

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC
INRS-Institut Armand-Frappier

**ÉTUDE DE LA DÉSHALOGÉNASE II DE
DESULFITOBACTERIUM FRAPPIERI PCP-1**

PAR
JACINTHE THIBODEAU

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

François Lépine, Ph.D.
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Daniel Dubreuil, Ph.D.
Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Directeur de recherche

Réjean Beaudet, Ph.D.
INRS-Institut Armand- Frappier

Résumé

Le pentachlorophénol (PCP), un composé toxique et récalcitrant dans l'environnement, est dégradé selon un mécanisme de déshalogénéation réductrice effectué par la bactérie anaérobie stricte, *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. *D. frappieri* est le seul microorganisme connu qui peut déshalogéner le PCP jusqu'au 3-chlorophénol. Deux déshalogénases, sensibles à l'oxygène et d'origine membranaire, seraient impliquées dans ce processus. La déshalogénase I, induite par le PCP et le 2,4,6-trichlorophénol (2,4,6-TCP), effectue la déshalogénéation principalement en position *ortho* de la molécule alors que la déshalogénase II, induite par le 3,5-dichlorophénol (3,5-DCP), effectue la déshalogénéation principalement en positions *meta* et *para*.

Les objectifs de ce projet de maîtrise étaient (I) d'optimiser les conditions de production de la déshalogénase II par la bactérie, (II) de la purifier et (III) de la caractériser. L'étude des conditions de culture de *D. frappieri* a permis d'obtenir des préparations membranaires dont l'activité de déshalogénéation *in vitro* était 100 fois plus élevée que l'activité initialement obtenue avec la bactérie. En effet, la température d'incubation des cultures s'est révélée un facteur important où l'activité maximale est obtenue à des températures entre 22-30°C comparativement à 37°C qui est la température optimale de croissance. Le pH optimal de croissance est 7,5 et la biomasse est recueillie à la fin de la phase exponentielle de croissance. La déshalogénase II, présente dans les préparations membranaires, a été solubilisée dans un tampon phosphate de potassium (pH 8,0) contenant 0,1% de Triton X-100, 20 % de glycérol et 1 mM de dithiothréitol. Une activité de déshalogénéation du 3,5-DCP d'environ 6,17 η moles 3-CP min^{-1} mg de protéines⁻¹ a été obtenue pour la fraction membranaire solubilisée. La déshalogénase II a été purifiée jusqu'à homogénéité et son poids moléculaire a été évalué à 57 kDa par SDS-PAGE. Une caractérisation partielle de cette enzyme a été entamée. Le pH optimal de l'activité enzymatique se situe à 6,8-7,0. Le sulfite (2,5 mM) inhibe à 100% l'activité de la déshalogénase II alors que le sulfate et le nitrate n'ont aucun effet à des concentrations jusqu'à 75 mM. Les essais d'inhibition par l'iodopropane ont révélé que la déshalogénase II, autant dans la préparation membranaire solubilisée que dans la préparation semi-purifiée, est inhibée en présence de 1-iodopropane, mais dans les conditions utilisées, l'activité n'est que faiblement restaurée en présence de lumière. Les résultats obtenus suggèrent la présence d'une cobalamine comme cofacteur. Enfin, le spectre d'activité démontre que le PCP, le 3,4,5-trichlorophénol et le 3,5-DCP sont rapidement déshalogénés en positions *para* et *meta*. Une activité plus faible de déshalogénéation en position *ortho* est aussi observée pour le 2,4,6-TCP et le 2,4-DCP. Ce travail a permis la purification et la caractérisation partielle d'une nouvelle enzyme de *D. frappieri* PCP-1 pouvant déshalogéner différents chlorophénols en positions *para* et *meta*.


Étudiant


Directeur de recherche

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier Réjean Beaudet Ph.D. de m'avoir accueillie dans son laboratoire et d'avoir dirigé mes travaux de maîtrise. Je le remercie pour tous ses conseils, sa très grande disponibilité et son soutien financier.

J'aimerais aussi remercier très chaleureusement Rita Alary pour son expertise, ses conseils judicieux et pratico-pratiques et pour son soutien lors de la purification de la déshalogénase II. Merci pour les conversations et les rires!

Je tiens à remercier tout le groupe de l'environnement pour toutes les connaissances variées apprises lors des réunions de laboratoire et je pense que la force du groupe réside dans chacune de vos expertises.

Un remerciement spécial au Congrès INRS-Institut Armand-Frappier pour le premier prix de présentation par affiche.

Je ne pourrais passer sous silence l'année passée dans l'AGEIAF et c'est pourquoi je tiens à remercier les filles avec qui j'ai partagé des moments inoubliables. Merci Annie, Anne-So et Rox!

Enfin, je me fais un plaisir de remercier mes parents et mon frère que j'adore, car ils ont toujours su m'encourager et me soutenir. Merci de votre écoute et de votre présence malgré la distance qui nous sépare!

