ce nouveau réactif n'est pas restreint aux protéines membranaires. Ce phénomène a pu être observé pour des protéines très solubles, ainsi que pour des protéines prédisposées à la précipitation isoélectrique (Rabilloud *et al.*, 1997).

Les surfactants sont ajoutés à la solution de solubilisation pour agir en synergie avec les chaotropes. Leur rôle est d'empêcher les interactions hydrophobes lors de l'exposition des domaines hydrophobes résultant de l'action des chaotropes. Ceci est particulièrement important pour les protéines membranaires, qui possèdent un ou plusieurs de ces domaines. Ce sont la tête polaire et la queue hydrophobe du surfactant qui jouent un rôle lors de la solubilisation (Jones, 1999). Dans le cas des protéines membranaires, la queue du surfactant infiltre la couche lipidique et se lie aux résidus hydrophobes, permettant la dispersion de ces domaines dans un milieu aqueux par la formation de micelles. La tête polaire, quant à elle, peut briser les liens ioniques et hydrogènes, facilitant la dispersion. Les surfactants zwitterioniques de type sulfobetaine semblent les plus efficaces, même s'ils sont en général peu compatibles avec l'urée. Bien qu'il ne possède pas le pouvoir surfactant le plus élevé, c'est le 3-[(3-cholamido-propyle)diméthylammonio]-1-propanesulfate (CHAPS), qui est le plus couramment utilisé, puisqu'il est le plus soluble en présence de fortes concentrations d'urée. D'autres sulfobetaines sont plus efficaces, mais leur utilité est restreinte en raison de leur incompatibilité avec l'urée. C'est cela qui a poussé les chercheurs à synthétiser des

homologues plus solubles (Gianazza *et al.*, 1987 ; Rabilloud *et al.*, 1990). L'inclusion d'un groupe amide faisant le pont entre la tête polaire et la queue hydrophobe a grandement amélioré la tolérance à l'urée (Rabilloud *et al.*, 1990). Récemment, Chevallet *et al.* (1998) ont déterminé les exigences structurales d'un sulfobetaine hautement efficace et compatible avec l'urée. Ce dernier doit comporter une queue alkyle ou alkyl-aryle de 14-16 carbones, une tête sulfobetaine de 3 carbones et un espace de 3 carbones entre l'ammonium quaternaire et le groupe carboxy-amide. Suite à ces résultats, les détergents les plus prometteurs sont le ASB14 et le C8Ø (figure 4). Ces deux surfactants ont été testés avec succès en combinaison avec l'urée et la thiourée pour solubiliser les protéines membranaires d'*E. coli* (Molloy *et al.*, 2000).

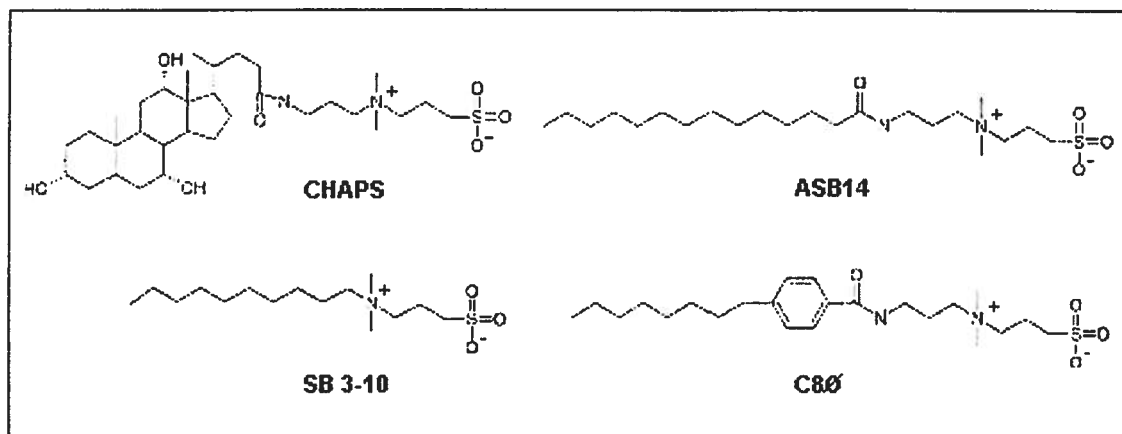


Figure 4: Structure de quelques surfactants zwitterioniques (Molloy *et al.*, 2000).

Les agents réducteurs sont utilisés pour briser les liens disulfures inter- et intramoléculaires. Les agents réducteurs cycliques tels que le dithiothreitol (DTT) ou le dithioérythritol (DTE) sont les plus communément utilisés. Les phosphines offrent cependant une alternative intéressante. Herbert *et al.* (1998) ont démontré que l'usage de la tributylphosphine (TBP) permettait d'améliorer la solubilité des protéines pour les lysats de cellules ovariennes de hamster chinois et pour l'intractable, une kératine de la laine comportant plusieurs liens disulfures. Il semblerait que cet agent réducteur non chargé maintient les conditions réductrices pendant toute la durée de l'isofocalisation, contrairement au DTT et au DTE. Malheureusement, les phosphines de courte longueur

de chaîne, incluant la TBP sont volatiles, toxiques et hautement inflammables lorsqu'elles sont concentrées. C'est pourquoi une étude sur l'efficacité de phosphines alternatives lors de l'électrophorèse 2D, ou sur la sécurité du transport et de l'utilisation de formes diluées de TBP serait nécessaire.

2.4.4.2.2.2 *Le préfractionnement*

Pour visualiser un plus grand nombre de protéines, le préfractionnement de l'échantillon s'avère souvent nécessaire. Une façon d'y arriver est de prendre avantage des bandes de gradient de pH immobilisé et de préfractionner les protéines selon leur *pI* en utilisant des gradients de pH très étroits (Wasinger, Bjellqvist et Humphery-Smith, 1997). La migration dans différents gradients de pH étroits peut faire varier les patrons protéiques et ainsi permettre la visualisation de certaines protéines qui autrement seraient masquées ou difficilement visibles. Le préfractionnement peut aussi s'effectuer selon plusieurs autres méthodes comme la solubilisation séquentielle, qui permet de séparer les protéines selon leur solubilité en utilisant différents chaotropes, surfactants et agents réducteurs (Molloy *et al.*, 1998); la centrifugation différentielle, qui permet de séparer les protéines selon leur localisation intracellulaire et permet d'établir le protéome d'organelles (Pasquali, Fialka et Huber, 1999 ; Jung *et al.*, 2000); la focalisation isoélectrique préalable à l'électrophorèse 2D, qui permet de minimiser la précipitation et l'agrégation des protéines (Zuo et Speicher, 2000) et la chromatographie d'adsorption, qui peut être utilisée pour générer des fractions enrichies en protéines basiques ou hydrophobes (Fountoulakis *et al.*, 1999 ; Harrington *et al.*, 1992). En enrichissant un certain groupe de protéines, le préfractionnement réduit la complexité de l'échantillon et limite ainsi les risques de co-migration. De plus, il permet de visualiser certaines protéines peu abondantes qui, autrement, se retrouveraient en trop faible concentration pour être identifiées. Il ne faut cependant pas abuser de ces méthodes. Chaque étape ajoutée diminue la reproductibilité, accroît les pertes d'échantillon et augmente le temps de travail (Zuo et Speicher, 2000).

2.4.4.3 La détection des protéines et l'analyse des gels

La détection des protéines dans le gel est une limite importante de l'électrophorèse 2D. Ceci est particulièrement vrai pour les protéines qui sont présentes en faibles quantités dans la cellule. Comme plusieurs de ces protéines sont responsables de la régulation cellulaire, cette limite devient un problème important lorsqu'il s'agit de comprendre la régulation de voies métaboliques ou de signalisation (Gygi *et al.*, 2000). Idéalement, une technique de révélation devrait détecter l'ensemble des protéines dans le gel.

L'autoradiographie et la fluorographie sont les méthodes de détection les plus sensibles. Elles permettent de détecter des subattomoles de protéines. Pour utiliser ces techniques, l'échantillon doit être composé de protéines marquées *in vivo* avec des isotopes radioactifs tels que S^{35} , C^{14} , H^3 ou, dans le cas des phosphoprotéines, P^{32} . Le marquage *in vivo* exige cependant un milieu de culture défini lors de la croissance des cellules, ce qui est parfois impossible. De plus, certaines protéines ayant un faible renouvellement dans la cellule peuvent ne pas être marquées par cette méthode. Enfin, il ne faut pas négliger les risques inhérents à la manipulation de ce type de matériel (Celis *et al.*, 2000). La coloration au nitrate d'argent est très sensible, sa limite de détection étant de l'ordre du femtomole (Quadroni et James, 1999). Cette technique est cependant complexe, comportant plusieurs étapes. Des réactifs de grande pureté et un minutage précis sont nécessaires pour obtenir des résultats reproductibles et de qualité. Plusieurs variables peuvent en modifier les résultats. La coloration au bleu de Coomassie est la plus simple et la plus reproductible, mais sa limite de détection n'est que de l'ordre du subpicomole. Ce colorant a l'avantage de permettre une certaine quantification des protéines puisqu'il se lie stoechiométriquement aux protéines. Les composés fluorescents tel le SYPRO développé par Molecular Probes procurent cependant la meilleure réponse linéaire entre l'intensité de la coloration de chaque tache et la quantité de protéines qui s'y trouve (Lopez 2000). La sensibilité de ce type de coloration dépasse celle du nitrate d'argent et du bleu de Coomassie (Matsui, Smith-Beckerman et Epstein, 1999 ; Rabilloud, 1999).

Après coloration des gels, l'analyse peut être faite manuellement, ou avec l'aide de certains logiciels tels que MELANIE (Appel *et al.*, 1997) et PDQUEST (Sinha *et al.*, 1998) qui superposent les patrons protéiques pour en déterminer les différences (ou les ressemblances).

2.4.4.4 La digestion

Les protéines d'intérêt sont digérées à même le gel avec des protéases ou des composés chimiques ayant une activité spécifique en vue d'analyser leurs peptides en spectrométrie de masse. Les protéases utilisées ont un K_M entre 5 et 50 mM (Quadroni et James, 1999). De celles-ci, c'est la trypsine qui est généralement employée, car les peptides issus d'une digestion tryptique facilitent l'analyse par spectrométrie de masse. Quant aux composés chimiques, c'est le bromure de cyanogène (CNBr) en solution acide est le plus souvent employé. Quadroni et James (1999) proposent toutefois plusieurs autres composés chimiques pour digérer les protéines de façon spécifique. Le **tableau 3** résume les caractéristiques des enzymes et composés chimiques les plus couramment utilisés. Pour être analysés en spectrométrie de masse, les peptides extraits du gel doivent être concentrés et exempts de tous les contaminants reliés à l'électrophorèse, tels les sels, tampons et détergents. La méthode de purification généralement employée est la chromatographie à phase inversée.

Tableau 3: Protéases et composés chimiques utilisés pour digérer les protéines (<http://matrixscience.com>)

Enzyme ou réactif	Site de clivage	Exceptions
Acide formique	C-terminal de D	
Arg-C	C-terminal de R	Lorsque P est en C-terminal de R
Asp-N	N-terminal de D	
Chymotrypsine	C-terminal de F, Y, W, L, I, V et M	Lorsque P est en C-terminal de F, Y, W, L, I, V ou M
CNBr	C-terminal de M	
Lys-C	C-terminal de K	Lorsque P est en C-terminal de K
Lys-C/P	C-terminal de K	
Pepsine A	C-terminal de F et L	
Trypsine	C-terminal de K et R	Lorsque P est en C-terminal de K ou R
Tryp-CNBr	C-terminal de K, R et M	Lorsque P est en C-terminal de K, R ou M
TrypChymo	C-terminal de F, Y, W, L, K et R	Lorsque P est en C-terminal de F, Y, W, L, K ou R
Trypsine/P	C-terminal de K et R	

2.4.4.5 La spectrométrie de masse

Pour être analysés en spectrométrie de masse, les peptides doivent être chargés et dépourvus de molécules d'eau. C'est pourquoi on les convertit en ions désolvatés. Les deux méthodes les plus utilisées pour y arriver sont l'ionisation par électrovaporisation (ESI) et l'ionisation par désorption au laser assistée par la matrice (MALDI). Avec la méthode MALDI, l'échantillon est incorporé dans une matrice, puis irradié avec un laser. Suite à l'excitation rapide des molécules de la matrice, les peptides sont libérés sous forme d'ions gazeux (Karas et Hillenkamp, 1988). Le plus grand avantage de cette méthode est que l'application de l'échantillon peut être effectué par un robot. Un autre

avantage de la méthode MALDI est que les peptides peuvent souvent être analysés sans qu'il y ait purification après digestion (Qin *et al.*, 1997). Avec l'ESI, l'échantillon est en solution, puis un potentiel est appliqué afin de le vaporiser en fines gouttelettes chargées. Ces dernières s'évaporent rapidement et laissent leur charge aux peptides, qui deviennent des ions désolvatés (Fenn *et al.*, 1989). Contrairement à la MALDI, l'ESI permet la production d'ions fortement chargés (Mann, Hendrickson et Pandey, 2001).

Essentiellement, tous les spectromètres de masse mesurent le quotient masse/charge (m/z) d'analytes tels que les protéines, peptides ou fragments de peptides. Différents principes peuvent être appliqués pour effectuer la séparation des analytes selon leur masse. La séparation basée sur le temps de vol (TOF), la séparation par quadripôle et la séparation par trappe ionique en sont quelques uns. L'analyseur de type TOF mesure le temps pris par les ions en phase gazeuse pour voyager de la source d'ionisation jusqu'au détecteur (Lahm et Langen, 2000 ; McDonald et Yates III, 2000). L'analyseur de type quadripôle est constitué de quatre tiges parallèles auxquelles un champ électrique est appliqué, et que les ions doivent traverser. Le quadripôle peut transmettre tous les ions au détecteur ou agir comme un filtre de masse et ne permettre que la transmission des ions ayant un quotient masse/charge (m/z) donné. La combinaison de plusieurs quadripôles est souvent utilisée pour obtenir de l'information sur la séquence en acides aminés d'un peptide. L'analyseur à trappe ionique, quant à lui, a la particularité de pouvoir garder les ions moléculaires en réserve afin de les éjecter sélectivement de la trappe. La sensibilité s'en trouve ainsi augmentée (Yates III, 1998).

Bien qu'il existe une multitude de combinaisons, le TOF est généralement combiné à la MALDI, alors que les analyseurs de type quadripôle et trappe ionique sont plutôt utilisés avec l'ESI (Yarmush et Jayaraman, 2002).

2.4.4.5.1 L'analyse par spectrométrie de masse

L'analyse des peptides par spectrométrie de masse peut fournir deux types d'information: la masse des peptides (profil peptidique) et celle de leurs fragments (séquence en acides aminés). C'est à partir de l'une ou l'autre de ces informations ou de ces deux informations combinées qu'il est possible d'identifier la protéine (Yates III, 2000).

Pour identifier les protéines par leur profil peptidique, le MALDI-TOF est le plus fréquemment utilisé. Parce qu'il est très rapide et peut être complètement automatisé, ce dernier a l'avantage de se prêter aux travaux protéomiques à grande échelle (Ekstrom *et al.*, 2000).

Les spectromètres de masse de type quadripôle avec cellule de collision sont les plus utilisés pour obtenir des séquences en acides aminés. La procédure utilisée est connue sous le nom de spectrométrie de masse en tandem, ou SM/SM (**figure 5**). Les peptides sont généralement ionisés par nanoélectrovaporisation. Dans un premier temps, l'appareil est opéré en mode balayage et tous les ions sont séparés selon leur quotient m/z dans le premier quadripôle. Un spectre de masse correspondant au profil peptidique est alors obtenu. À cette étape, le résultat est similaire à celui obtenu avec un MALDI-TOF. Dans un deuxième temps, le spectromètre de masse est opéré en mode SM/SM et seulement les ions ayant un quotient m/z déterminé sont sélectionnés pour entrer dans la chambre de collision (deuxième quadripôle) où ils sont fragmentés par collision avec un gaz inerte. Les fragments résultants sont ensuite transmis vers un autre quadripôle (on parle alors de triple-quadripôle) ou un TOF (on parle alors de Q-TOF) pour l'analyse de masse et la création d'un deuxième spectre de masse (Graves et Haystead, 2002). C'est en calculant la différence de masse entre chacun de ces fragments qu'il est possible de déduire une courte séquence en acides aminés appelée étiquette. En raison de sa sensibilité supérieure, le Q-TOF est plus approprié que le triple-quadripôle pour faire de la protéomique (Schindler, Van Dorsselaer et Falick, 1993).

A) Mode Balayage

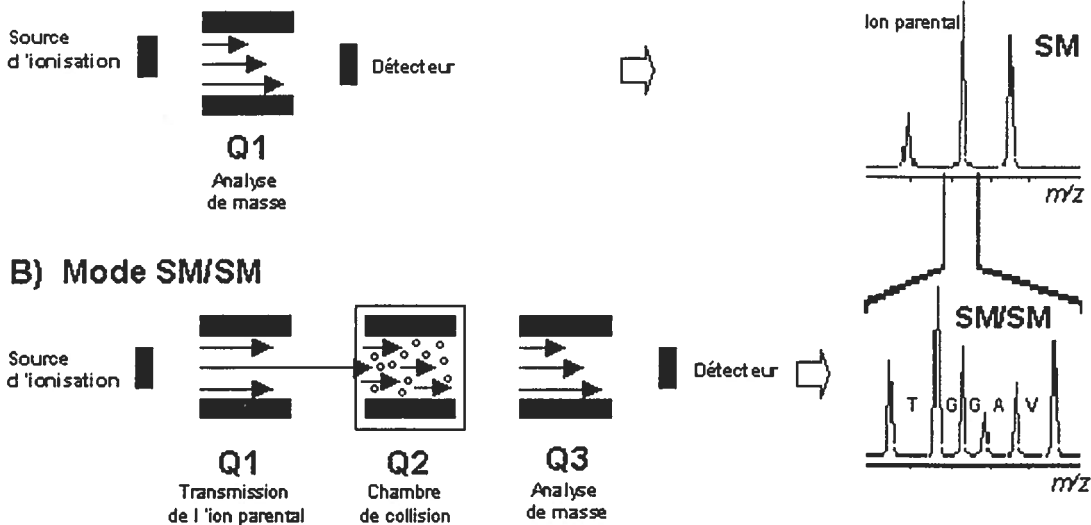


Figure 5: Analyse en modes balayage et SM/SM avec un spectromètre de masse de type triple-quadrupôle.

A) Les ions dont la valeur de m/z est couverte par le balayage passent à travers le premier quadripôle pour l'analyse de masse. Un spectre de masse (SM) représentant le profil peptidique de la protéine est alors obtenu. À partir de ce spectre, un ion est sélectionné pour la fragmentation (ion parental). B) En mode SM/SM, l'ion parental transmis de façon sélective dans la chambre de collision où il est fragmenté. Les fragments résultants (ions filles) sont séparés dans le troisième quadripôle et un deuxième spectre de masse est obtenu. La différence de masse entre chacun des ions filles correspond à la masse des résidus d'acides aminés constituant le peptide.

2.4.4.5.2 L'identification des protéines

Certains logiciels tels que PeptIdent (<http://ca.expasy.org/tools/peptident.html>) permettent d'identifier les protéines par leur profil peptidique en comparant les masses de peptides spécifiées par l'utilisateur avec les peptides théoriques calculés pour toutes les protéines répertoriées dans les banques de données. D'autres logiciels permettent l'identification de protéines en comparant des étiquettes avec les séquences retrouvées dans les banques de données. TagIdent (<http://ca.expasy.org/tools/tagident.html>) en est un exemple.

L'identification des protéines par la masse des peptides a souvent été considérée comme insuffisante puisque les masses des peptides peuvent varier suite à des modifications post-traductionnelles ou à des modifications induites par le traitement des protéines pour leur séparation par électrophorèse 2D (Müller *et al.*, 1999). L'identification à partir du profil peptidique couplée à l'identification à partir des étiquettes offre encore les résultats les plus sûrs (Pagé-Bélanger, 2002). Quelle que soit la technique d'analyse choisie, celle-ci demeure assujettie aux protéines répertoriées dans les banques de données. L'identification de protéines d'organismes moins populaires est par conséquent plus difficile (Harry *et al.*, 2000).

2.4.4.6 Contourner l'électrophorèse 2D

Bien que l'électrophorèse 2D permette la visualisation d'un large spectre de protéines, cette dernière possède de nombreuses limites. Pour accélérer l'analyse des protéomes et visualiser les protéines ayant des propriétés physico-chimiques extrêmes, de nouvelles techniques de séparation contournant l'électrophorèse 2D sont apparues. Deux de ces techniques seront présentées ici.

La première de ces techniques consiste à séparer les peptides par chromatographie liquide à haute pression (CLHP) multidimensionnelle. Toutes les protéines d'une cellule sont réduites puis digérées. Le mélange de peptides est ensuite déposé sur une colonne microcapillaire fortement échangeuse de cations. À l'aide d'un gradient de sel, une première fraction de ces peptides est éluée vers une colonne en phase inverse. Les peptides y sont alors nettoyés de leurs sels et de leur tampon, puis sont élués avec de l'acétonitrile vers un SM/SM pour l'analyse de séquence. Par la suite, le processus reprend de nouveau en augmentant la concentration de sel dans la colonne échangeuse de cations. Ce procédé peut ainsi séparer des peptides en plus de dix fractions différentes selon le type d'échantillon (Link *et al.*, 1999). En plus d'être plus rapide que l'électrophorèse 2D, cette technique permet d'analyser un plus large spectre de protéines car elle n'est pas restreinte dans l'utilisation de détergents.

La seconde technique est basée sur le marquage des protéines par des étiquettes d'affinité avec un code isotopique (ICAT pour «Isotope-Coded Affinity Tags»). Le ICAT est composé d'un site d'attachement à une colonne d'affinité (biotine), un groupement réagissant de façon spécifique avec les cystéines et un corps auquel sont incorporés les marqueurs isotopiques. Il y a deux types de corps : lourd, avec huit deutériums (D); et léger, où les deutériums sont substitués par des hydrogènes (**figure 6**).

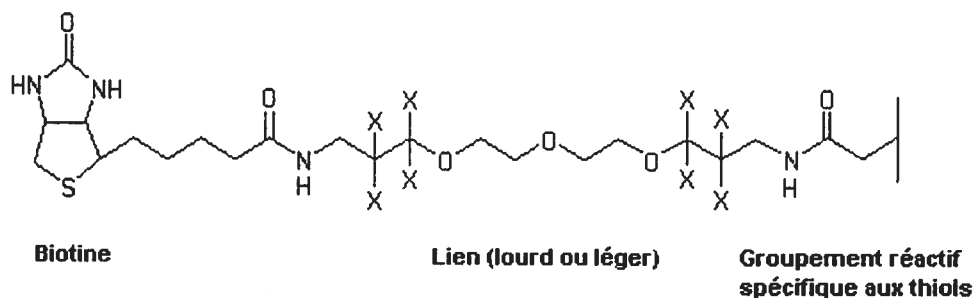


Figure 6: Structure du «Isotope-Coded Affinity Tag» (ICAT).

Le réactif est composé d'une biotine, d'un lien pouvant être marqué d'isotopes stables, et d'un groupement réactif spécifique aux thiols. Les «X» représentent des deutériums pour la forme lourde, et des hydrogènes pour la forme légère.

Les protéines de deux états cellulaires différents sont marquées respectivement par un ICAT lourd et léger, qui s'attache spécifiquement aux groupements thiols des cystéines. Les protéines provenant des deux états cellulaires sont ensuite rassemblées pour la protéolyse, et les peptides résultants sont passés à travers une colonne d'affinité où seuls ceux qui sont marqués avec le ICAT, donc contenant une ou des cystéines, sont retenus par la colonne. Ces derniers sont alors élués à travers un CLHP micro-capillaire afin de les séparer selon leur hydrophobicité. Des peptides ayant la même séquence en acides aminés, mais issus d'états physiologiques différents sont facilement identifiables sur le chromatogramme puisque essentiellement co-élués. Après leur passage sur CLHP, les peptides sont analysés par SM/SM. Il est alors possible d'observer l'abondance relative des peptides provenant d'états cellulaires différents, grâce à leur différence de masse de 8 Da (**figure 7**). L'analyse des données est beaucoup plus simple avec le ICAT qu'avec une simple CLHP multidimensionnelle, car seuls les peptides contenant des cystéines sont retenus. Cependant, c'est la possibilité de faire une analyse semi-

quantitative qui rend cette technique particulièrement attrayante, même si elle ne permet pas de visualiser les différents isoformes d'une même protéine. Ceci est particulièrement vrai si la différence se situe sur un peptide qui ne contient pas de cystéine (Gygi et al., 1999).

État cellulaire A

Cystéines marquées
avec un ICAT

État cellulaire B

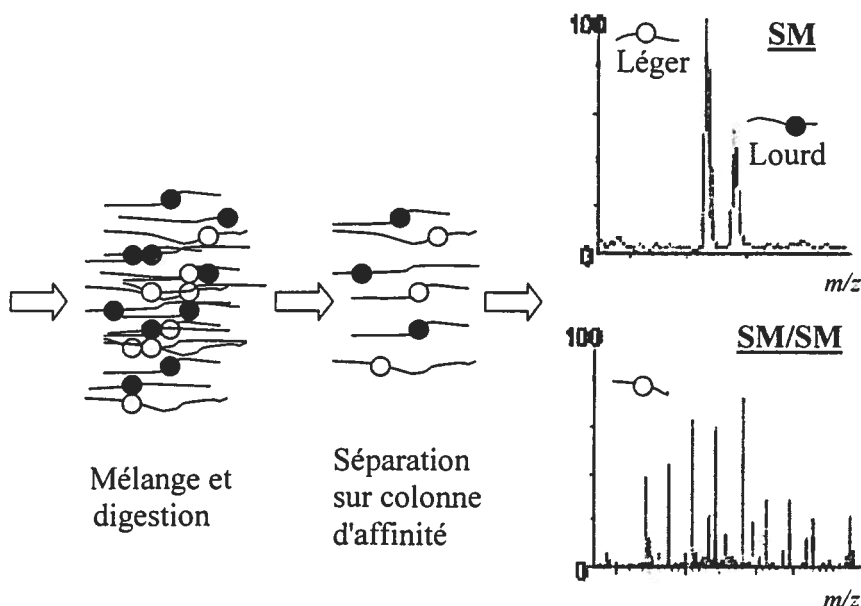


Figure 7: Quantification différentielle et identification des protéines par marquage isotopique différentiel.

Les cystéines des protéines de deux états cellulaires différents sont respectivement marquées avec des ICAT légers et lourds. Les protéines sont mélangées et digérées. Les peptides marqués par un ICAT sont isolés sur une colonne d'affinité et fractionnés par CLHP avant d'être analysés en spectrométrie de masse. L'abondance relative des protéines dans les deux états cellulaires est évaluée en SM. Une analyse SM/SM des peptides permet d'identifier les protéines par séquençage. Modifié de http://www.systemsbiology.org/research/core_fac/Proteomics/overview.html.

2.4.4.7 La protéomique et la recherche

Bien que la protéomique soit une discipline encore jeune, il existe déjà deux façons de la pratiquer. Certains chercheurs s'en servent uniquement pour établir des

banques de données sous forme de gels d'électrophorèse 2D représentant des organismes, organes ou tissus dans des états physiologiques précis, alors que d'autres l'utilisent pour étudier les systèmes biologiques en comparant entre eux des patrons protéiques issus de différents états physiologiques d'un organisme, organe ou tissus. Qu'ils soient de la première ou la deuxième catégorie, les projets impliquant la protéomique se multiplient (Pagé-Bélanger, 2002).

De nombreuses banques de données 2D provenant de différents groupes de recherche sont déjà disponibles sur Internet (Vihinen, 2001). Un index est disponible sur le site «WORLD-2DPAGE» (<http://www.expasy.ch/ch2d/2d-index.html>). Au début de l'année 2001, un organisme portant sur le protéome humain, le «Human Proteome Organization» (HUPO), a été fondé afin de coordonner toutes les initiatives en matière de protéome humain et créer une banque de données universelle. Ce projet s'inspire de la banque de données HUGO, Human Genome Project Organisation, générée par le séquençage du génome humain.

L'industrie pharmaceutique a depuis longtemps saisi tout le potentiel de la protéomique comme outil d'analyse biologique. Cette nouvelle technique lui permet entre autres d'identifier les protéines impliquées dans certaines pathologies, ce qui peut déboucher sur de nouvelles cibles thérapeutiques (donc de nouveaux médicaments) et l'élaboration de nouvelles méthodes diagnostiques (Petricoin *et al.*, 2002 ; Bertucci, 2002).

3 Matériel et méthodes

3.1 Culture de *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 et production de la biomasse

3.1.1 Origine de la souche *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1

La souche *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 (ATCC 700357) a été isolée par Bouchard *et al.* (1996) d'un consortium méthanogène anaérobie capable d'effectuer la dégradation du PCP (Juteau *et al.*, 1995a, 1995b). Cette souche a été conservée sous forme lyophilisée et sous forme congelée à -80°C . Lors de la production de biomasse, une ampoule était décongelée et utilisée pour inoculer un milieu liquide anaérobie dans des bouteilles sérologiques de 70 mL.

3.1.2 Milieu de culture

Desulfitobacterium frappieri PCP-1 a été cultivé dans un milieu liquide minimal anaérobie (MLA) semblable à celui décrit par Boyd *et al.* (1983). Un volume de 1 L de ce milieu contient les composés suivants: 0,27 g de KH_2PO_4 , 0,35 g de K_2HPO_4 , 0,53 g de NH_4Cl (J.T. Baker, Phillipsburg, N.J.), 0,10 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g de $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (Mallinckrodt, Paris, K.Y.), 0,073 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Fischer Scientific Company, Fair Lawn, N.J.), 0,005 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Montréal, Qc), 0,001 g d'extrait de levures (Difco, Détroit, MI), 6,05 g de pyruvate, 0,001 g de résazurine (Sigma, St-Louis, MO), 0,01 g de 3,5-DCP (Aldrich, Milwaukee, WI), et 10 mL d'une solution de minéraux (Wolin, Wolin et Wolfe, 1963). Cette solution contenait, par litre, 0,1 g de chacun des minéraux suivants: $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 (J.T. Baker, Phillipsburg, N.J.) et $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Anachemia, Montréal, Qc). Toutes les solutions sont préparées avec de l'eau déionisée.

Le KH_2PO_4 , le K_2HPO_4 , le NH_4Cl , la solution de minéraux et la résazurine (utilisée comme indicateur du potentiel redox) ont été mis en solution, puis le pH a été

ajusté à 7,5 avec du NaHCO_3 . Le mélange a été rendu anaérobie, ayant bouilli pendant 1 h dans un ballon relié à une colonne réfrigérante limitant l'évaporation. Il a ensuite été transféré dans des bouteilles sérologiques de 70 mL où il a été barboté avec un mélange gazeux composé de 10% de H_2 , 10% de CO_2 et 80% de N_2 (Médigas, St-Laurent, Qc), afin d'éliminer l'oxygène résiduel. Ces bouteilles ont été scellées avec des bouchons de butyle et stérilisées à l'autoclave (121°C pendant 15 minutes). Par la suite, les solutions de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$, pyruvate, extrait de levures, 3,5-DCP ainsi que la solution contenant le $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, le $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et le $\text{FeCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ont été injectées (en ordre) dans chaque bouteille, donnant un volume final de 35 mL. Les solutions ajoutées après autoclavage ont été préparées de manière anaérobie et préalablement stérilisées à l'aide d'un filtre de porosité de 0,2 μm . Les solutions de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$, pyruvate, extrait de levures et 3,5-DCP ont été préparées avec de l'eau bouillie. Il est à noter que le 3,5-DCP a été dissout dans une eau alcaline. Ici, le $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ est utilisé pour la réduction du milieu, afin de le maintenir en anaérobie. Le pyruvate et l'extrait de levures, quant à eux, fournissent les apports en carbone et en énergie, essentiels à la croissance de la souche. La déshalogénation réductrice en position *meta* étant induite par le 3,5-DCP chez *D. frappieri* PCP-1, ce composé a été omis pour les cultures témoins où aucun type de déshalogénation n'était induit. Un inoculum correspondant à 5% (v/v) du volume de la culture a été ajouté à certaines bouteilles, alors que d'autres n'ont pas été inoculées (contrôle abiotique).

3.1.3 Travail en conditions anaérobies

Les travaux nécessitant des manipulations en conditions anaérobies ont été exécutés en grande partie dans une chambre anaérobie (Sheldon Manufacturing Inc., modèle BAC II: Bactron Anaerobic/Environmental Chamber, Orégon). Le mélange gazeux dans la chambre est composé de 10% de H_2 , 10% de CO_2 et 80% de N_2 (Médigas, St-Laurent, Qc). L'enceinte est non stérile et permet le travail à mains nues, pour plus de dextérité.

Quant aux solutions utilisées pour la production du MLA et des fractions cellulaires, elles ont généralement été rendues anaérobies selon la procédure suivante. Un bécher en verre contenant la solution et un barreau magnétique étaient déposés dans une jarre anaérobie ayant une entrée et une sortie pour les gaz, ainsi qu'un manomètre permettant de contrôler la pression à l'intérieur du contenant. Le tout était déposé sur une plaque agitatrice (Corning Hot Plate Stirrer, modèle PC 351) afin de mélanger la solution à vitesse élevée. La sortie était reliée à une pompe à vide, alors que l'entrée était fixée à une bonbonne contenant le mélange gazeux de H_2 , CO_2 et N_2 décrit précédemment. Après avoir laissé la solution sous vide pendant 5 à 10 min, une dizaine de lavages avec le mélange gazeux étaient effectués, en alternant l'entrée de gaz et le vide. Le dernier cycle se terminait par une entrée du mélange gazeux. Ensuite, la jarre anaérobie et son contenu étaient introduits dans la chambre anaérobie. La solution était alors transférée dans des bouteilles sérologiques de 70 mL (Canlab, Pointe-Claire, Qc), qui étaient ensuite scellées avec des bouchons de butyle (Geo-Microbial Technologies, Ochelata, N.J.). Les bouteilles étaient alors retirées de la chambre anaérobie, et les solutions étaient prélevées à l'aide d'une seringue.

3.1.4 Production de la biomasse

La méthodologie employée pour la production de la biomasse et le fractionnement cellulaire est inspirée de Ni, Fredrickson et Xun (1995). Trois lots de la souche PCP-1 ont été produits : pour un de ces lots, il n'y avait pas d'addition de 3,5-DCP dans le milieu de culture et absence d'activité de déshalogénéation, alors que pour les deux autres lots, du 3,5-DCP était ajouté afin d'induire l'activité de déshalogénéation en position *meta* et *para*. La souche PCP-1 de *Desulfitobacterium frappieri* a d'abord été repiquée deux fois à 48 heures d'intervalle dans des bouteilles sérologiques de 70 mL, en présence ou en absence de 3,5-DCP. Un volume de 25 mL de culture a ensuite été utilisé pour inoculer une bouteille Schott de 1L contenant 450 mL de milieu. Après 24 heures d'incubation à 30°C, le contenu a été utilisé pour inoculer une bouteille en verre de 12 L contenant 8,7 L de milieu. Celle-ci a été incubée 25 heures à 30°C pour favoriser la croissance, puis 15 heures à 22°C afin d'obtenir une meilleure activité de déshalogénéation. Pour les deux

dernières cultures, le pH a été ajusté à 8 avec une solution de KH_2PO_4 , au lieu de 7,5 avec du NaHCO_3 . La croissance de *D. frappieri* entraînant une baisse importante du pH, cette mesure a permis de diminuer la fréquence d'ajustement de celui-ci tout en gardant un bon niveau de contrôle.

Entre chaque passage et durant les périodes d'incubation, des échantillons de la culture ont été prélevés stérilement afin d'évaluer certains paramètres. La pureté de la culture était vérifiée par un examen en microscopie photonique après coloration de Gram (Difco, Détroit, MI). La densité optique à une longueur d'onde de 600 nm était mesurée au spectrophotomètre (SP6-550 UV/VIS, Canlab PYE UNICAM). Le pH des cultures était mesuré avec un pH-mètre (pH meter 125, Corning). Lorsqu'il était inférieur à 7, il était immédiatement réajusté avec une solution de NaHCO_3 saturée. Finalement, la transformation du 3,5-DCP en 3-CP était suivie par analyse au HPLC selon la méthodologie décrite à la section 3.17. Des ajouts de 3,5-DCP (5 mg/L) ont été faits lorsque la quantité initiale était presque toute transformée en 3-CP, soit après 15 et 25 heures d'incubation environ.

3.1.5 Fractionnement cellulaire

La biomasse a été récoltée lorsque la culture a atteint une densité optique de 0,5 à 600 nm, soit environ 40 heures après l'ensemencement. La culture a d'abord été distribuée dans des bouteilles de polycarbonate de 500 mL (Beckman, Palo Alto, CA) pour une centrifugation de 20 min, à 9 000 x g et 4°C (Beckman, Avanti J-25 Centrifuge).

Dans une enceinte anaérobe, les culots ont été resuspendus dans 300 mL de tampon phosphate de potassium anaérobe 0,05 M à pH 7,5 contenant 1 mM de dithiothreitol (DTT) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Le tout a de nouveau été centrifugé à 9 000 x g et 4°C, pendant 15 min cette fois-ci. Les culots obtenus ont ensuite été resuspendus dans 100 mL du même tampon additionné de 1,25 mL d'une solution de phénylméthylsulfonylfluoride (PMSF) (Sigma, ST-Louis, MO) (5 mg de PMSF dissout dans 4,5 mL d'éthanol anhydre et 0,5 mL d'eau).

Afin d'assurer un bris maximal des cellules, ces dernières ont été passées deux fois à la presse de French (5-598A, Aminco, Silver Spring, MA) à une pression de 18 000 psi. Dans le but de minimiser l'entrée d'oxygène, les suspensions cellulaires ont été transvidées dans un flacon Erlenmeyer de 125 mL relié à l'entrée de la presse, ainsi qu'à un ballon contenant le mélange gazeux décrit plus tôt. Un second flacon Erlenmeyer fixé à la sortie de la presse a servi à récolter les lysats cellulaires. Les flacons ont tout simplement été interchangés pour effectuer le second passage à la presse de French.

Dans une enceinte anaérobie, le lysat cellulaire a été transvidé dans des tubes en plastique de 40 mL pour être ensuite centrifugé à 17 000 x g et 4°C pendant 30 min (Beckman, Avanti J-25 Centrifuge). Les surnageants obtenus ont été recueillis et redistribués dans des tubes de polycarbonate de 40 mL, toujours à l'intérieur d'une enceinte anaérobie, puis centrifugés à 161 000 x g et 4°C pendant 90 min (Beckman, L5-65 Ultracentrifuge). Les surnageants obtenus (fraction cytoplasmique) ont été aliquotés dans des bouteilles sérologiques de 70 mL. Les culots (fraction membranaire) ont été resuspendus dans un volume final de 10 mL de tampon phosphate de potassium (0,05 M, pH 7,5) contenant 1 mM de DTT et 20% (v/v) de glycérol (EMScience, Gibbstown, NJ). Ces suspensions ont été distribuées en aliquotes de 1 mL dans des bouteilles sérologiques de 12 mL en borosilicate (Canlab, Pointe-Claire, Qc) fermées hermétiquement avec des bouchons en butyle. Toutes les aliquotes ont été conservées à -80°C.

3.1.6 Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été effectué avec la trousse « Bio-Rad Protein Assay » (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Ce test est basé sur la méthode de Bradford (1976). Les volumes de réactif et de solution protéique ont été diminués de cinquante fois par rapport aux recommandations du fabricant. L'échantillon a été dosé en triplicata après avoir été dilué dans l'eau dix, quinze et vingt fois respectivement. La droite d'étalonnage a été calculée à partir de sept concentrations (0,2 à 0,8 mg/mL) d'albumine sérique bovine (Sigma, St-Louis, MO) solubilisée dans de l'eau déionisée (lors du dosage des

protéines cytoplasmiques) ou dans la solution de solubilisation décrite à la section 3.2.1 diluée dix fois (lors du dosage des protéines membranaires).

3.1.7 Dosage de l'activité de déshalogénéation

Le dosage de l'activité de déshalogénéation en position *meta* a été réalisé à partir de la fraction membranaire décongelée pour chacun des lots. À chaque fois, un prélèvement de 1,1 mL a été solubilisé dans 10 mL d'un tampon de phosphate de potassium 0,05 M pH 8,0 contenant 1 mM de DTT, 20% (v/v) de glycérol et 0,1% (v/v) de Triton X-100.

L'essai enzymatique a été effectué dans un tampon d'activité enzymatique (TAE) anaérobie comprenant 0,1 M de phosphate de potassium pH 7,5, 20% (v/v) de glycérol, 2 mM de citrate de titane, 2 mM de méthyl viologen (Sigma, St-Louis, MO) et 1 mM de 3,5-DCP. La solution de citrate de titane a été préparée à partir d'une solution de chlorure de titane (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) 15% (p/v) et d'une solution de citrate de sodium 0,2 M (J. T. Baker, Phillipsburg, N. J.). Son pH a été ajusté à 7,0 avec une solution saturée en Na_2CO_3 (Fisher Scientific Company, Fair Lawn, N. J.) et elle a été conservée dans une bouteille sérologique en borosilicate à 4°C et à l'obscurité.

Pour effectuer le dosage enzymatique, des bouteilles en borosilicate de 12 mL fermées avec des bouchons en butyle et scellées contenant 1,95 mL de TAE ont été placés dans un bain à 37°C 15 minutes avant l'ajout de 5 µL de suspension membranaire solubilisée. Les bouteilles ont par la suite été incubées pendant 2 h à 37 °C. La réaction enzymatique a alors été arrêtée par l'ajout de 1 mL d'une solution d'acétonitrile (qualité CLHP, Mallinckrodt, Pointe-Claire, Qc) contenant 0,33% (v/v) d'acide acétique (Mallinckrodt, Pointe-Claire, Qc) et les solutions ont été transférées dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL et centrifugées 5 min à 15 000 x g et 20°C (Biofuge A, Canlab, Pointe-Claire, Qc). Les surnageants ont été recueillis et transférés dans des bouteilles de 1 mL pour injecteur automatique, afin d'analyser leur contenu en chlorophénols par CLHP (section 3.1.8). Tous les dosages ont été effectués en duplicata.

3.1.8 Analyse des chlorophénols par chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

Le CLHP (modèle 600) était couplé à un spectrophotomètre (modèle 486) et à un injecteur automatique (modèle 717 Plus) (Waters, Mississauga, Ont.). Le système était contrôlé par le logiciel Millenium 32, installé sur un ordinateur Digital Celebris (modèle 590). La colonne utilisée était une NovaPak C₁₈ (3,9 x 150 mm).