TABLE DES MATIÈRES

	Page
Résumé	ii
Remerciements	iii
Table des matières	iv
Liste des tableaux	vi
Liste des figures	vii
Liste des abréviations	viii
Introduction	1
Revue de littérature	4
1. Pentachlorophénol et autres composés halogénés toxiques	5
2. Déshalogénéation réductrice et halorespiration	7
2.1 Les mécanismes de déshalogénéation.....	7
2.2 La déshalogénéation réductrice.....	8
2.3 L'halorespiration.....	10
3. Souches bactériennes effectuant la déshalogénéation réductrice	11
3.1 <i>Desulfitobacterium frappieri</i> PCP-1.....	17
4. Les déshalogénases	22
4.1 La 3-chlorobenzoate déshalogénase réductrice de <i>Desulfomonile tiedjei</i> DCB-1	22
4.2 La déshalogénase réductrice de <i>Dehalobacter restrictus</i>	25
4.3 La tétrachloroéthylène déshalogénase réductrice de <i>Dehalospirillum multivorans</i>	26
4.4 Les tétrachloroéthylène et trichloroéthylène déshalogénases réductrices de <i>Dehalococcoides ethenogenes</i> souche 195.....	30
4.5 La <i>ortho</i> -chlorophénol déshalogénase réductrice de <i>Desulfitobacterium dehalogenans</i> souche JW/IU-DC1.....	32
4.6 La déshalogénase aryle-réductrice de <i>Desulfitobacterium</i> <i>chlororespirans</i> souche Co23.....	34
4.7 La 3-chloro-4-hydroxyphénylacétate (3-Cl-4-OHPA) déshalogénase réductrice de <i>Desulfitobacterium hafniense</i> souche DCB-2.....	35
4.8 Les chlorophénol et tétrachloroéthylène déshalogénases réductrices de <i>Desulfitobacterium</i> sp. souche PCE1	36
4.9 La tétrachloroéthylène déshalogénase réductrice de <i>Desulfitobacterium</i> sp. souche PCE-S.....	37
4.10 Les déshalogénases réductrices de <i>Desulfitobacterium</i> <i>frappieri</i> souche PCP-1.....	37
4.11 Objectifs de l'étude.....	39

Matériel et méthodes	42
1. Provenance de <i>Desulfitobacterium frappieri</i> souche PCP-1.....	43
2. Préparation du milieu et culture de <i>D. frappieri</i> PCP-1 dans des bouteilles de sérum.....	43
3. Manipulations en conditions anaérobies.....	45
4. Conditions de culture pour la production de la déshalogénase II.....	45
4.1 Température et vitamines.....	46
4.2 Courbe de croissance.....	47
5. Production d'une biomasse et fractionnement cellulaire.....	47
6. Solubilisation de la déshalogénase II.....	50
7. Dosage <i>in vitro</i> de l'activité de déshalogénéation.....	50
8. Cinétique enzymatique.....	51
9. Analyse des chlorophénols par chromatographie liquide à haute performance (CLHP).....	51
10. Dosage des protéines.....	52
11. Purification de la déshalogénase II.....	52
12. Électrophorèse en gel de polyacrylamide avec SDS.....	54
13. Caractérisation de la déshalogénase II.....	55
13.1 Détermination du pH optimal.....	55
13.2 Effet du sulfate, du sulfite et du nitrate sur l'activité de la déshalogénase II.....	56
13.3 Essais d'inhibition de l'activité de la déshalogénase II par le 1-iodopropane.....	56
13.4 Spectre d'activité de la fraction membranaire solubilisée.....	57
Résultats	59
1. Conditions optimales de production de la déshalogénase II.....	60
1.1 Effet de l'addition de vitamines et de la température d'incubation..	60
1.2 Courbe de croissance.....	62
2. Dosage de l'activité enzymatique de déshalogénéation.....	63
3. Purification de la déshalogénase II.....	65
4. Caractérisation de la déshalogénase II.....	68
4.1 Détermination du pH optimal.....	68
4.2 Effet du sulfate, sulfite et nitrate.....	68
4.3 Essai d'inhibition réversible de l'activité par le 1-iodopropane.....	71
4.4 Spectre d'activité d'une préparation membranaire de la déshalogénase II solubilisée.....	73

Discussion	74
1. Conditions optimales de production de la déshalogénase II.....	75
2. Purification de la déshalogénase II.....	77
3. Caractérisation partielle de la déshalogénase II.....	80
Conclusion	86
Bibliographie	90

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1 : Résumé des caractéristiques de souches bactériennes anaérobies autres que <i>Desulfitobacterium</i> effectuant la déshalogénéation réductrice	20
Tableau 2 : Résumé des caractéristiques de souches bactériennes anaérobies du genre <i>Desulfitobacterium</i> effectuant la déshalogénéation réductrice	21
Tableau 3 : Résumé des caractéristiques des déshalogénases produites par des bactéries anaérobies	40
Tableau 4 : Résumé des caractéristiques, structures et substrats transformés par les déshalogénases produites par les souches bactériennes anaérobies du genre <i>Desulfitobacterium</i>	41
Tableau 5 : Conditions de culture utilisées lors des essais de production de la déshalogénase II par <i>D. frappieri</i> PCP-1	46
Tableau 6 : Tableau de purification de la déshalogénase II	67
Tableau 7 : Spectre d'activité d'une préparation membranaire solubilisée de la déshalogénase II pour différents chlorophénols	73