Deux phases mobiles ont été utilisées pour créer le gradient nécessaire à la séparation des chlorophénols sur la colonne. La phase mobile A, composée d'eau déionisée et d'acide acétique 0,1% (v/v) a été filtrée sur filtre Gelman FP-450 (FP-vericel pour CLHP) 0,45 µm. La phase mobile B, composée d'acétonitrile et d'acide acétique 0,1% (v/v) a été filtrée sur filtre Gelman Nylaflo 0,2 µm. Les deux phases ont été barbotées avec de l'hélium (Médigas, St-Laurent, Qc) pendant 15 min.

Le programme appliqué était le suivant: la colonne était équilibrée pendant 5 min avec un mélange de 70% et 30% des phases mobiles A et B, respectivement. Pendant les 4 minutes suivant l'injection de l'échantillon, la concentration de la phase mobile B augmentait de 25% de façon linéaire. Les concentrations étaient alors maintenues pendant 10 min, après quoi les conditions initiales étaient restaurées en 3 min par un gradient concave afin de rééquilibrer la colonne. Un débit de 2 mL/min a été maintenu pendant toute la durée du programme. Les mesures d'absorbance ont été prises à une longueur d'onde de 220 nm.

3.2 Électrophorèse en deux dimensions

3.2.1 Solubilisation des protéines membranaires

Les protéines membranaires ont été solubilisées dans une solution contenant : de l'urée 9 M, du CHAPS 5% (p/v), du Tris 0,48% (p/v) et du DTT 0,4% (p/v). Cette

solution a été conservée à -20°C sans DTT et agitée après chaque décongélation afin de resolubiliser l'urée. Des volumes de fraction membranaires variant entre 5 et 35 μL ont été ajoutés à la solution de solubilisation pour donner un volume final de 210 μL . Le tout a été agité brièvement avant d'être mis en agitation douce pendant 1 h à la température de la pièce. Par la suite, les solutions ont été centrifugées 10 min à $13\,000 \times g$ et 20°C (Biofuge A, Canlab, Pointe-Claire, Qc).

Tout comme les protéines provenant de la fraction membranaire, la déshalogénase II purifiée (57 kDa) (laboratoire de Réjean Beaudet, INRS-IAF) a été solubilisée selon la méthode décrite ci-dessus. Un volume de 120 μL de la déshalogénase purifiée (0,1 mg/ml) a été ajouté à 90 μL de tampon de solubilisation, pour donner un volume final de 210 μL .

3.2.2 Isofocalisation

L'isofocalisation est l'étape au cours de laquelle les protéines ont été séparées selon leur pI sur des bandes d'acrylamide de 18 cm ayant un gradient de pH linéaire et immobilisé. Plusieurs gradients de pH ont été utilisés (3.0-10.0, 4.0-7.0, 3.5-4.5, 4.0-5.0, 4.5-5.5, 5.0-6.0, 5.5-6.7, 6.0-9.0 et 6.0-11.0) car l'isofocalisation dans différents gradients peut faire varier les patrons protéiques et ainsi permettre la visualisation de certaines protéines qui autrement seraient masquées ou difficilement visibles. Ces bandes sont disponibles commercialement sous forme déshydratée (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède). Préalablement à l'isofocalisation, elles ont dû être réhydratées dans un tampon contenant les protéines.

Les protéines membranaires solubilisées et les protéines cytoplasmiques ont été placées dans un tampon de réhydratation constitué d'urée 9 M, de CHAPS 5% (p/v), de quelques grains de bleu de bromophénol (Fisher Scientific Company, Fair Lawn, N.J.) et d'un tampon contenant un mélange d'ampholytes transporteurs ayant une plage linéaire de pH appropriée (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suède). Le tampon de réhydratation était conservé à -20°C sans le mélange d'ampholytes et était

brièvement agité avant utilisation afin de resolubiliser l'urée. La concentration du mélange d'ampholytes était de 2% (v/v) pour les protéines cytoplasmiques et 3% (v/v) pour les protéines membranaire et la déshalogénase II purifiée. Les bandes de gradient de pH devaient être réhydratées avec un volume de 350 μ L. Dans le cas des protéines membranaires et de la déshalogénase II purifiée, ce volume était composé de : 168,7 μ L de tampon de réhydratation, 11,1 μ L de mélange d'ampholytes, et 190,2 μ L de protéines solubilisées selon la méthode décrite à la section 3.2.1. Dans le cas des protéines cytoplasmiques, ce volume était constitué de: tampon de réhydratation, 5 à 35 μ L de protéines et 7,4 μ L du mélange d'ampholytes. Le tout a été agité brièvement avec un agitateur Vortex et a été mis en agitation douce pendant 1 h à la température de la pièce. Les solutions ont ensuite été centrifugées 10 min à 13 000 x g et 20°C (Biofuge A, Canlab, Pointe-Claire, Qc).

Les solutions de protéines dans le tampon d'équilibration ont été prélevées en prenant soin de laisser les culots puis elles ont été déposées sur la section centrale du contenant pour les bandes (Strip holder, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède). Pour que le contact entre le gel et le liquide soit optimal, les bandes ont été déposées en les tenant par les deux extrémités, de telle sorte que le centre des bandes touche d'abord la solution. Les extrémités étaient ensuite rabattues délicatement pour que le liquide couvre l'ensemble du gel par capillarité. L'extrémité acide de la bande était orientée vers le côté pointu du contenant. Les bandes ont par la suite été recouvertes d'environ 1,5 mL d'huile minérale, puis le couvercle a été remis sur le contenant. Le contenant était ensuite déposé sur le «IPGphor Isoelectric Focusing System» (Pharmacia Biotech, Suède) de façon à ce que le côté acide des bandes soit vis-à-vis l'anode. L'appareil effectuait alors le programme suivant, à raison de 100 μ g par bande:

Étape	Voltage (V)	V*h	Durée (h)
Réhydratation	0	0	12
1	500	500	1
2	3500	3 500	1
3	8000	104 000	13

Lorsque l'isofocalisation était terminée, les bandes étaient immédiatement mises à équilibrer, ou encore conservées à -80°C .

3.2.3 Équilibration

Après l'isofocalisation, les bandes ont été mises en agitation (Clinical Rotator, Fisher, Etats-Unis) dans un tampon d'équilibration, afin de réduire et charger négativement les protéines. Les bandes ont été équilibrées dans 15 mL de tampon contenu dans des tubes de 21 cm avec un étranglement à 6 cm du fond et fermé avec un bouchon de caoutchouc (bouchon # 3, Fisher Scientifique). La solution stock de tampon était composée de glycérol 3% (p/v), d'urée 6 M, de tampon Tris HCl (1,5 M; pH 8,8) 33% (v/v), de SDS 4% (p/v) et de quelques grains de bleu de bromophénol. Cette solution mère a été conservée à 4°C pour une période maximale de deux semaines. Lors de la première équilibration de 15 min, 1% (p/v) de DTT (p/v) était ajouté pour réduire les protéines. Lors de la seconde équilibration, le DTT a été substitué par 2,5% (p/v) d'iodoacétamide (Sigma, St-Louis, MO) afin d'alkyler les groupements thiol sur les protéines et ainsi prévenir leur réoxydation.

3.2.4 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Après l'équilibration, les protéines contenues dans les bandes ont été séparées en fonction de leur masse moléculaire. Toutes les électrophorèses ont été effectuées sur des gels de polyacrylamide 12% (p/v) de $1,5 \times 195 \times 200$ mm contenant 0,1% (p/v) de SDS et 0,375 M de Tris-HCl à pH 8,8. Ces gels ont été préparés selon la méthode de Bio-Rad: Reagent and Gel Preparation for Laemmli SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Bio-Rad Laboratories, CA, Etats-Unis; Laemmli, 1970). Aucune préparation n'a été dégazée avant l'ajout du N,N,N',N'-Tétra-méthyl-éthylènediamine (TEMED) (qualité pour l'électrophorèse, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Afin d'égaliser les gels et de les maintenir anoxiques, ils ont été recouverts de butan-1-ol (J.T. Baker, Phillipsburg, N.J.) saturé en eau après avoir été coulés dans la cassette. La polymérisation des gels

complétée, ceux-ci ont été nettoyés avec de l'eau déionisée. Après avoir été rincée à l'eau déionisée, la bande est déposée sur le dessus du gel. Des étalons de faible masse moléculaire (Bio-Rad, Hercules, CA) ont été déposés sur un papier buvard de 2 x 4 mm (IEF electrode strip, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède), placé à côté de l'extrémité acide de la bande.

Les gels ont par la suite été soumis à 20 V pendant 1 h, puis 100 V pendant 18 h à environ 13 °C dans le tampon de migration suivant: 25 mM de Tris-HCl pH 8,8, 192 mM de glycine (qualité pour électrophorèse, BioRad Laboratories, Richmond, CA) et 0,1% (p/v) de SDS.

3.2.5 Coloration des protéines

Tous les gels ont été colorés au nitrate d'argent, selon une méthode inspirée de Pappin et Perkins (1999). Chaque étape a été effectuée sous agitation (Clinical Rotator, Fisher, Etats-Unis) dans 500 mL de solution.

Afin de fixer les protéines dans les gels, ces derniers ont été placés pendant 1 h en présence d'une solution de 50% (v/v) de méthanol (alcool de commerce du Québec, Ville St-Laurent, Qc) et 5% (v/v) d'acide acétique glacial (Anachemia, N.J.). Par la suite, les gels ont été agités pendant 10 min dans une solution de méthanol à 50% (v/v), avant d'être lavés deux fois dans de l'eau déionisée pendant 10 min. Les gels ont ensuite été agités pendant 1 min en présence de 0,02% (p/v) de thiosulfate de sodium (J.T. Baker Chemical Co. Phillipsburg, N.J.) avant d'être rincés deux autres fois pendant 1 min avec de l'eau déionisée. La coloration proprement dite s'effectuait pendant 20 min en présence de 0,2% (p/v) de nitrate d'argent (AR BHD, Toronto, Ont.). À la fin de cette période, les gels ont de nouveau été lavés deux fois pendant 1 min avec de l'eau déionisée. Le développement était effectué dans une solution de carbonate de sodium 0,2% (p/v) (Fisher Scientifique Co., Fair Lawn, N.J.) additionnée de formaldéhyde 0,1% (v/v) (BDH, Etats-Unis) Lorsque cette solution était déposée sur les gels, un précipité était immédiatement formé. La solution était alors remplacée par une nouvelle. Une fois la

coloration désirée atteinte, le développement a été arrêté avec une solution d'acide acétique 5% (v/v). Cette solution d'arrêt de la coloration provient du protocole de Blum, Beier et Gross (1987). Afin de comparer les gels faits à partir des fractions provenant des lots induits et non-induits pour la déshalogénation réductrice en position *meta* et *para*, ceux-ci ont été colorés en parallèle.

3.2.6 Conservation des gels

Après la coloration, une digitalisation de l'image de certains gels a été exécutée en format TIFF à 300 ppp. Certains gels ont été séchés par la suite entre deux films de 25,5 x 28 cm (Gel drying film, Promega, Madison, WI) selon les recommandations du fabricant. D'autres gels ont été conservés à 4 °C dans la solution d'arrêt de la coloration décrite à la section 3.2.5.

3.2.7 Analyse des gels

Les gels d'électrophorèse 2D préparés à partir des fractions membranaires et cytoplasmiques des lots induits et non-induits pour la déshalogénation réductrice en position *meta* et *para*, ont été comparés visuellement entre eux afin de déterminer quelles taches correspondaient aux protéines induites ou réprimées. Les électrophorèses 2D de la déshalogénase II purifiée ont permis de situer cette dernière dans les gels effectués à partir de fractions membranaires et cytoplasmiques.

Pour chaque tache dans les gels correspondant à la déshalogénase II purifiée ou à des protéines induites ou réprimées, le point isoélectrique et la masse moléculaire ont été mesurés en triplicata. Ce sont les valeurs moyennes des triplicatas des points isoélectriques et des masses moléculaires qui ont été retenues pour chacune des protéines d'intérêt. La formule suivante a été utilisée pour déterminer les points isoélectriques:

$$[x (y - z) / 18] + z = pI$$

x = distance (horizontale) en cm entre l'extrémité acide du gel et l'endroit où se situe la tache d'intérêt
y = valeur du pH à l'extrémité basique de la bande de gradient de pH utilisée
z = valeur du pH à l'extrémité acide de la bande de gradient de pH utilisée
pI = point isoélectrique

La masse moléculaire de la déshalogénase II, ainsi que celle des protéines induites et réprimées lors de la déshalogénation réductrice ont été déterminées à partir d'une courbe d'étalonnage. Il s'agit de la courbe de la distance parcourue en centimètres en fonction de la masse des étalons. L'équation de la courbe a été déterminée à l'aide du logiciel Excel pour Office 2000 et a pris la forme d'une polynomiale de troisième ordre. La masse moléculaire de chaque protéine sur un gel a été approximée à partir de cette équation et de la distance parcourue dans le gel.

Les taches d'intérêt ainsi que des sections de gels exempts de protéine (témoins) ont été prélevés à l'aide d'un scalpel. Ces échantillons ont été conservés à -80°C dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL.

3.3 Analyse en spectrométrie de masse

Chaque protéine d'intérêt, de même que des échantillons de gel exempts de protéines, ont été digérés à la trypsine. Les peptides ainsi obtenus ont été extraits des gels, puis purifiés pour ensuite être analysés en spectrométrie de masse.

3.3.1 Digestion des protéines à même le gel

Les morceaux de gel ont d'abord été lavés pendant 1 h dans un tube Eppendorf de 1,5 mL contenant 500 μL d'une solution de NH_4HCO_3 (Fisher Chemicals, Fair Lawn, N.J.) 100 mM, à raison d'un morceau par Eppendorf. Par la suite, cette solution a été substituée par 150 μL de la même solution additionnée de 10 μL d'une solution de DTT 45 mM, afin de réduire à nouveau les protéines. Les tubes ont été incubés dans un bain à 60°C pendant 30 min. Le mélange a ensuite été ramené à la température de la pièce, et

10 μL d'une solution d'iodoacétamide 100 mM ont été ajoutés. Après une incubation de 30 min à l'obscurité, la solution a été jetée et les morceaux de gel ont été agités vigoureusement pendant 1 h en présence de 1 mL d'une solution contenant 50% (v/v) d'acétonitrile (qualité pour CLHP, EM Science, Gibbstown, N.J.) et 50% (v/v) de NH_4HCO_3 100 mM. Par la suite, chaque morceau de gel a été coupé en plus petits morceaux d'environ 1 mm^3 à l'aide d'un scalpel. Ces dernières ont été transférées dans un tube Eppendorf de 500 μL contenant 50 μL d'acétonitrile, afin d'amorcer la déshydratation des gels. Après 15 min l'excédent d'acétonitrile a été retiré à l'aide d'une pipette pasteur, puis la déshydratation a été complétée à l'aide d'un évaporateur à vide. Cet évaporateur était composé de trois pièces: la trappe de condensation réfrigérée (Savant Instrument Inc., Farmingdale, N.Y.), la centrifugeuse de marque SpeedVac (modèle SVC 100H, Savant Instrument Inc., Farmingdale, N.Y.) et la pompe (Cenco-Magavac Vacuum Pump, Central Scientific Co., Chicago, Etats-Unis). Les morceaux de gel ont ensuite été réhydratés dans 20 μL (ou jusqu'à ce que les morceaux soient recouverts) d'une solution de NH_4HCO_3 25 mM additionnée de 2 μL de trypsine porcine 0,1 g/L (qualité pour le séquençage, Promega, Madison, WI). La trypsine avait préalablement été solubilisée selon les recommandations du manufacturier dans une solution d'acide acétique 50 mM. Après 15 min d'incubation à la température de la pièce, 20 à 30 μL de NH_4HCO_3 25 mM ont été ajoutés afin de préserver l'humidité des morceaux de gels pour l'incubation qui durait toute la nuit dans un bain à 37 °C. Le lendemain, les surnageants correspondant aux peptides d'une même protéine ont été prélevés et rassemblés dans un même tube Eppendorf de 1,5 mL. Afin de maximiser la récupération des peptides, deux autres extractions ont été effectuées en présence d'acétonitrile 60% (v/v) et d'acide trifluoroacétique (TFA) 0,1% (v/v) Fisher Chemical, Fair lawn, N.J.) pendant 30 min dans un bain à 37 °C. Après chaque extraction, le surnageant est récupéré et déposé dans l'Eppendorf de 1,5 mL contenant déjà des produits de digestion de la même protéine. Les échantillons ont finalement été asséchés complètement à l'évaporateur à vide, puis conservés à -80°C ou immédiatement purifiés selon la méthode décrite à la section 3.3.2

3.3.2 Purification des peptides

Les peptides ont été purifiés sur des mini-colonnes (ZipTip C₁₈, Millipore Corporation, Bedford, MA) qui sont insérées dans des embouts de pipette de 20 µL. Les instruments de verre utilisés pour préparer les solutions nécessaires à la purification ont été lavés de façon successive avec de l'eau déionisée, du méthanol, de l'acétone et de l'hexane. Les tubes et embouts utilisés lors de la purification ont préalablement été siliconisés. Toutes les solutions, à l'exception de la solution mère de TFA 20% (v/v), ont été filtrées à l'aide d'une seringue sur un filtre de 0,2 µm. Les solutions contenant du TFA 0,1 à 1% (v/v) ont été préparées à partir de la solution mère de TFA. Toute entrée d'air dans la colonne a été évitée lors de la purification.

Les produits de digestion ont été resuspendus dans 20 µL d'une solution de TFA 1% (v/v). Les colonnes ont été humectées en pipettant cinq fois 10 µL d'une solution d'acétonitrile 50% (v/v). Par la suite, les colonnes ont été équilibrées en pipettant cinq fois une solution de TFA 0,1% (v/v). Les solutions peptidiques acidifiées ont ensuite été déposées sur les colonnes où elles ont été aspirées et rejetées dix fois afin d'y fixer les peptides. Les colonnes ont ensuite été lavées des sels en pipettant vingt fois la solution de TFA 0,1% (v/v). Finalement, les peptides ont été élués dans cinq tubes Eppendorfs de 500 µL contenant 3 µL d'une solution de méthanol 50% (v/v) et acide acétique 0,1% (v/v). La solution a été aspirée et rejetée huit fois dans chacun des cinq tubes, afin d'optimiser la récupération des peptides. Les échantillons ont été dégazés par sonification pendant 5 min puis ont été centrifugés 30 sec à 13 000 x g et 20°C (Biofuge A, Canlab, Pointe-Claire, Qc).

3.3.3 Spectrométrie de masse

L'appareil utilisé était un spectromètre de masse à triple quadripôle (Quatro II, Micromass) et l'acquisition des données a été effectuée sous le contrôle du logiciel MassLynx version 3.3 de Micromass. Les échantillons ont été prélevés à l'aide d'une seringue de 10 µL (Hamilton), puis transférés dans un capillaire de verre plaqué d'or

(type D, Micromass). Ce dernier a été installé sur une interface Z-SprayTM. Le gaz de collision utilisé était l'argon (Médigas, St-Laurent, Qc) et l'azote (Médigas, St-Laurent, Qc) était employé pour assécher l'échantillon.

Seuls les pics doublement ou triplement chargés ne se retrouvant pas dans le témoin (produit de digestion d'un gel exempt de protéine) ont été analysés en SM/SM. Les voltages appliqués sur le capillaire et le cône ont été ajustés pour chaque peptide afin d'optimiser le signal. Au moins trois acquisitions avec trois énergies de collision différentes, variant selon les peptides, ont été effectuées.

3.3.4 Analyse spectrale

L'analyse en spectrométrie de masse a permis d'obtenir deux types de spectres: les spectres SM, et les spectres SM/SM. Sur les spectres SM, les pics correspondent aux différents peptides d'une protéine. C'est à partir de ces spectres qu'il est possible de déterminer la charge (z) et la masse (m) en Dalton d'un peptide. Sur les spectres SM/SM, les pics correspondent aux fragments d'un peptide après que celui-ci soit passé par la cellule de collision. C'est à partir de ces spectres qu'il est possible de déterminer une partie de la séquence d'un peptide. Dans les deux cas, la lecture du spectre se fait comme suit: sur l'abscisse est indiquée la masse divisée par la charge (m/z), et sur l'ordonnée est indiquée l'intensité du signal.

Les spectres SM étaient analysés en premier afin d'identifier la charge et la masse des peptides. La charge a été déterminée à partir de la différence de m/z entre les ions pseudo-moléculaires et les ions isotopiques de ces peptides. Le carbone constitue un élément important de la protéine. Dans la nature, ce dernier se retrouve principalement sous deux formes isotopiques, la première étant plus abondante que l'autre: C^{12} (six protons et six neutrons) et C^{13} (six protons et sept neutrons). L'ion pseudo-moléculaire n'est constitué que de la première forme isotopique, alors que les ions isotopiques possèdent un ou plusieurs carbones sous la deuxième forme isotopique. Il en résulte que la différence de masse entre l'ion pseudo-moléculaire et l'ion isotopique ne contenant

qu'un seul carbone sous la deuxième forme isotopique, ainsi que la différence de masse entre chacun des ions isotopiques, est de 1 Da étant donné la différence de 1 neutron. Sur un spectre de masse où l'abscisse représente les valeurs de m/z , la différence de m/z entre chacun de ces ions est égale à $1/z$ selon l'équation suivante: $[\Delta(m/z) = 1/z]$. Ainsi, on peut déduire que les ions sont doublement chargés lorsque la différence de m/z entre chacun d'eux est de 0,5. De même, on peut conclure que les ions sont triplement chargés si la différence de m/z est égale à 0,33. Après avoir déterminé la charge d'un peptide, il est possible de trouver sa masse. Pour ce faire, la valeur de m/z fournie par le spectre doit être multipliée par la charge ($m/z * z = m$). Afin de connaître la masse du peptide non-chargé, il ne reste plus qu'à soustraire autant de Daltons qu'il y a de charges sur le peptide, chaque charge résultant de l'addition d'un proton (H^+) dont la masse est de 1 Da. Les pics se trouvant à la fois dans les spectres témoins SM et dans les spectres SM des produits de digestion des protéines d'intérêt n'ont pas été considérés comme des peptides appartenant aux protéines d'intérêt.

Le séquençage des peptides a été effectué à partir des spectres SM/SM et avec l'aide du logiciel Biolynx version 3.4. Les spectres SM/SM ont tout d'abord subi un traitement qui consistait à soustraire le bruit de fond, arrondir la courbe et finalement centrer les pics. La carboxyaminométhylcystéine et la méthioninesulfoxide ont été retenues comme modifications lors de l'analyse des séquences. Pour s'assurer de la valeur des pics sélectionnés par le logiciel, trois acquisitions en SM/SM d'un même peptide ont été comparées. L'erreur tolérée par le logiciel Biolynx sur l'ion pseudo-moléculaire était de 0,5 Da par rapport à la valeur monoisotopique théorique, et de 0,5 m/z par rapport à la valeur monoisotopique théorique du fragment ionique. Les erreurs tolérées ont augmenté respectivement à 1 Da et 1 m/z lors de l'analyse en absence du logiciel. Au cours de l'analyse dite en absence de logiciel, les différences de m/z entre les pics centrés ont été calculées à la main. C'est l'analyste, et non Biolynx, qui a eu le dernier mot en ce qui concerne la détermination de la séquence finale à partir des spectres en SM/SM, le logiciel n'étant utilisé que comme support à l'analyse.

Les séquences peptidiques trouvées lors de l'analyse en SM/SM ont été utilisées pour identifier la séquence complète des protéines d'intérêt parmi les séquences préliminaires de *Desulfotobacterium hafniense* obtenues sur le site Internet du Doe Joint Genome Institute (http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/desha/desha.home.html). Ce site donne accès à un logiciel de type Standard protein-protein BLAST [blastp] (NCBI) permettant de comparer une séquence peptidique donnée à l'ensemble des séquences déjà répertoriées chez *D. hafniense*. Ce logiciel fournit également de l'information concernant la nature et la masse de la protéine, ainsi que la taille et l'emplacement de son gène dans le génome de *D. hafniense*. Un minimum de trois peptides séquencés en spectrométrie de masse devaient se retrouver, au moins en partie, dans la même séquence protéique de *D. hafniense* pour que cette dernière soit considérée comme étant la bonne.

Afin d'en confirmer la validité, les séquences protéiques trouvées provenant de *D. hafniense* ont été digérées théoriquement à la trypsine de haute spécificité avec le logiciel MassLynx. Les résultats donnaient la masse, ainsi que la valeur de m/z qui devaient être retrouvée pour chacun des peptides, que ces derniers soient chargés 1, 2, 3 ou 4 fois. Le logiciel tenait compte d'une oxydation possible des méthionines et du traitement des cystéines à l'iodoacétamide. En tenant compte d'une marge d'erreur de 0,5 Da, au moins quatre des masses théoriques devaient concorder avec les masses retrouvées lors de l'analyse en spectrométrie de masse pour que les séquences protéiques de *D. hafniense* soient retenues comme étant les séquences potentielles d'une protéine d'intérêt chez *D. frappieri*.

4 Résultats

4.1 Activité de déshalogénation des différents lots produits

Afin d'identifier les protéines induites et réprimées au cours de la déshalogénation réductrice en position *meta* du 3,5-DCP chez *D. frappieri* PCP-1, trois lots différents de préparations membranaires et cytoplasmiques ont été produits. Un de ces lots a été préparé en absence d'inducteur (3,5-DCP) dans les cultures de telle sorte qu'il n'y ait aucune activité de déshalogénation, contrairement aux deux autres lots pour lesquels la présence de l'inducteur devait générer une activité de déshalogénation réductrice. L'activité enzymatique des préparations membranaires obtenues de chacun des lots a été dosée en utilisant le 3,5-DCP comme substrat après solubilisation des protéines dans le tampon de solubilisation. Comme prévu, le lot non-induit ne présentait aucune activité de déshalogénation, alors que les deux lots induits présentaient une activité de déshalogénation de l'ordre de 31 nmole/min/mg.

4.2 Analyse des gels après électrophorèse en deux dimensions

4.2.1 Point isoélectrique et masse moléculaire de la déshalogénase II purifiée de *D. frappieri*

La migration de la déshalogénase II purifiée après électrophorèse en deux dimensions a révélé que cette protéine se présente sous cinq isoformes (A, B, C, D et E) ayant les points isoélectriques suivants: 5,5, 5,6, 5,7, 5,8 et 5,9. Leur masse moléculaire est évaluée à 57 kDa sur gel SDS-PAGE (**figure 8**). La quantité des ces isoformes n'étant pas suffisante pour les analyser séparément en spectrométrie de masse, il a fallu les regrouper. L'analyse a donc été effectuée à partir de la bande obtenue par gel SDS-PAGE. Ainsi, le spectre de masse de la déshalogénase II purifiée correspond aux cinq isoformes confondus. Les résultats obtenus se retrouvent à la section 4.3.1.

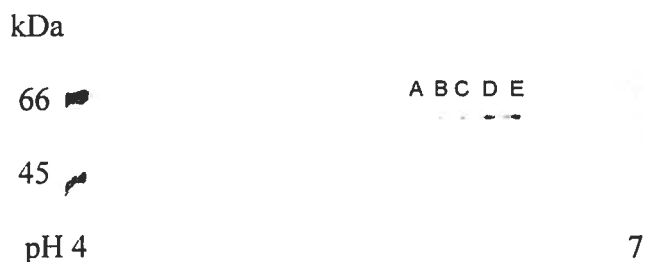


Figure 8: Isoformes A, B, C, D et E de la déshalogénase II purifiée et séparée par électrophorèse 2D sur un gradient de pH allant de 4 à 7.

4.2.2 Analyse des fractions cytoplasmique et membranaire après électrophorèse 2D

Pour chacune des fractions, des électrophorèses en deux dimensions ont été effectuées sur différents gradients de pH. De larges spectres de pH (3.0-10.0, 4.0-7.0, 6.0-9.0 et 6.0-11.0) ont d'abord été utilisés afin d'avoir une vue d'ensemble des protéomes. Comme le pI de la majorité des protéines visibles sur gel se situait entre 3.5 et 7.0, des spectres de pH plus étroits (3.5-4.5, 4.0-5.0, 4.5-5.5, 5.0-6.0 et 5.5-6.7) ont ensuite été utilisés afin d'obtenir une meilleure résolution. Plusieurs concentrations de protéines ont également été testées et il s'est avéré qu'une quantité de 800 µg par gel permettait de visualiser le plus grand nombre de protéines sans surcharger le gel. C'est donc cette quantité de protéines qui a été utilisée dans la majorité des cas.

4.2.2.1 Fraction cytoplasmique

L'analyse des gels obtenus après électrophorèse en deux dimensions d'aliquotes de fractions cytoplasmiques a révélé la présence d'une bande correspondant à la déshalogénase II dans les fractions induites pour la déshalogénéation en position *meta* du 3,5-DCP. L'enzyme n'y est présente que sous un seul isoforme ayant un point isoélectrique de 5,8, ce qui correspond à l'isoforme D de la déshalogénase II purifiée, et une masse moléculaire toujours évaluée à 57 kDa sur SDS-PAGE (**figure 9B**). La confirmation que cette tache était bien la déshalogénase II a été faite par les analyses en

spectrométrie de masse après digestion tryptique (voir section 4.3.1). Aucune tache correspondant à la déshalogénase II n'a été retrouvée dans la fraction non-induite.

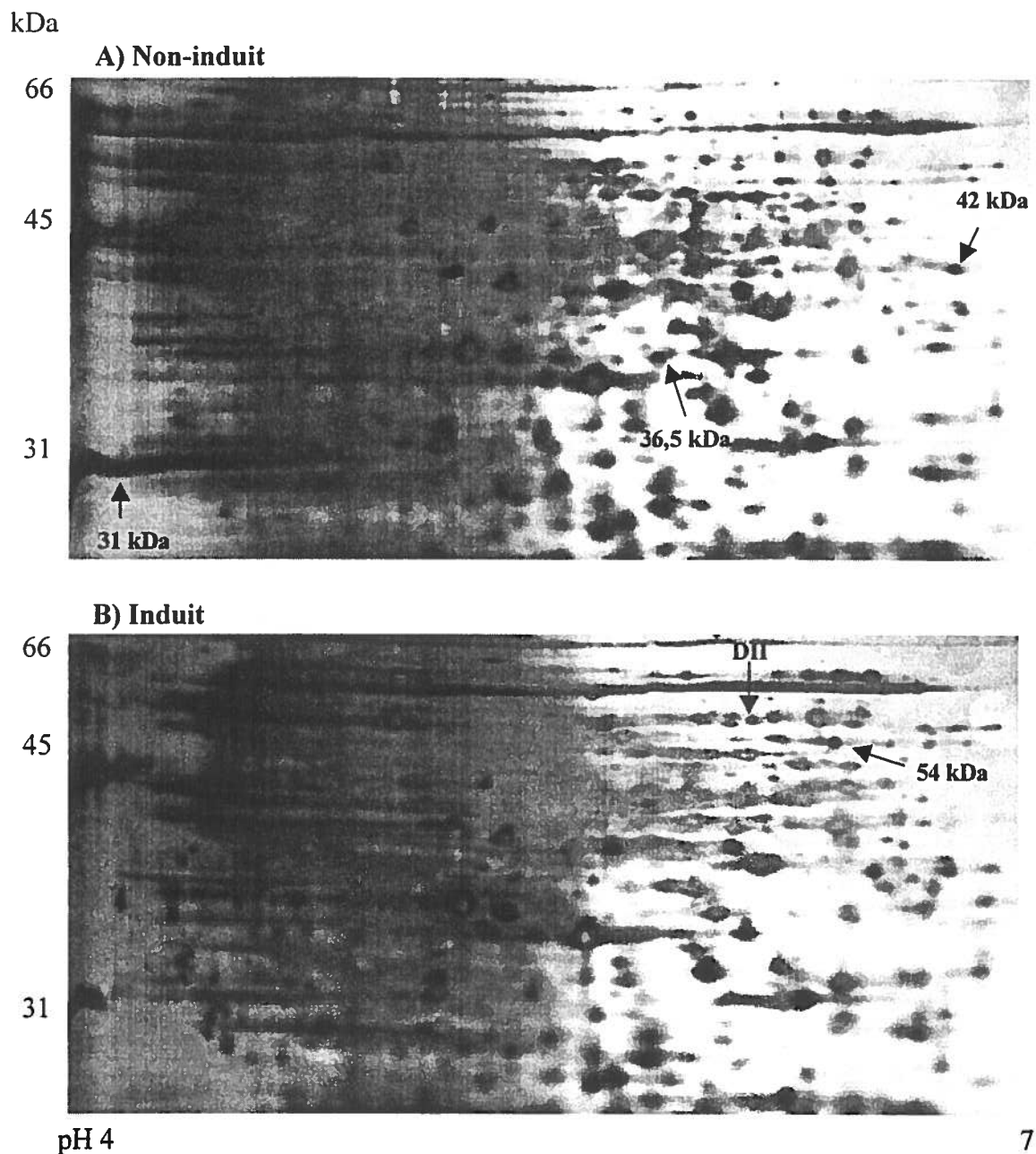


Figure 9: Protéines cytoplasmiques (800 µg) provenant de lots induit et non-induit pour la déshalogénation du 3,5-DCP en position *meta*, séparées par électrophorèse 2D sur un gradient de pH allant de 4 à 7. A) Lot non-induit au 3,5-DCP ; B) Lot induit au 3,5-DCP.

L'induction d'une autre protéine a pu être observée dans les cultures induites pour la déshalogénation du 3,5-DCP. Cette dernière ne se présente que sous une seule forme dont la masse moléculaire a été évaluée à 54 kDa par SDS-PAGE, et dont le pI est de 6,1. De plus, la comparaison des gels a permis de découvrir trois protéines réprimées qui se retrouvent également sous une seule forme et dont les masses moléculaires ont été évaluées à 31, 36,5 et 42 kDa, toujours par SDS-PAGE. Elles ont un pI de 4,4, 5,6 et 6,4, respectivement (**figure 9A**).

4.2.2.2 Analyse des fractions membranaires après électrophorèse en deux dimensions

L'analyse des gels obtenus après électrophorèse en deux dimensions a permis de démontrer la présence de la déshalogénase II dans la fraction membranaire des lots induits au 3,5-DCP. Cette dernière y est présente sous deux isoformes ayant 5,5 et 5,6 de pI, ce qui correspond aux isoformes A et B de l'enzyme purifiée, et une masse moléculaire toujours évaluée à 57 kDa (**figure 10**). Aucune tache correspondant à la déshalogénase II n'a été retrouvée dans la fraction membranaire du lot non-induit.

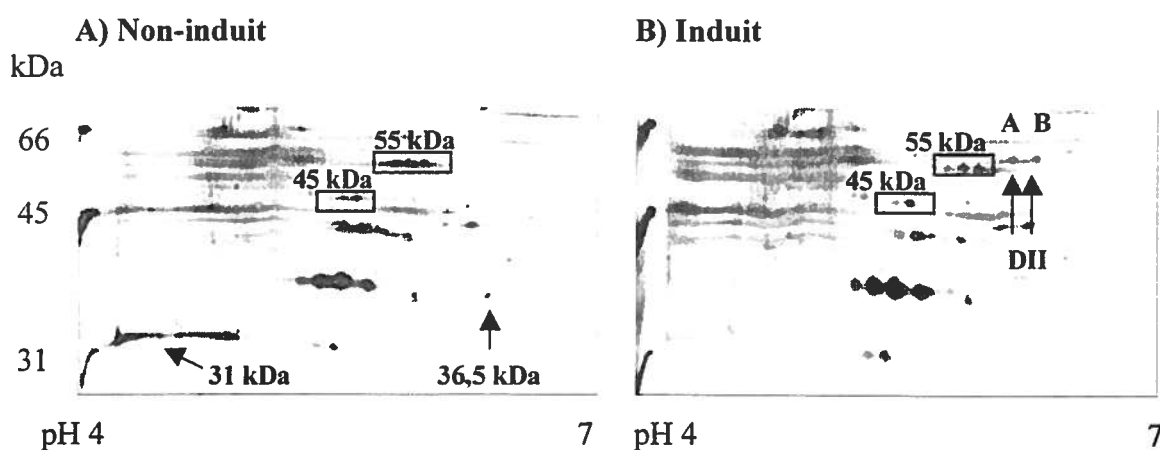


Figure 10: Protéines membranaires (800 µg) provenant de lots induit et non-induit pour la déshalogénation du 3,5-DCP en position *meta*, séparées par électrophorèse 2D sur un gradient de pH allant de 4 à 7. A) Lot non-induit au 3,5-DCP ; B) Lot induit au 3,5-DCP.

L'induction de deux autres protéines a pu être observée lors de la comparaison des gels de fractions membranaires. La masse moléculaire de ces protéines a été évaluée à 53 et 42,5 kDa sur gel SDS-PAGE. Alors que les valeurs de pI sont de 5,9, 6,0 et 6,1 pour la protéine de 53 kDa, elles sont de 5,8 et 5,9 pour la protéine de 42,5 kDa (**figure 11**). La comparaison des gels de fractions membranaires a également permis d'observer la répression des protéines de 31 et 36,5 kDa mentionnées plus haut, avec exactement les mêmes points isoélectriques (**figure 10**).

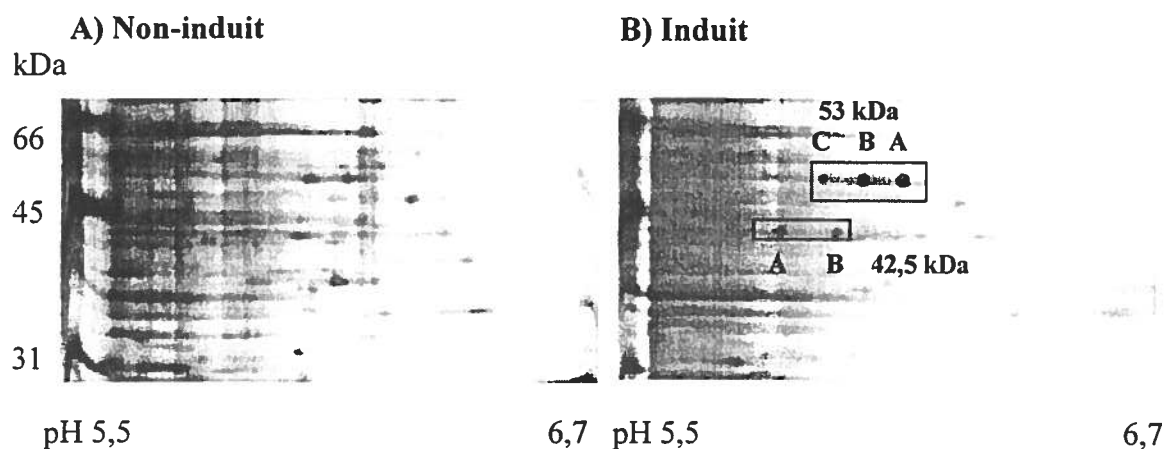


Figure 11: Protéines membranaires (800 µg) provenant de lots induit et non-induit pour la déshalogénéation du 3,5-DCP en position *meta*, séparées par électrophorèse 2D sur un gradient de pH allant de 5,5 à 6,7. A) Lot non-induit au 3,5-DCP ; B) Lot induit au 3,5-DCP.

4.2.2.3 Comparaison avec les résultats obtenus par Pagé-Bélanger (2002) dans le cadre de l'étude protéomique de *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 lors de l'induction pour la déshalogénéation réductrice en position *ortho* du 2,4,6-TCP.

En 2002, Pagé-Bélanger avait observé l'induction d'une protéine membranaire de 15 kDa et la répression de deux protéines membranaires de 55 et 45 kDa au cours d'une étude protéomique de *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 lors de l'induction de la déshalogénéation réductrice en position *ortho* du 2,4,6-TCP. Ces phénomènes n'ont pas pu être observés en présence de 3,5-DCP. On retrouve les protéines de 55 et 45 kDa autant dans la fraction induite que non-induite au 3,5-DCP (**figure10**), et aucune protéine de 15 kDa n'a été identifiée comme étant induite par le 3,5-DCP.

4.3 Identification des protéines d'intérêt par spectrométrie de masse

4.3.1 La protéine 57 kDa – déshalogénase II

Les produits de digestion tryptique de la déshalogénase II purifiée ont été analysés en spectrométrie de masse, tous isoformes confondus (A, B, C, D et E). Le profil peptidique (**figure 12** et **tableau 4**) ainsi que les séquences obtenues (**tableau 4** et annexe A) ont permis de remonter jusqu'au gène 192 du contig 2977 du génome partiel de *D. hafniense* (site Internet du Doe Joint Genome Institute (JGI)). Des six séquences peptidiques identifiées en SM/SM pour la déshalogénase II, cinq se retrouvent intégralement dans le produit de ce gène. Pour ce qui est de l'autre séquence, soit EYF(I,L)TDP, l'acide aminé identifié comme étant une leucine ou une isoleucine est remplacé par une proline chez *D. hafniense* (**tableau 4**). La masse moléculaire et le pI théoriques de la séquence déduite du gène 192 sont respectivement de 61 kDa et 7,41. Il y a donc une différence d'environ 4 kDa entre la déshalogénase II et cette protéine. Le profil peptidique obtenu par SM pour la déshalogénase II couvre toutefois 30% de la séquence théorique correspondant au produit du gène retrouvé chez *D. hafniense* (**figure 13**).

La comparaison entre la séquence protéique de 61 kDa et les protéines des banques de données révèle que l'enzyme est similaire à plusieurs déshalogénases réductrices PceA/CprA. Les plus hauts pourcentages d'identité (64%) et de similarité (74%) ont été obtenus avec les déshalogénases PCE réductrices de *Dehalobacter restrictus*, *Desulfitobacterium frappieri* TCE-1 et *Desulfitobacterium* sp. Y51. Une analyse plus approfondie de la séquence révèle que la protéine de 61 kDa contient le motif TAT (RRXFXK) à l'extrémité N-terminale, ainsi que deux motifs de liaison à des centres Fe/S en son extrémité C-terminale (FCXXCXXCXXXCP et CXXCXXXC) (**figure 13**).

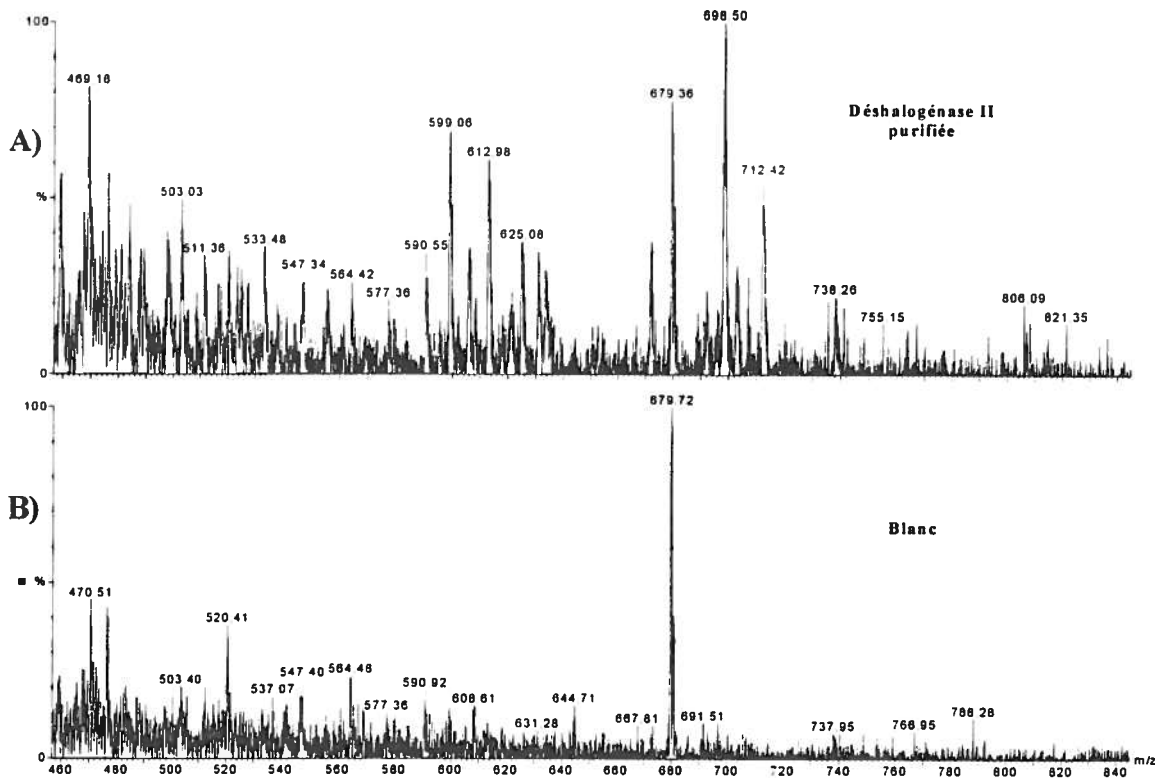


Figure 12: A) Spectre de masse des peptides tryptiques de la déshalogénase II purifiée chez *D. frappieri*, séparée par SDS-PAGE 12% (p/v) et digérée à même le gel ; B) Spectre de masse obtenu à partir d'un échantillon de gel témoin, soumis aux mêmes conditions.

MNLDRRSFLKASLVSAVAASAAAKETFAPLTAAEAEIIAPIRETA**AEFFPYQ**VDPKY
 QRLPAEKLAYLRMFDPEENKGPIKFHFDDVSKITGKKDTGKDLPCLT
 PNLSALKGVRRP
 LVKQEPFSSPIMTAASYPCAKRKMGRALDMALVVASWSVEYHNGFTAPGSGPGGVIA
 HYPFNPMTNETGTEPVFLAGMYSWDNTKARERREQGRQWKFSVEEASRIVKKAARFL**G**
ADMAGIAPYDDRWTFSTWCRPNLKPFKLNGRTE**YFF**TD**PF**KL**M**KGEVEVYGSTSVEAD
 WEKYAGFTPKSVIAMTFEMDYEAYRTA**PSVLQGA**APGKSYSNMGEVAYKVASFLREIGY
 NAVPSGNDTGMSVPIAVQAGLGEAGRSGQLITQKYGPRVRIAKVYTDLELVPDKPINIG
 AREFCRLCLKADVCPAQAI SHVKDPWVLQPEDCTPSENPYTEKWQFDSQRCLSFFAYN
 GGDCGSCIAVCSWNKIDAWQHDVARI**ATQIPLVQDA**ARKFDEWFGYNGPVNPEERIE**ESG**
YIANMVKDFWKDTEPTK

Figure 13: Séquence protéique de 61 kDa déduite du gène 192 du contig 2977 du génome partiel de *Desulfotobacterium hafniense* (site Internet du JGI).

Les séquences surlignées correspondent aux peptides détectés en SM et les séquences en caractères gras ont été identifiées en SM/SM. La première séquence soulignée contient le motif TAT, alors que les deux dernières contiennent des motifs suspectés être responsables de la liaison à des centres Fe/S.

Tableau 4: Comparaison du profil peptidique théorique de la protéine de 61 kDa chez *D. hafniense* avec celui obtenu expérimentalement pour la déshalogénase II de *D. frappieri*.

Seuls les peptides de plus de 500 Da sont retenus. Les séquences suivies d'un astérisque (*) résultent d'un clivage manqué. La mention (X,Y) signifie X ou Y.

Profil peptidique théorique de la protéine de 61 kDa chez <i>D. hafniense</i>		Profil peptidique observé pour la déshalogénase II chez <i>D. frappieri</i>			
Séquences	Masse (Da)	Séquences	m/z	z	Masse (Da)
LCLK	532.30		533.48	1	532.48
MGWR	548.25				
LPNGR	555.31		555.42	1	554.42
LPAEK	556.32				
DFWK	594.28				
EFBR	610.25				
RPLVK	611.41				
LAYLR	634.38				
MNLDR	647.31				
DTEPTK	689.32				
VASFLR	691.40				
YAGFTPK	782.40				
SGQLITQK	873.49				
WQFDSQR	965.44		483.73	2	965.46
FHFDDVSK	993.46		497.62	2	993.24
YQRLLPAEK*	1003.55		502.97	2	1003.94
MFDPEENK	1008.42				
FESVEEASR	1052.48				
TAPSVLQGAAPGK	1195.66	PSVLQ	599.06	2	1196.12
IDAWQHVAR	1209.59		606.05	2	1210.10
IESGYIANMVK	1223.62	ESGYIAN	612.98	2	1223.96
TEYFPTDPFK	1243.58	EYF(I,L)TDP	630.97	2	1259.94
SYSNMGEVAYK	1247.55		625.08	2	1248.16
DFWKDTEPTK*	1265.59		633.59	2	1265.18
IATQIPLVQDAAR	1394.79	ATQIPLV	698.50	2	1395.00
MFDPEENKGPIK*	1403.68		703.00	2	1404.00
ETAEPYQVDPK	1422.67	AEFP	712.36	2	1422.72
DLPCLTPNLSALK	1440.76				
ASLVSVAAVAASAAAAK	1527.86				
CADVCPAQAIHVK	1554.73				
FLGADMAGIAPYDDR	1610.74	GADMA	806.39	2	1610.78
SVIAMTFEMDYEAYR	1824.81				
GEVEVYGSTSVADWEK	1883.84				
ETFAPLTAAAEIIPIR	1912.03				
FDEWFGYNGPVNPEER	1954.85				
WTFSTWCRPNLKPFK	1966.99				
QEPFSSPIMTAASYPCAK	1983.91				
VYTDLELVPDKPINIGAR	2012.09		671.94	3	2012.82
DPWVLQPEDCTPSNPYTEK	2404.05				
CLSFFAYNGDCGSCIAVCSWNK	2672.09				
EIGYNVPSGNDTGMSVPIAVQAGLGEAGR	2929.42				
ALDMALVVASWSVEYHYNGFTAPGSGPGG					
VIAHYFPNPMTNETGTEPVFLAGMYSWDN	6468.23				

Afin de confirmer qu'il s'agit bien de la déshalogénase II, la protéine de 57 kDa retrouvée dans les fractions cytoplasmiques et membranaires induites au 3,5-DCP a été analysée en spectrométrie de masse. Les résultats obtenus pour la protéine cytoplasmique ainsi que pour les deux isoformes membranaires analysés séparément correspondent à ceux obtenus pour l'enzyme purifié. Les profils peptidiques sont similaires, et la fragmentation des peptides en mode SM/SM a donné les mêmes séquences (**figure 14**).

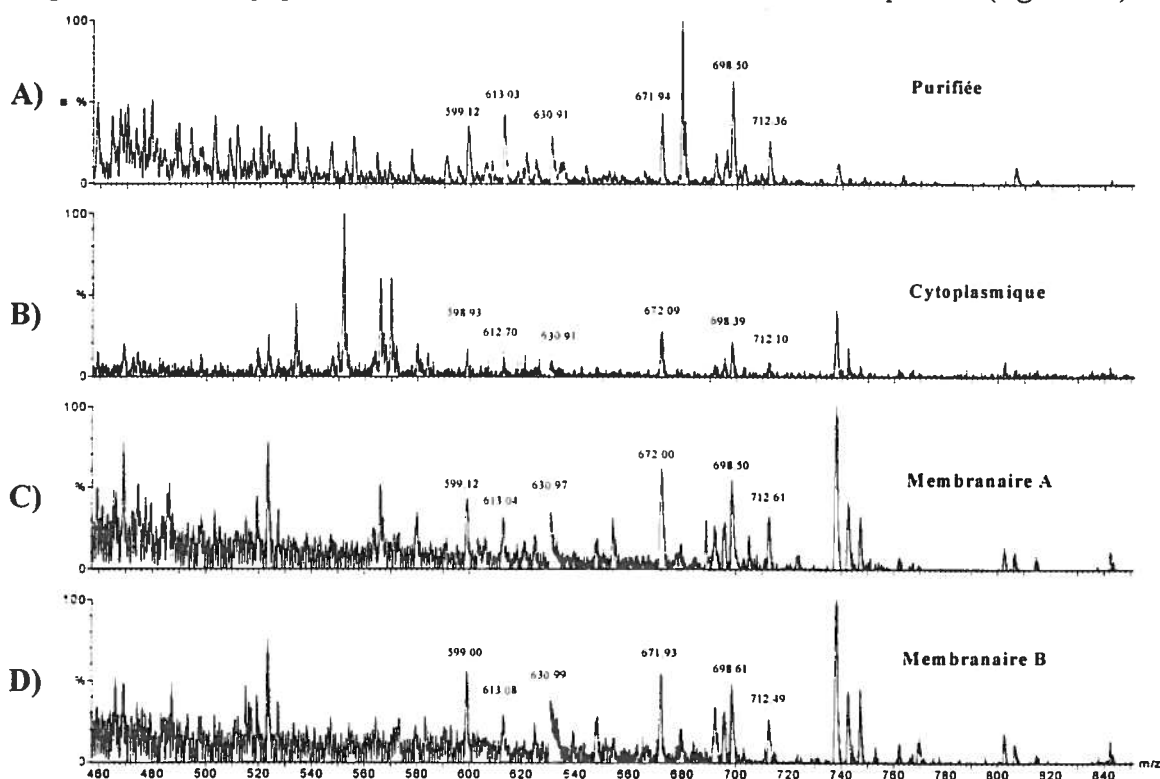


Figure 14: Comparaison des spectres de masse obtenus pour la déshalogénase II. A) Déshalogénase II purifiée; B) Protéine cytoplasmique de 57 kDa induite par le 3,5-DCP; C) isoformes A de la protéine membranaire de 57 kDa induite par le 3,5-DCP; D) isoforme B de la protéine membranaire de 57 kDa induite par le 3,5-DCP.

4.3.2 La protéine 54 kDa

Le profil peptidique (**figure 15** et **tableau 5**) et les deux séquences obtenus (**tableau 5** et annexe B) pour la protéine cytoplasmique induite de 54 kDa en spectrométrie de masse ont permis de remonter jusqu'au gène 3824 du contig 3277 du génome partiel de *D. hafniense*. La masse moléculaire et le pI théoriques du produit de ce gène sont respectivement 54,8 kDa et 6,02, ce qui correspond aux valeurs obtenues

expérimentalement. Le profil peptidique couvre 28% de la séquence correspondant au gène (figure 16).

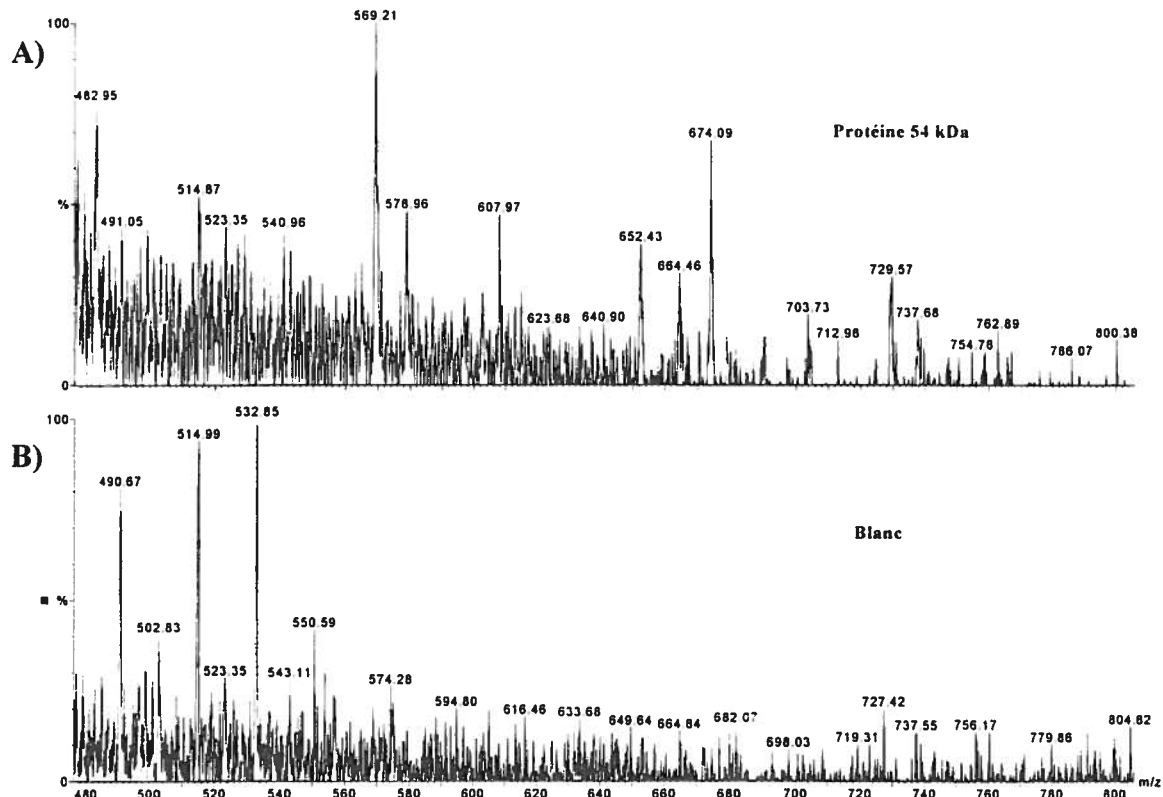


Figure 15: A) Spectre de masse des peptides tryptiques de la protéine de 54 kDa chez *D. frappieri*, séparée par électrophorèse 2D et digérée à même le gel ; B) Spectre de masse obtenu à partir d'un échantillon de gel témoin, soumis aux mêmes conditions.

MFILAKGYVYLVGAGPGEPKLLTVKGAECIARADVLIYDRLASPRLLSLAGPDCEMIYV
GKSPDRHTLRQDEINQLLVQKSLAGKVVTRLKGGDPFVFGRGGEAEALLAVGIPFEIV
PGITSAIAVPAYAGIPVTHREMTSSFVITGHEDPGKNDSIAIWEHLVPAHGTLIFLMG
MENLSLIAQRLLIQHGKNPATPVGIIQWGTRPEQRTLVGRLDTIASLVQEQQGFTNPATII
VGEVSLREKLQWFEKKPLFGSRIVVTRARHQAGVLAQAIEDLGGEPEWFFPAIEIREPS
DPELLTRAMQDLRRFKWLVTFSANGVERFLSGLKDSGKDIRDLSGMEIVAVGPVTQAAL
EQRGLCVTCMPEEYRAEGILAELTGRIL**PGE**GVLLARAEAEARDVLPQSLQTLGAEVWDV
PVYKTVSGSANKGLLKSMLEDKQIQAVTFTSSSTVRNFCRLIDNQTELLDGVKLF**SIGP**
LTSAAARELGLPIHKEAARSTIDGLVAALVEGARG

Figure 16: Séquence protéique déduite du gène 3824 du contig 3277 du génome partiel de *Desulfotobacterium hafniense* (site Internet du JGI).

Les séquences surlignées correspondent aux peptides détectés en SM et la séquence en caractères gras a été identifiée en SM/SM.

Tableau 5: Comparaison du profil peptidique théorique de la protéine de 54,8 kDa chez *D. hafniense* avec celui obtenu expérimentalement pour la protéine de 54 kDa de *D. frappieri*.

Seuls les peptides de plus de 500 Da sont retenus. Les séquences suivies d'un astérisque (*) résultent d'un clivage manqué.

Profil peptidique théorique de la protéine de 54,8 kDa chez <i>D. hafniense</i>		Profil peptidique observé pour la protéine de 54 kDa chez <i>D. frappieri</i>			
Séquences	Masse (Da)	Séquences	m/z	z	Masse (Da)
HTLR	525,30				
LASPR	542,32				
TLVGR	544,33				
LLTVK	572,39				
AEEAR	574,27				
IVVTR	586,38				
NFCR	595,25				
FLSGLK	663,40				
LIQHGK	694,41				
SMLEDK	721,33				
MFILAK	721,42				
AMQDLR	732,36				
TVSGSANK	762,39				
GAECIAR	775,36				
KPLFGSR	803,47				
LQWFEK	849,44				
ELGLPIHK	905,53				
GGDPFVFGR	950,46				
ADVLIYDR	963,50		482.95	2	963,90
AEGILAEITGR	1128,61				
ILPGEVLLAR	1136,69	PGE	569.46	2	1136,92
EPSPPELLTR	1155,58		578.96	2	1155,92
LKGGDPFVFGR*	1191,64		596.57	2	1191,14
LFSIGPLTSAAAR	1302,73	SIGP	652.18	2	1130,36
QDEINQLLVQK	1326,71		664.72	2	1327,44
WLFTSANGVER	1377,70				
GYVYLVGAGPGEPK	1405,72				
LIDNQTELLDGVK	1456,78		729.95	2	1457,90
STIDGLVAALVEGAR	1470,80				
GLCVTCMPEEYR	1513,64				
QIQAVTFTSSSTVR	1523,79		762.89	2	1523,78
LLSLAGPDCEMIYVGK	1764,88				
EMTSSFAVITGHEDPGK	1804,83		602.14	3	1803,42
NPATPVGIIQWGTRPEQR	2019,07		674.22	3	2019,66
MFILAKGYVYLVGAGPGEPK*	2109,13		704.49	3	2110,47
DLSGMEIVAVGPVTQAALQQR	2183,13				
DVLPQSLQTLGAEVWDVPVY	2356,23				

Une recherche comparative dans les banques de données effectuée à l'aide du logiciel Standard protein-protein BLAST (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) a révélé que la séquence protéique obtenue partageait 51% d'identité et 66% de similarité avec l'uroporphyrinogène III synthase/méthyltransférase de *Selenomonas ruminantium* subsp. *ruminantium*.

4.3.3 La protéine 31 kDa

Le profil peptidique (**figure 17** et **tableau 6**) et les cinq séquences obtenues (**tableau 6** et annexe C) pour la protéine de 31 kDa réprimée dans le cytoplasme et la membrane n'ont pas permis de retrouver la séquence protéique complète dans le génome partiel de *D. hafniense*, ni dans celui d'aucun autre organisme traduit dans les deux directions et dans les trois cadres de lecture. Il est à noter que les spectres de masse obtenus pour la protéine de 31 kDa cytoplasmique et membranaire étaient identiques, ce qui confirme qu'il s'agit bien de la même protéine.

Tableau 6: Profil peptidique obtenu expérimentalement pour la protéine de 31 kDa chez *D. frappieri*.

La mention (X,Y) signifie X ou Y.

Séquences	<i>m/z</i>
PYAAP	589,10
VEA(I,L)	607,15
AV(I,L)E	613,35
	648,24
TEA(I,L)(N,I,L)T	671,09
	723,49
PPASG	856,48
	908,51
	971,49
	1084,61

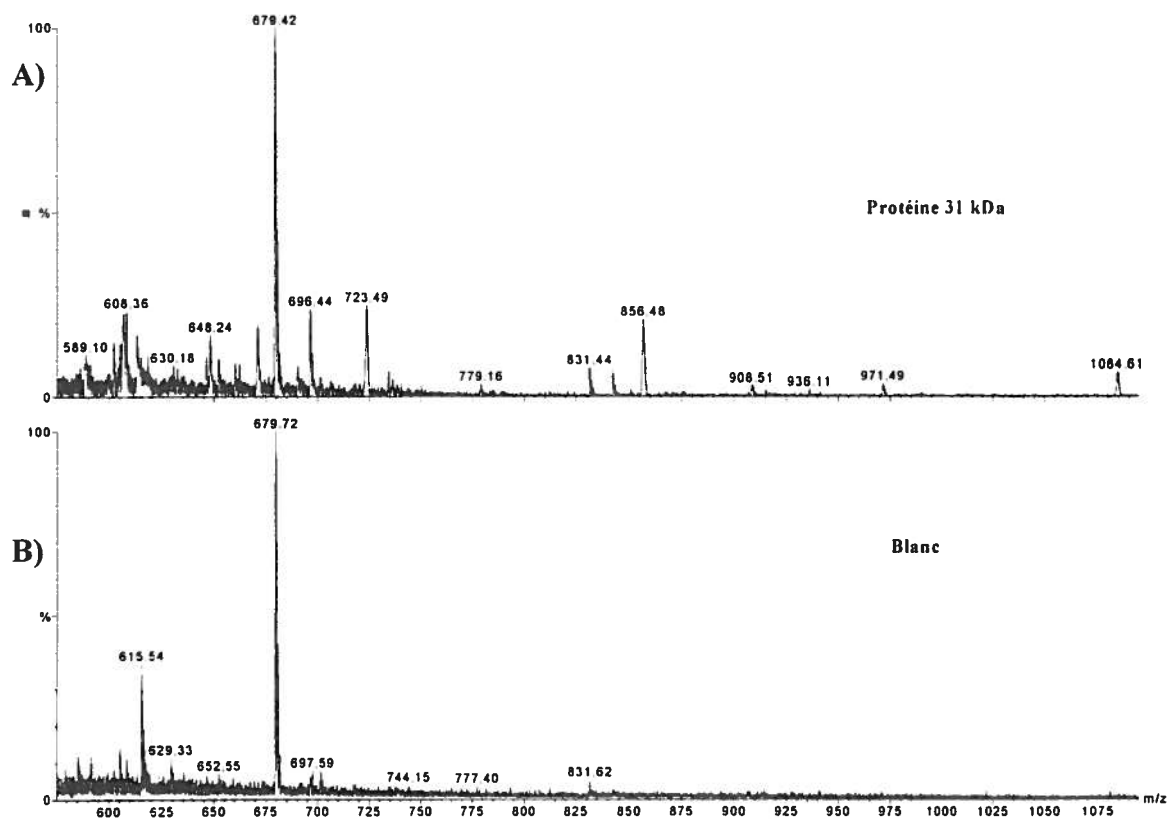


Figure 17: A) Spectre de masse des peptides tryptiques de la protéine de 31 kDa chez *D. frappieri*, séparée par électrophorèse 2D et digérée à même le gel ; B) Spectre de masse obtenu à partir d'un échantillon de gel témoin, soumis aux mêmes conditions.

4.3.4 La protéine 36,5 kDa

Comme ce fut le cas avec la protéine 31 kDa, le profil peptidique (**figure 18** et **tableau 7**) et les deux séquences obtenues pour la protéine de 36,5 kDa (**tableau 7** et annexe D) réprimée dans le cytoplasme et la membrane n'ont pas permis de retrouver la séquence protéique complète dans le génome partiel de *D. hafniense*, ni dans aucun autre organisme. Il est à noter que les spectres de masse obtenus pour la protéine de 36,5 kDa cytoplasmique et membranaire étaient identiques, ce qui confirme qu'il s'agit bien de la même protéine.

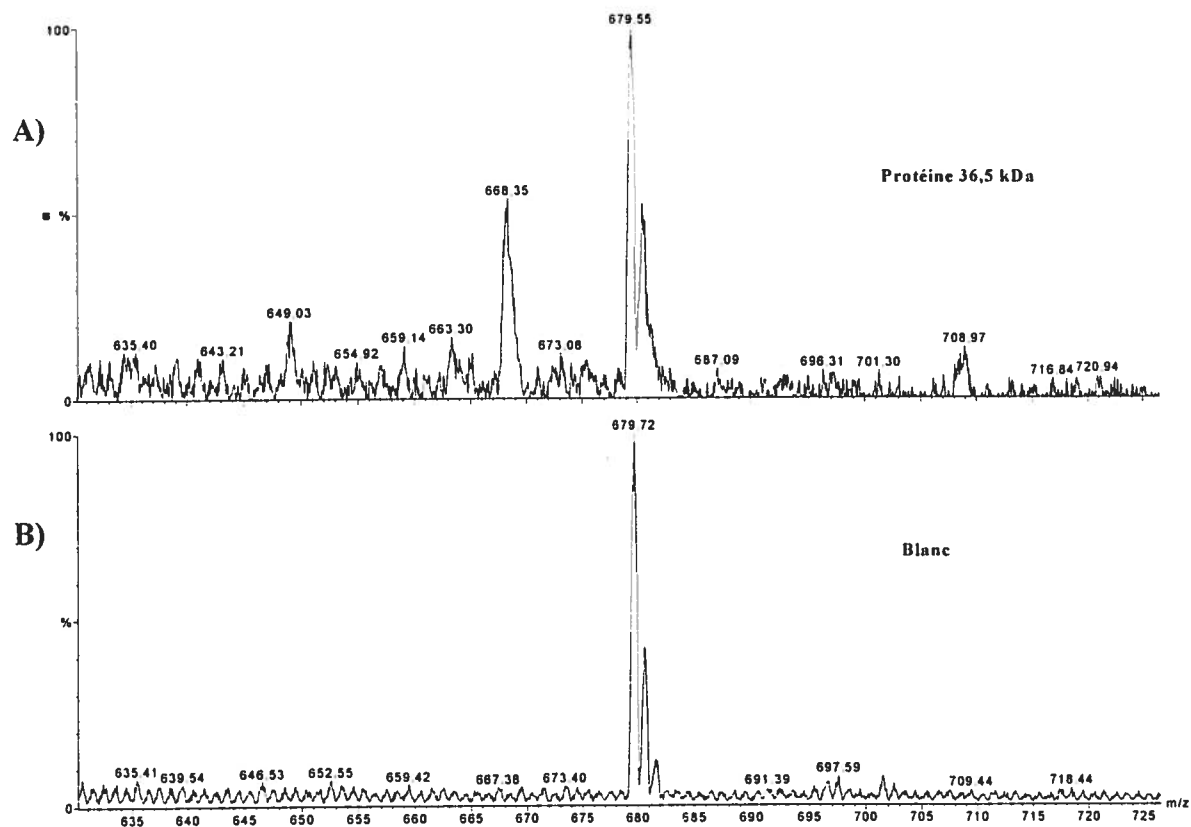


Figure 18: A) Spectre de masse des peptides tryptiques de la protéine de 36,5 kDa chez *D. frappieri*, séparée par électrophorèse 2D et digérée à même le gel ; B) Spectre de masse obtenu à partir d'un échantillon de gel témoin, soumis aux mêmes conditions.

Tableau 7: Profil peptidique obtenu expérimentalement pour la protéine de 36,5 kDa chez *D. frappieri*.

La mention (X,Y) signifie X ou Y.

Séquences	<i>m/z</i>
	649,03
(N,D)SPV(I,L,N)S	668,35
FDNT	708,97

4.3.5 La protéine 42 kDa

Le profil peptidique (figure 19 et tableau 8) et la séquence obtenue pour la protéine cytoplasmique réprimée de 42 kDa en spectrométrie de masse (tableau 8 et annexe E) ont permis de remonter jusqu'au gène *Desu6767* du contig 2678 du génome partiel de *D. hafniense*. La masse moléculaire et le pI théoriques du produit de ce gène sont respectivement 42,3 kDa et 6,06, ce qui correspond aux valeurs obtenues expérimentalement. Le profil peptidique couvre 46% de la séquence correspondant au gène (figure 20).

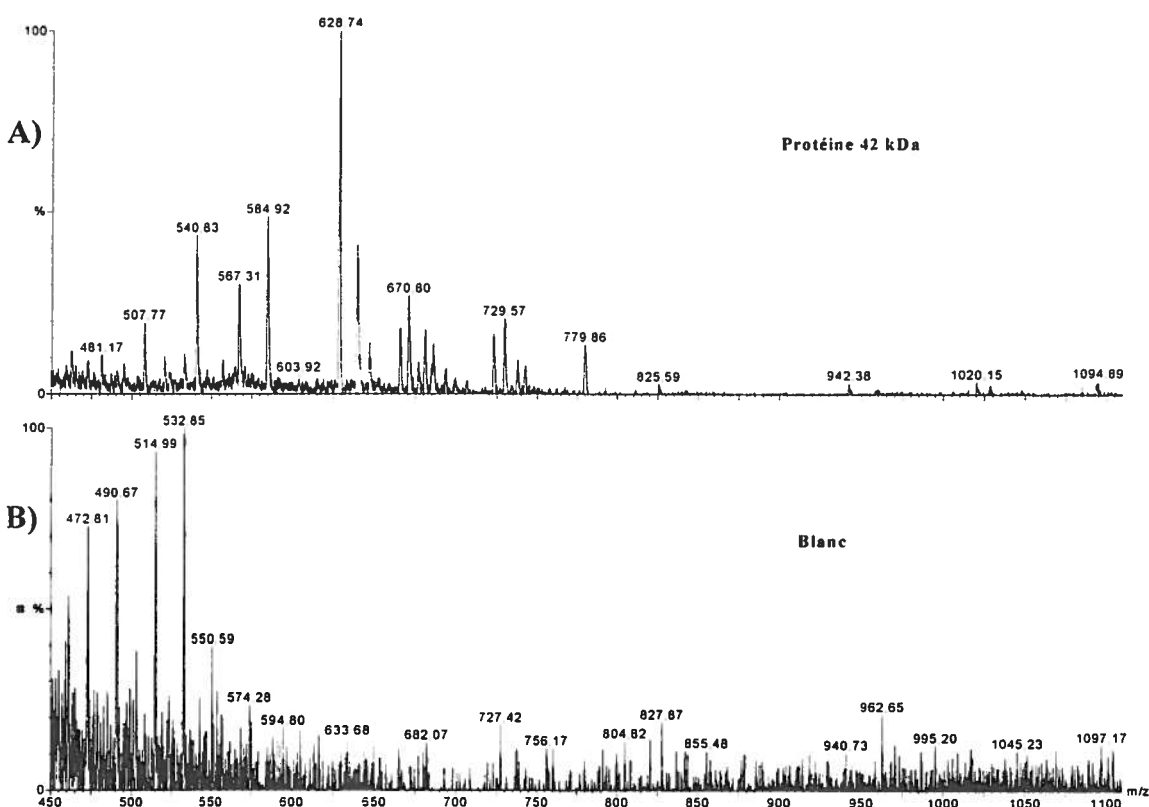


Figure 19: A) Spectre de masse des peptides tryptiques de la protéine de 42 kDa chez *D. frappieri*, séparée par électrophorèse 2D et digérée à même le gel ; B) Spectre de masse obtenu à partir d'un échantillon de gel témoin, soumis aux mêmes conditions.

Tableau 8: Comparaison du profil peptidique théorique de la protéine de 42,3 kDa chez *D. hafniense* avec celui obtenu expérimentalement pour la protéine de 42 kDa de *D. frappieri*.

Seuls les peptides de plus de 500 Da sont retenus. Les séquences suivies d'un astérisque (*) résultent d'un clivage manqué.

Profil peptidique théorique de la protéine de 42,3 kDa chez <i>D. hafniense</i>		Profil peptidique observé pour la protéine de 42 kDa chez <i>D. frappieri</i>			
Séquences	Masse (Da)	Séquences	<i>m/z</i>	<i>z</i>	Masse (Da)
CAEK	506,22				
GMLNK	561,29				
LFTDR	650,34				
IAINHK	694,41				
YIKPIK	760,48				
FAGTEIK	764,41				
YVDVDR	765,37				
EIDGVLK	772,43				
QAFEQMK	880,41				
NTEEIYR	923,43		462,30	2	922,60
LKEIDGVLK*	1013,61		507,77	2	1013,54
YVTDFPNPK	1079,53		540,83	2	1079,66
DGVIIINFSR	1132,62		567,31	2	1132,62
YEDANGVLVR	1134,57				
AGAGVNNIPLDK	1167,62		584,92	2	1167,84
ENVNISDLMNK	1275,61		639,38	2	1276,76
EMVIATMIMAAR	1335,67				
LFTDRYVDVDR*	1397,69		699,43	2	1396,86
INCLNNISQAGLK	1443,75		723,11	2	1444,22
GIVVFNTPGANANGVK	1556,83	VFNTP	779,86	2	1557,72
DTLVDEEALIELK	1557,81		520,31	3	1557,93
NIPNMLGQFTSTLAK	1633,85				
LGVIGLGAIGILVANAANK	1763,85				
YVDVDRYEDANGVLVR	1881,92		628,74	3	1883,22
ECDFITIHVPLTDSNR	1915,91				
STSMHDLELPPNIEAIAR	1992,99		665,48	3	1993,44
NSVNFPCNDMGVCNQAGR	2038,84		680,93	3	2039,79
			1020,15	2	2038,30
INCLNNISQAGLKLFTDR*	2076,08		693,73	3	2078,19
NLVGGVNWNVNSCQTDPEVAK	2186,04		729,57	3	2185,71
			1094,89	2	2187,78
LEMDVCGYDPYISVEHAWK	2311,03				
GSYAYTLIDIETPVDPEDITK	2355,16				
VCGVEGVIAIPHLGASTAESEE					
NCAVMAVEQIMNYLEHGNIK	4542,17				

MFKINCLNNISQAGLKLFTDRYVDVDRYEDANGVLVRSTSMHDLELPPNIEAIARAGAG
 VNNIPLDKCAEKGI**VVENTP**GANANGVKEMVIATMIMAARNLVGGVNWVNSCQTDPEVA
 KLVEKNKAKFAGTEIKGKKLG**VIGLGA**IGILVANAANKLEMDVCGYDPYISVEHAWKLS
 KYIKPIKNTEEIYRECFITIHVPLTDSNRGMLNKQAFEQMKDGVIIILNFSRDTLVDEE
 ALIEALKTGKVAKYVTDFFPNPKVCGVEGVIAI**PHLGASTAESE**ENCAVMAVEQIMNYLE
 HGNIKNSVNFPNCMDGVCNQAGRIAINHKNI**PNMLGQFTSTLAKEN**VNISDLMNKSKGS
 YAYTLIDIETPVDPEMITKLKEIDGVLKVRVIK

Figure 20: Séquence protéique déduite du gène *Desu6767* du contig 2678 du génome partiel de *Desulfitobacterium hafniense* (site Internet du JGI).

Les séquences surlignées correspondent aux peptides détectés en SM et la **séquence en caractères gras** a été identifiée en SM/SM. La séquence soulignée contient le motif propre aux oxydoréductases NAD dépendantes.

Une recherche comparative dans les banques de données effectuée à l'aide du logiciel Standard protein-protein BLAST [blastp] (NCBI) a révélé que la séquence protéique obtenue partageait 42% d'identité et 62% de similarité avec la D-3-phosphoglycérate déshydrogénase de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. D'ailleurs, une analyse plus approfondie de la séquence révèle la présence du motif GXGXXG, propre aux oxydoréductases NAD dépendantes, dans la région centrale de la protéine de 42,3 kDa (**figure 20**).

4.3.6 La protéine 53 kDa

L'analyse par SM des produits de digestion des isoformes A et B de la protéine membranaire induite de 53 kDa a permis de confirmer qu'il s'agissait bien des isoformes d'une même protéine. En effet, les profils peptidiques obtenus pour chacun correspondent parfaitement (**figure 21**).

Le profil peptidique (**figure 21** et **tableau 9**) et les sept séquences obtenus (**tableau 9** et annexe F) ont permis de remonter jusqu'au gène *Desu7176* du contig 2867, ainsi qu'au gène *Desu6783* du contig 2687 du génome partiel de *D. hafniense*. Le profil peptidique de la protéine 53 kDa couvre 16% de la séquence déduite du gène *Desu7176* et 49% de la séquence déduite du gène *Desu6783*. Alors que trois séquences identifiées

en SM/SM se retrouvent dans le produit du gène *Desu7176*, deux se retrouvent dans le produit de l'autre gène (**figure 22**). Aucune correspondance n'a pu être établie pour la séquence G(I,L)TY résultant de la fragmentation du pic 703,95. Ce pic, ainsi que le pic 691,29 ne peut d'ailleurs être relié aux produits des gènes mentionnés précédemment. La masse moléculaire est de 30,8 kDa pour le produit du gène *Desu7176*, et de 22,5 kDa pour le produit du gène *Desu6783*. La masse moléculaire des deux séquences protéiques mises ensemble est de 53,3 kDa, ce qui correspond à la valeur obtenue expérimentalement.

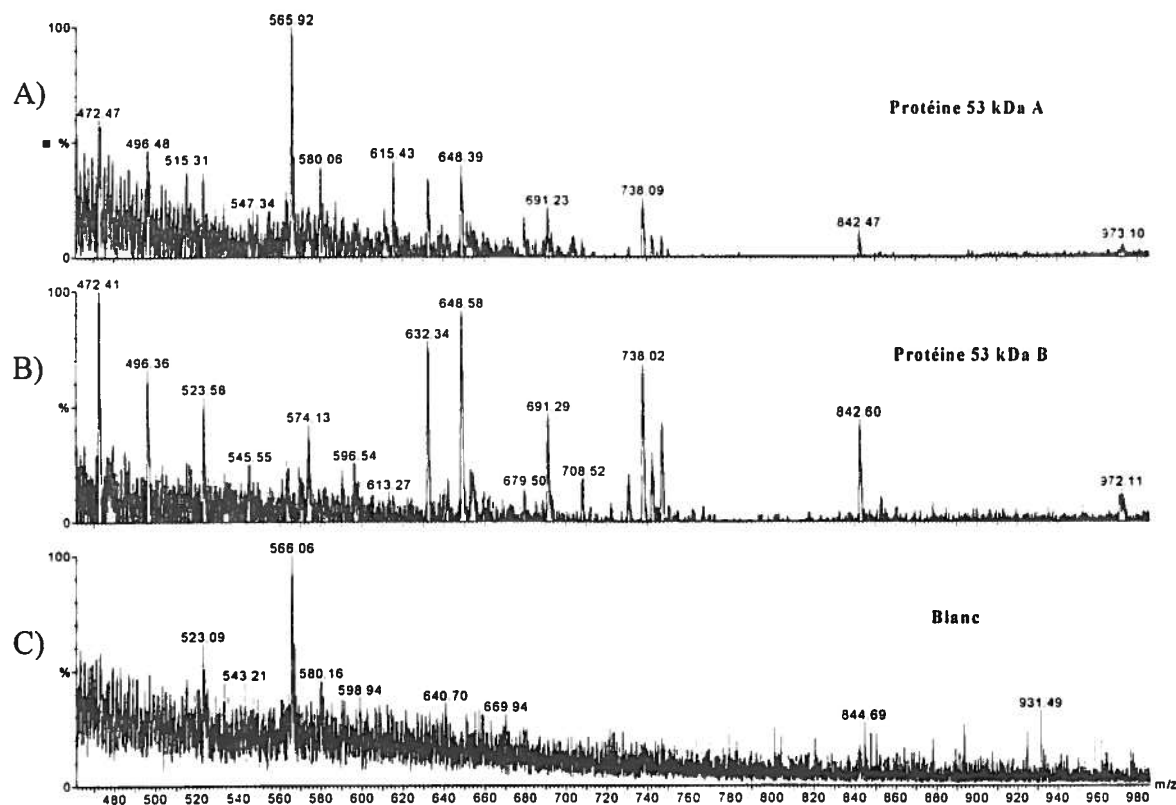


Figure 21: A,B) Spectre de masse des peptides tryptiques des isoformes A et B de la protéine de 53 kDa chez *D. frappieri*, séparée par électrophorèse 2D et digérée à même le gel ; C) Spectre de masse obtenu à partir d'un échantillon de gel témoin, soumis aux mêmes conditions.

Tableau 9: Comparaison du profil peptidique théorique des produits des gènes *Desu7176* et *Desu6783* de *D. hafniense* avec celui obtenu expérimentalement pour la protéine de 53 kDa de *D. frappieri*.

Seuls les peptides de plus de 500 Da sont retenus.

Profil peptidique théorique du produit du gène <i>Desu 7176</i> chez <i>D. hafniense</i>		Profil peptidique observé pour la protéine de 53 kDa chez <i>D. frappieri</i>			
Séquences	Masse (Da)	Séquences	<i>m/z</i>	<i>z</i>	Masse (Da)
VPTGGR	585,32				
IEGHLK	695,40				
MSALFAGK	823,43				
SIGTMYSR	826,40				
GFEPLLR	830,47				
VVIDPVTR	897,53				
QDFLFNR	938,46				
DATYVTER	953,45				
YQGQDPGLLR	1145,58	QGQD	574,41	2	1146,82
LIAAGDTAPLTPR	1294,72	LAAGDTA	648,58	2	1295,16
VEVEVTNGVVTDAK	1458,76	VEVT	730,99	2	1459,98
TCGVCAGSHGWASSLALDQAFGAK	2450,11				
QPHQSSIVAGGVMTLPNIEVVEQFR	2735,41				
YEPDAFCVNDPELVTLAVSHYLHALNMQAK	3444,65				
NLMIGAMWLHDHPLHFYHLSALDYLDITAVAK	3707,34				
SMLLEQIDYLENIYLQDVLTFGTGPLLPLAQAGV					
GGGYGNFLAYGGFGLDDER	5683,39				

Profil peptidique théorique du produit du gène <i>Desu 6783</i> chez <i>D. hafniense</i>		Profil peptidique observé pour la protéine de 53 kDa chez <i>D. frappieri</i>			
Séquences	Masse (Da)	Séquences	<i>m/z</i>	<i>z</i>	Masse (Da)
DAYSFVK	828,40				
GALGHWIK	880,49				
AFETVILAK	990,57	FETVI	496,36	2	990,72
YNIKPGAVAR	1087,61		545,55	2	1089,10
MISITVPDLAK	1186,66				
DAQGNYGPLEK	1190,56		596,54	2	1191,08
YDGKPIEVGPLAR	1413,76	IEVG	472,41	3	1414,23
			708,52	2	1415,04
MLVMQPQGLMDIIAK	1686,89		563,33	3	1686,99
EMINWVNQLEAEMGK	1790,83				
ALIGVPIPDENNPINIVR	1943,08		972,11	2	1942,22
DHVTENYQMVPPTTWNFSPK	2392,12				
SYDPCLACAIHLDPQTNEIR	2485,17				
IHDTEHWNPPATGQGIGLTEVPR	2524,25		632,34	4	2525,36
			842,60	3	2524,80

A) Produit du gène *Desu7176* du contig 2867 chez *D. hafniense*

MGKVVIDPVTRIEGHLKVE**VEVT**NGVVTDAKSIGTMYRGFEPLLRGRDPRDATYVTERT
CGVCAGSHGWASSLALDQAFGAKVPTGGRLIRNLMIGAMWLHDHPLHFYHLSALDYLDI
TAVAKY**QGQDP**GLLRVKDKISKLI**IAAGDTA**PLTPRYEPDAFCVNDPELVTLAVSHYLHA
LNMQAKAKKMSALFAGKQPHQSSIVAGGVTMLPNIEVVEQFRSMLLEQIDYLENIYQLQD
VLTFGTGPLLPLAQAGVGGGYGNFLAYGGFGLDDERQDFLFNRDCL

B) Produit du gène *Desu6783* du contig 2687 chez *D. hafniense*

MISITVPDLAKKDAYSFVKAPRYDGKPI**IEVG**PLARMLVMQPQGLMDIIAKYNIKPGAVA
RHAARA**FETVIL**AKEMINWVNQLEAEMGKGLRIHDTEHWNPPATGQGIGLTEVPRGALG
HWIKIKDHVTENYQMVVPTTWNFSPKDAQGNYGPLEKALIGVPIPDENNPINIVRVIRS
YDPC**LACAI**HLIDPQTNEIRKFKVN

Figure 22: A) Séquence protéique déduite du gène *Desu7176* du contig 2867 du génome partiel de *Desulfitobacterium hafniense* (site Internet du JGI). B) Séquence protéique déduite du gène *Desu6783* du contig 2687 du génome partiel de *Desulfitobacterium hafniense* (site Internet du JGI).