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1 : Mécanismes de déshalogénéation	9
Figure 2 : Modèle chimiosmotique de la déshalorespiration de <i>D. tiedjei</i> DCB-1	24
Figure 3 : Modèle pour la chaîne respiratoire de <i>D. restrictus</i>	26
Figure 4 : Modèle de la déshalogénéation réductrice du PCE, à flot réversible d'électrons, de <i>D. multivorans</i>	29
Figure 5 : Mécanisme proposé pour la <i>ortho</i> -chlorophénol déshalogénase réductrice chez <i>D. dehalogenans</i>	34
Figure 6 : Effet de différentes conditions de culture de <i>D. frappieri</i> PCP-1 sur la déshalogénéation du 3,5-DCP	61
Figure 7 : Effet de la température d'incubation des cultures de <i>D. frappieri</i> PCP-1 sur la déshalogénéation du 3,5-DCP	61
Figure 8 : Courbe de croissance de <i>D. frappieri</i> PCP-1 avec ajustement de pH après 60 heures de culture pour une température d'incubation de 25°C	62
Figure 9 : Cinétique enzymatique de la formation de 3-CP en fonction du temps pour deux préparations (A) et (B) de la déshalogénase II de <i>D. frappieri</i> PCP-1	64
Figure 10 : Chromatogramme obtenu lors de la chromatographie sur la colonne d'hydrophobicité (Méthyl-CIH)	66
Figure 11 : Électrophorèse en gel de polyacrylamide (12%), en conditions dénaturantes (SDS). Le gel a été coloré pour les protéines avec le bleu de Coomassie R-250	67
Figure 12 : Détermination du pH optimal de la déshalogénase II dans un tampon phosphate de potassium (0,1 M)	69
Figure 13 : Effet du sulfate et du nitrate sur l'activité de la préparation de la déshalogénase II	70
Figure 14 : Effet du sulfite sur l'activité de la déshalogénase II	70
Figure 15 : Essai d'inhibition réversible par le 1-iodopropane (1 mM) d'une préparation membranaire solubilisée et d'une préparation semi-purifiée de déshalogénase II	72

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- 3-CB : 3-chlorobenzoate
- BPC : biphényles polychlorés
- CG : chromatographie en phase gazeuse
- CHAPS : 3-[(3-cholamidopropyl)diméthyl-ammonio]-1-propanesulfonate
- CIH : Chromatographie à interactions hydrophobiques
- Cl-HBA : 3-chloro-4-hydroxybenzoate
- CLHP : chromatographie liquide à haute performance
- Cl-OHPA : 3-chloro-4-hydroxyphénylacétate
- CP : monochlorophénol
- DCE : dichloroéthylène
- DCP : dichlorophénol
- DTT : dithiothréitol
- MLA : milieu liquide anaérobie utilisé pour la culture de *D. frappieri* PCP-1
- PCE : tétrachloroéthylène
- PCP : pentachlorophénol
- SDS : lauryl sulfate de sodium
- TAE : tampon d'activité enzymatique utilisé pour les essais *in vitro* de l'activité de déshalogénéation
- TCE : trichloroéthylène
- TCP : trichlorophénol
- TeCP : tétrachlorophénol

INTRODUCTION

Un grand nombre de composés halogénés toxiques et récalcitrants tels que les biphényles polychlorés (BPC), le pentachlorophénol (PCP), le tétrachloroéthylène (PCE) et l'hexachlorobenzène sont responsables de nombreux problèmes de pollution de l'environnement. Ces substances sont résistantes à la transformation oxydative des environnements naturels. La déshalogénéation réductrice effectuée par certains microorganismes anaérobies est souvent le seul mécanisme connu pour la biodégradation de plusieurs de ces composés aromatiques polluants hautement halogénés. C'est la première étape de biodégradation et elle permet de rendre les substances moins toxiques et plus facilement transformables par les microorganismes retrouvés en conditions anaérobies et également pour la dégradation subséquente en conditions aérobies.

Le PCP a été très utilisé depuis les années 1930 comme agent de préservation dans l'industrie des bois extérieurs puis, par la suite, dans l'agriculture, comme pesticide vu son large spectre d'activité contre les bactéries, les champignons, les insectes, les plantes et les animaux (Orser et Lange, 1994). Le PCP est, de plus, reconnu pour être très toxique pour les organismes vivants incluant l'humain. Il peut pénétrer par la peau et, à long terme, peut être cancérigène, tératogène et hautement embryotoxique. C'est pourquoi il est prioritaire d'identifier des méthodes pouvant éliminer ce composé toxique présent dans les sols afin de l'éliminer ou d'en réduire la concentration. D'ailleurs, une des avenues la plus prometteuse est l'utilisation de microorganismes capables d'effectuer la déshalogénéation réductrice en condition anaérobie. La biodégradation aérobie permet de dégrader efficacement le PCP, cependant, les biotraitements anaérobies offrent des perspectives avantageuses grâce à leur moindre coût, à leur capacité de dégrader des substances fortement chlorées, difficilement dégradées par les bactéries aérobies et à leur facilité d'application *in situ* (Boyer, 1999).