Les séquences surlignées correspondent aux peptides détectés en SM et les **séquences en caractères gras** ont été identifiées en SM/SM. Les séquences soulignées contiennent le motif CXXC propre aux grandes sous-unités des hydrogénases Fe/Ni.

Une recherche comparative dans les banques de données effectuée à l'aide du logiciel Standard protein-protein BLAST [blastp] (NCBI) a révélé que les deux séquences protéiques obtenues partagent 85% d'identité et 86% de similarité avec un précurseur putatif de la grande sous-unité d'une hydrogénase Ni/Fe chez *Desulfitobacterium dehalogenans* (**figure 23**). Cette protéine a une masse moléculaire de 55,6 kDa, ce qui est très près de la valeur de 53 kDa obtenue expérimentalement.

Une analyse plus approfondie montre que le motif CXXC se retrouve à l'extrémité N-terminale du produit du gène *Desu7176*, ainsi qu'à l'extrémité C-terminale du produit du gène *Desu6783*. Or, toutes les grandes sous-unités d'hydrogénases connues à ce jour contiennent deux motifs CXXC; un à l'extrémité N-terminale, et l'autre à l'extrémité C-terminale.

Il semble donc que la protéine 53 kDa soit codée par un seul gène, semblable à celui de *D. dehalogenans*, mais qu'une erreur soit survenue lors du séquençage du

génomique de *D. hafniense*. Ainsi, une partie du gène de la protéine 53 kDa s'est retrouvée dans le contig 2867, alors que l'autre partie s'est retrouvée dans le contig 2687.

```

MGKVVIDPVTRIEGHLKVEVEVTNGVVTDAKSIGTMYRGFEPLLRGRDPRDATYVTERTCGVCAG
MGKVVIDPVTRIEGHLKVEVEVTNGVVTDARSIGTMFRGLNA-VKSRDPRDATYVTERTCGVCAS

SHGWASSLALDQAFGAKVPTGGRLIRNLMIGAMWLHDHPLHFYHLSALDYLDITAVAKYQGQDP
AHGWASSLCLDDAFGAKVPAGGRIIRNL I TSAMWLHDAALHFYHLSALDFLDITAVAKYQGQDP

GLLRVKDKISKL I AAGDTAPLTTRYEPDAFCVNDPELVTI AVSHYLHAI NMQAKAKKMSALFAG
GLLRVKEKIGKL I AAG -TAPLTTRYEPDEYCVNDPELVTI AVSHYKALDMQAKAKKMSALFAL

FAGKQPHQSSIVAGGV TMLPNIEVVEQFRSMLLEQIDYLENIYLQDVLTFGTGPLLPLAQAGVGGG
FAGKQPHQSSIVVGGV TMLPNIEVVEQYRSLLLEQIDFLENVYLQDVLTFGTGPLLPLAQAGVGGG

YGNFLAYGGFGLDDERQDFLENRDCL-----MIS
YNNFLSFGGFGLDDEKKNFFLPAGVIMDGLSKVMAVDQ S KVTEGVTYAWYKDSPKGDHPYDS

ITVPDLAKKDAYSFVKAPRYDGKP I EVGPLARMLVMQPQGLMDI IAKYNIKPGAVARHAARAFE
DTVPDIKRKDAYSFVKAPRYDGKPV EGVNGLARMLVMQPKPFMDIVAKYSIKPGVVARHAARAYE

TVILAKEM INWVNQLEAEMGKGLRIHDTEHWNPPATGQG IGLTEVPRGALGHWIKIKDHVTENY
AVILAKEMLNWCNALEAE I GKVSEFT I PS I GNPPATGQGVGLTEVPRGALGHWIKIKDHKTENY

QMVVPTTWNFSPKDAQGNYGPLEKALIGVP I PDENNPINIVRV IRSYDPCLACAIHLIDPQTNEIRK
QMVVPTTWNFSPKDAQGNYGPLEKALIGVVPDENNPINIVRVVRSNLPCLACAIHLIDPQTNEIHK

FKVN
FK IS

```

Figure 23: Comparaison des séquences protéiques déduites des gènes *Desu7176* du contig 2867 et *Desu6783* du contig 2687 du génome partiel de *Desulfotobacterium hafniense* avec la séquence du précurseur putatif de la grande sous-unité de l'hydrogénase Ni/Fe chez *Desulfotobacterium dehalogenans*.

La séquence **surlignée en noir** correspond au produit du gène *Desu7176*. La séquence **surlignée en gris** correspond au produit du gène *Desu6783*.

4.3.7 La protéine 42,5 kDa

L'analyse par SM des produits de digestion des isoformes A et B de la protéine membranaire induite de 42,5 kDa a permis de confirmer qu'il s'agissait bien des isoformes d'une même protéine. En effet, les profils peptidiques obtenus pour chacun correspondent parfaitement (**figure 24**).

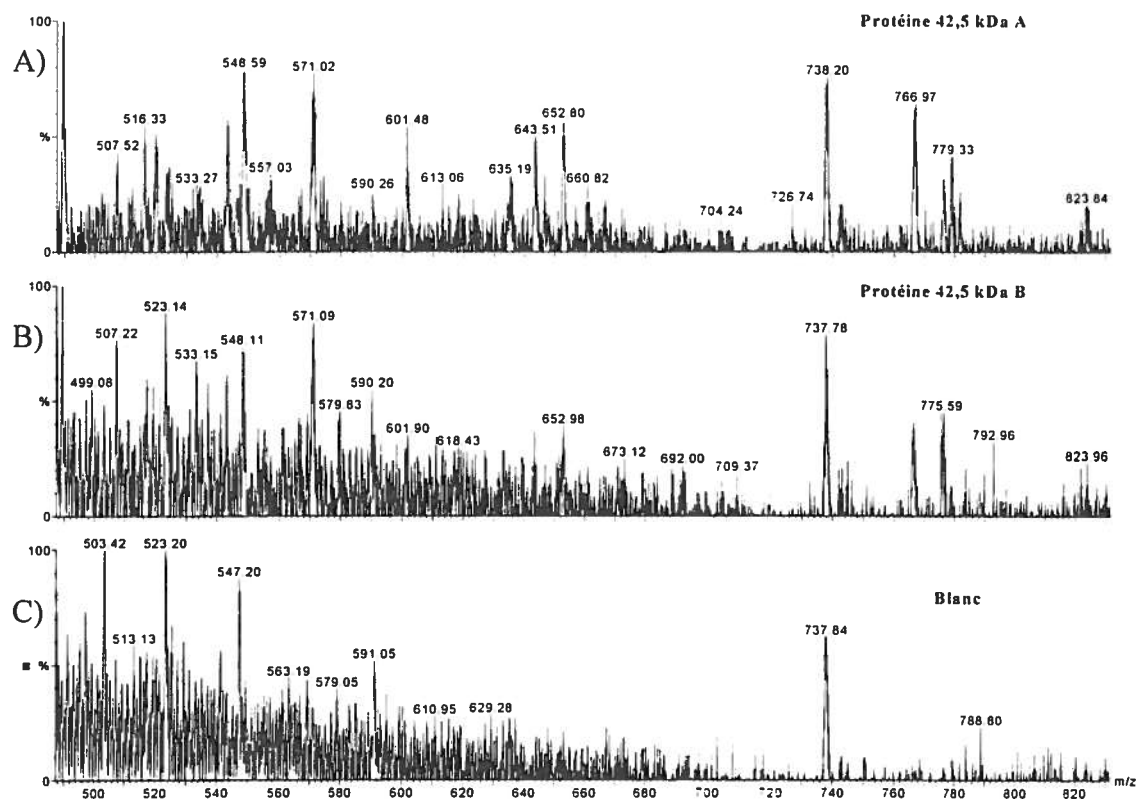


Figure 24: A,B) Spectre de masse des peptides tryptiques des isoformes A et B de la protéine de 42,5 kDa chez *D. frappieri*, séparée par électrophorèse 2D et digérée à même le gel ; C) Spectre de masse obtenu à partir d'un échantillon de gel témoin, soumis aux mêmes conditions.

Le profil peptidique (**figure 24** et **tableau 10**) et les quatre séquences (**tableau 10** et annexe G) obtenus pour la protéine de 42,5 kDa en spectrométrie de masse ont permis de remonter jusqu'au gène *Desu6765* du contig 2677 du génome partiel de *D. hafniense*. La masse moléculaire et le pI théoriques du produit de ce gène sont respectivement 49,3 kDa et 7,08. Le profil peptidique de la protéine 42,5 kDa couvre 30% de cette séquence protéique. Plus spécifiquement, les peptides s'étendent sur une séquence de 42,7 kDa, ce qui correspond à la valeur obtenue expérimentalement (**figure 25**). L'étude de la séquence obtenue a également révélé la présence de deux motifs CXXCXXCXXC suspectés être responsables de la liaison à des centres Fe/S.

Tableau 10: Comparaison du profil peptidique théorique de la protéine de 48,5 kDa chez *D. hafniense* avec celui obtenu expérimentalement pour la protéine de 42,5 kDa de *D. frappieri*.

Seuls les peptides de plus de 500 Da sont retenus. La séquence suivie d'un astérisque (*) résulte d'un clivage manqué.

Profil peptidique théorique de la protéine de 48,5 kDa chez <i>D. hafniense</i>		Profil peptidique observé pour la protéine de 42,5 kDa chez <i>D. frappieri</i>			
Séquences	Masse (Da)	Séquences	<i>m/z</i>	<i>z</i>	Masse (Da)
QEMR	562,25				
VVEVK	572,35				
GTTIR	674,37				
FGDVY GK	784,38				
AQMPFSK	807,39				
LTATWPR	843,46				
LFHSLLR	884,52				
SMANAHFK	904,42				
CTEVCAGK	923,38				
HLPYFLSG	932,48				
QVFQCIR	949,48		476,23	2	950,46
QYIELAK	976,56		489,49	2	976,98
MYADEQFK	1030,44		516,33	2	1030,66
FILDVVSNR	1061,59				
VFHAATGDDAK	1130,54				
VHVFLVGLEK	1139,67		571,02	2	1140,04
LDIPGMILEIR	1268,72	PGM	635,19	2	1268,38
IGDQQGLPMT PK	1283,65				
EFHIILMDNGR	1343,67				
EQAYQGYDFAALR	1530,71	AYQGYD	766,97	2	1531,94
QEIENALENDILR	1555,78	IENAL	779,33	2	1556,66
SMASEEHLNAALLK	1625,84		543,16	3	1625,48
DAENPQNLC LQCGK	1645,72		823,84	2	1645,68
NREQAYQGYDFAALR*	1800,85		601,48	3	1801,44
SYAAEHLDEMIEQFEK	1938,87				
FVPNFEDAGYILQTLPR	1979,02				
EQVADTFNNNLSYTS DPVIAK	2325,11	SYT	776,31	3	2325,93
FVEADMGISGANIAVAETGTLMMMTNEGNAR	3200,46				
NGTAQQLTSYVTMITGPNPTYYPDGSIEDK	3260,52				
EGFDVQETDLGEWIVQLQGQRPSH MVMPAIHMTK	3909,48				

SMANAHFKQ**EIENALE**NDILRGALGRFGDVYGKNREQ**AYQGYD**FAALREKVVEVKSYAA
 EHLDEMIEQFEKAATARGAKVFHAATGDDAKQYIIELAKQQKVNIVKSKSMASEEIH
 NAALLKEGFDVQETDLGEWIVQLQGQRPSHMVMPAIIHMTKEQVADTFNNNL**SYTSDPVI**
 AKLVKTARQEMRKKEVEADMGISGANIAVAETGTLMMMTNEGNARLTATWPRVHVFLVG
 LEKFVPNFEDAGYILQTLPRNGTAQQLTSYVTMITGPNPTYYPDGSIEDKEFHIILMDN
 GRRKMYADEQFKQVFQ**CIRCAAC**LNVC**PAFQLV**GGHVYGHIYTGGIGTILTAFLNSEKD
 AENPQNL**CLOC**GKCTEVCAGKLDI**PGMILE**IRNRIGDQQGLPMTPKFILDVVSNNRRLFH
 SLLRVASKAQMPFSKGQTTIRHLPYFLSG

Figure 25: Séquence protéique déduite du gène *Desu6765* du contig 2677 du génome partiel de *Desulfotobacterium hafniense* (site Internet du JGI).

Les séquences surlignées correspondent aux peptides détectés en SM et les **séquences en caractères gras** ont été identifiées en SM/SM. Les séquences soulignées sont suspectées être des motifs de liaison à des centres Fe/S.

Une recherche comparative dans les banques de données effectuée à l'aide du logiciel Standard protein-protein BLAST [blastp] (NCBI) a révélé que la séquence protéique de 48,5 kDa partageait 54% d'identité et 73% de similarité avec la sous-unité d'une hydrogénase chez *Fusobacterium nucleatum* subsp. *vincentii*.

4.3.8 Synthèse

Afin de mieux s'y retrouver, les résultats obtenus pour chacune des protéines induites et réprimées décrites précédemment sont résumés dans le **tableau 11**.

Tableau 11 : Synthèse des résultats obtenus pour les protéines induites et réprimées lors de la déshalogénation du 3,5-DCP chez *D. frappieri* PCP-1.

Protéines	État	Origine	Isoformes	pI	Similarité
Déshalogénase II (57 kDa)	Induite	Cytoplasmique	1	5,8	74% avec les déshalogénases PCE réductrices de <i>Dehalobacter restrictus</i> , <i>Desulfitobacterium frappieri</i> TCE-1 et <i>Desulfitobacterium</i> sp. Y51
		Membranaire	2	5,5 5,6	
31 kDa	Réprimée	Cytoplasmique	1	4,4	N.D.
		Membranaire	1	4,4	
36,5 kDa	Réprimée	Cytoplasmique	1	5,6	N.D.
		Membranaire	1	5,6	
42 kDa	Réprimée	Cytoplasmique	1	6,4	62% avec la D-3-phosphoglycérate déshydrogénase de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
42,5 kDa	Induite	Membranaire	2	5,8	73% avec la sous-unité d'une hydrogénase chez <i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>vincentii</i>
				5,9	
53 kDa	Induite	Membranaire	3	5,9	86% avec un précurseur putatif de la grande sous-unité d'une hydrogénase Ni/Fe de <i>Desulfitobacterium dehalogenans</i>
				6,0	
				6,1	
54 kDa	Induite	Cytoplasmique	1	6,1	66% avec l'uroporphyrinogène III synthase/méthyltransférase de <i>Selenomonas ruminantium</i> subsp. <i>ruminantium</i>

5 Discussion

5.1 La protéine 57 kDa - Déshalogénase II

Notre étude protéomique utilisant l'électrophorèse en deux dimensions des préparations cytoplasmique et d'extrait des membranes a confirmé que la synthèse de la déshalogénase II était effectuée uniquement dans les cultures des bactéries PCP-1 contenant du 3,5-DCP qui agirait comme inducteur. Ceci est en accord avec les résultats de Bouchard *et al.* (1996) et Dennie *et al.* (1998) qui ont montré que le 3,4,5-TCP et le 3,5-DCP sont des inducteurs de la déshalogénation des chlorophénols en position *meta* et *para*. Ce phénomène a déjà été rapporté dans la littérature pour des déshalogénases chez d'autres espèces, telles que *Desulfitobacterium* sp. Y51, chez qui l'expression de la déshalogénase PCE réductrice est induite par le PCE et le TCE (Suyama *et al.*, 2002). Pour la déshalogénase I, Pagé-Bélanger (2002) avait observé que cette protéine, présente sous différentes isoformes, était constitutive mais que la présence de 2,4,6-TCP était nécessaire pour obtenir une activité de déshalogénation.

La présence de la déshalogénase II dans la membrane et dans le cytoplasme laisse croire que cette enzyme est liée à la membrane de façon non-intégrale. Il a d'ailleurs été observé que plusieurs déshalogénases sont liées à la membrane via une protéine d'ancrage (Magnuson *et al.*, 2000; Neumann, Wohlfarth et Diekert, 1998; van de Pas *et al.*, 1999). Bien que la technique d'électrophorèse 2D ait permis d'identifier cinq isoformes (A, B, C, D et E) pour la déshalogénase II purifiée (provenant de la fraction membranaire induite au 3,5-DCP), on n'a retrouvé que l'isoforme D dans la fraction cytoplasmique induite, et les isoformes A et B dans la fraction membranaire induite. Différents scénarios pourraient expliquer la différence observée entre l'extrait purifié et la fraction membranaire. Par exemple, les conditions de solubilisation et d'électrophorèse utilisées auraient pu favoriser l'association de certaines isoformes à d'autres protéines membranaires pour former des agrégats notamment au cours de la première électrophorèse dans un gradient de pH. Il se peut que les isoformes C, D et E soient présents en trop faible quantité dans la membrane pour être détectés, mais que le processus de purification ait malgré tout favorisé ces derniers au détriment des isoformes A et B. Il est même possible que le processus de purification ait entraîné la transformation des isoformes A et B en C, D et E. Les

différentes isoformes observées pourraient représenter différents stades de maturation de la protéine. La présence de cofacteur corrinnoïde et des centres Fer/soufre est généralement observée chez les déshalogénases et pourrait être impliquée dans les différents stades de maturation possiblement représentés par les différentes isoformes observées. Les empreintes peptidiques obtenues en spectrométrie de masse étant constantes d'une isoforme à l'autre, il n'a pas été possible de déterminer la nature de leurs différences. Les peptides portant les modifications n'ont probablement pas été détectés en spectrométrie de masse, leur valeur de m/z étant en dehors de la plage sélectionnée, ou n'ayant pas été ionisés en quantité suffisante.

Récemment, Niggemeyer *et al.* (2001) ont affirmé que *D. frappieri* PCP-1 et *D. hafniense* devraient être unifiées en une seule espèce, suite à une étude physiologique comparative et une analyse d'hybridation ADN-ADN. Le génome de *D. frappieri* PCP-1 n'ayant pas encore été séquencé, celui de *D. hafniense* s'est avéré un outil précieux pour l'identification de la séquence de la déshalogénase II. Cependant, il existe au moins une différence entre la protéine de *D. hafniense* et celle de *D. frappieri*. En effet, après digestion théorique de la séquence de la déshalogénase II de *D. hafniense*, on retrouve entre autre un peptide dont la masse est de 1243,58 Da et dont la séquence est TEYFPTDPFK alors que la masse obtenue expérimentalement chez *D. frappieri* est de 1259,94 et la séquence identifiée en spectrométrie de masse est EYF(I,L)TDP. La différence de masse entre les deux peptides correspond exactement à la différence de masse entre une proline et une leucine ou une isoleucine. Ce résultat suggère que les deux protéines ont au moins un acide aminé de différence. La protéine de *D. hafniense* n'ayant pas été purifiée à ce jour, on ne peut dire si celle-ci est active ou si les différences, aussi minimes soient-elles, pourraient entraîner une perte ou un gain d'activité lors de la déshalogénation réductrice en position *meta* du 3,5-DCP.

La comparaison entre la séquence protéique de 61 kDa retrouvée chez *D. hafniense* et les protéines des banques de données révèle que l'enzyme est similaire à plusieurs déshalogénases réductrices PceA/CprA. Les plus hauts pourcentages d'identité (64%) et de similarité (74%) ont été obtenus avec les déshalogénases PCE réductrices de

Dehalobacter restrictus, *Desulfitobacterium frappieri* TCE-1 et *Desulfitobacterium* sp. Y51. Ainsi, la déshalogénase II serait plutôt du type PceA.

La majorité des déshalogénases réductrices, putatives ou caractérisées, contiennent le motif RRXFXK propre au système de sécrétion TAT (twin arginine translocation) en leur extrémité N-terminale. Ce système implique généralement des protéines capables de se lier à différents cofacteurs dans le cytoplasme où elles sont repliées avant d'être exportées. Ces protéines possèdent un peptide signal en N-terminale qui les dirige au bon endroit dans la cellule (ou à l'extérieur de la cellule) avant d'être clivé. En plus du motif RRXFXK, le peptide signal contient un motif AXA qui correspond au site de clivage. Le fait que la masse théorique de la protéine de *D. hafniense* soit de 61 kDa et que celle observée par SDS-PAGE pour *D. frappieri* soit de 57 kDa permet de supposer qu'un peptide signal est effectivement clivé. De plus, le profil peptidique observé chez *D. frappieri* ne couvre pas la partie N-terminale de la protéine de 61 kDa de *D. hafniense*, dans laquelle on retrouve d'ailleurs le motif TAT (RRXFXK), ainsi que quelques motifs AXA situés un peu plus loin qui pourraient correspondre au site de clivage. Il est donc plus que probable que la déshalogénase II soit régie par le système de sécrétion TAT. Comme un gène codant pour une protéine d'ancrage à la membrane (CprB/PceB) se trouve juste en amont du gène de la déshalogénase II (Villemur *et al.*, 2002), on peut supposer que la déshalogénase II est amenée vers cette dernière.

Une étude plus approfondie de la séquence obtenue pour la déshalogénase II révèle la présence de deux motifs suspectés d'être responsables de la liaison à des centres Fe/S. Le premier (FCXXCXXCXXXCP) est considéré comme celui qui permet la fixation d'un centre Fe₄S₄ (Bruschi et Guerlesquin, 1988), alors que le deuxième (CXXCXXXC) permettrait la fixation à un centre Fe₃S₄, étant précédé d'une glycine (GXXCXXCXXXC) (Von Wintzingerode *et al.* 2001). Ces résultats n'ont rien de surprenant, Villemur *et al.* (2002) ayant observé la présence des motifs FCXXCXXCXXXCP et CXXCXXXC dans le produit de tous les gènes *cprA* et *pceA* connus, ainsi que dans d'autres déshalogénases décrites antérieurement. La présence de centres Fe/S dans la déshalogénase II n'a pas encore été démontrée expérimentalement.

5.2 La protéine 54 kDa

L'étude comparative des gels après électrophorèse 2D des protéines cytoplasmiques de *D. frappieri* a permis d'observer l'induction d'une protéine de 54 kDa dans les cultures contenant du 3,5-DCP. Les résultats obtenus en spectrométrie de masse pour cette protéine ont permis de trouver le gène correspondant chez *D. hafniense*, et il s'est avéré que le produit de ce dernier partageait 51% d'identité et 66% de similarité avec l'uroporphyrinogène III synthase/méthyltransférase de *Selenomonas ruminantium* subsp. *ruminantium*.

Anderson, Entsch et McKay (2001) ont découvert l'uroporphyrinogène III synthase/méthyltransférase de *Selemonas ruminantium* subsp. *ruminantium* en clonant l'opéron chromosomique responsable des premières étapes de la synthèse de corrinoïdes chez *S. ruminantium*. Cinq cadres de lecture ouverts (*hemA*, *hemC*, *cobA+hemD*, *hemB* et *hemL*) ont été trouvés dans le fragment cloné, et toutes les séquences en acides aminés déduites de ces cadres de lecture partageaient des similarités avec des protéines impliquées dans la synthèse de porphyrines et de corrines. Cependant, le gène désigné *cobA+hemD* était particulier, puisque ce dernier codait pour une protéine ayant deux domaines catalytiques, soient l'uroporphyrinogène III synthase (HemD) et l'uroporphyrinogène III 2,7-méthyltransférase (CobA). Plus précisément, le segment CobA de *S. ruminantium* montrait 52% d'identité et 69% de similarité avec la protéine CobA de *Bacillus megaterium*, et le segment HemD montrait 33% d'identité et 50% de similarité avec la protéine HemD de *Bacillus subtilis*. C'est pourquoi les auteurs ont nommé cet enzyme bifonctionnel «uroporphyrinogène III synthase/méthyltransférase».

Le premier domaine catalytique, soit l'uroporphyrinogène III synthase, est responsable de la cyclisation de l'hydroxyméthylbilane. Cette réaction transforme l'hydroxyméthylbilane en uroporphyrinogène III. Le second domaine catalytique, soit l'uroporphyrinogène III 2,7-méthyltransférase, catalyse deux méthylations sur l'uroporphyrinogène III dans le but de la transformer en précorrène II. Ainsi, la protéine

CobA+HemD, ou l'uroporphyrinogène III synthase/méthyltransférase, a la capacité de convertir l'hydroxyméthylbilane en précorrène II.

Afin de vérifier que la protéine de 54 kDa de *D. frappieri* possède bien les deux domaines catalytiques décrits plus hauts, la séquence de son homologue de 54,8 kDa chez *D. hafniense* a fait l'objet d'une recherche dans la banque de données des familles de protéines (Protein families database of alignments and HMMs; <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>). Les résultats obtenus sont exactement les mêmes que pour l'uroporphyrinogène III synthase/méthyltransférase de *S. ruminantium*, c'est-à-dire que les domaines CobA et HemD ont été détectés en N- et C-terminal, respectivement. Plus précisément, le segment CobA de *D. hafniense* montre 55% d'identité et 72% de similarité avec la protéine CobA de *Bacillus megaterium*, et le segment HemD montre 32% d'identité et 48% de similarité avec la protéine HemD de *Bacillus subtilis*. Ces valeurs sont dans le même ordre que celles obtenues pour l'uroporphyrinogène III synthase/méthyltransférase de *S. ruminantium*. Ces résultats suggèrent que la protéine de 54 kDa induite dans le cytoplasme de *D. frappieri* PCP-1 lors de la déshalogénation du 3,5-DCP est un enzyme bifonctionnel, capable de transformer l'hydroxyméthylbilane en uroporphyrinogène III, puis en précorrène II. Ceci est doublement intéressant, puisque l'uroporphyrinogène III est un précurseur d'hèmes (cytochromes, myoglobine, etc.), alors que la précorrène II est un précurseur de cofacteurs corrinoïdes, tels que la vitamine B₁₂. En 1997, Louie *et al.* ont observé l'induction du cytochrome *c* lors de la déshalogénation du 3-chlorobenzoate chez *D. tiedjei*. Chez *D. frappieri*, l'induction d'une protéine CobA+HemD permet de supposer qu'un phénomène semblable se produit lors de la déshalogénation du 3,5-DCP. De plus, l'induction de la protéine CobA+HemD porte à croire qu'un cofacteur corrinoïde est également induit par le 3,5-DCP dans le but de s'associer à la partie protéique de la déshalogénase II.

Fait intéressant, la présence d'un enzyme bifonctionnel CobA+HemD n'a jusqu'à maintenant été observée que chez des organismes anaérobies stricts et fermentaires, soient *S. ruminantium*, *Clostridia josui*, *Clostridia perfringens* et *Paenibacillus macerans* (Anderson, Entsch et McKay, 2001). L'induction de la protéine 54 kDa chez *D. frappieri*

PCP-1 confirme cette observation, ce dernier étant également anaérobie strict et fermentaire.

5.3 Les protéines 31 et 36,5 kDa

L'analyse des gels obtenus après électrophorèse 2D des fractions cytoplasmique et membranaire provenant de bactéries PCP-1 cultivées en présence et en absence de 3,5-DCP a permis d'observer la répression des protéines 31 et 36 kDa. Ces dernières, qui étaient initialement présentes autant dans le cytoplasme que dans la membrane, ont été totalement réprimées dans les cultures effectuant la déshalogénation du 3,5-DCP.

Pour ces deux protéines, le profil peptidique et les séquences en acides aminés obtenus en spectrométrie de masse n'ont pas permis de retrouver la séquence protéique complète à partir du génome partiel de *D. hafniense*. Ceci n'est pas tellement surprenant puisqu'au moment de la rédaction de ce mémoire, seulement 66% du génome de *D. hafniense* est séquencé. Des essais ont également été faits pour retrouver les gènes correspondant chez d'autres espèces, mais sans résultats. Lorsque le séquençage du génome de *D. hafniense* sera complété, il sera alors certainement possible d'identifier les protéines 31 et 36,5 kDa. Quoi qu'il en soit, il est fort probable que ces dernières soient impliquées dans un processus métabolique entrant en compétition avec l'halorespiration.

5.4 La protéine 42 kDa

La répression d'une protéine cytoplasmique de 42 kDa dans les cultures contenant du 3,5-DCP a également pu être constatée lors de l'analyse des gels après électrophorèse 2D. Les résultats obtenus en spectrométrie de masse pour cette protéine ont permis de trouver le gène correspondant chez *D. hafniense*, et il s'est avéré que le produit de ce dernier partageait 42% d'identité et 62% de similarité avec la D-3-phosphoglycérate déshydrogénase de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

La D-3-Phosphoglycérate déshydrogénase est impliquée dans la biosynthèse de la sérine où elle catalyse la réduction réversible et stéréospécifique du 3-phospho-D-glycérate en 3-phosphohydroxypyruvate (Grant, 1989). La D-3-phosphoglycérate déshydrogénase fait partie de la famille des 2-hydroxyacide déshydrogénases NAD dépendantes isomère D spécifiques (Kochhar *et al.*, 1992). Toutes les oxydoréductases NAD dépendantes pour lesquelles la structure tertiaire a été déterminée possèdent un domaine $\beta\alpha\beta$ responsable de la liaison à la portion AMP du NAD. Le motif GXGXXG est associé à la présence de ce domaine. Alors que cette séquence conservée se situe à l'extrémité N-terminale chez la majorité des oxydoréductases NAD dépendantes, on la retrouve autour du 150^e acide aminé chez les membres de la famille des D-2-hydroxyacide déshydrogénases (Taguchi et Ohta, 1991).

Le domaine catalytique SerA (phosphoglycérate déshydrogénase) couvrant la quasi totalité de la protéine 42,3 kDa de *D. hafniense*, on peut supposer que son homologue chez *D. frappieri*, soit la protéine 42 kDa, est bien une phosphoglycérate déshydrogénase. Et puisque le motif GXGXXG se situe entre le 142^e et le 147^e acide aminé dans la séquence protéique de *D. hafniense*, on peut conclure que la protéine 42 kDa est isomère D spécifique. Ainsi, il semble que la protéine 42 kDa ait une fonction s'apparentant à une D-3-phosphoglycérate déshydrogénase, comme le suggèrent les résultats obtenus par comparaison avec les banques de données des protéines.

La répression d'une D-3-phosphoglycérate déshydrogénase chez *D. frappieri* lors de la déshalogénéation du 3,5-DCP pourrait peut être s'expliquer par l'hypothèse suivante. En absence de D-3-phosphoglycérate déshydrogénase, le 3P-D-glycérate serait disponible et métabolisé vers un autre composé qui agirait comme donneur d'électrons (ex le formate) lors de l'halorespiration en présence d'un chlorophénol. Ainsi, un plus grand nombre de molécules par exemple de formate serait produit pour être ensuite oxydée par la formate déshydrogénase (**figure 26**). On sait que le formate est utilisé comme source de carbone et de donneurs d'électrons chez *D. frappieri* et *D. hafniense* en présence d'As(V) comme accepteur d'électrons (Niggemyer et al, 2001). Le succinate, le fumarate et le lactate peuvent aussi agir comme donneurs d'électrons.

Selon un modèle suggéré pour l'halorespiration chez *D. tiedjei*, l'action de la formate déshydrogénase serait en partie responsable du maintien du gradient d'oxydoréduction entraînant la production d'ATP. Pendant que l'oxydation du formate libère des protons dans le périplasme, la réduction du composé halogéné par la déshalogénase consomme des protons dans le cytoplasme, ce qui génère une force protomotrice. Les électrons relâchés par la formate déshydrogénase sont transportés de l'autre côté de la membrane via le cytochrome *c* et la quinone, jusqu'à la déshalogénase. Enfin, la force protomotrice générée par le processus entraîne la production d'ATP par une ATPase (Louie et Mohn, 1999).

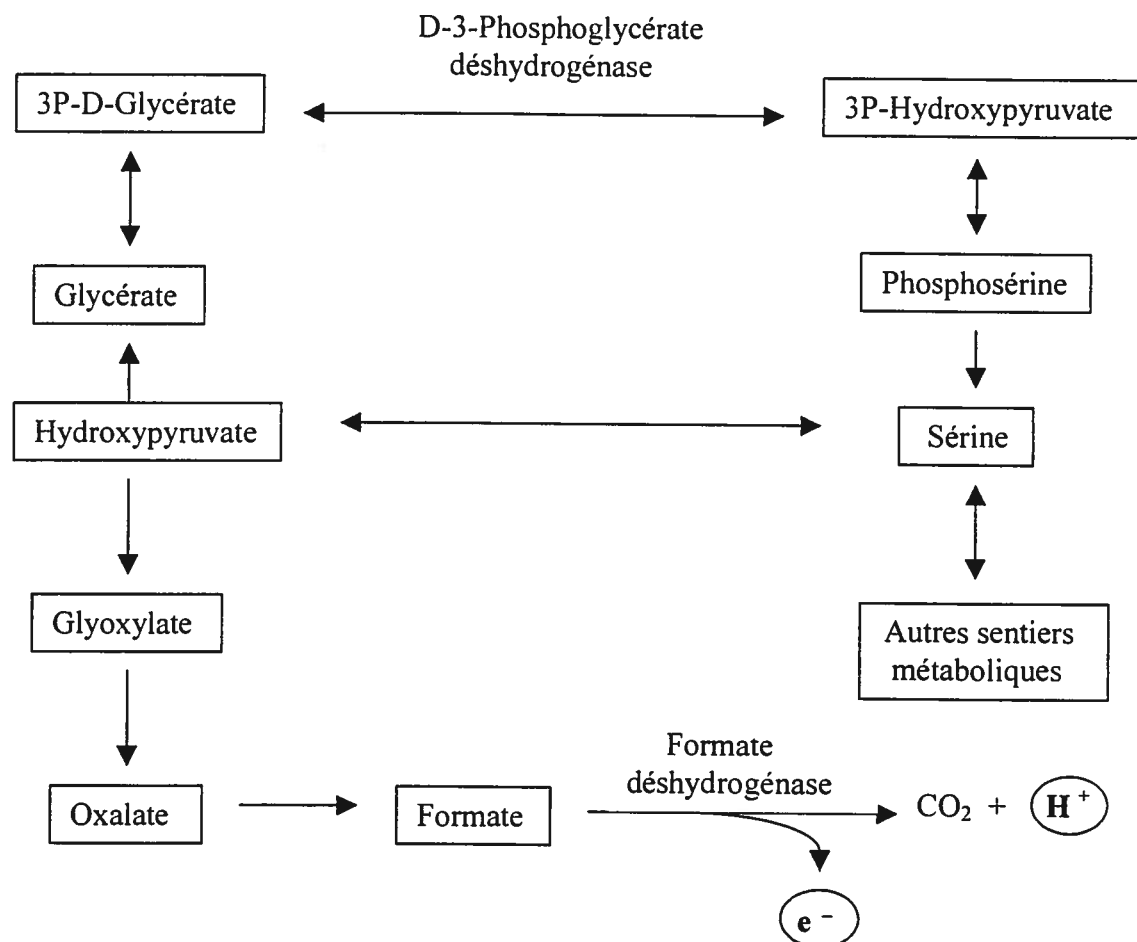


Figure 26: Sentier proposé pour le métabolisme du formate et de la sérine chez *D. hafniense* (<http://genome.ornl.gov/keggmaps/dhaf/15jun01/html/map01100.html>).

La répression de la protéine 42 kDa par *D. frappieri* pourrait entraîner la formation de composés (ex. le formate) qui agiraient comme donneurs d'électrons favorisant ainsi le processus d'halorespiration en présence de 3,5-DCP comme accepteur des électrons. Toutefois une étude plus approfondie de l'halorespiration chez *D. frappieri* est nécessaire pour connaître les mécanismes impliqués et confirmer nos hypothèses.

5.5 La protéine 53 kDa

L'analyse des fractions membranaires provenant de cultures induite et non-induite au 3,5-DCP montre que les trois isoformes de la protéine 53 kDa sont présents dans les deux cultures, mais en plus grande quantité lors de la déshalogénation du 3,5-DCP. Une recherche comparative dans les banques de données a révélé que l'homologue de la protéine 53 kDa chez *D. hafniense* partageait 86% de similarité avec un précurseur putatif de la grande sous-unité d'une hydrogénase Ni/Fe chez *Desulfitobacterium dehalogenans*.

En raison du pourcentage élevé de similarité de son homologue chez *D. hafniense* avec le précurseur putatif de la grande sous-unité d'une hydrogénase Ni/Fe chez *Desulfitobacterium dehalogenans*, on peut supposer que la protéine membranaire de 53 kDa induite chez *D. frappieri* est également un précurseur de la grande sous-unité d'une hydrogénase Ni/Fe. Le fait que le motif CXXC propre aux grandes sous-unités des hydrogénases ait été retrouvé à l'extrémité N-terminale du produit du gène *Desu7176*, ainsi qu'à l'extrémité C- terminale du produit du gène *Desu6783* chez *D. hafniense*, vient confirmer cette hypothèse.

Les hydrogénases catalysent l'oxydation de l'hydrogène moléculaire (H_2) et jouent un rôle vital dans le métabolisme anaérobie. Les hydrogénases contenant des métaux sont divisées en trois classes: Fer, Ni/Fe et Ni/Fe/Se. Les hydrogénases Fe/Ni isolées catalysent l'oxydation et la réduction du H_2 , avec des cytochromes multi-hèmes de faible potentiel tels que le cytochrome c_3 , qui agit comme donneur ou accepteur d'électron, dépendant de son état d'oxydation. Les hydrogénases Ni/Fe sont des protéines

hétérodimériques composées d'une grande et une petite sous-unité. Alors que la grande sous-unité contient le centre Fe/Ni, la petite sous-unité possède des centres Fe/S. Toutes les grandes sous-unités connues à ce jour semblent être reliées par l'évolution (Menon *et al.*, 1990) et contiennent deux motifs CXXC; un à l'extrémité N-terminale, et l'autre à l'extrémité C-terminale. Ces quatre cystéines sont impliquées dans la liaison avec l'atome de Nickel (Volbeda *et al.*, 1995). Il n'y a pas de consensus sur le mécanisme catalytique de l'hydrogénase Ni/Fe. Un mécanisme de transport d'électron du site actif Ni au cytochrome c_3 en passant par les centres Fe/S a cependant été suggéré.

L'induction du précurseur de la grande sous-unité d'une hydrogénase lors de la déshalogénation du 3,5-DCP chez *D. frappieri* n'a rien de surprenant. Selon le modèle d'halorespiration proposé par Louie et Mohn (1999) chez *Desulfomonile tiedjei* DCB-1, l'hydrogénase serait, tout comme la formate déshydrogénase, responsable du maintien du gradient d'oxydoréduction entraînant la production d'ATP. Pendant que l'oxydation de l'hydrogène moléculaire libère des protons dans le périplasma, la réduction du composé halogéné par la déshalogénase consomme des protons dans le cytoplasme, ce qui génère une force protomotrice. Les électrons relâchés par l'hydrogénase sont transportés de l'autre côté de la membrane via le cytochrome *c* et la quinone, jusqu'à la déshalogénase. Enfin, la force protomotrice générée par le processus entraîne la production d'ATP. L'induction de la protéine 53 kDa serait donc un autre moyen pris par *D. frappieri* PCP-1 pour favoriser le processus d'halorespiration lors de la déshalogénation du 3,5-DCP.

Le centre Fe/Ni de la grande sous-unité pourrait être impliqué dans différents stades de maturation, possiblement représentés par les différentes isoformes observées. Les empreintes peptidiques obtenues en spectrométrie de masse étant identiques pour les deux isoformes ayant été analysées, il n'a pas été possible de déterminer la nature de leurs différences. Tout comme pour les isoformes de la déshalogénase II, les peptides portant les modifications n'ont probablement pas été détectés en spectrométrie de masse, leur valeur de m/z étant en dehors de la plage sélectionnée, ou n'ayant pas été ionisés en quantité suffisante.

5.6 La protéine 42,5 kDa

L'induction d'une protéine membranaire sous deux isoformes de 42,5 kDa a également pu être constatée lors de l'analyse des gels après électrophorèse 2D. Les résultats obtenus en spectrométrie de masse pour cette protéine ont permis de trouver le gène correspondant chez *D. hafniense*, et il s'est avéré que le produit de ce dernier partageait 54% d'identité et 73% de similarité avec la sous-unité d'une hydrogénase chez *Fusobacterium nucleatum* subsp. *vincentii*. Tout comme la protéine de *F. nucleatum*, la séquence protéique retrouvée chez *D. hafniense* présente deux motifs suspectés être responsables de la liaison à des centres Fe/S. À la lumière de ces faits, on peut supposer que ces deux protéines ont des fonctions similaires et émettre l'hypothèse que la protéine 42,5 kDa est une sous-unité d'hydrogénase. En fait, il pourrait s'agir de la petite sous-unité de l'hydrogénase Fe/Ni.

En considérant le fait qu'un précurseur de la grande sous-unité d'une hydrogénase Ni/Fe est induit par le 3,5-DCP (section 5.5), on peut penser qu'il en va de même pour la petite sous-unité de cette même hydrogénase. Comme il a été mentionné dans la section précédente, la petite sous-unité des hydrogénases Fe/Ni possède des centres Fe/S. Le fait que des motifs suspectés être responsables de la liaison à centres Fe/S aient été retrouvés dans le produit du gène correspondant à la protéine 42,5 kDa chez *D. hafniense* vient appuyer l'hypothèse selon laquelle la protéine 42,5 kDa serait la petite sous-unité de l'hydrogénase Fe/Ni. Toutefois, une étude plus poussée de l'hydrogénase Fe/Ni présente chez *D. hafniense* et *D. frappieri* serait nécessaire pour confirmer ces hypothèses.