La déshalogénéation réductrice consiste en une substitution d'un halogène (Cl, Br, I, F) par un atome d'hydrogène, rendant le composé halogéné moins toxique. Depuis quelques années, plusieurs souches bactériennes anaérobies capables d'effectuer la déshalogénéation réductrice ont été isolées et caractérisées. Ces bactéries, à spectre plus ou moins large, sont responsables de la déshalogénéation de différents composés halogénés

tels que les chlorophénols, les tétra- et trichloroéthylènes ainsi que le 3-chloro-4-hydroxyphénylacétate. Les déshalogénases sont responsables de ces transformations et elles ont été isolées et caractérisées à partir de différents microorganismes anaérobies tels que *Desulfomonile tiedjei* DCB-1, *Dehalospirillum multivorans*, *Dehalococcoides ethenogenes*, celles du genre *Desulfitobacterium* telles que *dehalogenans*, *chlororespirans*, *hafniense*, souche PCE-1, souche PCE-S et *frappieri* souche PCP-1. *D. frappieri* est la seule bactérie capable de déshalogéner le PCP jusqu'au 3-chlorophénol; la majorité des autres microorganismes ne pouvant déshalogéner les chlorophénols qu'en position *ortho*. Ainsi, chez *D. frappieri* PCP-1, la déshalogénéation du PCP est catalysée par deux enzymes membranaires et sensibles à l'oxygène. La déshalogénase I, réalise la déshalogénéation principalement en position *ortho* alors que la déshalogénase II, effectue la déshalogénéation en positions *meta* et *para*. Aucune déshalogénase responsable de ces dernières transformations (en *meta* et *para*) n'a encore été purifiée et caractérisée. Il a également été démontré que *D. frappieri* PCP-1 pouvait déshalogéner une grande variété de composés aromatiques halogénés (Dennie *et al.*, 1998), survivre dans différents environnements contaminés ou non (Lanthier *et al.*, 2001) et être utilisée dans des procédés anaérobies de biodégradation du PCP dans des sols et des bioréacteurs (Beaudet *et al.*, 1998; Lanthier *et al.*, 2000; Tartakovsky *et al.*, 1999).

Les objectifs de ce projet de maîtrise étaient (I) d'optimiser les conditions de production de la déshalogénase II par *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1, dans le but d'obtenir une préparation membranaire ayant un taux élevé de déshalogénéation du 3,5-DCP, (II) de réaliser la purification et, éventuellement, (III) une caractérisation préliminaire de l'enzyme.

REVUE DE LITTÉRATURE

1- Le pentachlorophénol et autres composés halogénés toxiques

Le pentachlorophénol (PCP) a été largement utilisé, depuis son introduction sur le marché dans les années 1930, dû à sa versatilité et à son action biocide. Il a d'abord été utilisé comme agent de conservation dans l'industrie du bois. Puis, à cause de son large spectre d'activité, contre les bactéries, les champignons, les insectes, les plantes supérieures et inférieures ainsi que contre les animaux, il a aussi été utilisé dans l'industrie et l'agriculture (Orser et Lange, 1994). Le PCP possède ces fonctions biocides car c'est un composé xénobiotique stable, peu réactif, très toxique et résistant à la dégradation. La toxicité du PCP réside dans sa capacité de rendre la membrane cellulaire perméable aux protons, détruisant ainsi les gradients de pH membranaires et les potentiels électriques. Puisqu'il a la capacité de s'adsorber aux membranes déjà altérées, il cause des désordres des fonctions membranaires tel que le découplage de la phosphorylation oxydative (McAllister *et al.*, 1996). De plus, le PCP, puisqu'il est très acide, est soluble autant dans les solvants aqueux qu'organiques (Orser et Lange, 1994). Chez l'homme, le PCP pénètre par la peau et il a récemment été démontré qu'un taux élevé de PCP dans le sang augmente significativement le risque d'immunodéficiences cellulaires et humorales (Volker *et al.*, 2001).

Il existe d'autres composés xénobiotiques qui ont été largement épendus ou libérés dans l'environnement depuis les années 1930. Ces derniers sont classés selon trois catégories, soit les pesticides organochlorés, les solvants alkyles et les aryles halogénés (Mohn et Tiedje, 1992). La première catégorie, les pesticides organochlorés, inclut le DDT, le lindane, le mirex et le toxaphène. Ces composés ont surtout été utilisés comme pesticides et sont dégradés par la déshalogénéation réductrice. La deuxième catégorie, les solvants alkyles, regroupe les solvants halogénés en C₁ et C₂ tels que le chlorométhane, le chloroforme, le tétrachloroéthylène (PCE) et le trichloroéthylène (TCE). Ces produits ont été utilisés pour le nettoyage à sec, pour le dégraissage des machineries, pour la fabrication de composantes électroniques et comme pesticides. Ils sont relativement peu solubles dans l'eau et sont donc les majeurs contaminants des sols et des eaux souterraines. Enfin, la dernière catégorie, les aryles halogénés, comprend les composés halogénés

tels que des anilines, des benzènes, les biphényles, des phénoxyacétates et des phénols. Ainsi, les biphényles polychlorés (BPC) et le PCP font partie de cette catégorie. Ces composés ont été largement employés comme pesticides, agents de transfert de chaleur et fluides hydrauliques. Ce n'est pas avant les années 1980 que la déshalogénéation réductrice des composés aryles halogénés a été reconnue (Mohn et Tiedje, 1992).