Une erreur expérimentale pourrait être à l'origine de la différence de masse observée entre le produit du gène retrouvé chez *D. hafniense* (49,3 kDa) et la protéine observée chez *D. frappieri* (42,5 kDa). Il est également possible que la protéine mature soit plus petite chez *D. frappieri*.

Les centres Fe/S de la petite sous-unité pourraient être impliqués dans différents stades de maturation, possiblement représentés par les deux isoformes observés. Les

empreintes peptidiques obtenues en spectrométrie de masse étant identiques pour les deux isoformes, il n'a pas été possible de déterminer la nature de leurs différences. Tout comme pour les isoformes de la déshalogénase II et la protéine 53 kDa, les peptides portant les modifications n'ont probablement pas été détectés en spectrométrie de masse, leur valeur de m/z étant en dehors de la plage sélectionnée, ou n'ayant pas été ionisés en quantité suffisante.

6 Conclusion

L'utilisation de micro-organismes anaérobies capables d'effectuer l'halorespiration semble une solution prometteuse pour la restauration des sols et le traitement d'effluents contaminés par des composés organiques halogénés. Cependant, nos connaissances sur les mécanismes impliqués lors de la déshalogénation réductrice et l'halorespiration en conditions anaérobies sont encore très limitées à ce jour. C'est pourquoi il nous a semblé essentiel d'aller de l'avant dans l'étude de ces mécanismes afin d'obtenir une meilleure compréhension et une plus grande efficacité des biotraitements anaérobies. Parce qu'elle a l'avantage de permettre l'étude des systèmes biologiques de façon globale, c'est la protéomique qui a été utilisée pour réaliser l'étude sur *D. frappieri* PCP-1 lors de la déshalogénation en position *meta* du 3,5-DCP. Les travaux effectués auront permis d'identifier différentes protéines induites et réprimées par le 3,5-DCP. Ces dernières, ainsi que la déshalogénase II purifiée, ont été caractérisées par spectrométrie de masse.

Les résultats obtenus pour la déshalogénase II purifiée ont révélé que l'enzyme est similaire à plusieurs déshalogénases réductrices PceA/CprA et que, tout comme la majorité des déshalogénases réductrices, elle pourrait être régie par le système de sécrétion TAT. Notre étude protéomique utilisant l'électrophorèse en deux dimensions des préparations cytoplasmique et d'extrait des membranes a confirmé que la synthèse de la déshalogénase II était effectuée uniquement dans les cultures des bactéries PCP-1 contenant du 3,5-DCP qui agirait comme inducteur. La présence de la déshalogénase II dans la membrane et dans le cytoplasme laisse croire que cette enzyme pourrait être liée à la membrane de façon non-intégrale via une protéine d'ancrage telle que démontré pour les déshalogénases. Des études ultérieures sur les isoformes de la déshalogénase II se retrouvant le cytoplasme et la membrane seront nécessaires pour évaluer leur activité respective.

D'autre part, l'étude comparative des gels après électrophorèse 2D a permis d'observer l'induction des protéines 54, 53 et 42,5 kDa et la répression des protéines 31, 36,5 et 42 kDa. Alors que la protéine de 53 kDa induite dans la membrane serait le précurseur de la grande sous-unité d'une hydrogénase Ni/Fe, la protéine de 42,5 kDa, également induite dans la membrane, pourrait être la petite sous-unité de cette même

hydrogénase. Pour ce qui est de la protéine de 54 kDa induite dans le cytoplasme, elle a été identifiée comme étant possiblement une uroporphyrinogène III synthase/méthyltransférase. Il semble que la protéine cytoplasmique et réprimée de 42 kDa soit, quant à elle, apparentée à une D-3-phosphoglycérate déshydrogénase. Pour ce qui est des protéines 31 et 36,5 kDa dont la répression a été observée autant dans le cytoplasme que dans la membrane, il n'a pas été possible de les identifier puisqu'aucune corrélation n'a été trouvée avec les protéines répertoriées dans les banques de données, ni dans le génome de *D. hafniense*.

L'hydrogénase Fe/Ni catalyse l'oxydation et la réduction du H₂, en association avec des cytochromes multi-hèmes de faible potentiel tels que le cytochrome c₃. L'induction d'une hydrogénase lors de la déshalogénation du 3,5-DCP chez *D. frappieri* rejoint le modèle d'halorespiration proposé par Louie et Mohn (1999) chez *Desulfomonile tiedjei* DCB-1. Selon ce modèle l'hydrogénase serait, tout comme la formate déshydrogénase, responsable du maintien du gradient de protons entraînant la production d'ATP.

La D-3-phosphoglycérate déshydrogénase est impliquée dans la biosynthèse de la sérine, où elle catalyse la réduction réversible et stéréospécifique du 3-phospho-D-glycérate en 3-phosphohydroxypyruvate. En absence de cette enzyme, le 3P-D-glycérate serait métabolisé vers un autre composé, soit le formate, qui agirait comme donneur d'électrons lors de l'halorespiration. Des travaux ultérieurs sont toutefois nécessaires afin de confirmer ces hypothèses.

L'uroporphyrinogène III synthase/méthyltransférase est une enzyme bifonctionnelle impliquée à la fois dans la synthèse de précurseurs d'hèmes (tels que les cytochromes) et de cofacteurs corrinoïdes. En 1997, Louie *et al.* ont observé l'induction du cytochrome *c* lors de la déshalogénation du 3-chlorobenzoate chez *D. tiedjei*. Chez *D. frappieri*, l'induction de l'uroporphyrinogène III synthase/méthyltransférase permet de supposer qu'un phénomène semblable se produit lors de la déshalogénation du 3,5-DCP. D'ailleurs, l'hydrogénase Fe/Ni a absolument besoin d'un cytochrome pour fonctionner.

L'induction de l'enzyme bifonctionnel porte également à croire qu'un cofacteur corrinoïde est induit par le 3.5-DCP dans le but de s'associer à la partie protéique de la déshalogénase II. Comme on le sait, un cofacteur corrinoïde est associé à la partie protéique de la déshalogénase II et est nécessaire à son activité.

Il est malheureux que nous n'ayons pas pu identifier les protéines réprimées de 31 et 36,5 kDa. Au moment de la rédaction de ce mémoire, seulement 66% du génome de *D. hafniense* a été séquencé. Il sera certainement possible de procéder à l'identification quand le séquençage sera complété. Quoi qu'il en soit, il est fort probable que ces protéines soient impliquées dans un processus métabolique entrant en compétition avec l'halorespiration.

Les résultats obtenus ont permis d'identifier quelques protéines impliquées dans la déshalogénéation réductrice et l'halorespiration chez *D. frappieri* PCP-1. Il serait intéressant de poursuivre les recherches en ce sens. Puisque la détection des protéines est dépendante des méthodes de solubilisation (entre autres), l'utilisation de nouveaux chaotropes, surfactants et agents réducteurs (décrits à la section 2.4.4.2.2.1) pourrait être envisagée. Des études subséquentes à ce travail pourraient également s'orienter vers la caractérisation des protéines déjà identifiées afin de pouvoir les localiser dans la cellule et évaluer le mécanisme de l'halorespiration chez *D. frappieri* en fonction des modèles déjà connus.

Bibliographie

AEBERSOLD, R. H., D. B. TEPLow, L. E. HOOD et S. B. KENT. 1986. Electroblotting onto activated glass. High efficiency preparation of proteins from analytical sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels for direct sequence analysis. J. Biol. Chem. **261** : 4229-4238.

AEBERSOLD, R. H., J. LEAVITT, R. A. SAAVEDRA, L. E. HOOD, et S. B. KENT. 1987. Internal amino acid sequence analysis of proteins separated by one- or two-dimensional gel electrophoresis after in situ protease digestion on nitrocellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84** : 6970-6974.

ANDERSEN, J. S., et M. MANN. 2000. Functional genomics by mass spectrometry. FEBS Lett. **480** : 25-31.

ANDERSON, L. et J. SEILHAMER. 1997. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. Electrophoresis **18** : 533-537.

ANDERSON, N. G. et N. L. ANDERSON. 1996. Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future. Electrophoresis. **17** : 443-453.

ANDERSON, P. J., B. ENTSCH et D. B. McKAY. 2001. A gene, *cobA+hemD*, from *Selenomonas ruminantium* encodes a bifunctional enzyme involved in the synthesis of vitamin B₁₂. Gene. **281** : 63-70.

APPEL, R. D., P. M. PALAGI, D. WALTHER, J. R. VARGAS, J. C. SANCHEZ, F. RAVIER, C. PASQUALI et D. F. HOCHSTRASSER. 1997. Melanie II--a third-generation software package for analysis of two-dimensional electrophoresis images: I. Features and user interface. Electrophoresis. **18** : 2724-34.

BEAUDET, R., G. MCSWEEN, G. LÉPINE, S. MILOT et J. G. BISAILLON. 1997. Anaerobic biodegradation of pentachlorophenol in a liquor obtained after extraction of contaminated chips and wood powder. J. Appl. Microbiol. **82** : 186-190.

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

BERKS, B. C., F. SARGENT et T. PALMER. 2000. The Tat protein export pathway. Mol. Microbiol. **22** : 393-404.

BERTUCCI, F. 2002. Apport de la protéomique au dépistage du cancer de l'ovaire. Bulletin du Cancer. **89** : 658-660.

BLUM, J., H. BEIER et H. J. GROSS. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis. **8** : 93-98.

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

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

BOYER, A. 1999. Étude des déshalogénases I et II produites par *Desulfitobacterium frappieri* souche PCP-1. Mémoire de maîtrise, Ville de Laval, INRS-Institut Armand-Frappier.

BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72** : 248-54.

BREITENSTEIN, A., A. SAANO, M. SALKINOJA-SALONEN, J. R. ANDREESSEN et U. LECHNER. 2001. Analysis of a 2,4,6-trichlorophenol-dehalogenating enrichment culture and isolation of the dehalogenating member *Desulfitobacterium frappieri* strain TCP-A. Arch. Microbiol. **175** : 133-142.

BRODER, S. et J. C. VENTER. 2000. Sequencing the entire genomes of free-living organisms: the foundation of pharmacology in the new millenium. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **40** : 97-132.

BRUSCHI, M. et F. GUERLESQUIN. 1988. Structure, function and evolution of bacterial ferredoxins. FEMS Microbiol. Rev. **4** : 155-175.

CELIS, J. E., M. KRUHOFFER, I. GROMOVA, C. FREDERIKSEN, M. OSTERGAARD, T. THYKJAER, P. GROMOV, J. YU, H. PALSDOTTIR, N. MAGNUSSON et T. F. ORNTOFT. 2000. Gene expression profiling: monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics. FEBS Lett. **480** : 2-16.

CELIS, J. E., P. GROMOV, M. OSTERGAARD, P. MADSEN, B. HONORE, K. DEJGAARD, E. OLSEN, H. VORUM, D. B. KRISTENSEN, I. GROMOVA, A. HAUNSO, J. VAN DAMME, M. PUYPE, J. VANDEKERCKHOVE et H. H. RASMUSSEN. 1996. Human 2-D PAGE databases for proteome analysis in health and disease: <http://biobase.dk/cgi-bin/celis>. FEBS Lett. **398** : 129-134.

CHAMBERS, G., L. LAWRIE, P. CASH et G. I. MURRAY. 2000. Proteomics: a new approach to the study of disease. J. Pathol. **192** : 280-288.

CHEVALLET, M., V. SANTONI, A. POINAS, D. ROUQUIE, A. FUCHS, S. KIEFFER, M. ROSSIGNOL, J. LUNARDI, J. GARIN et T. RABILLOUD. 1998. New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. Electrophoresis **19** : 1901-1909.

CHRISTIANSEN, N. et B. K. AHRING. 1998. *Desulfitobacterium hafniense* sp. nov., an anaerobic, reductively dechlorinating bacterium. Int. J. Syst. Bacteriol. **46** : 442-448.

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

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

CUTLER, P. H. BIRRELL, M. HARAN, W. MAN, B. NEVILLE, S. ROSIER, M. SKEHEL et I. WHITE. 1999. Proteomics in pharmaceutical research and development. Biochem. Soc. Trans. **27** : 555-559.

DAMBOSKY, J. 1999. Tetrachloroethene-dehalogenating bacteria. Folia. Microbiol. **44** : 247-262.

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

DE WEERD, K. A., L. MANDELCO, R. S. TANNER, C. R. WOESE et J. M. SUFLITA. 1990. *Desulfomonile tiedjei* gen. nov. and sp. nov., a novel anaerobic, dehalogenating, sulfate-reducing bacterium. Arch. Microbiol. **154** : 23-30.

DOLFING, J. et J. M. TIEDJE. 1986. Hydrogen cycling in a three-tiered food web growing on the methanogenic conversion of 3-chlorobenzoate. FEMS Microbiol. Ecol. **38** : 293-298.

EDMAN, P. 1949. A method for the determination of the amino acid sequence of peptides. Arch. Biochem. Biophys. **22** : 475-483.

EKSTROM, S., P. ONNERFJORD, J. NILSSON, M. BENGTSSON, T. LAURELL et G. MARKO-VARGA. 2000. Integrated microanalytical technology enabling rapid and automated protein identification. Anal. Chem. **72** : 286-293.

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

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

FENN, J. B., M. MANN, C. K. MENG, S. F. WONG et C. M. WHITEHOUSE. 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. Science **246**: 64-71.

FETZNER, S. 1998. Bacterial dehalogenation. Appl. Microbiol. Biotechnol. **50** : 633-657.

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

FEY S. J. et P. M. LARSEN. 2001. 2D or not 2D. Curr. Opin. Chem Biol. **5** : 26-33.

FLEISCHMANN, R. D., M. D. ADAMS, O. WHITE, R. A. CLAYTON, E. F. KIRKNESS, A. R. KERLAVAGE, C. J. BULT, J. F. TOMB, B. A. DOUGHERTY, J. M.

MERRICK, *et al.* 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. Science **269** : 496-512.

FOUNTOULAKIS, M., M. F. TAKACS, P. BERNDT, H. LANGEN et B. TAKACS. 1999. Enrichment of low abundance proteins of *Escherichia coli* by hydroxyapatite chromatography. Electrophoresis. **20** : 2181-2195.

GERRITSE, J., V. RENARD, T. M. PEDRO, P. A. LAWSON, M. D. COLLINS et J. C. GOTTSCHAL. 1996. *Desulfitobacterium* sp. strain PCE1, an anaerobic bacterium that can grow by reductive dechlorination of tetrachloroethene or ortho-chlorinated phenols. Arch. Microbiol. **165** : 132-140.

GERRITSE, J., O. DRZYZGA, G. KLOETSRA, M. KEIJMEL, L. WIERSUM, R. HUTSON, M. D. COLLINS et J. C. GOTTSCHAL. 1999. Influence of different electron donors and acceptors on dehalorespiration of tetrachloroethene by *Desulfitobacterium frappieri* TCE1. Appl. Environ. Microbiol. **65** : 5212-5221.

GIANAZZA, E., T. RABILLOUD, L. QUAGLIA, P. CACCIA, S. ASTRUA-TESTORI, L. OSIO, G. GRAZIOLI et P. G. RIGHETTI. 1987. Additives for immobilized pH gradient two-dimensional separation of particulate material: comparison between commercial and new synthetic detergents. Anal. Biochem. **165** : 247-257.

GOFFEAU, A., B. G. BARRELL, H. BUSSEY, R. W. DAVIS, B. DUJON, H. FELDMANN, F. GALIBERT, J. D. HOHEISEL, C. JACQ, M. JOHNSTON, E. J. LOUIS, H. W. MEWES, Y. MURAKAMI, P. PHILIPPSSEN, H. TETTELIN et S. G. OLIVIER. 1996. Life with 6000 genes. Science **274** : 546, 563-567.

GRANT, G. A. 1989. A new family of 2-hydroxyacid dehydrogenases. Biochem. Biophys. Res. Comm. **165** : 1371-1374.

GRAVES, P. R. et T. A. J. HAYSTEAD. 2002. Molecular biologist's guide to proteomics. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **66** : 39-63.

GRIBBLE, G. W. 1994. The natural production of chlorinated compounds. Environ. Sci. Technol. **28** : 310A-319A.

GRIBBLE, G. W. 1996. Naturally occurring organohalogen compounds – a comprehensive survey. Prog. Org. Nat. Prod. **68** : 1-498.

GYGI, S.P. et R. AEBERSOLD. 2000. Mass spectrometry and proteomics. Curr. Opin. Chem. Biol. **4** : 489-494.

GYGI, S. P., G. L. CORTHALS, Y. ZHAN, Y. ROCHON et R. AEBERSOLD. 2000. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. PNAS. **97** : 9390-9395.

GYGI, S.P., B. RIST et R. AEBERSOLD. 2000. Measuring gene expression by quantitative proteome analysis. Curr. Opin. Biotechnol. **11** : 396-401.

GYGI, S.P., Y. ROCHON, B. R. FRANZA et R. AEBERSOLD. 1999. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. Mol. Cell. Biol. **19** : 1720-1730.

HARRINGTON, M. J., J. A. COFFMAN, F. J. CALZONE, L. E. HOOD, R. J. BRITTEN et E. H. DAVIDSON. 1992. Complexity of sea urchin embryo nuclear proteins that contain basic domains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89** : 6252-6256.

HARRY, J. L., M. R. WILKINS, B. R. HERBERT, N. H. PACKER, A. A. GOOLEY et K. L. WILLIAMS. 2000. Proteomics: Capacity versus utility. Electrophoresis. **21** : 1071-1081.

HAYNES, P. A. et J. R. YATES III. 2000. Proteome profiling-pitfalls and progress. Yeast. **17** : 81-87.

HERBERT, B. R., M. P. MOLLOY, A. A. GOOLEY, B. J. WALSH, W. G. BRYSON et K. L. WILLIAMS. 1998. Improved protein solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent. Electrophoresis. **19** : 845-851.

HOLLIGER, C., D. HAHN, H. HARMSSEN, W. LUDWIG, W. SCHUMACHER, B. TINDALL, F. VAZQUEZ, N. WEISS et A. J. B. ZEHNDER. 1998. Dehalobacter restrictus gen. nov. and sp. nov., a strictly anaerobic bacterium that reductively dechlorinates tetra- and trichloroethene in an anaerobic respiration. Arch. Microbiol. **169** : 313-321.

HOLLIGER, C., G. WOHLFARTH et G. DIEKERT. 1999. Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. FEMS Microbiol. Rev. **22** : 383-398.

JONES, M. N. 1999. Surfactants in membrane solubilisation. Int. J. Pharm. **177** : 137-139.

JUNG, E., M. HELLER, J.-C. SANCHEZ et D. F. HOCHSTRASSER. 2000. Proteomics meets cell biology: the establishment of subcellular proteomics. Electrophoresis. **21**: 3369-3377.

JUTEAU, P., R. BEAUDET, G. MCSWEEN, F. LÉPINE, S. MILOT et J.-G. BISAILLON. 1995a. Study of reductive dechlorination of pentachlorophenol by a methanogenic consortium. Can. J. Microbiol. **41** : 862-868.

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

KARAS, M. et F. HILLENKAMP. 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. Anal. Chem. **60** : 2299-2301.

KLOSE, J. 1975. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. Humangenetik. **26** : 231-243.

KLOSE, J. et U. KOBALZ. 1995. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. Electrophoresis. **16** : 1034-1059.

KOCHHAR, S., P. E. HUNZIKER, P. LEONG-MORGENTHALER et H. HOTTINGER. 1992. Evolutionary relationship of NAD⁺-dependent D-lactate dehydrogenase: comparison of primary structure of 2-hydroxy acid dehydrogenases. Biochem. Biophys. Res. Comm. **184** : 60-66.

KRASOTKINA, J., T. WALTERS, K. A. MARUYA et S. W. RAGSDALE. 2001. Characterization of the B₁₂- and iron-sulfur-containing reductive dehalogenase from *Desulfitobacterium chlororespirans*. J. Biol. Chem. **276** : 40991-40997.

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

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

LAHM, H.-W. et H. LANGEN. 2000. Mass spectrometry: a tool for the identification of proteins separated by gels. Electrophoresis. **21** : 2105-2114.

LANTHIER, M., R. VILLEMUR, F. LÉPINE, J.-G. BISAILLON et R. BEAUDET. 2000. Monitoring of *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 in pentachlorophenol-degrading anaerobic soil slurry reactors. Environ. Microbiol. **2** : 703-708.

LANTHIER, M., R. VILLEMUR, F. LÉPINE, J. G. BISAILLON, R. BEAUDET. 2001. Geographic distribution of *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 and *Desulfitobacterium* spp. in soils from the province of Quebec, Canada. FEMS Microbiology Ecology. **36** : 185-191.

LINK, A. J., K. ROBINSON et G. M. CHURCH. 1997. Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12. Electrophoresis. **18** : 1259-1313.

LINK, A., J. ENG, D. M. SHIELTZ, E. CARMACK, G. J. MIZE, D. R. MORRIS, B. M. GARVIK et J. R. YATES III. 1999. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. Nat. Biotechnol. **17** : 676-682.

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

LOPEZ, M. F., K. BERGGREN, E. CHERNOKALSKAYA, A. LAZAREV, M. ROBINSON et W. F. PATTON. 2000. A comparison of silver stain and SYPRO Ruby Protein Gel Stain with respect to protein detection in two-dimensional gels and identification by peptide mass profiling. Electrophoresis. **21** : 3673-3683.

LOTTSPEICH, F. 1999. Proteome analysis: a pathway to the functional analysis of proteins. Angew. Chem. Int. Ed. **38** : 2476-2492.

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

LOUIE, T. M., S. H. NI, L. XUN et W. W. MOHN. 1997. Purification, characterization and gene sequence analysis of a novel cytochrome *c* co-induced with reductive dechlorination in *Desulfomonile tiedjei* DCB-1. Arch. Microbiol. **168** : 520-527.

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

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

MAGNUSON, J. K., R. V. STERN, J. M. GOSSET et S. H. ZINDER. 1998. Reductive dechlorination of tetrachloroethene to ethene by a two-component enzyme pathway. Appl. Environ. Microbiol. **58** : 2874-2878.

MAGNUSON, J. K., M. F. ROMINE, D. R. BURRIS et M. T. KINGLSEY. 2000. Trichloroethene reductive dehalogenase from *Dehalococcoides ethenogenes*: sequence of *tceA* and substrate range characterization. Appl. Environ. Microbiol. **66** : 5141-5147.

MANN, M., R. H. HENDRICKSON et A. PANDEY. 2001. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. Annu. Rev. Biochem. **70** : 437-473.

MATSUI, N. M., D. M. SMITH-BECKERMAN et L. B. EPSTEIN. 1999. Staining of preparative 2-D gels. Coomassie blue and imidazole-zinc negative staining. Methods Mol. Biol. **112** : 307-11.

MAYMÓ-GATELL, X., T. ANGUISH et S. H. ZINDER. 1999. Reductive dechlorination of chlorinated ethenes and 1,2-dichloroethane by "*Dehalococcoides ethenogenes*" 195. Appl. Environ. Microbiol. **65** : 3108-3113.

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

McDONALD, W. H. et J. R. YATES III. 2000. Proteomic tools for cell biology. Traffic. **1** : 747-754.

MENON, N. K., J. ROBBINS, H. D. PECK JR, C. Y. CHATELUS, E. S. CHOI et A. E. PRZYBYLA. 1990. Cloning and sequencing of a putative *Escherichia coli* [NiFe] hydrogenase-1 operon containing six open reading frames. J. Bacteriol. **174**: 1969-1977.

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

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

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

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

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

MOLLOY, M. P., B. R. HERBERT, B. J. WALSH, M. I. TYLER, M. TRAINI, J. C. SANCHEZ, D. F. HOCHSTRASSER, K. I. WILLIAMS et A. A. GOOLEY. 1998. Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. Electrophoresis. **19** : 837-44.

MOLLOY, M. P., B. R. HERBERT, M. B. SLADE, T. RABILLOUD, A. S. NOUWENS, K. L. WILLIAMS et A. A. GOOLEY. 2000. Proteomic analysis of the *Escherichia coli* outer membrane. Eur. J. Biochem. **267** : 2871-2881.

MÜLLER, E.-C., M. SCHUMANN, A. RICKERS, K. BOMMERT, B. WITTMANN-LIEBOLD et A. OTTO. 1999. Study of Burkitt lymphoma cell line proteins by high resolution two-dimensional gel electrophoresis and nanoelectrospray mass spectrometry. Electrophoresis. **20** : 320-330.

NEUMANN, A., A. SIEBERT, T. TRESCHER, S. REINHARDT, G. WOHLFARTH et G. DIEKERT. 2002. Tetrachloroethene reductive dehalogenase of *Dehalospirillum multivorans*: substrate specificity of the native enzyme and its corrinoid cofactor. Arch. Microbiol. **177** : 420-426.

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

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

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

NIGGEMYER, A. S., E. SPRING, E. STACKEBRANDT et R. F. ROSENZWEIG. 2001. Isolation and characterization of a novel As(V)-reducing bacterium: implications for arsenic mobilization and the genus *Desulfitobacterium*. Appl. Environ. Microbiol. **67** : 5568-5580.

O'FARRELL, P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. **250** : 4007-4021.

PAGÉ-BÉLANGER, R. 2002. Étude protéomique de *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 lors de l'induction pour la déshalogénation réductrice en position ortho du 2,4,6-TCP. Mémoire de maîtrise, Ville de Laval, INRS-Institut Armand-Frappier.

PANDEY, A. et F. LEWITTER. 1999. Nucleotide sequence databases: a gold mine for biologists. Trends Biochem. Sci. **24** : 276-280.

PANDEY, A. et M. MANN. 2000. Proteomics to study genes and genomes. Nature. **405** : 837-846.

PAPPIN, D. J. C. et D. N. PERKINS. 1999. An integrated search engine for protein identification using mass spectrometry. Affiche présentée au congrès de l'ABRF («Bioinformatics and Biomolecular Technologies: Linking Genomes, Proteomes and Biochemistry») à Durham en Caroline du Nord.

PARKER, K. C., J. I. GARRELS, W. HINES, E. M. BUTLER, A. H. MCKEE, D. PATTERSON et S. MARTIN. 1998. Identification of yeast proteins from two-dimensional gels: working out spot cross-contamination. Electrophoresis. **19** : 1920-1932.

PASQUALI, C., I. FIALKA, et L. A. HUBER. 1999. Subcellular fractionation, electromigration analysis and mapping of organelles. J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. **722** : 89-102.

PAULSEN I. I., M. K. SLIWINSKI, B. NELISSEN, B. GOFFEAU et M. H. SAIER JR. 1998. Unified inventory of established and putative transporters encoded within the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS lett. **430** : 115-125.

PETRICORN III, E. F., D. K. ORNSTEIN, C. P. PAWELETZ, A. ARDEKANI, P. S. HACKETT, B. A. HITT, A. VELASSCO, C. TRUCCO, L. WIEGAND, K. WOOD, C. B. SIMONE, P. J. LEVINE, W. M. LINEHAN, M. R. EMMERT-BUCK, S. M. STEINBERG, E. C. KOHN et L. A. LIOTTA. 2002. Serum proteomic patterns for detection of prostate cancer. J. Natl. Cancer Inst. **94** : 1576-1578.

QIN, J., D. FENYO, Y. ZHAO, W. W. HALL, D. M. CHAO, C. J. WILSON, R. A. YOUNG et B. T. CHAIT. 1997. A strategy for rapid, high-confidence protein identification. Anal. Chem. **69** : 3995-4001.

QUADRONI, M. et P. JAMES. 1999. Proteomics and automation. Electrophoresis. **20** : 664-677.

RABILLOUD, T. 1996. Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. Electrophoresis. **17** : 813-829.

RABILLOUD, T. 1999. Silver staining of 2-D electrophoresis gels. Methods Mol. Biol. **112** : 297-305.

RABILLOUD, T., C. ADESSI, A. GIRAUDEL et J. LUNARDI. 1997. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. Electrophoresis. **18** : 307-316.

RABILLOUD, T., E. GIANAZZA, N. CATTÒ et P. G. RIGHETTI. 1990. Amidosulfobetaines, a family of detergents with improved solubilization properties: application for isoelectric focusing under denaturing conditions. Anal. Biochem. **185**: 94-102.

ROEPSTORFF, P. 1997. Mass spectrometry in protein studies from genome to function. Curr. Opin. Biotechnol. **8** : 6-13.

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

SCHEELE, G. A. 1975. Two-dimensional gel analysis of soluble proteins. Characterization of guinea pig exocrine pancreatic proteins. J. Biol. Chem. **250** : 5375-5385.

SCHINDLER, P., A. VAN DORSSELAER et A. M. FALICK. 1993. Analysis of hydrophobic proteins and peptides by electrospray ionisation mass spectrometry. Anal. Biochem. **213** : 256-263.

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

SCHUMACHER, W., C. HOLLIGER, A. J. B. ZEHNDER et W. R. HAGEN. 1997. Redox chemistry of cobalamin and iron-sulfur cofactors in the tetrachloroethene reductase of *Dehalobacter restrictus*. FEBS. **409** : 421-425.

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

SHEVCHENKO, A., O. N. JENSEN, A. V. PODTELEJNIKOV, F. SAGLIOCCO, M. WILM, O. VORM, P. MORTENSEN, H. BOUCHERIE et M. MANN. 1996. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93** : 14440-14445.

SINHA, P., G. HUTTER, E. KOTTGEN, M. DIETEL, D. SCHADENDORF et H. LAGE. 1998. Increased expression of annexin I and thioredoxin detected by two-dimensional gel electrophoresis of drug resistant human stomach cancer cells. J. Biochem. Biophys. Methods. **37** : 105-116.

SKIDMORE. A. F. et T. J. BEEBEE. 1990. Rat lactate dehydrogenase A and B subunit concentrations are not regulated by mRNA abundance in liver and heart. FEBS Lett. **270** : 67-70.

SLATER, J. H. 1994. Microbial dehalogenation of haloaliphatic compounds. Biochemistry of microbial degradation. 379-421.

SLATER, J. H., A. T. BULL et D. J. HARDMAN. 1995. Microbial dehalogenation. Biodegradation. **6** : 181-189.

SMIDT, H., A. D. L. AKKERMANS, J. VAN DER OOST et W. M. DE VOS. 2000. Halo-respiring bacteria-molecular characterization and detection. Enzyme Microb. Technol. **27** : 812-820.

SMIDT, H., A. D. L. AKKERMANS, J. VAN DER OOST et W. M. DE VOS. 2000. Halo-respiring bacteria-molecular characterization and detection. Enzyme Microb. Technol. **27** : 812-820.

SUYAMA, A., R. IWAKIRI, K. KAI, T. TOKUNAGA, N. SERA et K. FURUKAWA. 2001. Isolation and characterization of *Desulfitobacterium* sp. strain Y51 capable of efficient dehalogenation of tetrachloroethene and polychloroethanes. Biosci. Biotechnol. Biochem. **65** : 1474-1481.

SUYAMA, A., M. YAMASHITA, S. YOSHINO et K. FURUKAWA. 2002. Molecular characterization of the PceA reductive dehalogenase of *Desulfitobacterium* sp. strain Y51. J. Bacteriol. **184** : 3419-3425.

TAGUCHI, H. et T. OHTA. 1991. D-lactate dehydrogenase is a member of the D-isomer-specific 2-hydroxyacid dehydrogenase family. J. Biol. Chem. **266** : 12588-12594.

TARTAKOVSKY, B., M. LÉVESQUE, R. DUMORTIER, R. BEAUDET et S. R. GUIOT. 1999. Biodegradation of pentachlorophenol in a continuous anaerobic reactor augmented with *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. Appl. Environ. Microbiol. **65** : 4357-4362.

THIBODEAU, J. Étude de la déshalogénase II de *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. 2003. Mémoire de maîtrise, Ville de Laval, INRS-Institut Armand-Frappier.

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

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

VANBOGELEN, R. A., E. E. SCHILLER, J. D. THOMAS et F. C. NEIDHARDT. 1999. Diagnosis of cellular states or microbial organisms using proteomics. Electrophoresis. **20** : 2149-2159

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

VAN DE PAS, B. A., J. GERRITSE, W. M. DE VOS, G. SCHRAA et A. J. M. STAMS. 2001a. Two distinct enzyme systems are responsible for tetrachloroethene and

chlorophenol reductive dehalogenation in *Desulfitobacterium* strain PCE1. Arch. Microbiol. **176** : 165-169.

VAN DE PAS, B. A., S. JANSEN, C. IJCKEMA, G. SCHRAA, W. DE VOS et A. J. STAMS. 2001b. Energy yield of respiration on chloroaromatic compounds in *Desulfitobacterium dehalogenans*. Appl. Environ. Microbiol. **67** : 3958-3963.

VAN DE PAS, B. A., H. J. M. HARMSSEN, G. C. RAANGS, W. M. DE VOS, G. SCHRAA et A. J. M. STAMS. 2001c. A *Desulfitobacterium* strain isolated from human feces that does not dechlorinate chloroethenes or chlorophenols. Arch. Microbiol. **175** : 389-394.

VIHINEN, M. 2001. Bioinformatics in proteomics. Biomol. Eng. **18** : 241-248.

VILLEMUR, R., M. SAUCIER, A. GAUTHIER et R. BEAUDET. 2002. Occurrence of several genes encoding putative reductive dehalogenases in *Desulfitobacterium hafniense*/frappieri and *Dehalococcoides ethenogenes*. Can. J. Microbiol. **48** : 697-706.

VOLBEDA, A., M. H. CHARON, C. PIRAS, E. C. HATCHIKIAN, M. FREY et J. C. FONTECILLA-CAMPS. 1995. Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. Nature. **373** : 580-587.

VON WINTZINGERODE, F., C. SCHLÖTELBURG, R. HAUCK, W. HEGEMANN et U. B. GÖBEL. 2001. Development of primers for amplifying genes encoding CprA- and PceA-like reductive dehalogenases in anaerobic microbial consortia dechlorinating trichlorobenzene and 1,2-dichloropropane. FEMS Microbiol. Ecol. **35** : 189-196.

WASINGER, V. C., S.J., CORDWELL, A. CERPA-POLJAK, J.X. YAN, A. A. GOOLEY, M. R. WILKINS, M. W. DUNCAN, R. HARRIS, K. L. WILLIAMS et I. HUMPHERY-SMITH. 1995. Progress with gene-product mapping of the mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. Electrophoresis. **16** : 1090-1094.

WASINGER, V. C., BJELLQVIST, B. et HUMPHERY-SMITH, I. 1997. Proteomic 'contigs' of *Ochrobactrum anthropi*, application of extensive pH gradients. Electrophoresis. **18** : 1373-1383.

WILKINS, M. R., GASTEIGER, E., SANCHEZ, J.-C., BAIROCH, A., et HOCHSTRASSER, D. F. 1998. Two-dimensional gel electrophoresis for proteome projects: the effects of protein hydrophobicity and copy number. Electrophoresis. **17** : 1501-1505.

WILKINS, M. R., J. C. SANCHEZ, A. A. GOOLEY, R. D. APPEL, I. HUMPHERY-SMITH, D. F. HOCHSTRASSER et K. L. WILLIAMS. 1995. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. Biotechnol. Genet. Eng. Rev. **13** : 19-50.

WOLIN, E. A., M. J. WOLIN et R. S. WOLFE. 1963. Formation of methane by bacterial extracts. J. Biol. Chem. **238** : 2882-2886.

YARMUSH, M. L. et A. JAYARAMAN. 2002. Advances in proteomic technologies. Annu. Rev. Biomed. Eng. **4** : 349-373.

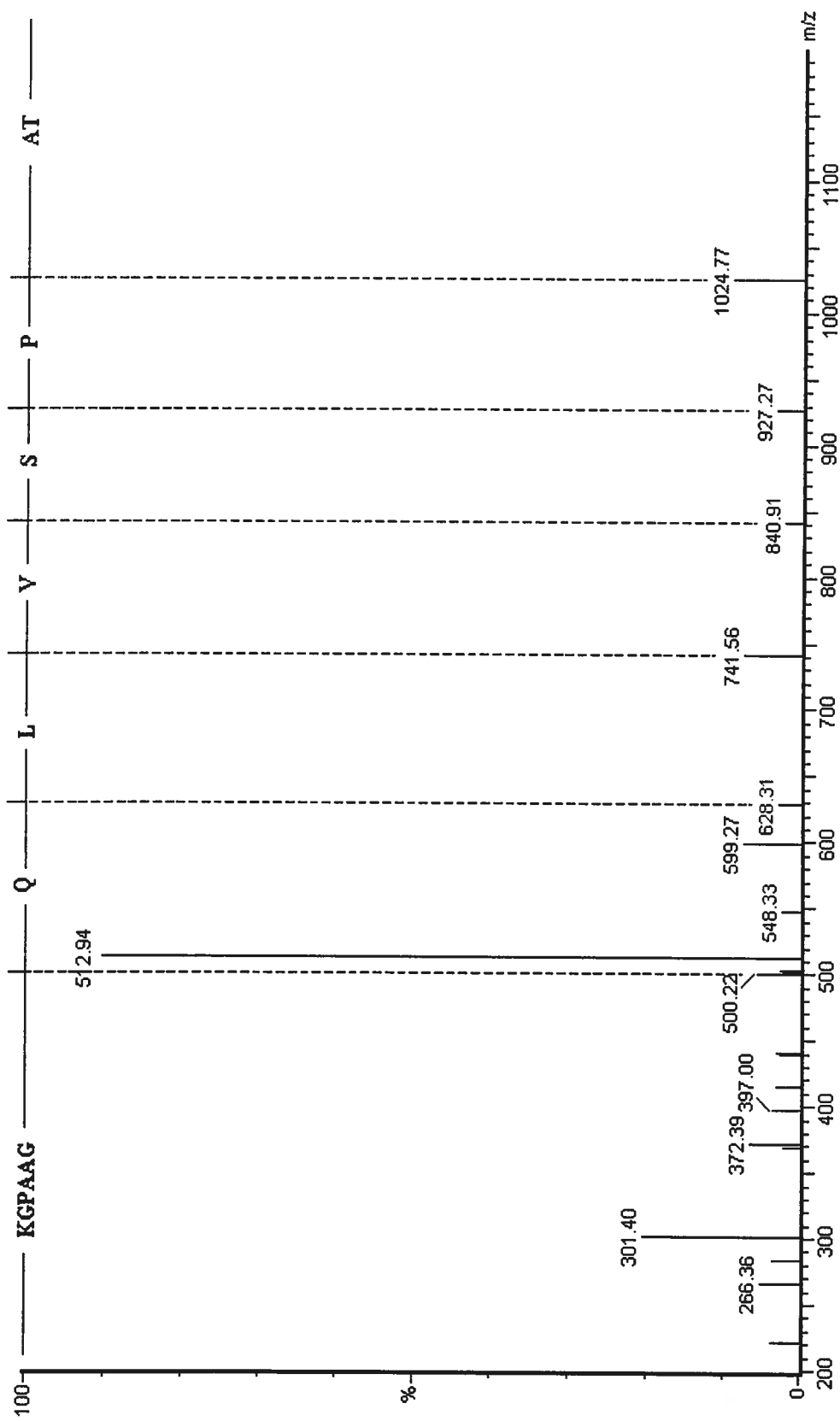
YATES III, J. R. 1998. Mass spectrometry and the age of the proteome. J. Mass Spectrom. **33** : 1-19.

YATES III, J. R. 2000. Mass spectrometry. From genomics to proteomics. Trends Genet. **16** : 5-8.

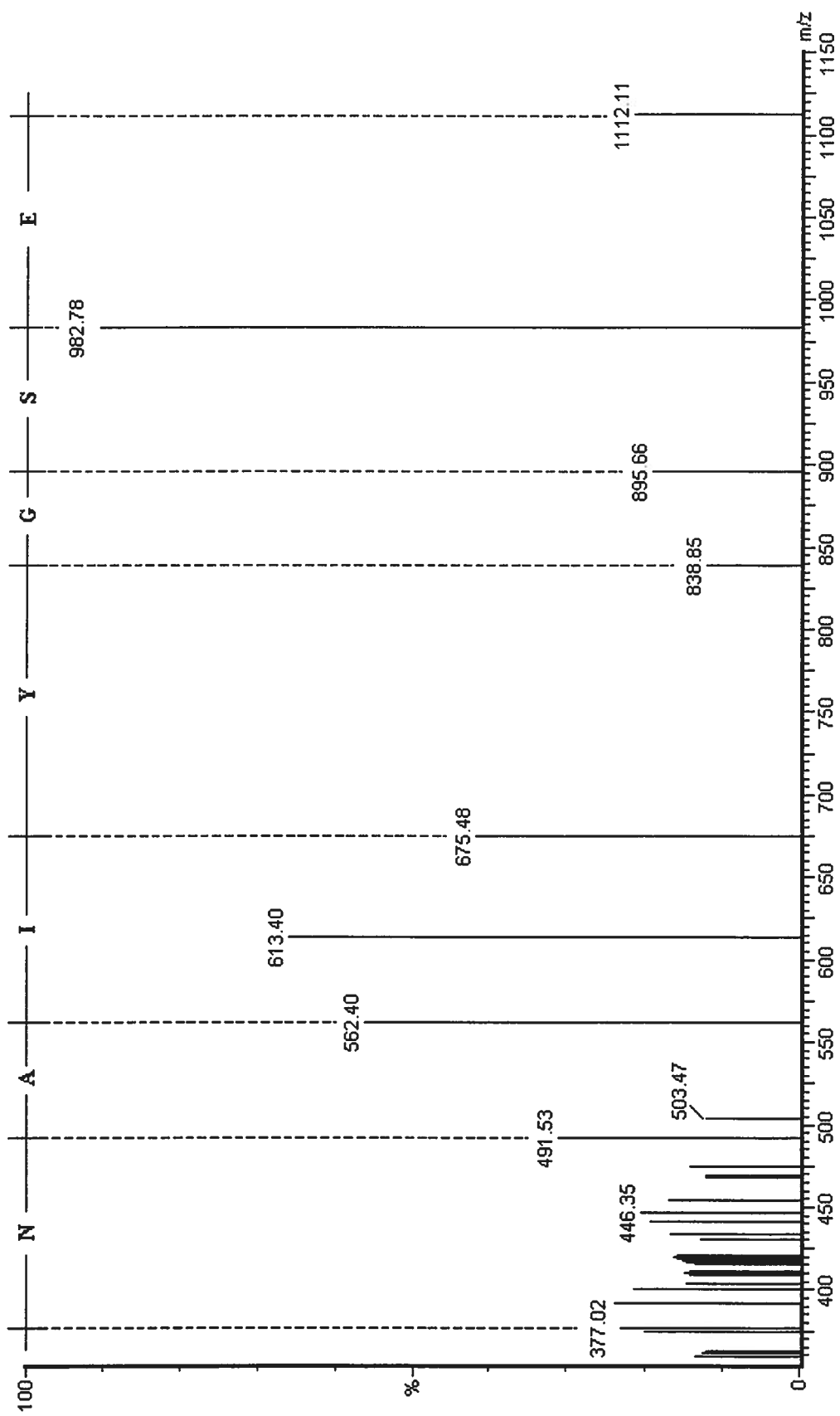
ZUO, X. et D. W. SPEICHER. 2000. A method for global analysis of complex proteomes using sample prefractionation by solution isoelectrofocusing prior to two-dimensional electrophoresis. Anal. Biochem. **284** : 266-278.