Plus spécifiquement, l'usage excessif et très répandu du PCP a conduit à la contamination de plusieurs environnements tels que les sols, l'eau de surface, de terrains et de lacs. En 1985, la production annuelle mondiale de PCP s'élevait à 100 000 tonnes. En 1978, au Canada, la consommation se situait entre 2 et 3 millions de kg par année dont 80% était utilisé pour la préservation du bois (McAllister *et al.*, 1996). À partir de 1970 son utilisation a été fortement réglementée et, à présent, le PCP est seulement utilisé par certaines industries de traitement du bois. Les méthodes traditionnelles utilisées pour l'élimination du PCP incluent l'entreposage dans des sites d'enfouissement, l'incinération et la biodégradation. La biodégradation du PCP a lieu selon trois processus : l'hydroxylation, l'oxygénolyse et la déshalogénéation réductrice. L'élimination du PCP peut se faire par des processus abiotiques comme la volatilisation, la photodécomposition et l'absorption tandis que la dégradation biotique est réalisée par les plantes ou les animaux qui l'ingèrent et le transforment et par la dégradation microbienne (McAllister *et al.*, 1996). La biodégradation du PCP et de composés aromatiques chlorés a été observée autant en conditions aérobie qu'anaérobie. Des essais pilotes et à grande échelle pour le traitement de l'eau de déchets et de sols contaminés au PCP ont été menés avec succès en utilisant les organismes aérobies tels que *Flavobacterium* spp. et *Rhodococcus* spp. (Stinson *et al.*, 1991). La dégradation du PCP en conditions anaérobies a été réalisée par l'utilisation d'un consortium méthanogène où avait lieu, dans un premier temps, la déshalogénéation réductrice du PCP en phénol, puis la minéralisation de ce dernier (Beaudet *et al.*, 1997). Il est important d'isoler, en culture pure, les microorganismes responsables de la déshalogénéation réductrice afin d'améliorer les connaissances sur ces bactéries et pouvoir les utiliser dans les conditions optimales pour celles-ci lors de la biorémediation des composés toxiques et polluants pour l'environnement et l'humain.

2- Déshalogénéation réductrice et halo-respiration

De façon générale, la déshalogénéation consiste en l'enlèvement d'un atome d'halogène (chlore, fluor, brome ou iode) d'une molécule halogénée. Ainsi, l'enlèvement d'halogènes, particulièrement le chlore et le fluor, de molécules organiques a fasciné les chimistes et microbiologistes pendant plusieurs années puisque de tels mécanismes diminuent les effets inhibiteurs et procurent des sources alternatives de carbone et d'énergie pour la croissance (Slater *et al.*, 1995). Ces réactions de déshalogénéation sont catalysées par des enzymes, les déshalogénases, produites par les microorganismes autant en aérobie qu'en anaérobie. Plusieurs mécanismes, pouvant éliminer les atomes d'halogènes, existent et ont été décrits. C'est pourquoi l'acquisition de connaissances supplémentaires et précises sur le fonctionnement de ces mécanismes pourrait permettre d'optimiser ces derniers et d'obtenir éventuellement une déshalogénéation plus efficace des composés toxiques qui polluent l'environnement.

2.1 Les mécanismes de déshalogénéation

La résistance à la biodégradation des composés halogénés est reliée à la quantité, au type et à la position des substituants halogénés. En règle générale, la récalcitrance du lien carbone-halogène est proportionnelle à l'électronégativité du substituant. Ainsi, un substituant ayant une forte électronégativité rend un lien carbone-halogène plus récalcitrant. De plus, les substances halogénées comportant un ou peu de substituants halogénés sont plus facilement dégradables que les composés polyhalogénés (Fetzner et Lingens, 1994).

Le lien carbone-halogène peut être clivé soit par une déshalogénéation enzymatique, où des enzymes spécifiques (les déshalogénases) effectuent le clivage, soit par la déshalogénéation chimique spontanée d'intermédiaires instables (Fetzner et Lingens, 1994). En ce qui concerne le clivage du lien carbone-halogène, il existe à ce jour sept mécanismes connus de déshalogénéation. Le premier est la déshalogénéation réductrice (Figure 1A) où le substituant halogène est remplacé par un hydrogène. Le deuxième est la déshalogénéation oxygénolytique (Figure 1B) où la réaction est

catalysée par des monooxygénases (dioxygénases) qui incorporent un ou deux atomes d'oxygène dans le substrat. Le troisième est la déshalogénéation hydrolytique (Figure 1C) où la réaction est catalysée par des halidohydrolases et le substituant halogène est remplacé dans une réaction de substitution nucléophile par un groupement hydroxyle dérivé de l'eau. Le quatrième mécanisme est la déshalogénéation thyolitique (Figure 1D). Chez les bactéries utilisant le dichlorométhane, une enzyme, la glutathione S-transférase catalyse la formation d'un conjugué S-chlorométhyl glutathione en même temps qu'a lieu une déchloruration. Le cinquième est la substitution intramoléculaire (Figure 1E) qui est un mécanisme impliqué dans la déshalogénéation des haloalcools vicinaux menant à la formation de composés époxydes. Le sixième mécanisme est la déhydrohalogénéation (Figure 1F) où un Cl⁻ est éliminé de la molécule permettant la formation d'une double liaison. Enfin, le dernier mécanisme est l'hydratation (Figure 1G) où l'addition d'une molécule d'eau à un lien insaturé, catalysée par une hydratase, peut mener à la déshalogénéation de composés vinyliques, tel que l'acide 3-chloroacrylique, par la décomposition chimique d'un intermédiaire instable (Fetzner et Lingens, 1994).