Annexe A

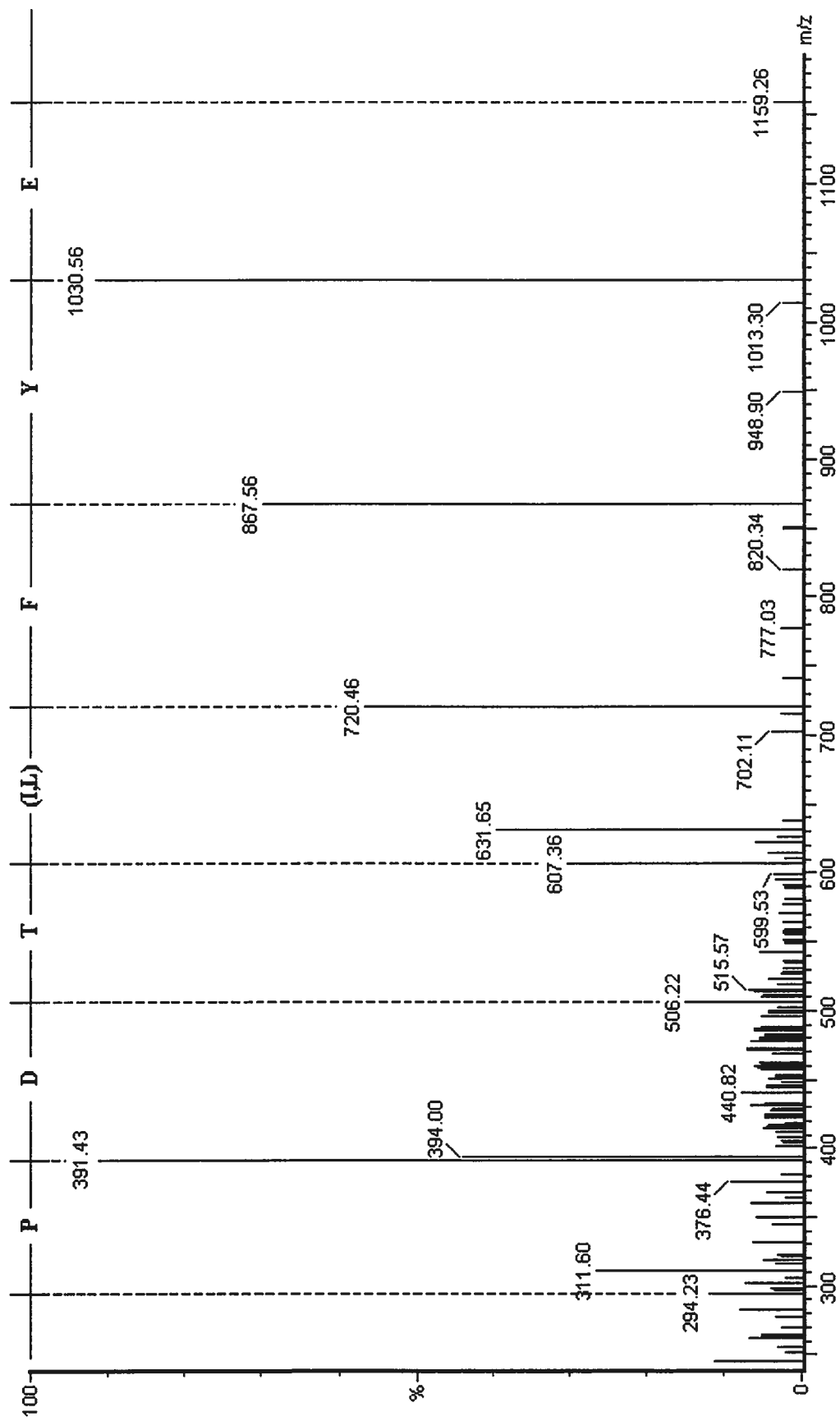
Spectres de masse en tandem obtenus pour la déshalogénase II



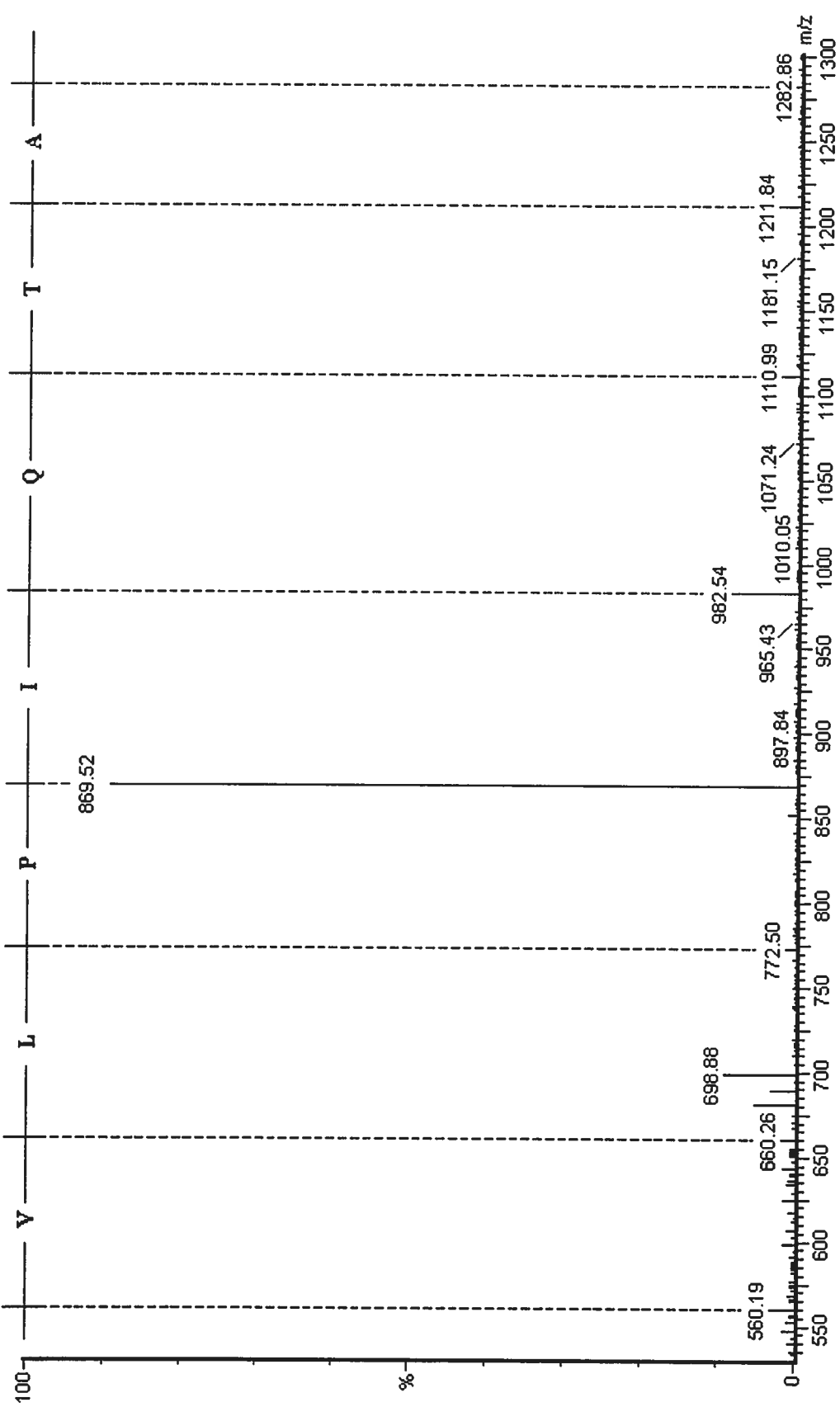
Annexe A-1 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire doublement chargé 599,06 m/z de la déshalogénase II (57 kDa) purifiée de *D. frappieri*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 24 eV.



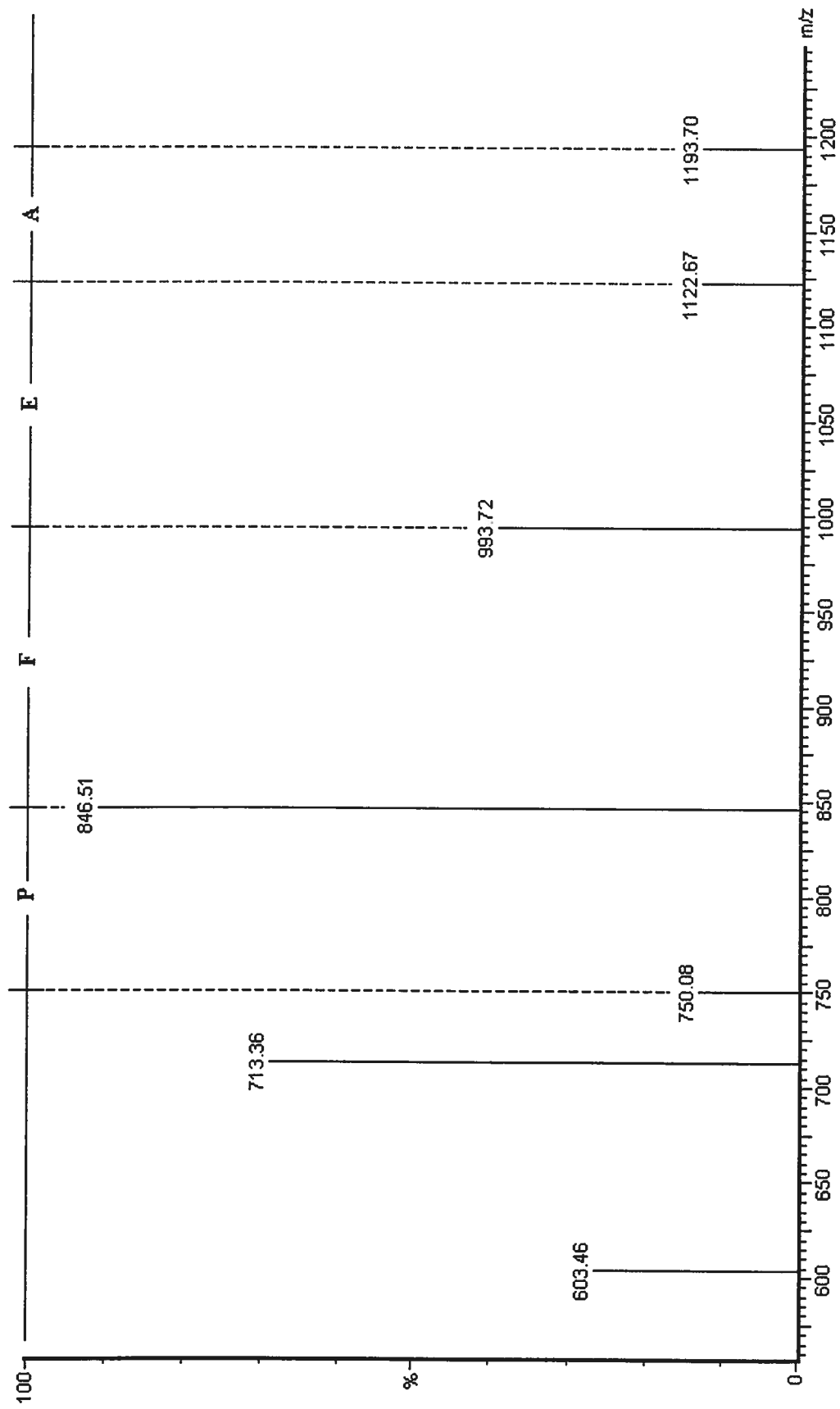
Annexe A-2 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire doublement chargé 612,98 m/z de la déshalogénase II (57 kDa) purifiée de *D. frappieri*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 26 eV.



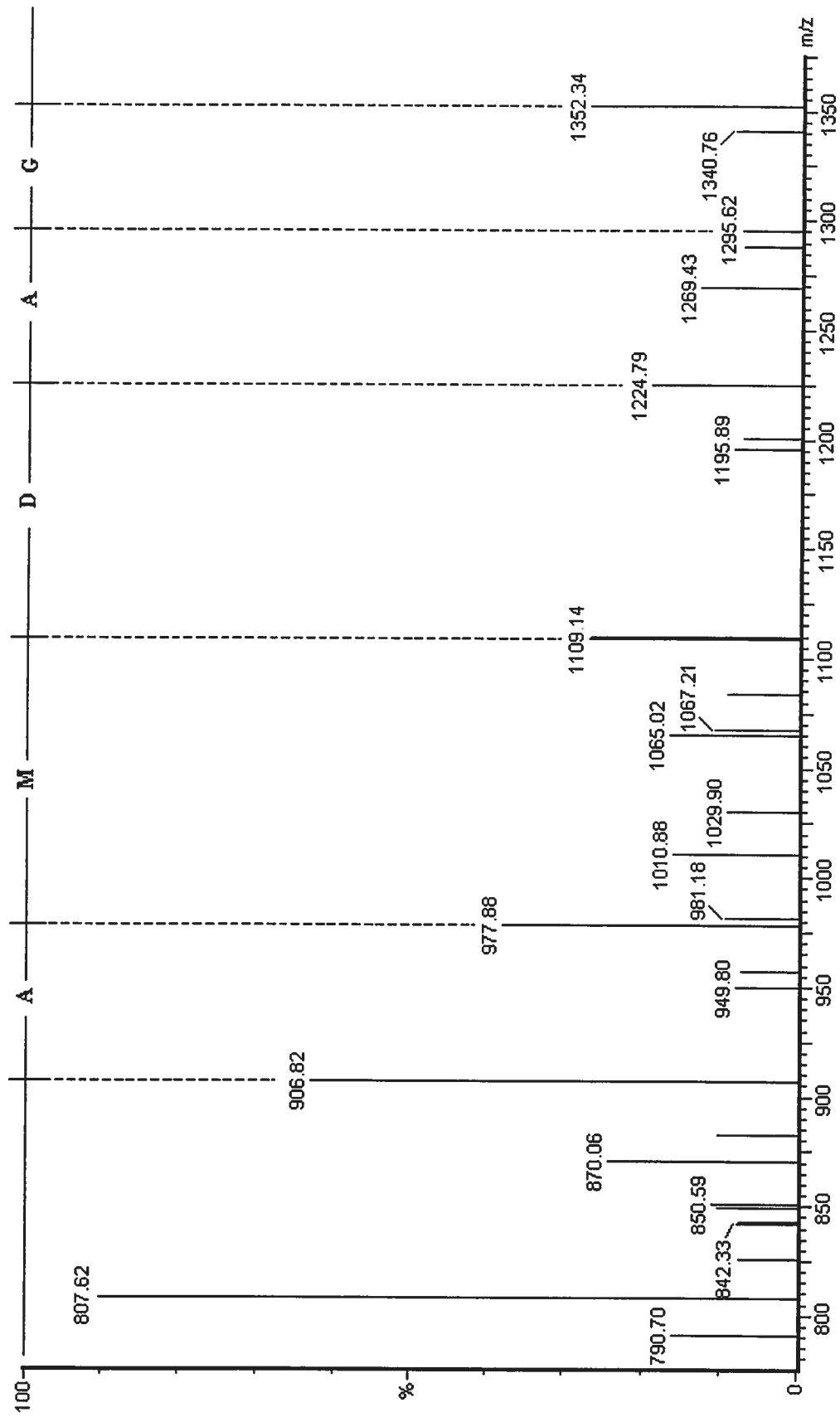
Annexe A-3 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire doublement chargé 630,97 m/z de la déshalogénase II (57 kDa) purifiée de *D. frappieri*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 25 eV.



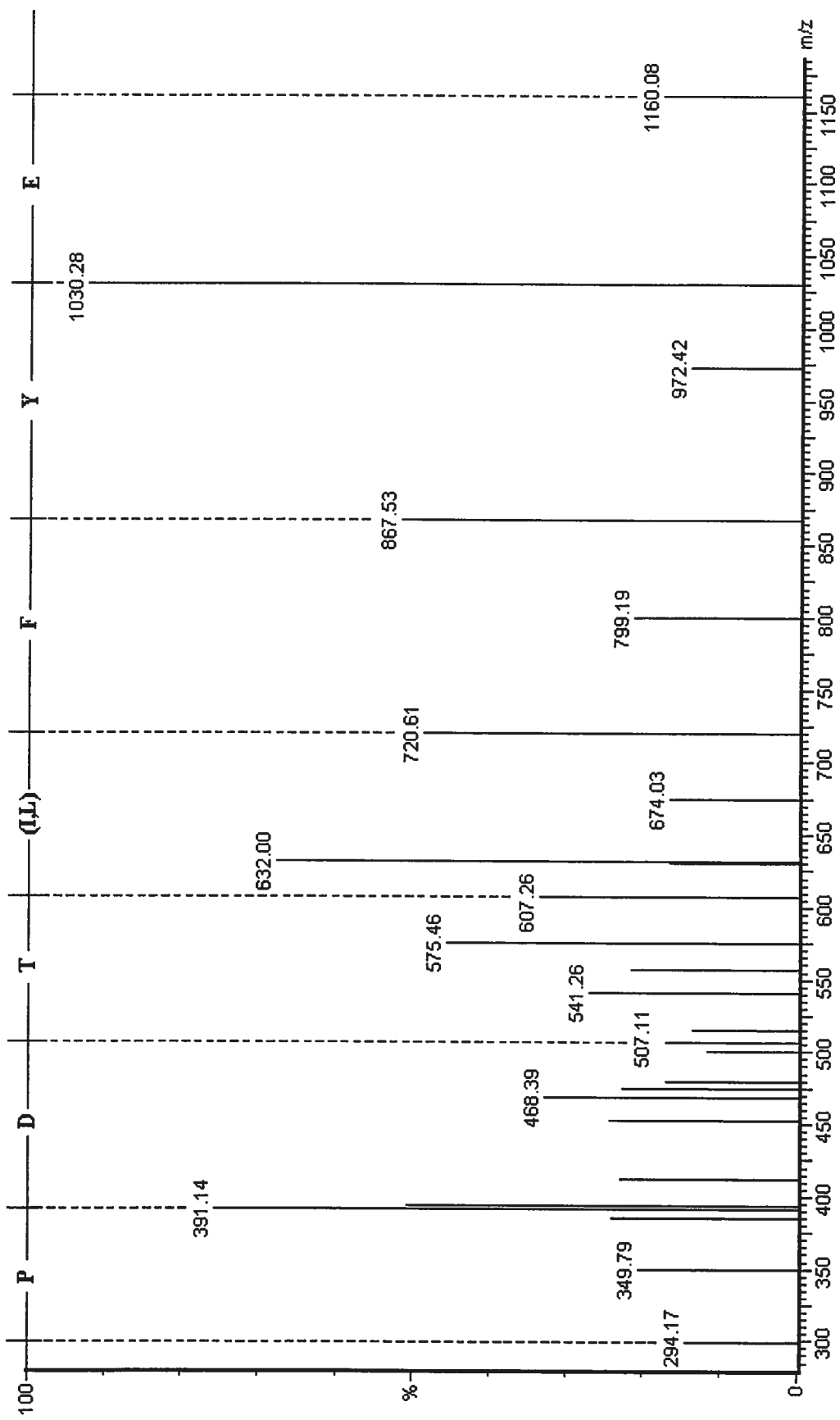
Annexe A-4 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire doublement chargé 698,50 m/z de la déshalogénase II (57 kDa) purifiée de *D. frappieri*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 27 eV.



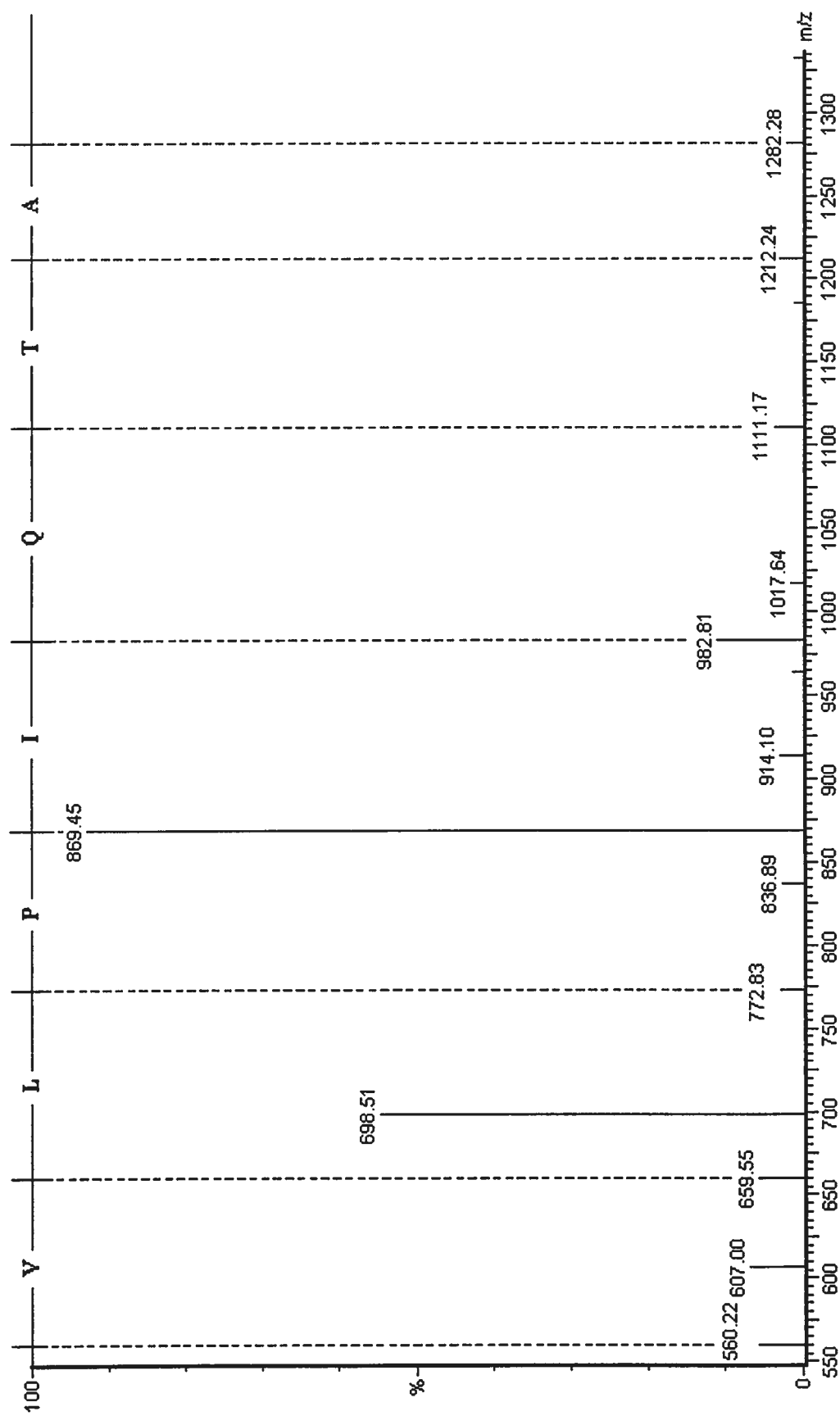
Annexe A-5 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire doublement chargé 712,36 m/z de la déshalogénase II (57 kDa) purifiée de *D. frappieri*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 24 eV.



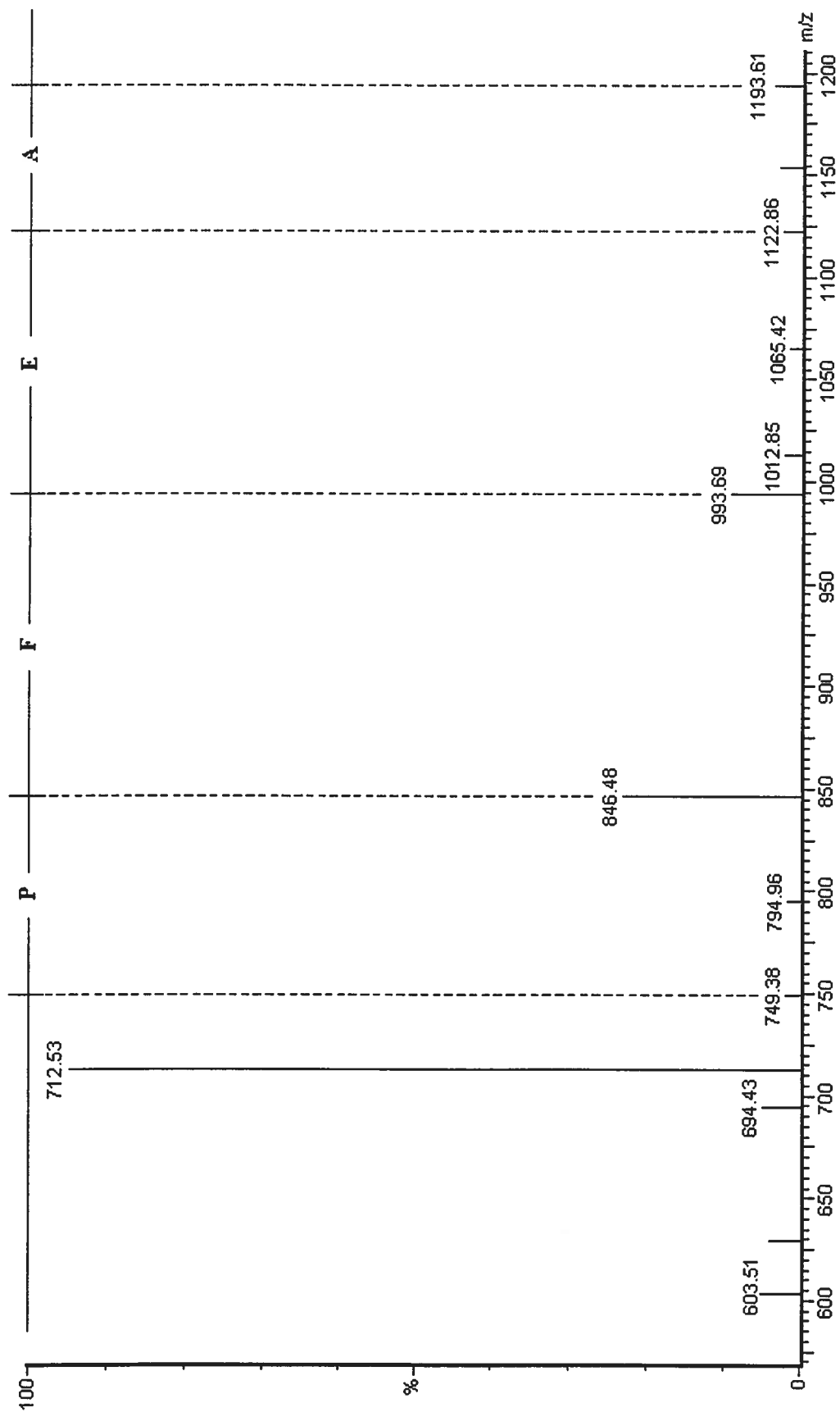
Annexe A-6 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire doublement chargé 806,39 m/z de la déshalogénase II (57 kDa) purifiée de *D. frappieri*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 21 eV.



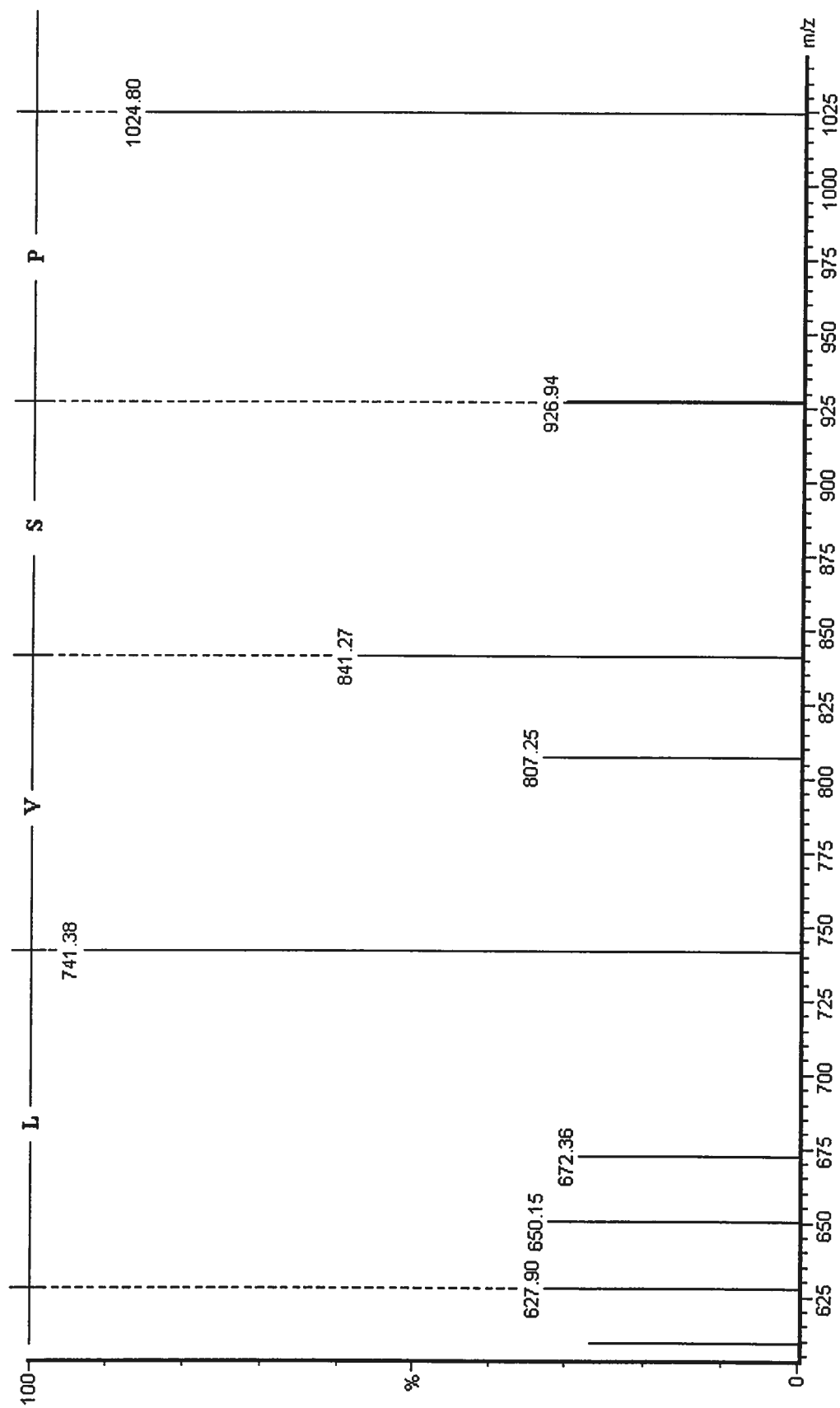
Annexe A-7 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire doublement chargé 630,91 m/z de la déshalogénase II (57 kDa) cytoplasmique induite chez *D. frappieri*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 29 eV.



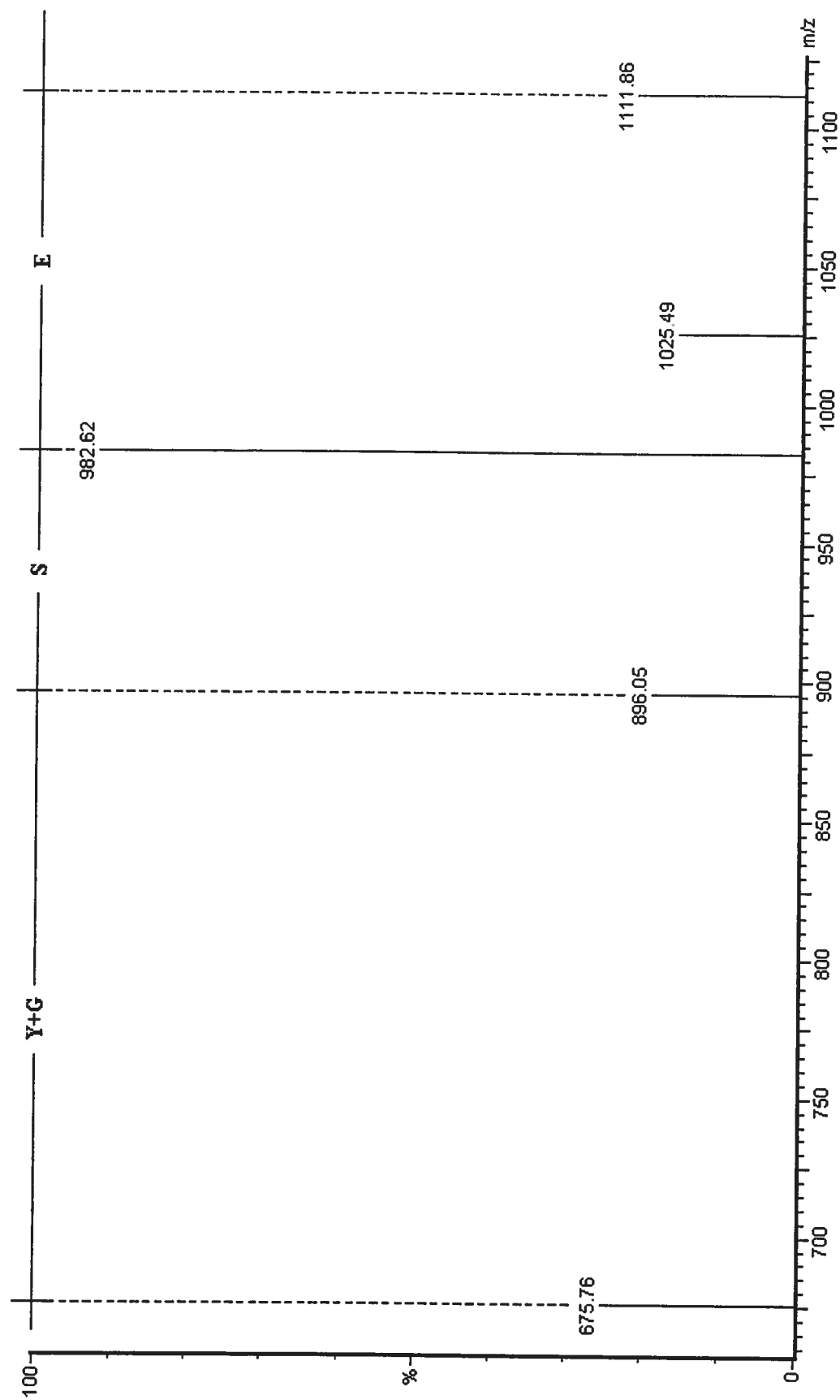
Annexe A-8 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire doublement chargé 698,39 m/z de la déshalogénase II (57 kDa) cytoplasmique induite chez *D. frappei*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 28 eV.



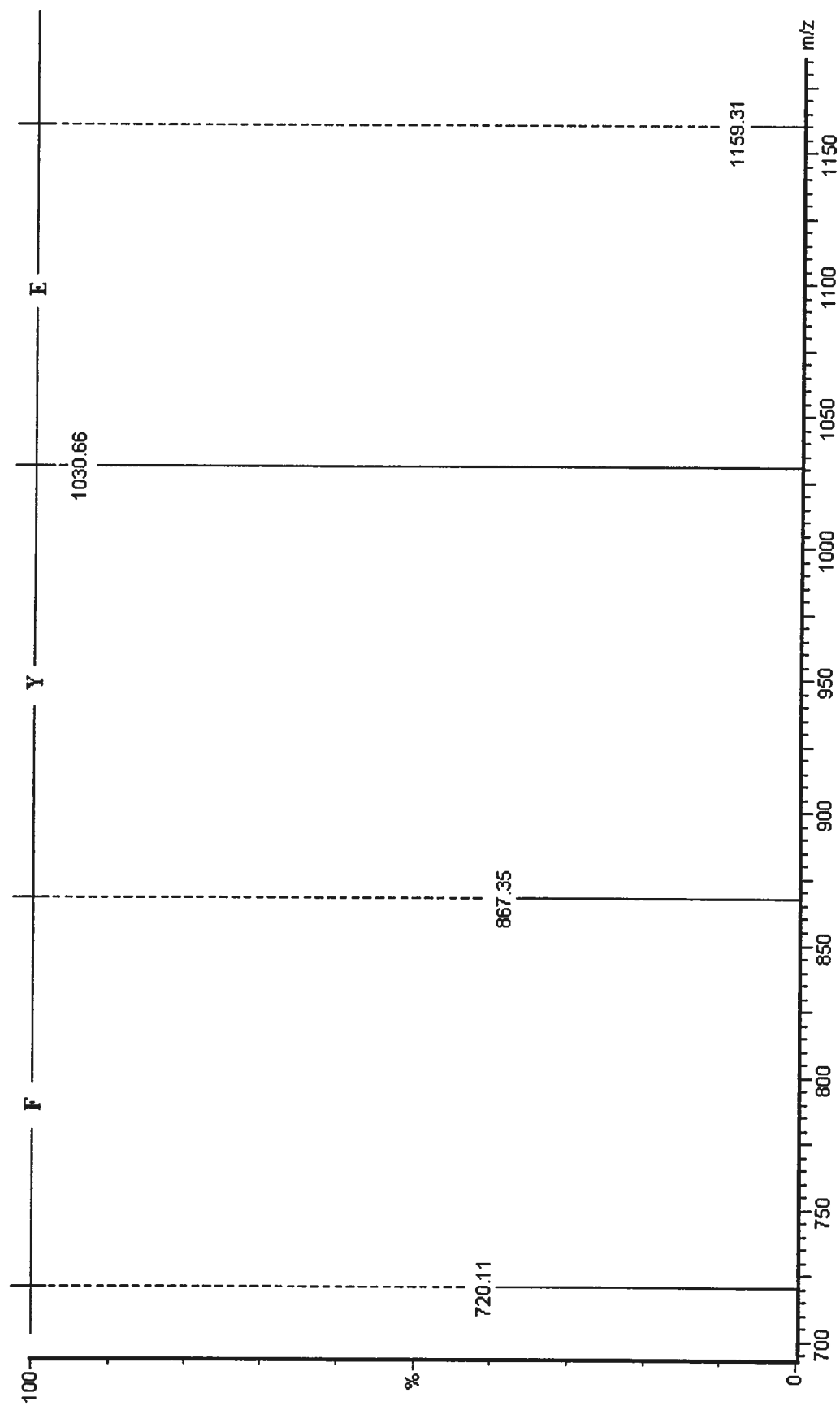
Annexe A-9 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire doublement chargé 712,10 m/z de la déshalogénase II (57 kDa) cytoplasmique induite chez *D. frappaeri*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 22 eV.



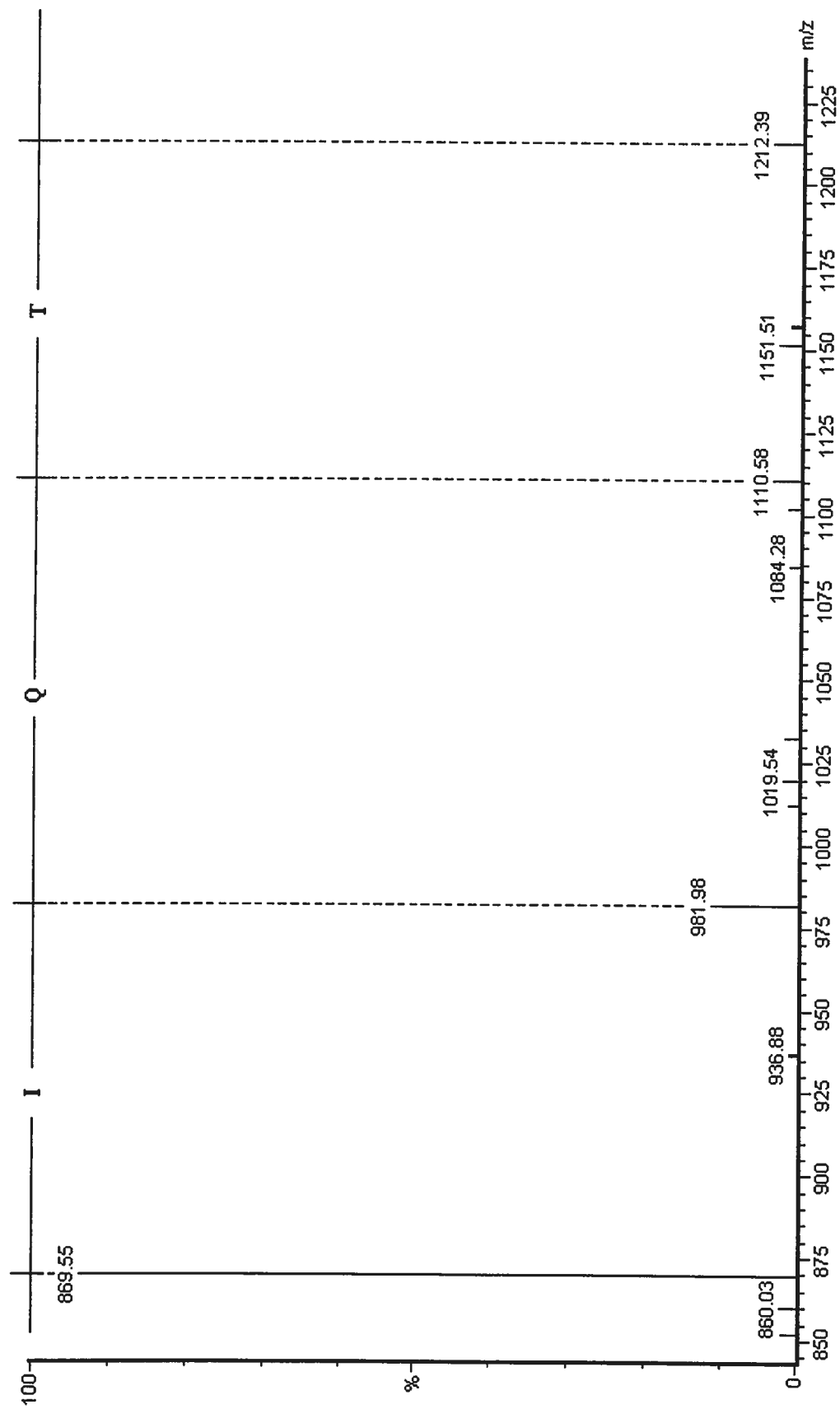
Annexe A-10 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire doublement chargé 599,12 m/z de l'isoforme A de la déshalogénase II (57 kDa) membranaire induite chez *D. frappieri*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 22 eV.



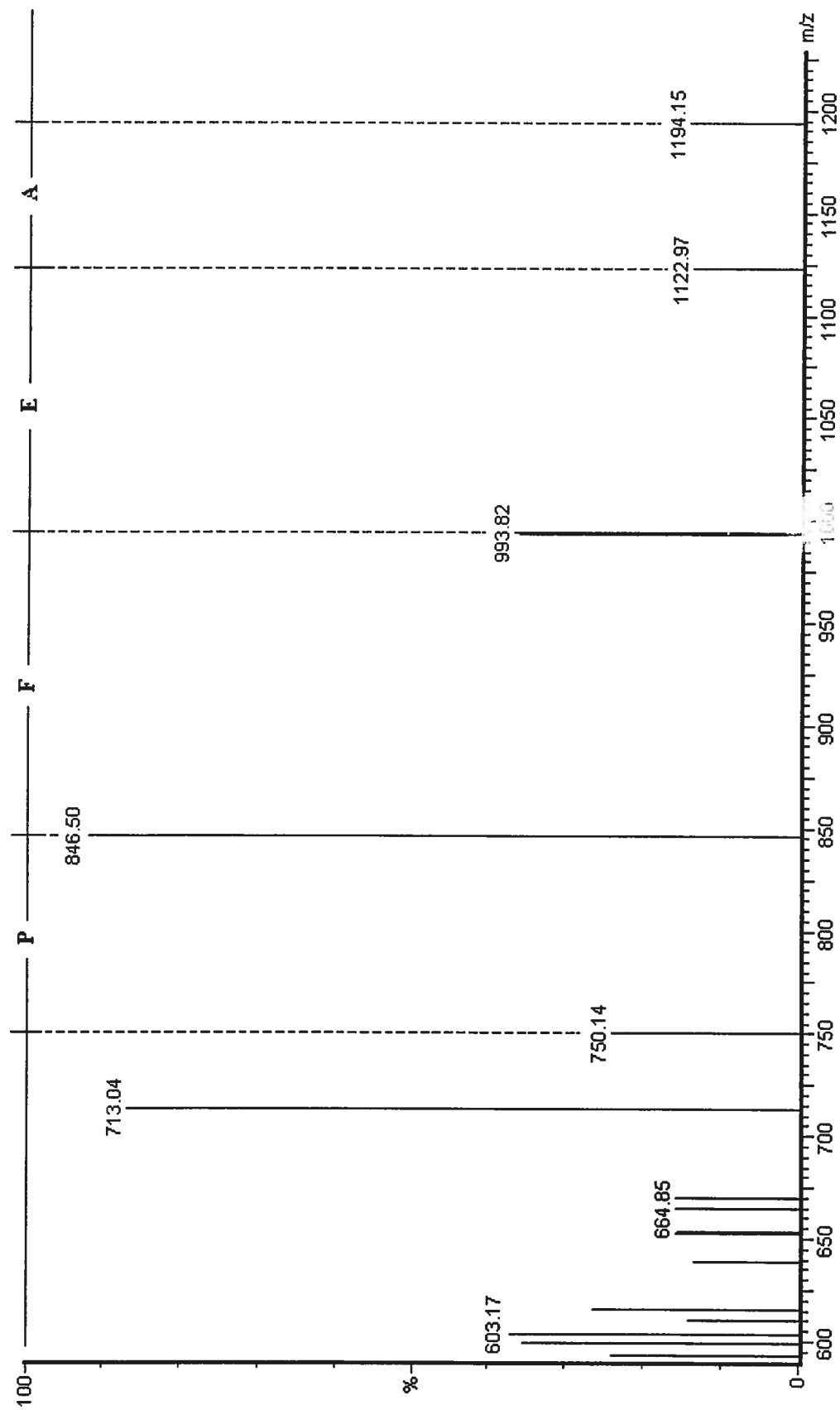
Annexe A-11 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire doublement chargé 613,04 m/z de l'isoforme A de la déshalogénase II (57 kDa) membranaire induite chez *D. frappieri*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 27 eV.



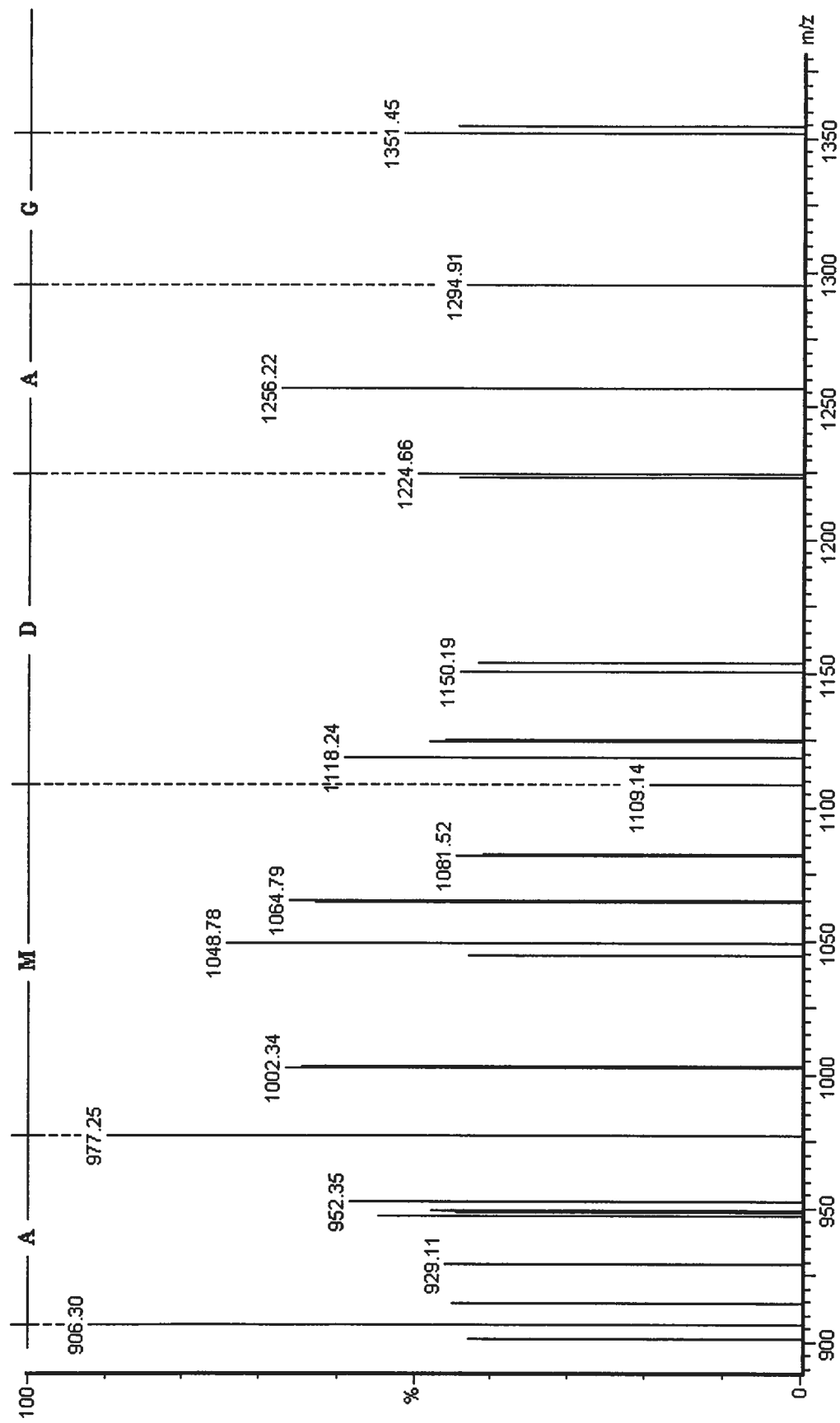
Annexe A-12 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire doublement chargé 630,97 m/z de l'isoforme A de la déshalogénase II (57 kDa) membranaire induite chez *D. frappieri*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 26 eV.



Annexe A-13 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire doublement chargé 698,50 m/z de l'isoforme A de la déshalogénase II (57 kDa) membranaire induite chez *D. frappieri*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 30 eV.



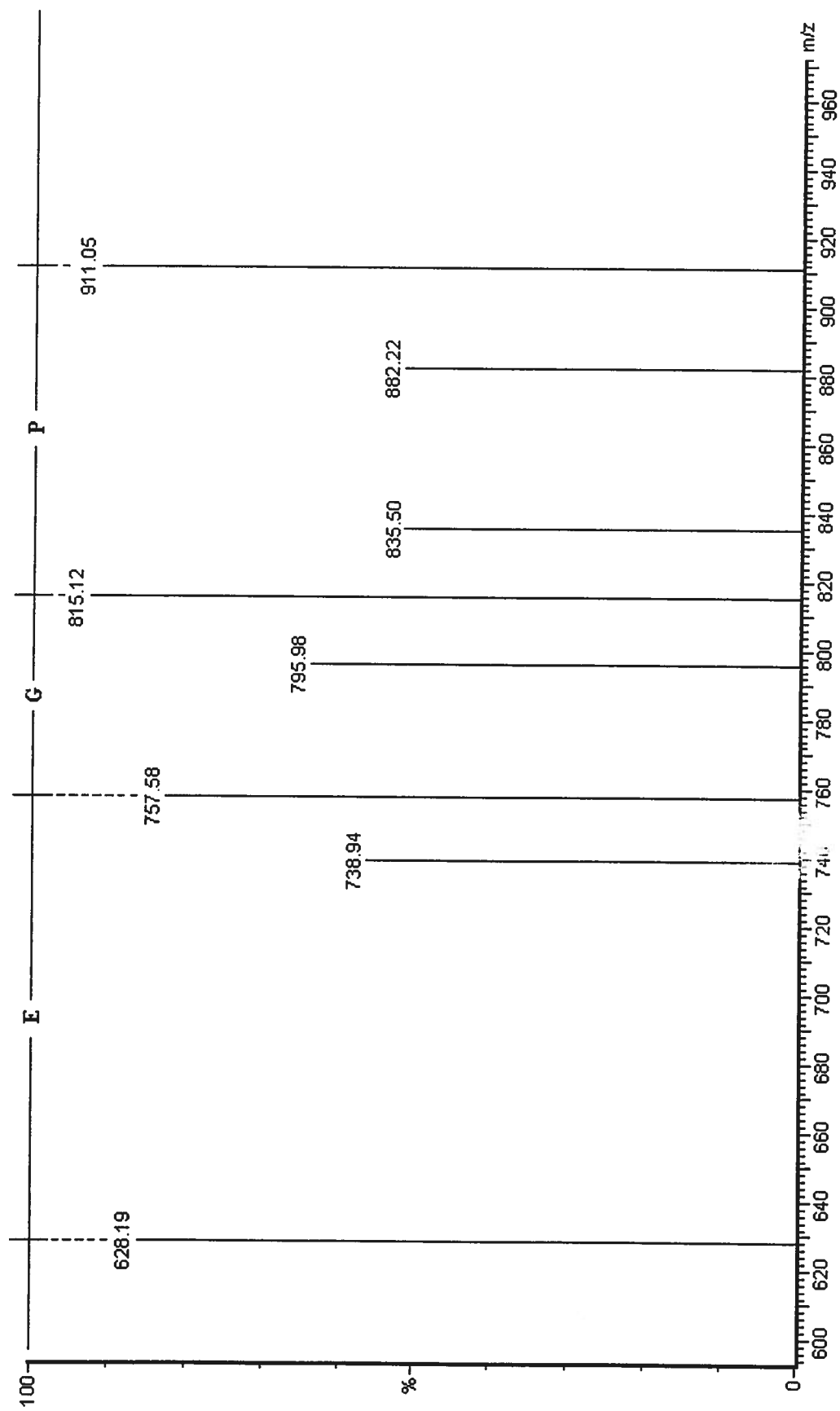
Annexe A-14 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire doublement chargé 712,61 m/z de l'isoforme A de la déshalogénase II (57 kDa) membranaire induite chez *D. frappieri*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 29 eV.



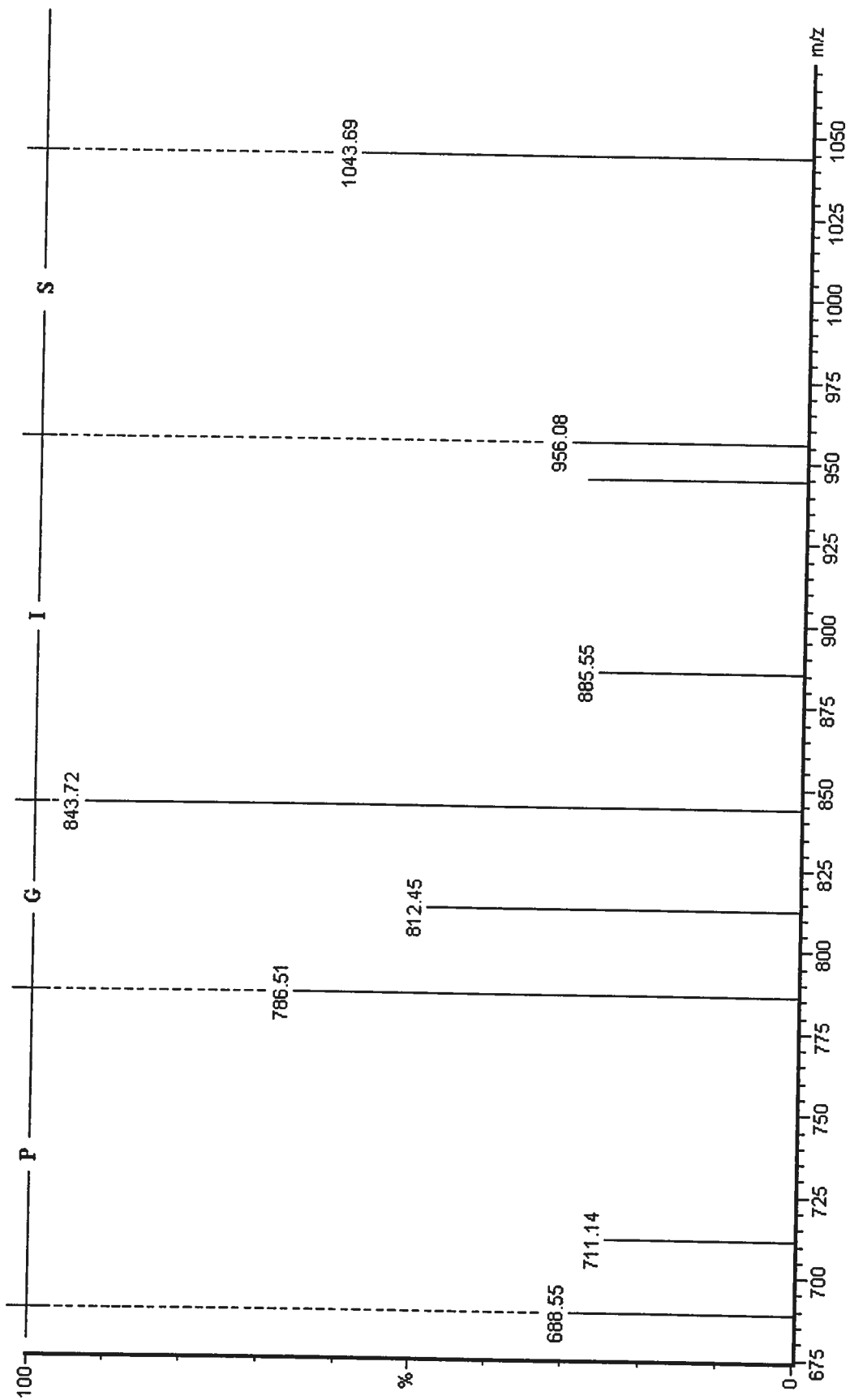
Annexe A-15 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire doublement chargé 806,39 m/z de l'isoforme A de la déshalogénase II (57 kDa) membranaire induite chez *D. frappieri*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 33 eV.

Annexe B

Spectres de masse en tandem obtenus pour la protéine 54 kDa



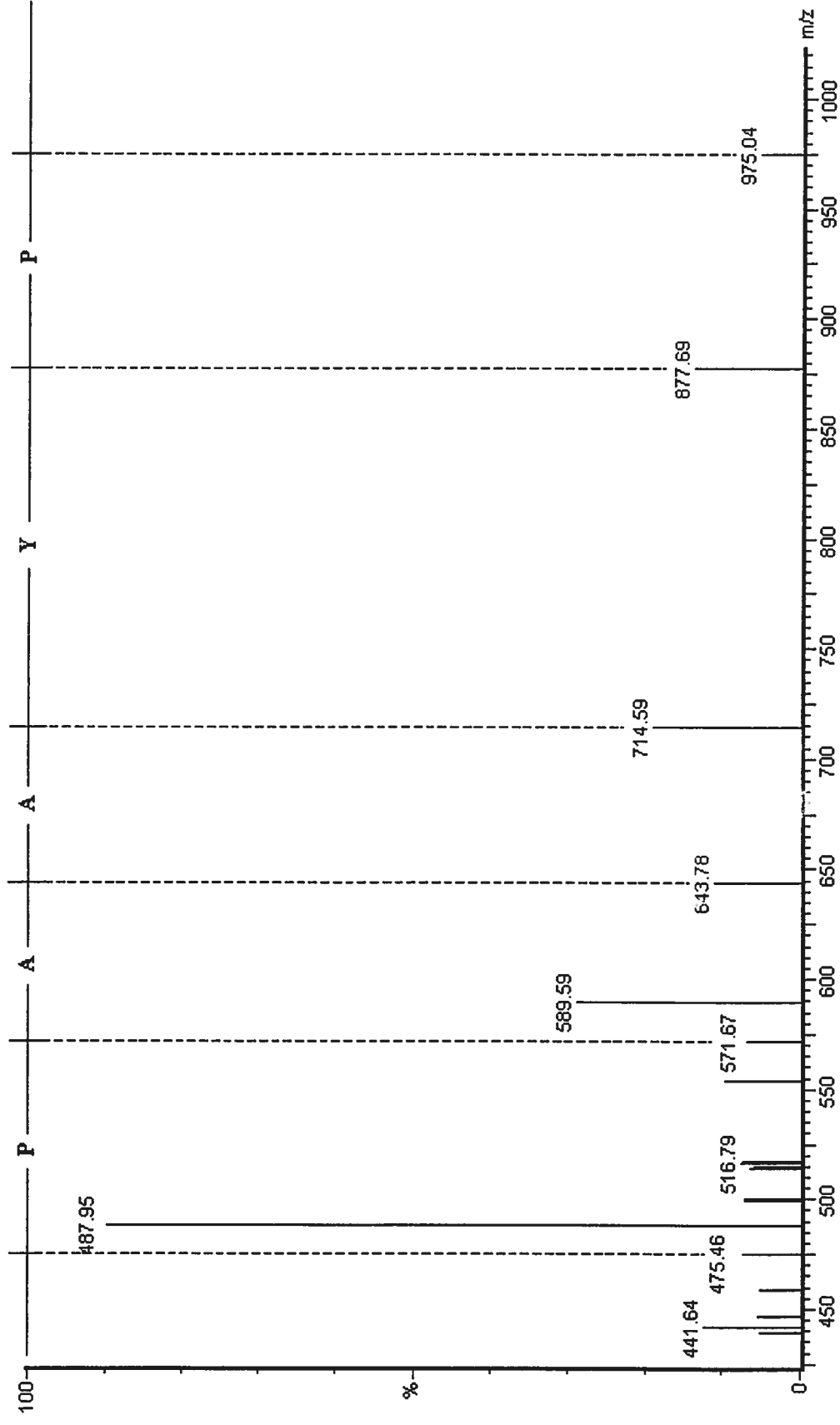
Annexe B-1 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire doublement chargé 569,46 m/z de la protéine cytoplasmique de 54 kDa induite chez *D. frappieri*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 30 eV.



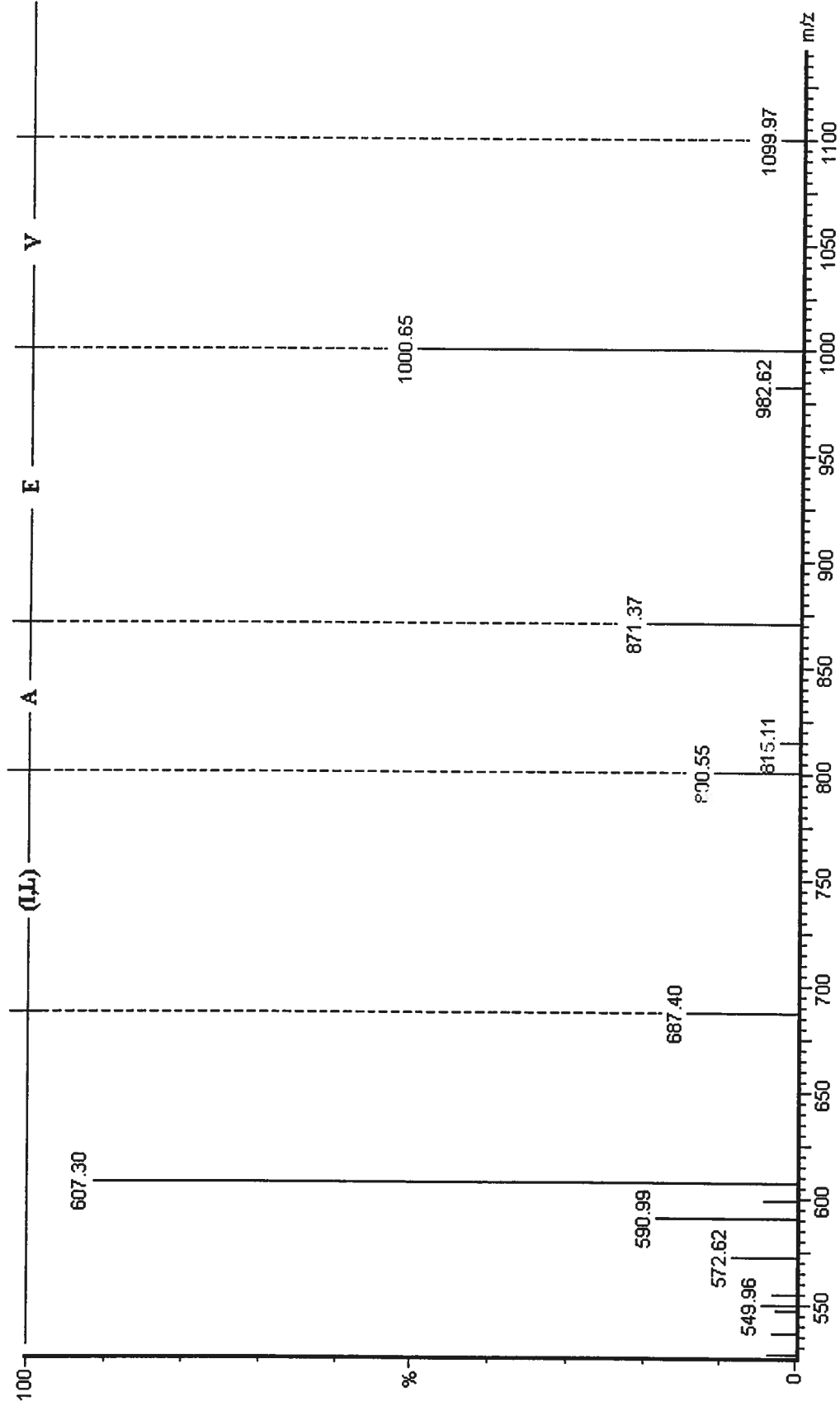
Annexe B-2 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire doublement chargé 652,18 m/z de la protéine cytoplasmique de 54 kDa induite chez *D. frappieri*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 32 eV.

Annexe C

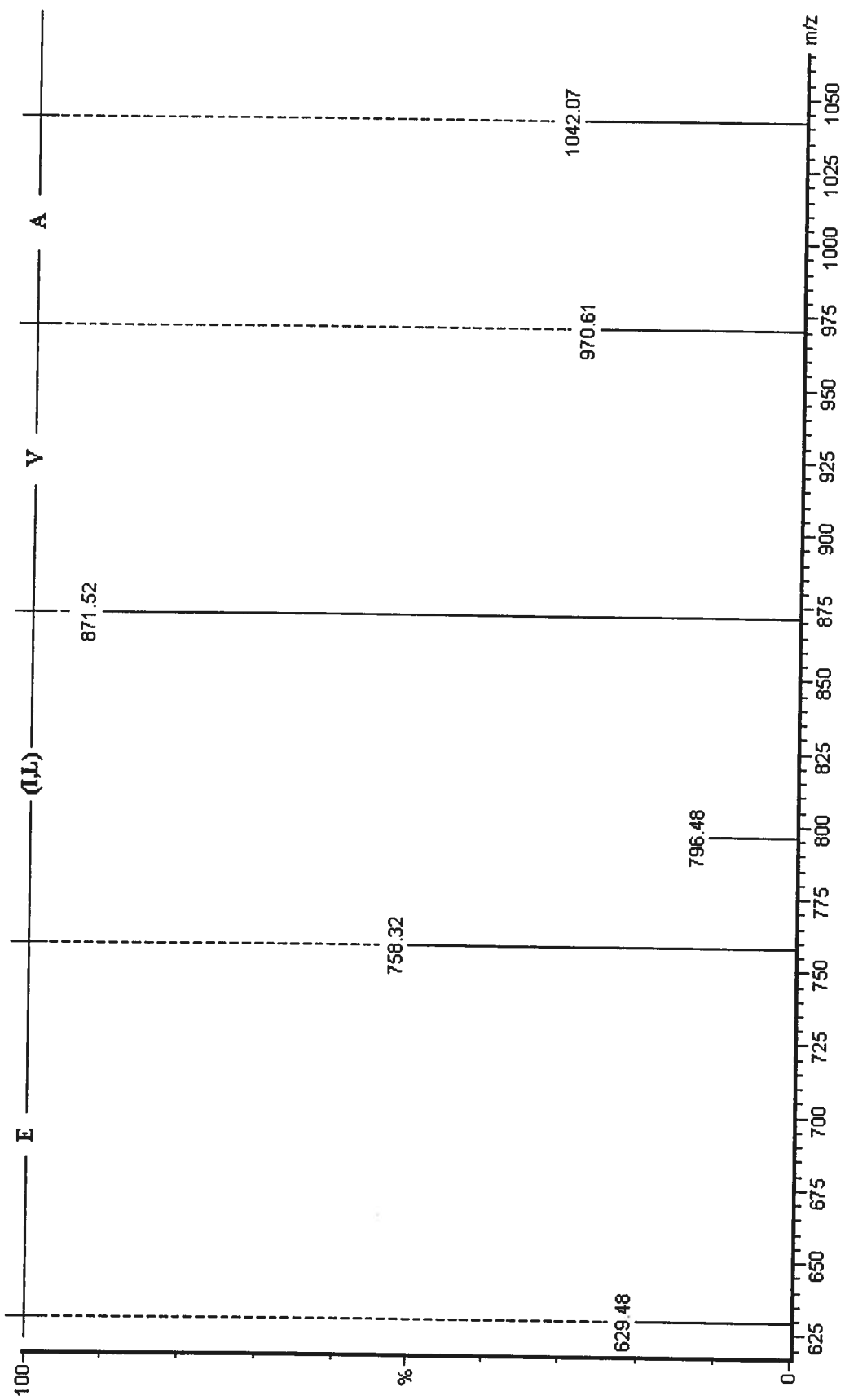
Spectres de masse en tandem obtenus pour la protéine 31 kDa



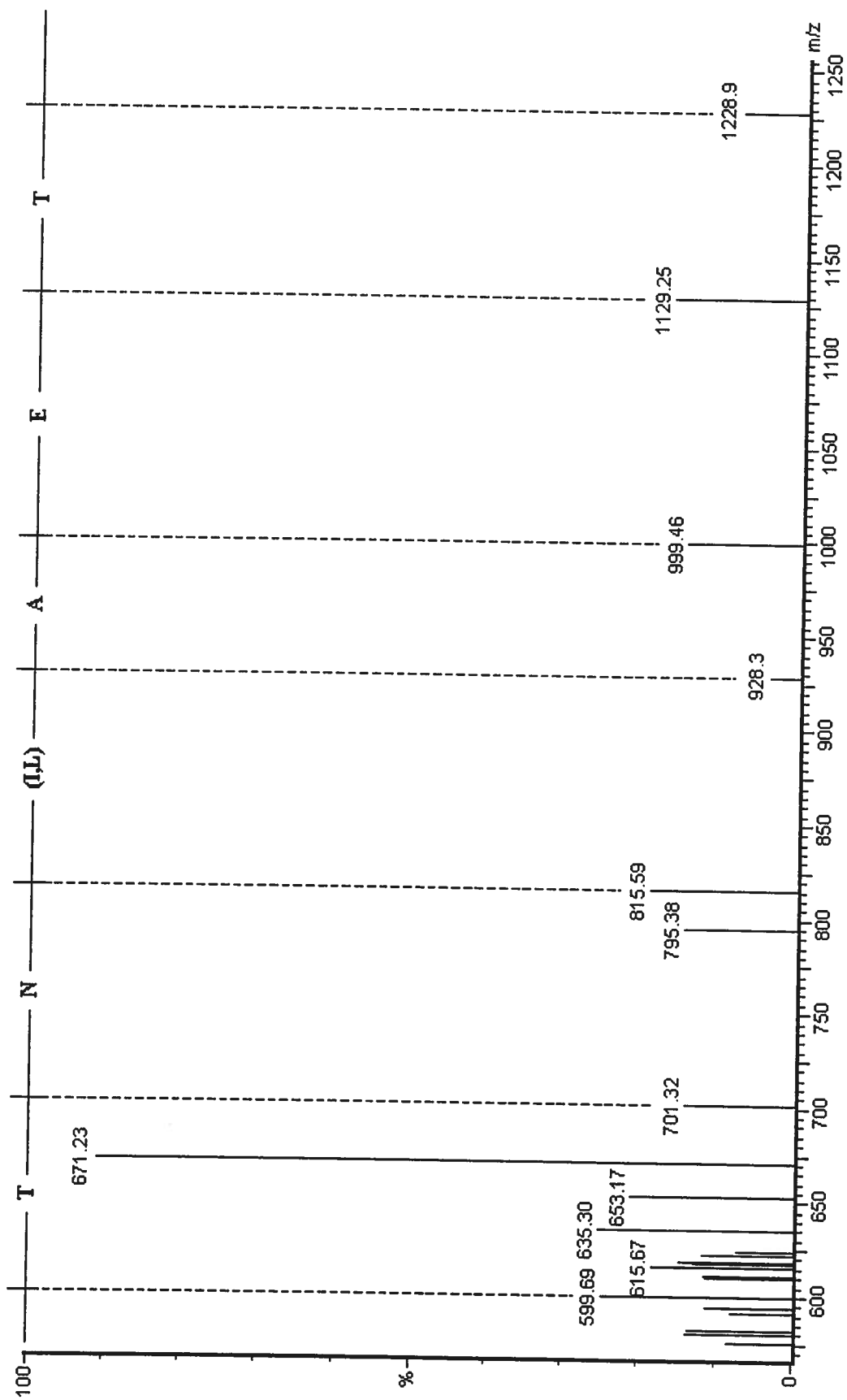
Annexe C-1 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire 589,10 m/z de la protéine de 31 kDa réprimée chez *D. frappieri*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 27 eV.



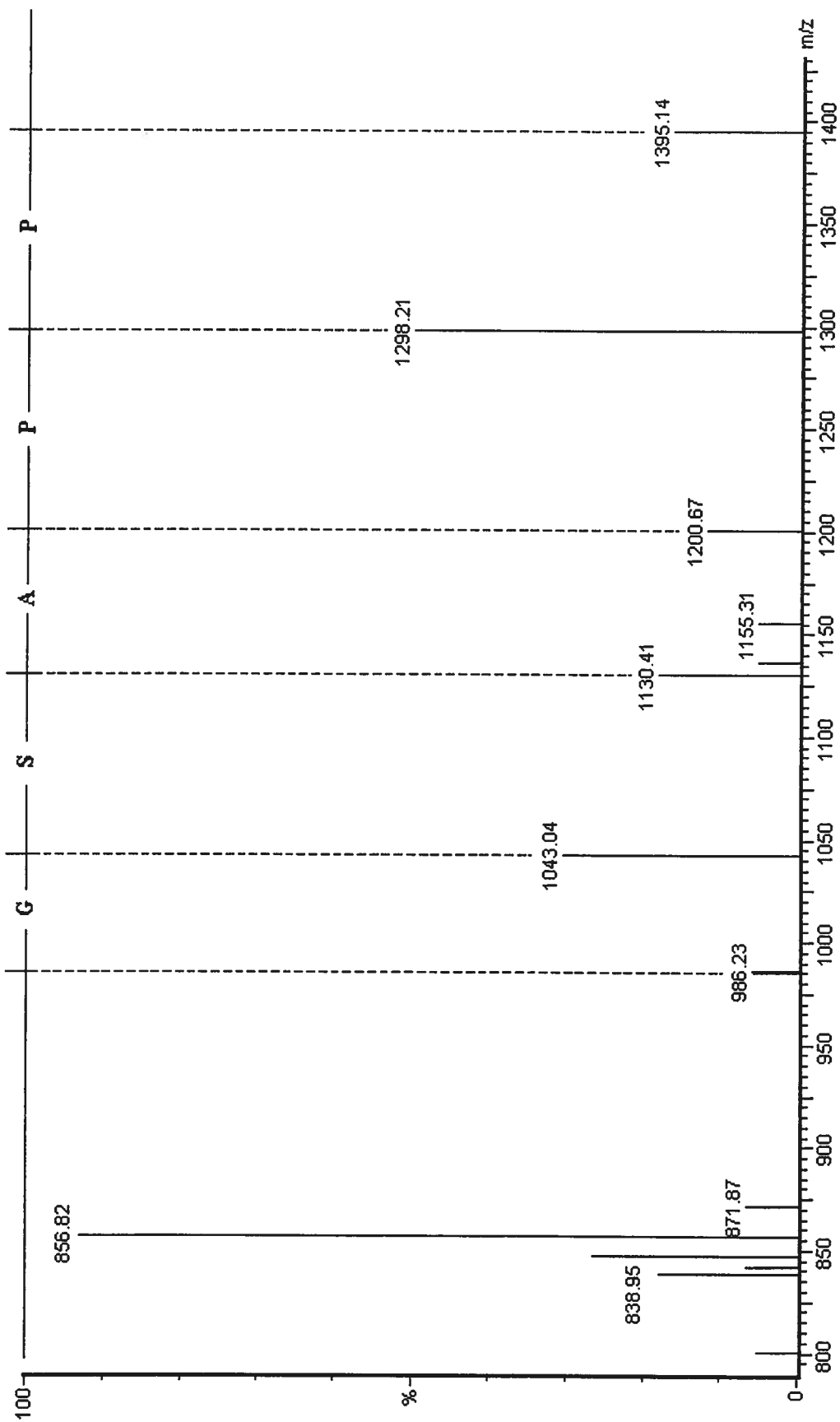
Annexe C-2 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire 607,15 m/z de la protéine de 31 kDa réprimée chez *D. frappieri*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 21 eV.



Annexe C-3 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire 613,35 m/z de la protéine de 31 kDa réprimée chez *D. frappieri*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 26 eV.



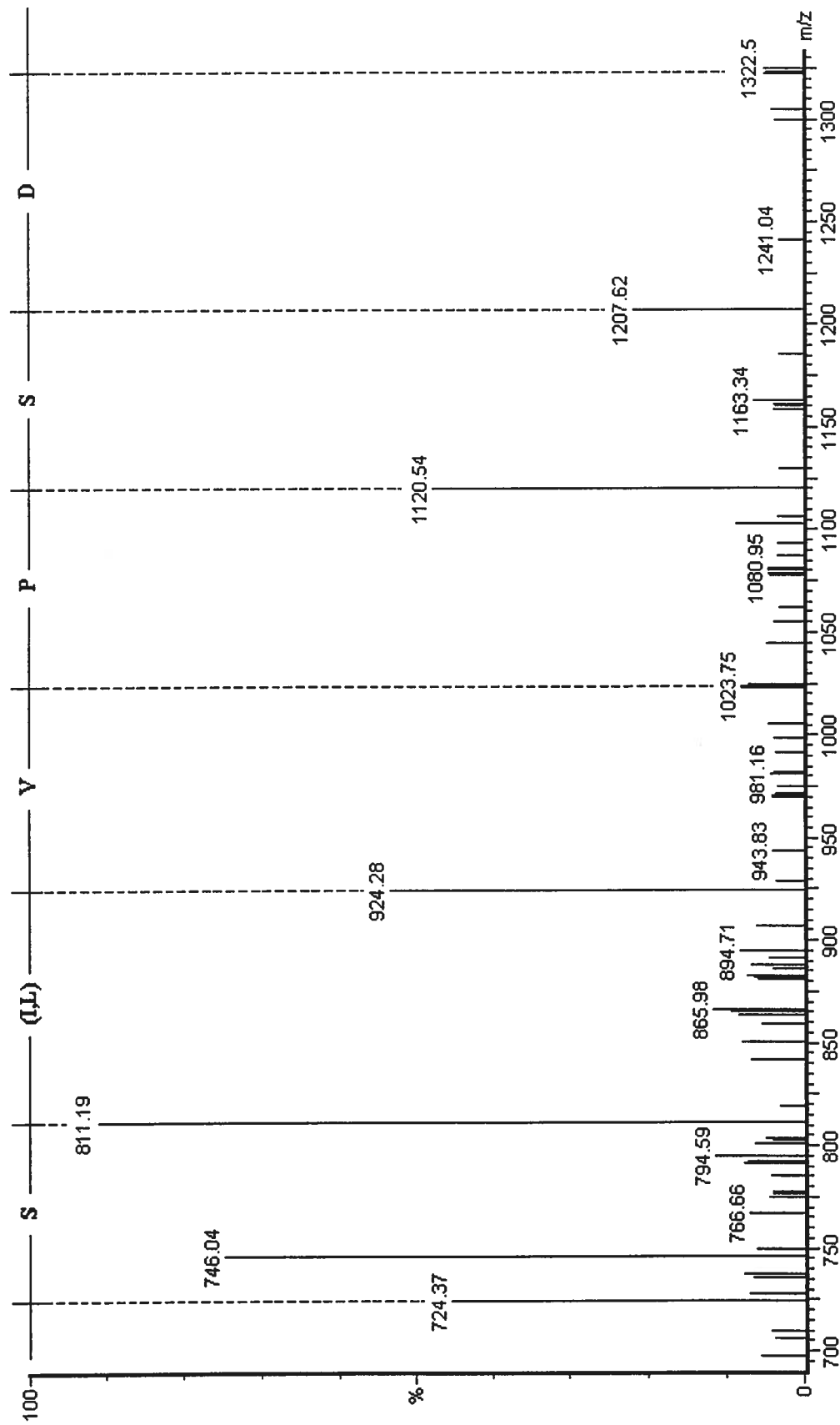
Annexe C-4 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire 671,09 m/z de la protéine de 31 kDa réprimée chez *D. frappieri*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 22 eV.



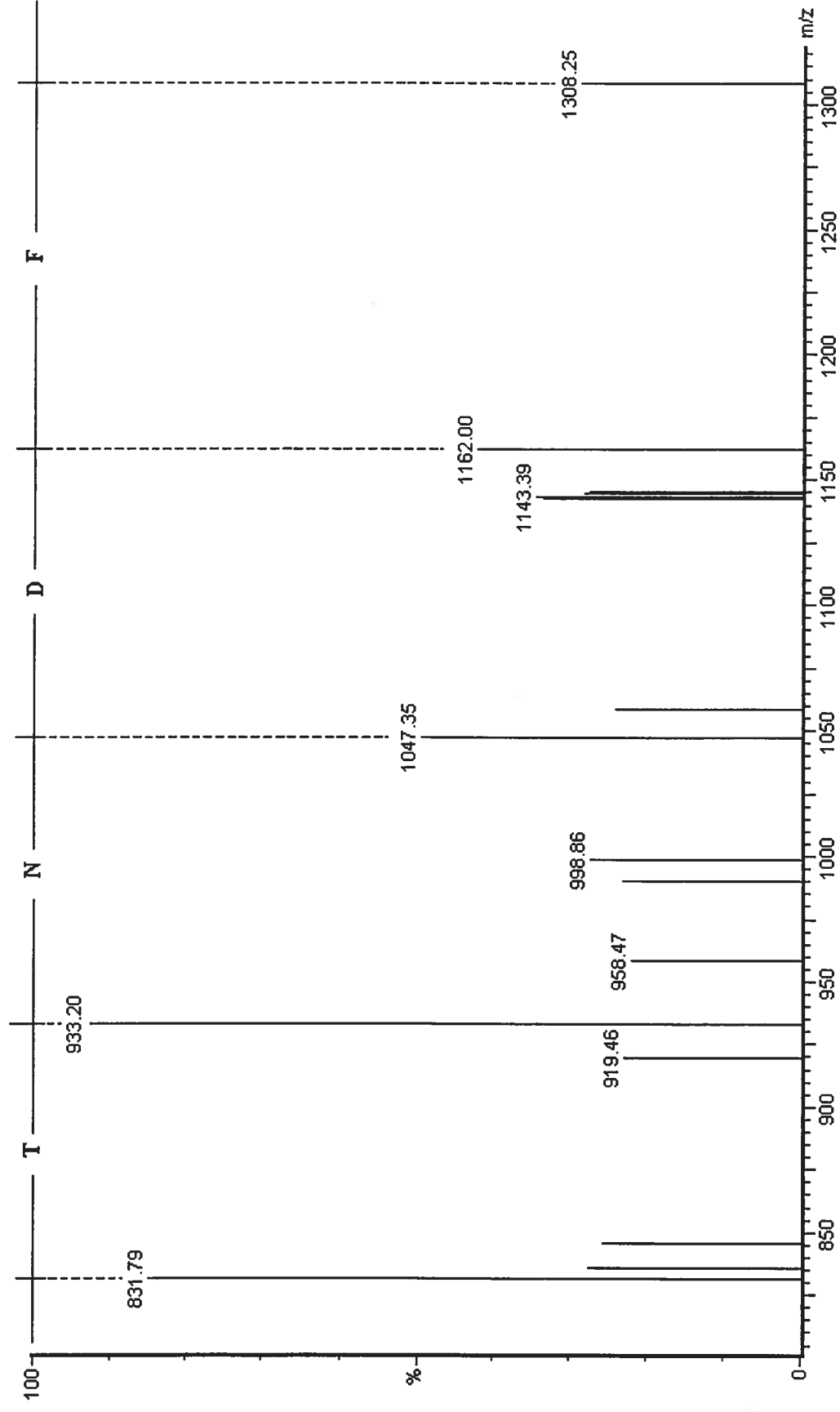
Annexe C-5 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire 856,48 m/z de la protéine de 31 kDa réprimée chez *D. frappieri*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 25 eV.