2.2 La déshalogénéation réductrice

La déshalogénéation réductrice est le seul mécanisme connu pour la biodégradation de composés fortement chlorés tels que les éthylènes, les benzènes, les phénols et les biphényles. Cette activité est prometteuse pour la biorémediation de polluants et de déchets chimiques (Mohn et Kennedy, 1992). La déshalogénéation réductrice implique le transfert de deux électrons dans une réaction où a lieu le relâchement de l'halogène qui est remplacé par un hydrogène. Elle se produit généralement en anaérobie, mais a l'avantage de diminuer la toxicité des composés et de les rendre plus facilement biodégradables par d'autres microorganismes. En aérobie, les microorganismes ne sont pas capable de métaboliser les composés fortement halogénés (Fetzner et Lingens, 1994). Pour les composés haloaromatiques, la déshalogénéation réductrice a été observée autant chez les microorganismes aérobie qu'anaérobie. Par contre, pour les biphényles fortement chlorés, l'hexachlorobenzène et le tétrachloroéthylène, la déshalogénéation réductrice anaérobie est le seul mécanisme connu.

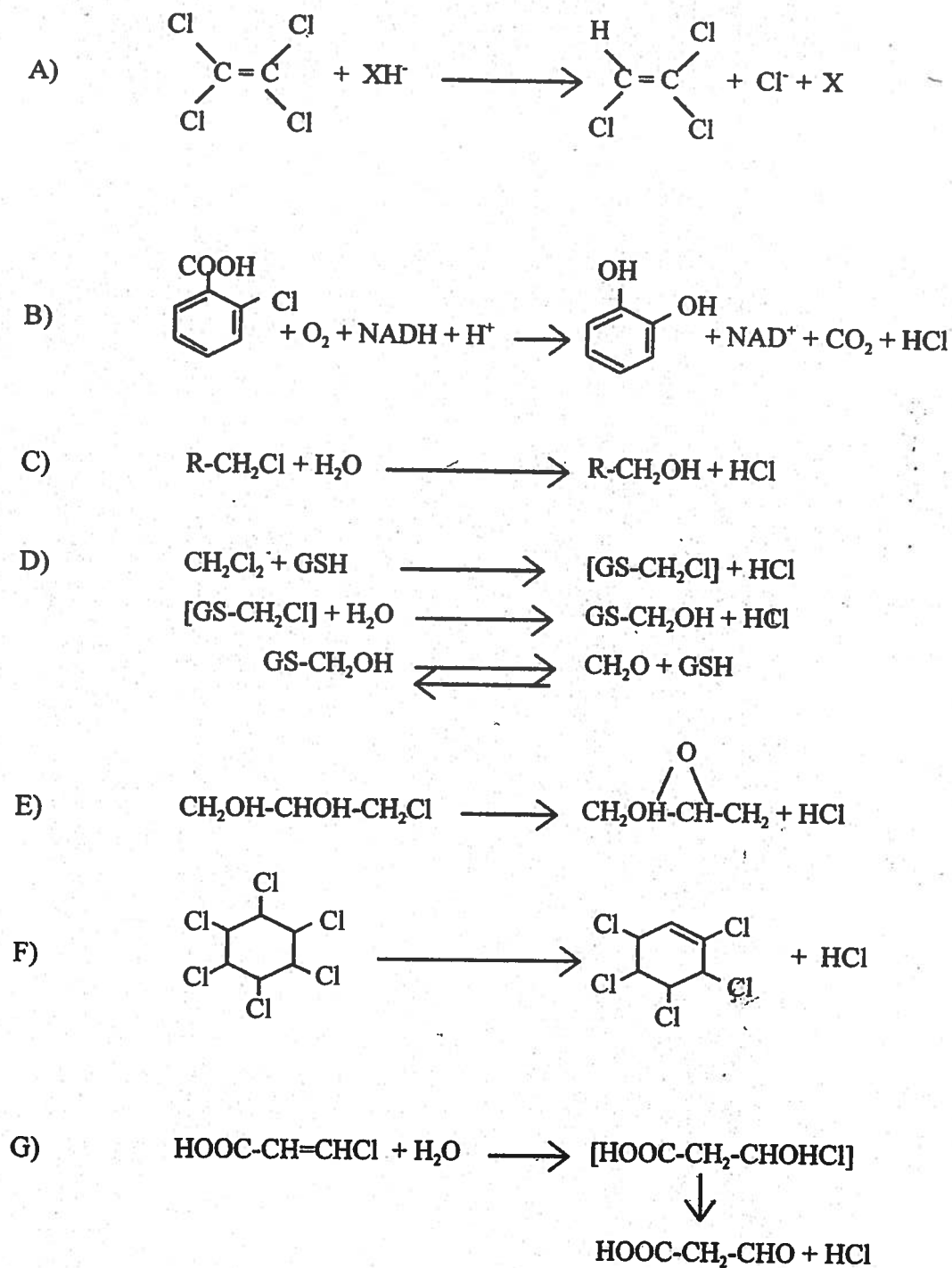


Figure 1. Mécanismes de déshalogénéation. (A) déshalogénéation réductrice ; (B) déshalogénéation oxygénolytique ; (C) déshalogénéation hydrolytique ; (D) déshalogénéation thiolitique ; (E) substitution intramoléculaire ; (F) déshydrohalogénéation ; (G) hydratation. Adaptée de Fetzner et Lingens (1994).

En termes de métabolisme microbien, les composés halogénés peuvent être transformés par des souches pures en conditions anaérobies selon trois voies majeures : (i) Le co-métabolisme où la modification du composé est fortuite, car les enzymes et cofacteurs catalysent normalement d'autres réactions et l'énergie produite n'est pas utile à la cellule. (ii) L'utilisation de composés halogénés comme source de carbone et d'énergie par les bactéries anaérobies qui utilisent des hydrocarbures chlorés C1 et C2. (iii) L'halorespiration (El Fantroussi *et al.*, 1998).

2.3 L'halorespiration

En conditions aérobies, les organismes sont en compétition pour le carbone et les sources d'énergie en utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons. Par contre, dans les environnements anaérobies les organismes sont en compétition non seulement pour les sources de carbone, mais aussi pour les accepteurs d'électrons. La déshalogénéation réductrice est un processus où il y a consommation d'électrons ce qui signifie que les composés halogénés peuvent servir d'accepteurs d'électrons. De plus, la déshalogénéation réductrice peut procurer assez d'énergie libre pour permettre l'utilisation de cette énergie par le microorganisme (Löffler *et al.*, 1996). Ce processus de formation d'énergie utilisant les composés halogénés comme accepteurs finaux d'électrons se nomme l'halorespiration.

L'identification des microorganismes capables de déshalogénéation fournit d'importantes informations sur la diversité des organismes impliqués dans ce processus ainsi que des explications fondamentales sur les divers mécanismes biochimiques impliqués (El Fantroussi *et al.*, 1998). C'est pourquoi, avec tous les composés polluants retrouvés dans l'environnement, il est important de porter une attention particulière à l'isolement en culture pure et à la caractérisation de bactéries capables d'effectuer la déshalogénéation réductrice.

3. Souches bactériennes effectuant la déshalogénéation réductrice

Plusieurs bactéries anaérobies qui effectuent la biodégradation des composés halogénés ont été isolées en culture pure et identifiées. La première à avoir été isolée et la plus connue à ce jour est *Desulfomonile tiedjei* souche DCB-1. D'autres bactéries connues à présent sont *Dehalobacter restrictus*, *Dehalospirillum multivorans*, *Dehalococcoides ethenogenes*, la souche 2-CP1 et TT4B. Dans le genre *Desulfitobacterium* les souches suivantes ont été étudiées : *D. dehalogenans*, *D. chlororespirans* souche Co23, *D. hafniense*, *D. frappieri* (PCP-1, TCE-1, TCP-A, et DP7), *Desulfitobacterium* sp. souche PCE-1, *Desulfitobacterium* sp. souche PCE-S, *Desulfitobacterium* sp. souche Y51 et *Desulfitobacterium* sp. souche GBFH. Quelques unes de ces bactéries anaérobies sont décrites en détails dans cette section, mais un résumé des caractéristiques, accepteurs d'électrons et spectre d'activité de toutes les souches est présenté aux tableaux 1 et 2 (voir p.20 et 21).

La déshalogénéation réductrice de chlorophénols est reconnue pour se produire dans des consortiums bactériens anaérobies, mais n'avait jamais été produite avec une culture pure. Or, *Desulfomonile tiedjei* DCB-1 est le premier microorganisme à avoir été isolé en culture pure, à partir d'un consortium méthanogène enrichi de boues d'épuration anaérobies (Shelton et Tiedje, 1984). *D. tiedjei* peut déshalogéner le 3-chlorobenzoate (3-CB), le tétrachloroéthylène (PCE), le pentachlorophénol (PCP) et plusieurs autres chlorophénols (excluant les monochlorophénols) après avoir été induit par un benzoate, un benzyl alcool ou un benzamide substitué par un chlore (ou brome) en position *meta* (Shuisong *et al.*, 1995). Les atomes de brome et d'iode peuvent être enlevés à toutes les positions de la molécule, tandis que les atomes de chlore peuvent l'être seulement en position *meta* (Mohn et Kennedy, 1992).

De plus, *D. tiedjei* DCB-1 obtient de l'énergie pour sa croissance de la déshalogénéation réductrice du 3-CB en benzoate et HCl; le 3-CB étant l'accepteur final des électrons (Cole *et al.*, 1995). Cette dégradation s'effectue grâce à un mécanisme chimiosmotique, l'halorespiration. Mohn et Kennedy (1992) ont démontré que le PCP est déshalogéné à un taux maximum de $54 \mu\text{mol de Cl h}^{-1} \text{ g de protéines}^{-1}$. De plus, le 3-CB est un inducteur nécessaire à la déshalogénéation du PCP;

alors que ni le 3-CP ou le PCP sont capables d'induire la déshalogénération réductrice. Le donneur d'électrons requis est le formate et la déshalogénération ne s'effectue qu'en position *meta*, les substituants en position *ortho* et *para* ne sont jamais enlevés. Une autre étude a démontré que la souche DCB-1 est capable de déshalogéner le tétrachloroéthylène (PCE) en trichloroéthylène (TCE) (Fatherpure *et al.*, 1987). L'activité de déshalogénération du TCE et du 3-CB est co-induite chez *D. tiedjei* DCB-1 (Cole *et al.*, 1995).