Annexe D

Spectres de masse en tandem obtenus pour la protéine 36,5 kDa



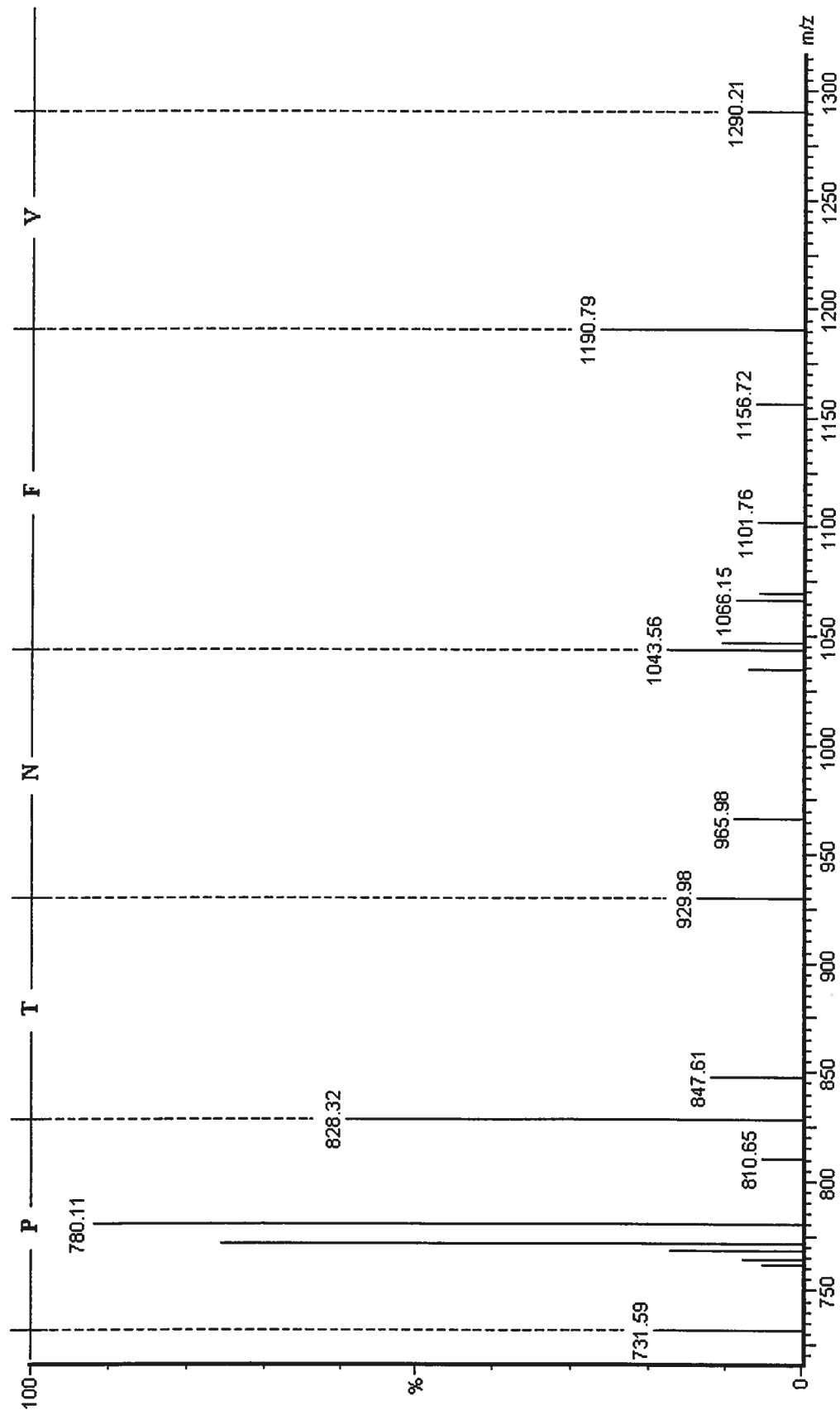
Annexe D-1 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire 668,35 m/z de la protéine de 36,5 kDa réprimée chez *D. frappieri*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 27 eV.



Annexe D-2 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire 708,97 m/z de la protéine de 36,5 kDa réprimée chez *D. frappieri*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 27 eV.

Annexe E

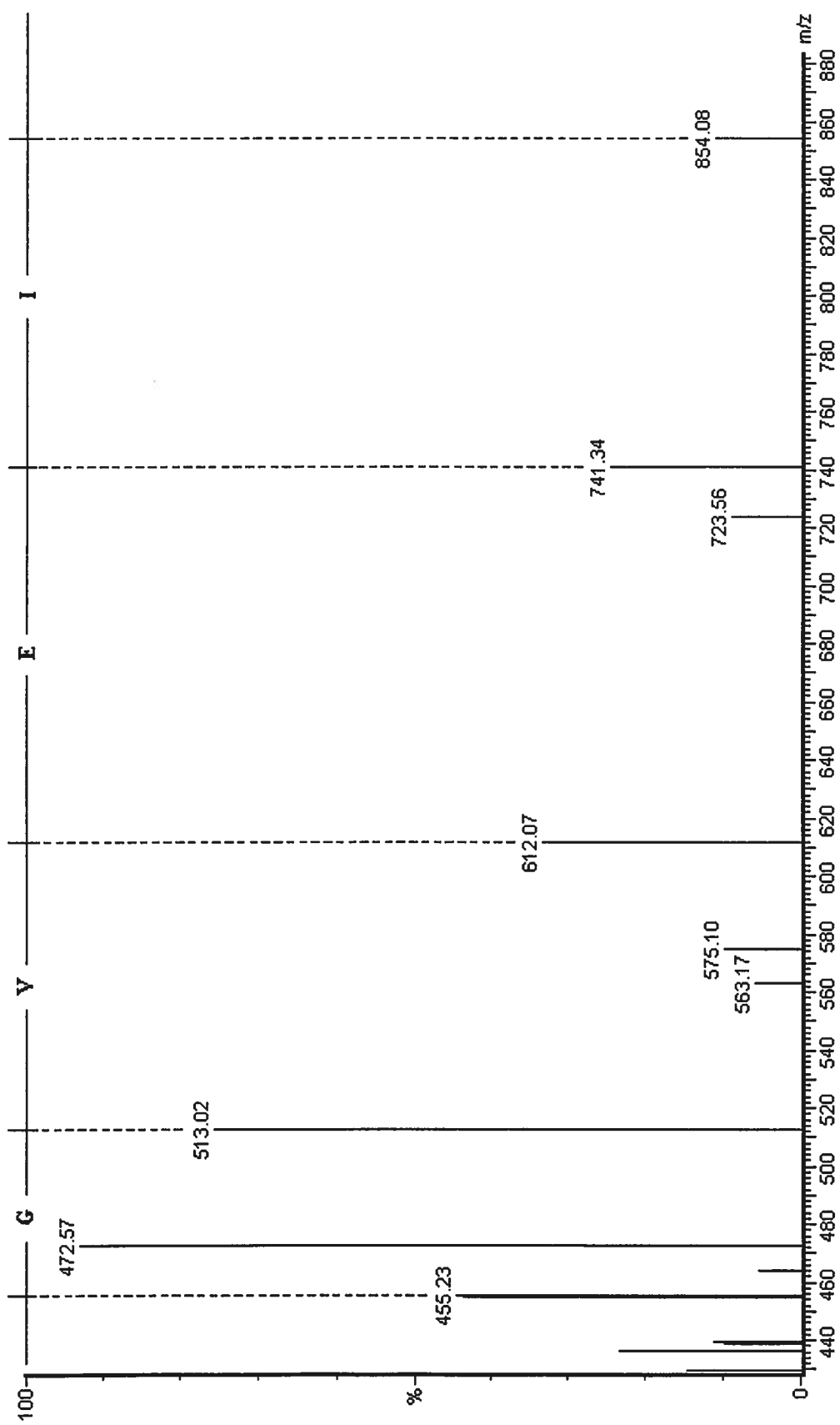
Spectre de masse en tandem obtenus pour la protéine 42 kDa



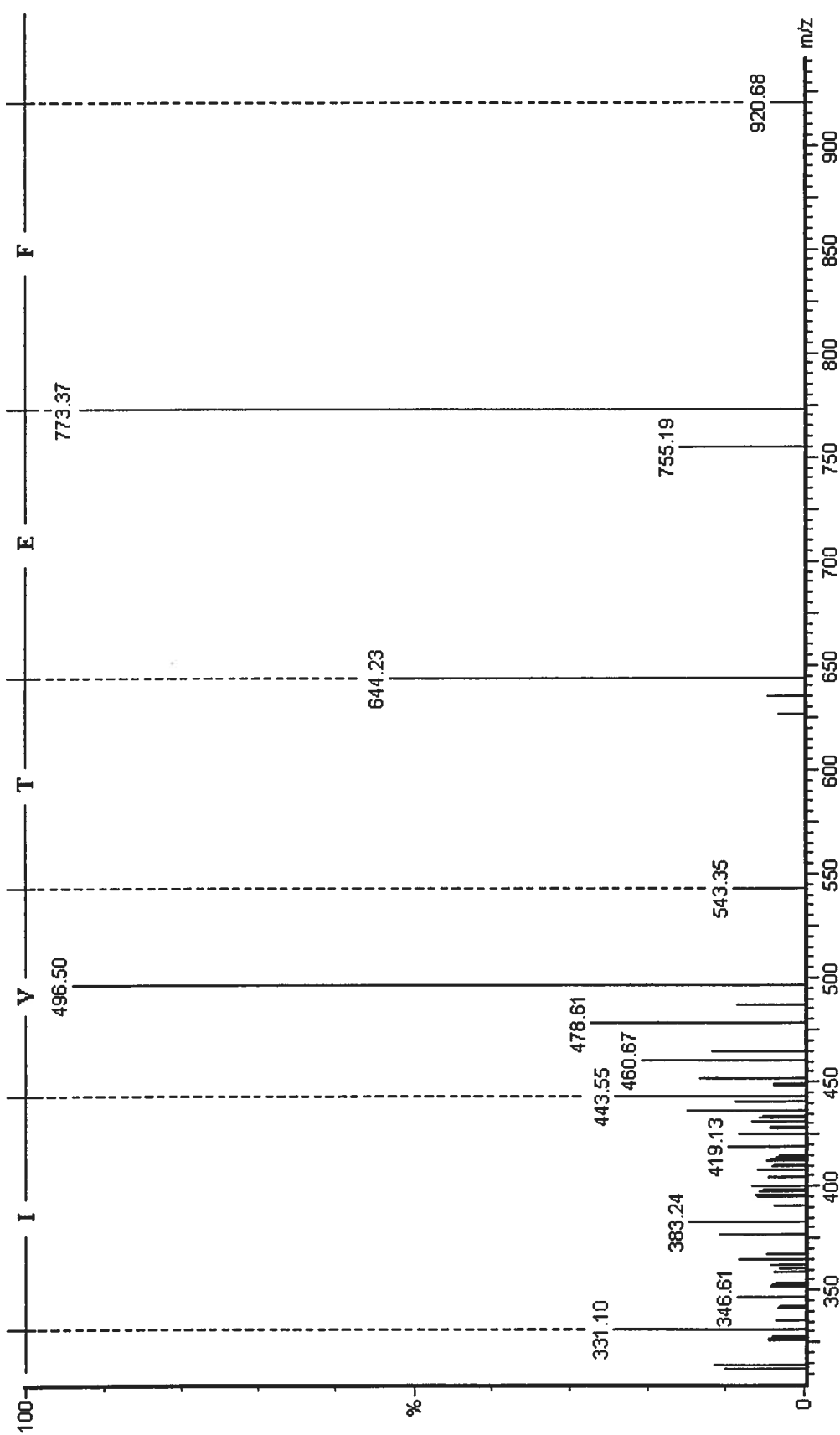
Annexe E-1 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire doublement chargé 779,86 m/z de la protéine cytoplasmique de 42 kDa réprimée chez *D. frappei*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 27 eV.

Annexe F

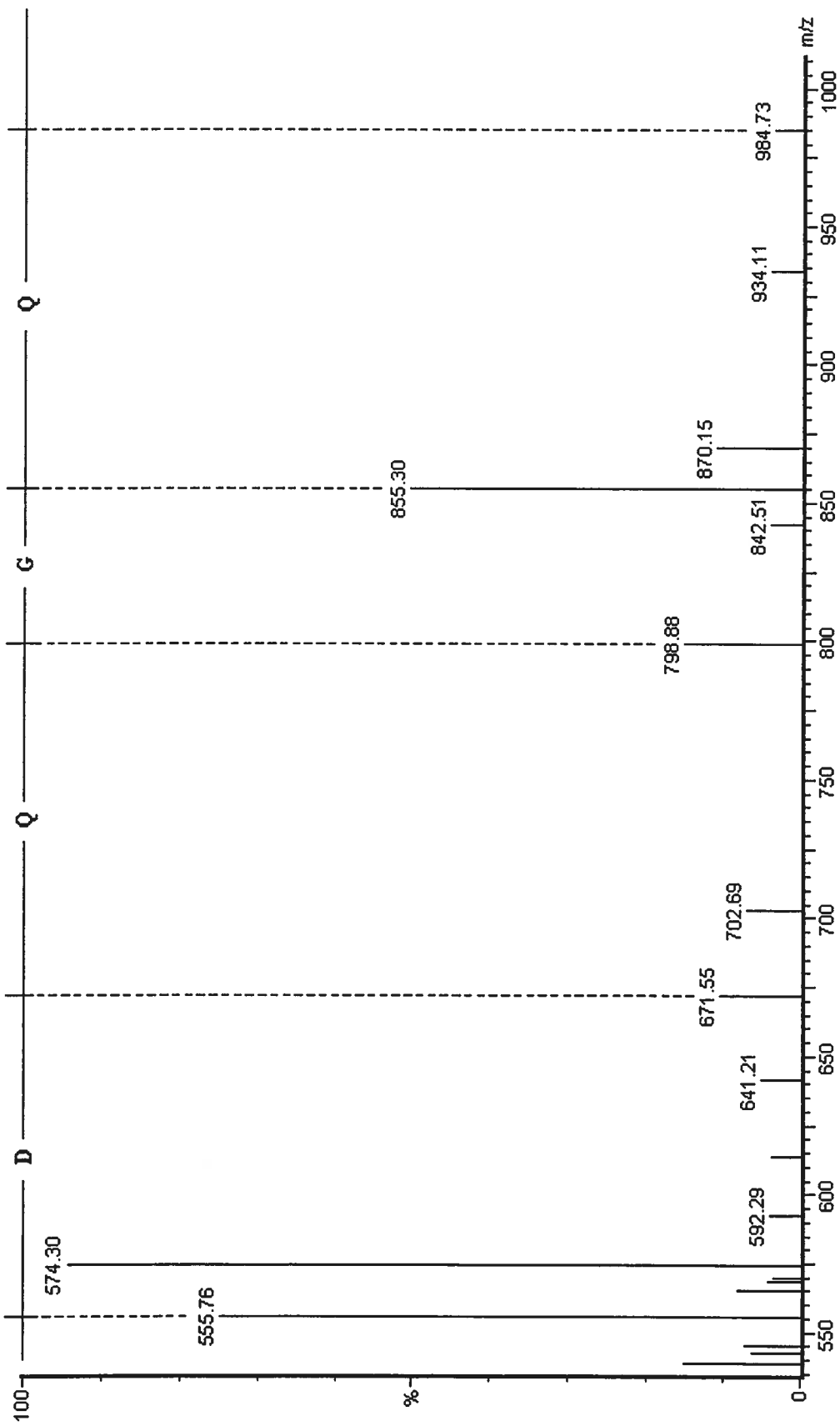
Spectres de masse en tandem obtenus pour la protéine 53 kDa



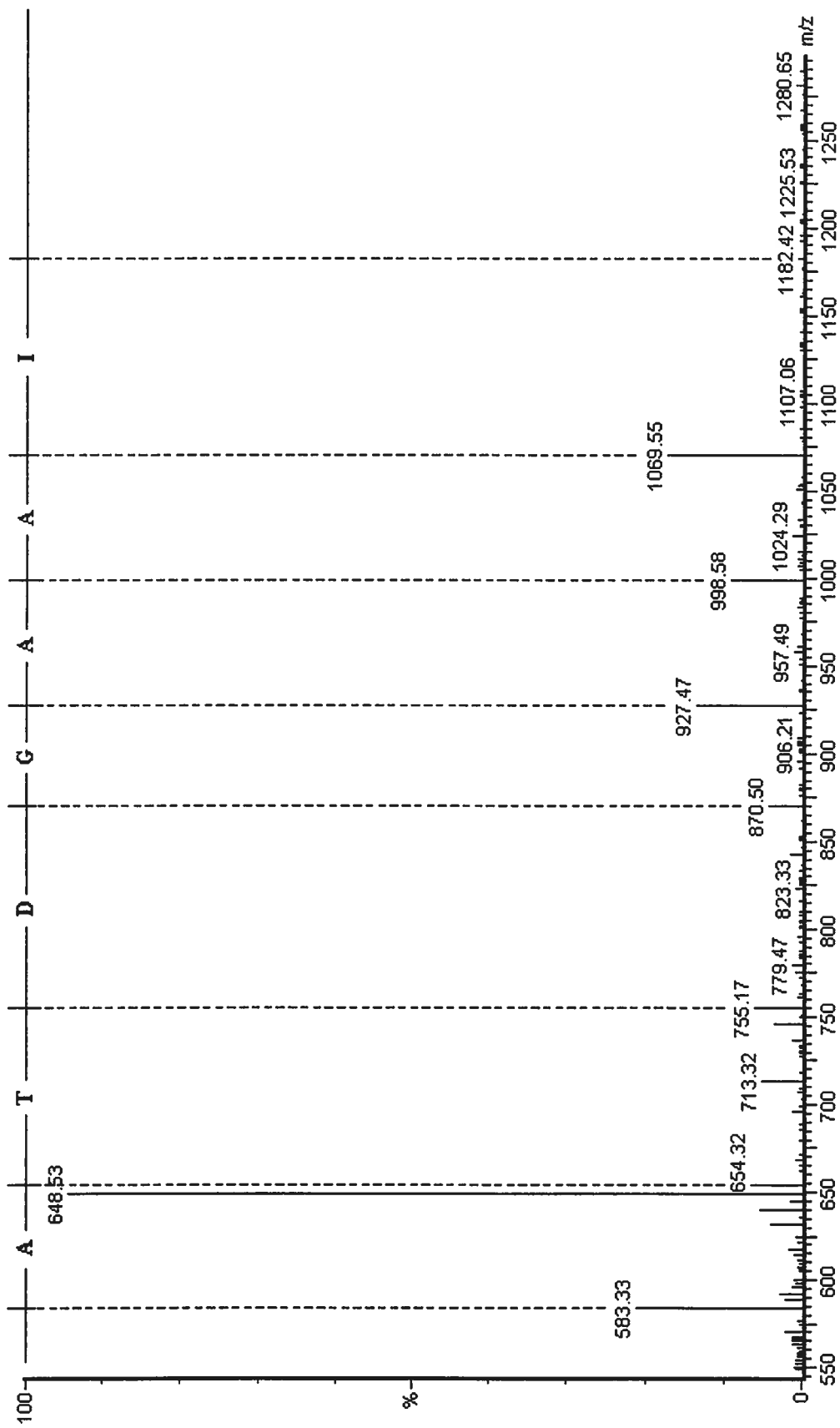
Annexe F-1 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire triplement chargé 472,41 m/z de la protéine membranaire de 53 kDa induite chez *D. frappieri*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 28 eV.



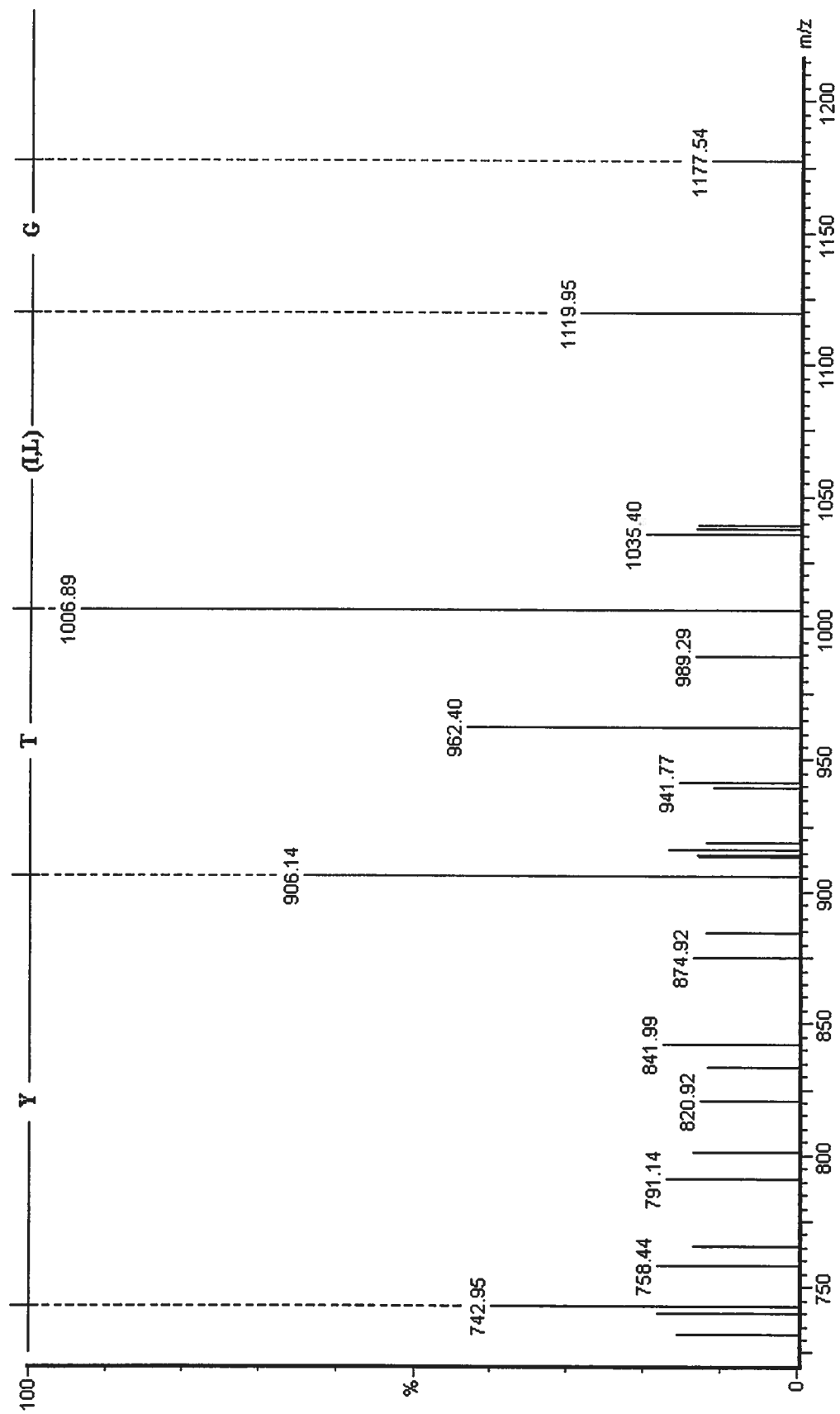
Annexe F-2 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire doublement chargé 496,36 m/z de la protéine membranaire de 53 kDa induite chez *D. frappieri*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 28 eV.



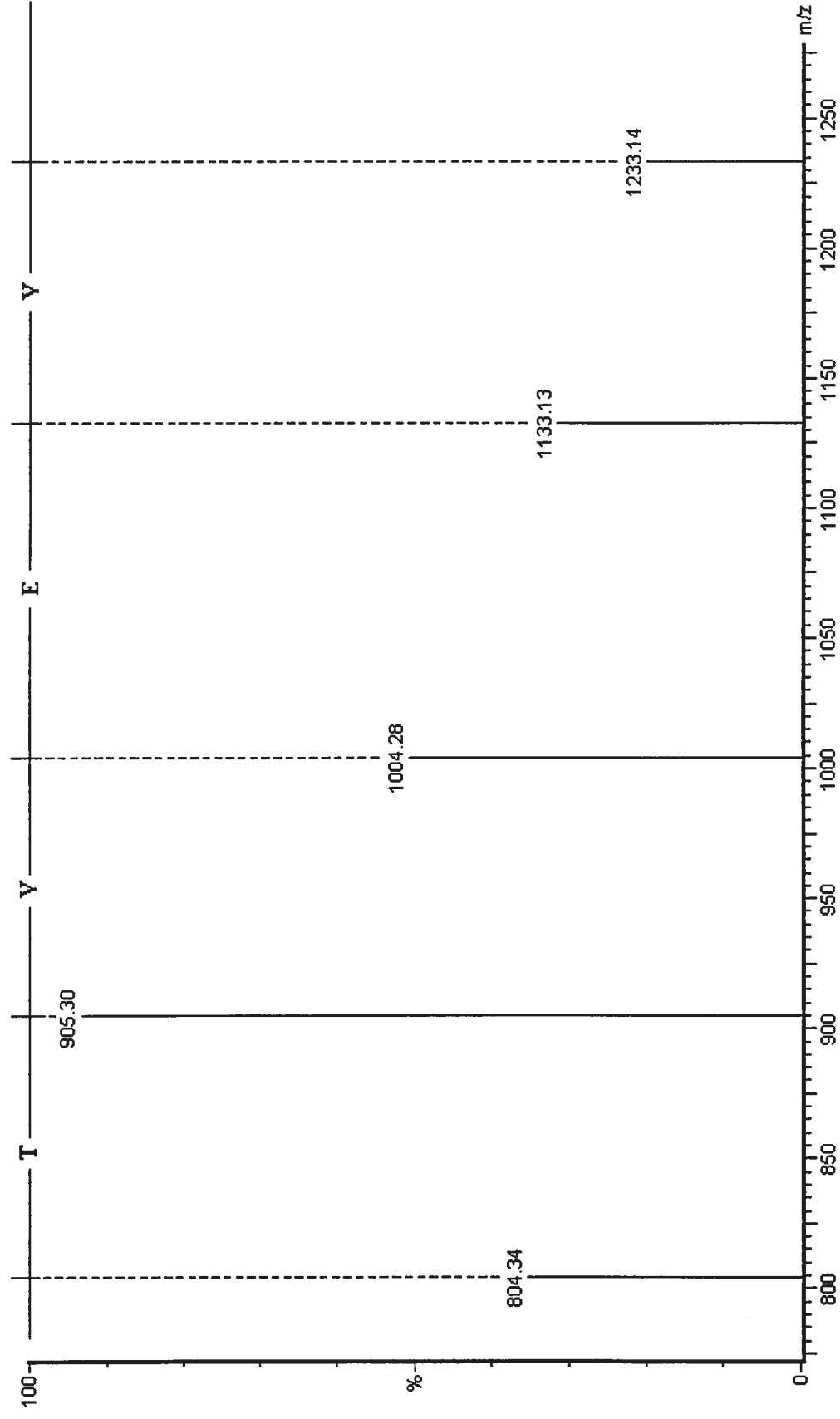
Annexe F-3 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire doublement chargé 574,41 m/z de la protéine membranaire de 53 kDa induite chez *D. frappieri*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 28 eV.



Annexe F-4 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire doublement chargé 648,58 m/z de la protéine membranaire de 53 kDa induite chez *D. frappieri*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 28 eV.



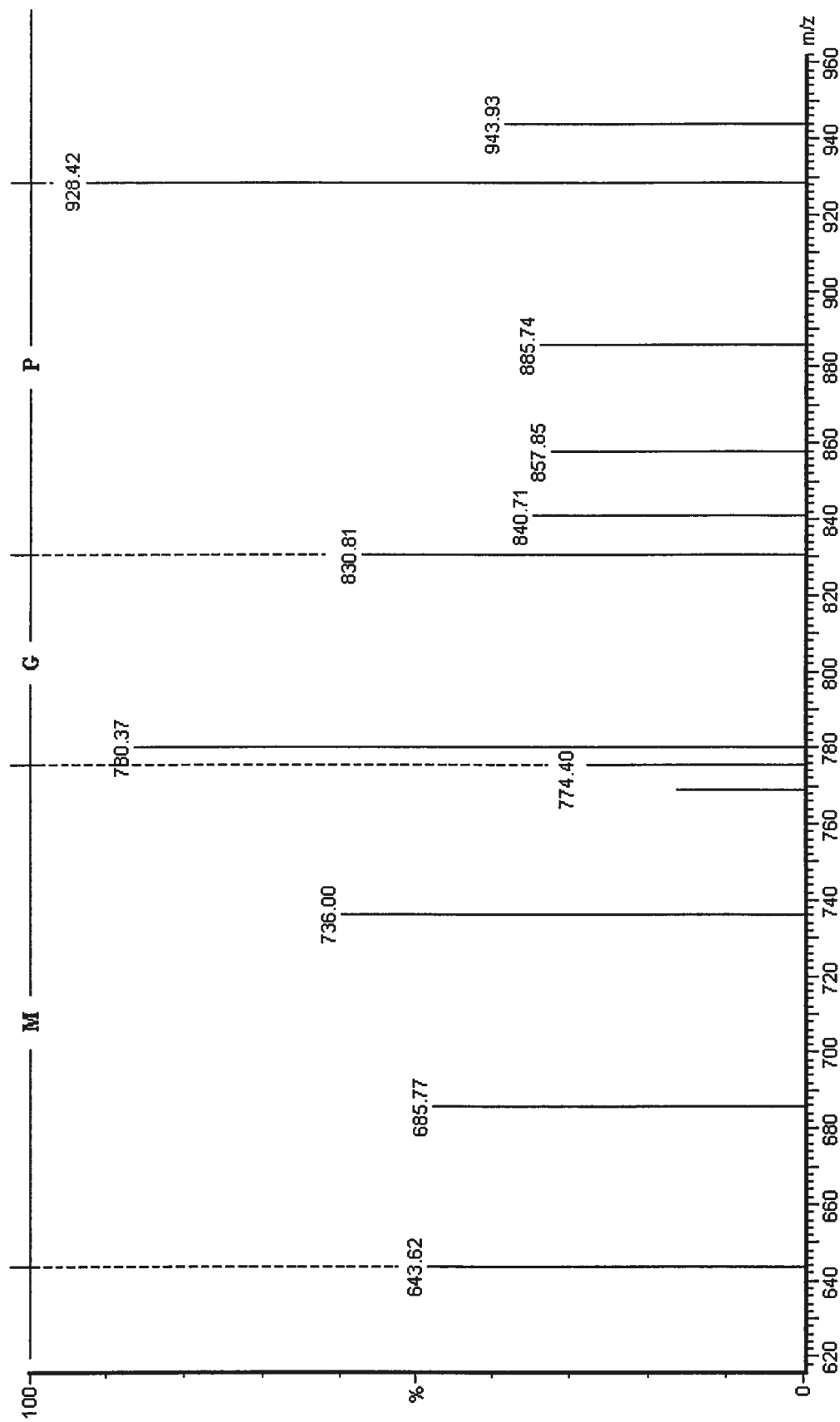
Annexe F-5 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire doublement chargé 703,96 m/z de la protéine membranaire de 53 kDa induite chez *D. frappieri*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 28 eV.



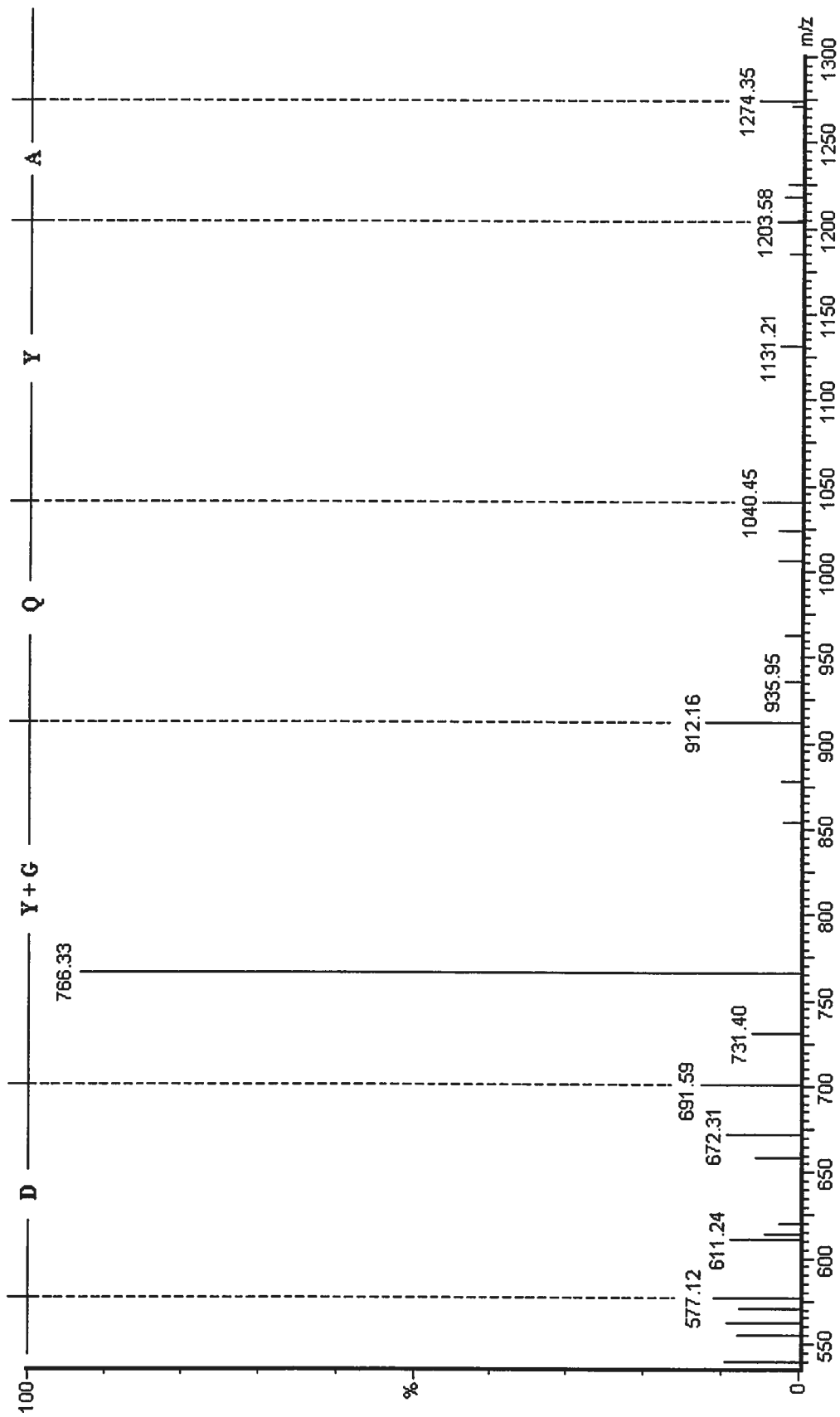
Annexe F-6 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire doublement chargé 730,99 m/z de la protéine membranaire de 53 kDa induite chez *D. frappieri*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 28 eV.

Annexe G

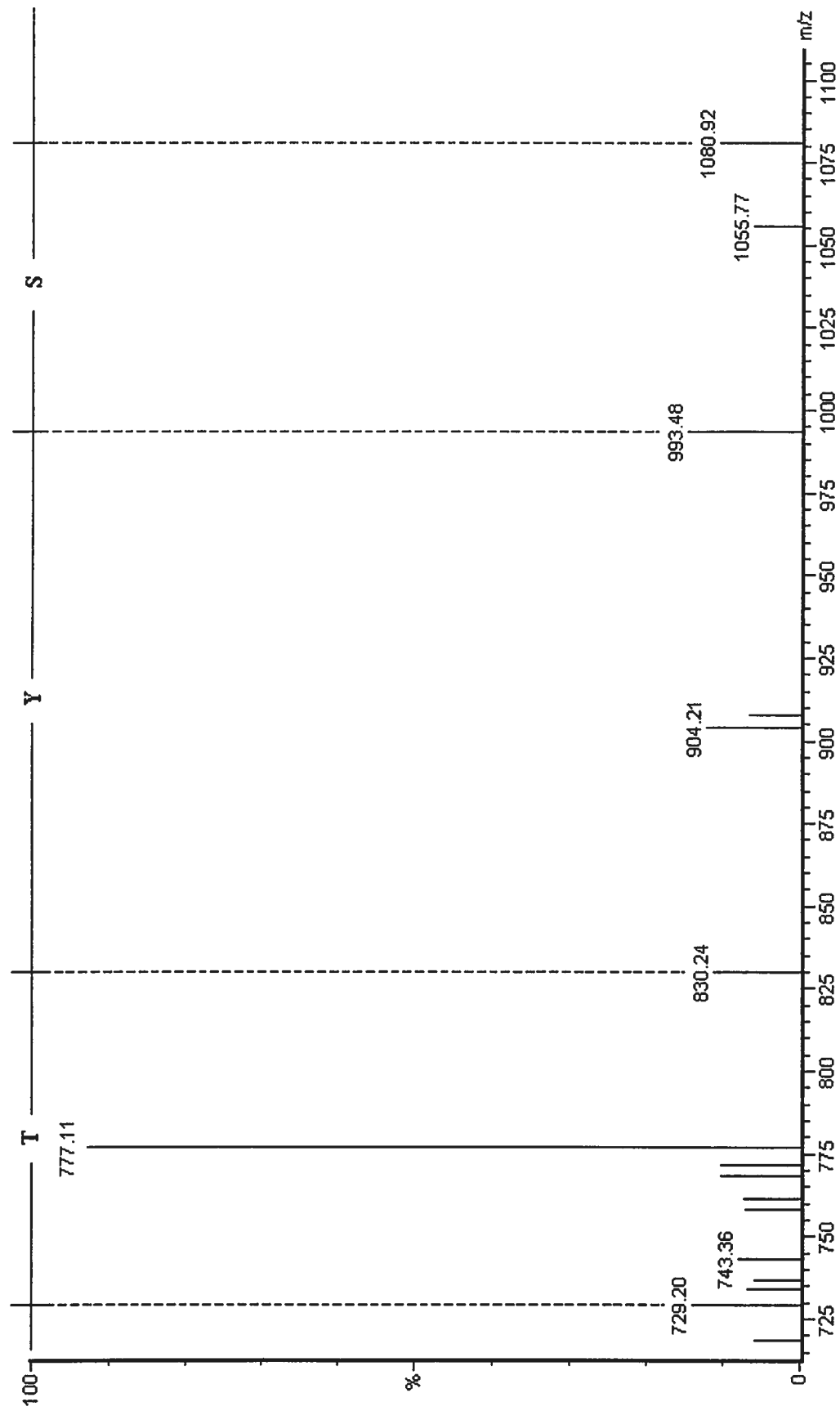
Spectres de masse en tandem obtenus pour la protéine 42,5 kDa



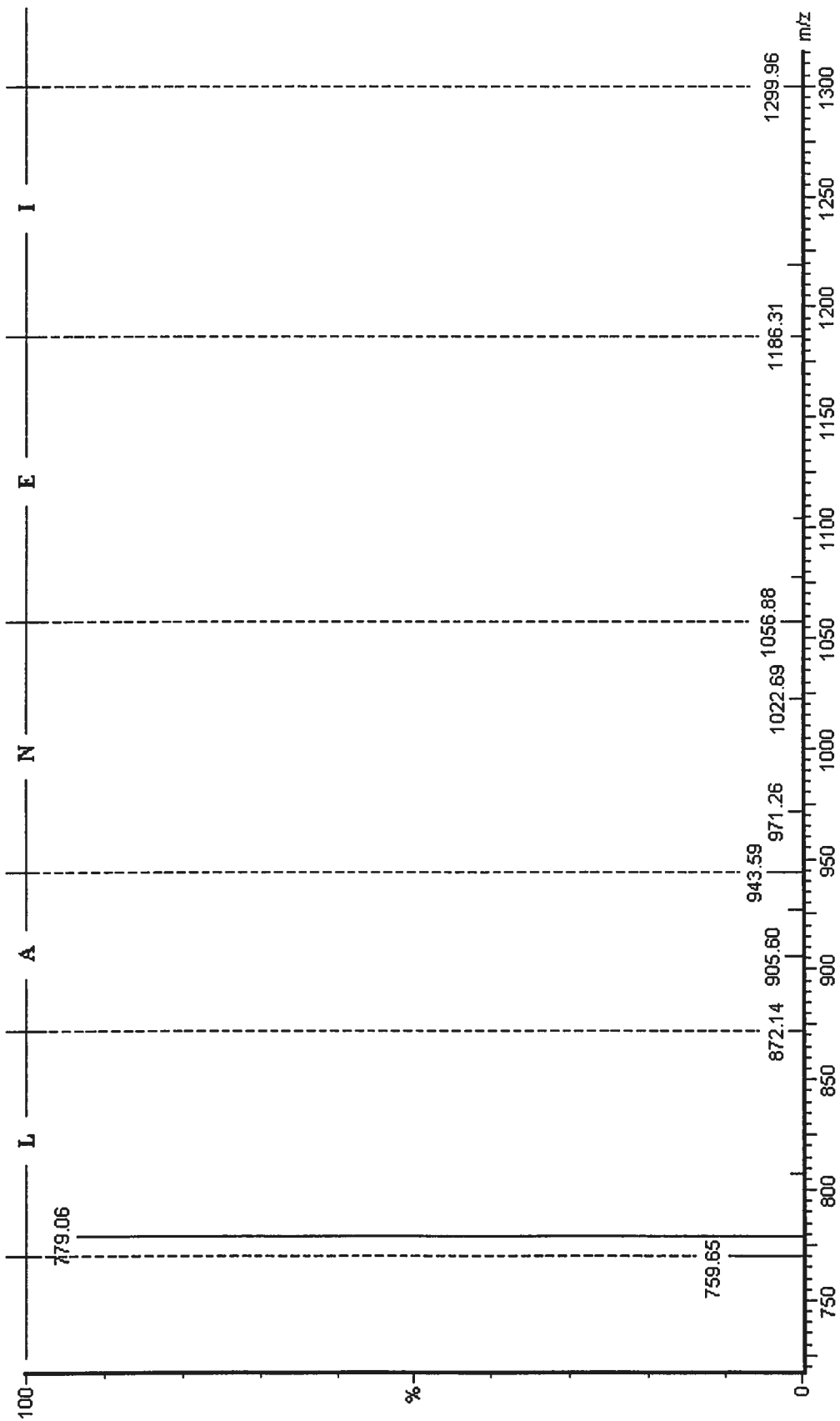
Annexe G-1 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire doublement chargé 635,19 m/z de la protéine membranaire de 42,5 kDa induite chez *D. frappieri*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 29 eV.



Annexe G-2 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire doublement chargé 766,97 m/z de la protéine membranaire de 42,5 kDa induite chez *D. frappieri*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 23 eV.



Annexe G-3 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire triplement chargé 776,31 m/z de la protéine membranaire de 42,5 kDa induite chez *D. frappieri*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 26 eV.



Annexe G-4 : Détermination de la séquence du peptide correspondant à l'ion pseudo-moléculaire doublement chargé 779,33 m/z de la protéine membranaire de 42,5 kDa induite chez *D. frappieri*. Analyse MS/MS effectuée avec une énergie de collision de 31 eV