D'autres souches bactériennes sont capables de déshalogéner plusieurs composés toxiques tels que les chlorophénols et le PCE. Par exemple, les souches bactériennes, autres que celles du genre *Desulfitobacterium*, qui effectuent principalement la déshalogénération du PCE sont *Dehalobacter restrictus* PER-K23, *Dehalospirillum multivorans*, *Dehalococcoides ethenogenes* souche 195 et la souche TT4B. La souche 2-CP1 dégrade seulement le 2-chlorophénol.

Ainsi, *D. restrictus*, connue dans le passé sous le nom de souche PER-K23, a été isolée à partir d'une culture enrichie au lactate et au PCE provenant d'un réacteur à film fixe contenant des sédiments de la rivière du Rhin et des boues granulaires anaérobies d'une raffinerie de sucre (Holliger *et al.*, 1998). Elle utilise exclusivement le dihydrogène comme donneur d'électrons et le PCE et TCE comme accepteurs d'électrons dans le processus d'halorespiration et elle ne peut croître par fermentation (Holliger *et al.*, 1998). *D. restrictus* conserve l'énergie nécessaire à sa croissance grâce à l'oxydation du H₂ couplée à la déchloruration réductrice du PCE en *cis*-1,2-dichloroéthylène et en chlore comme produits finaux (Schumacher et Holliger, 1996).

D'autre part, *D. multivorans*, bactérie anaérobie stricte, a été isolée à partir de boues activées contenant du PCE et de l'hydrogène moléculaire comme seules sources d'énergie et de l'acétate comme source de carbone (Scholz-Muramatsu *et al.*, 1995). D'après l'analyse du gène de l'ARNr 16S, *D. multivorans* représente un nouveau genre et une nouvelle espèce appartenant à la subdivision epsilon des Protéobactéries. Ce microorganisme est capable de déshalogéner le PCE en *cis*-1,2-dichloroéthylène (DCE) via le trichloroéthylène (TCE) (Scholz-Muramatsu *et al.*, 1995).

Dehalococcoides ethenogenes souche 195 a été isolée à partir de cultures microbiennes mixtes (Maymo-Gatell *et al.*, 1997). Elle est la seule capable de dégrader le tétrachloroéthylène jusqu'à l'éthylène par le mécanisme de déshalogénéation réductrice. Elle croît en présence de H₂ et de PCE qui servent de donneur et d'accepteur d'électrons, respectivement (Maymo-Gatell *et al.*, 1997). De plus, lorsque la souche 195 croît en présence de PCE et qu'elle est transférée dans un milieu contenant soit du trichloroéthylène (TCE), du *cis*-dichloroéthylène (DCE), du 1,1-DCE ou du 1,2-dichloroéthane (DCA) comme accepteurs d'électrons, il y a consommation de ces composés, ce qui permet une croissance bactérienne (Maymo-Gatell *et al.*, 1999).

Enfin, la souche TT4B a été isolée à partir de sédiments anaérobies connus comme étant contaminés par une variété de solvants organiques (Krumholz *et al.*, 1996). La souche TT4B transforme le tétrachloroéthylène en *cis*-dichloroéthylène et ne peut croître par fermentation. Les seuls donneurs d'électrons qu'elle peut utiliser pour déshalogéner le PCE sont le pyruvate et l'acétate, alors qu'elle peut utiliser le tétrachloroéthylène, le trichloroéthylène, le fumarate et le nitrilacétate ferrique comme accepteurs d'électrons (Krumholz *et al.*, 1996).

La souche 2CP-1 est capable de croître via la déshalogénéation réductrice du 2-chlorophénol et a été isolée d'une culture enrichie de sédiments provenant d'un petit ruisseau du Michigan (Cole *et al.*, 1994). La souche 2-CP1 croît dans un milieu anaérobie minimal réduit additionné de 2-CP, d'acétate et de vitamines. Le produit de la réaction est le phénol. Il y a aussi inhibition de la croissance en absence de 2-CP ou d'acétate (Cole *et al.*, 1994). Cette bactérie effectue seulement la déshalogénéation en position *ortho* et le 2-CP est le seul inducteur connu. Enfin, d'après l'analyse de la séquence de l'ARNr 16S, cet organisme appartient au groupe Delta de la classe des protéobactéries et elle est plus apparentée aux myxobactéries qu'aux bactéries sulfidogéniques (Cole *et al.*, 1994).

Les bactéries du genre *Desulfitobacterium* sont des microorganismes anaérobies en forme de bâtonnet qui ont la capacité de déshalogéner les chlorophénols, le PCE, le TCE et le 3-chloro-4-hydroxyphénylacétate (3-Cl-4-OHPA). La première bactérie du genre à avoir été isolée à partir de sédiments

méthanogènes provenant de lacs est *Desulfitobacterium dehalogenans* souche JW/IU-DC1 (Utkin *et al.*, 1994). Cet organisme possède un large spectre d'activité puisqu'il est capable de déshalogéner plusieurs chlorophénols en position *ortho* autres que le 3-Cl-4-OHPA et le 2,4-DCP (Utkin *et al.*, 1995). La présence d'un substituant chloré en position *meta* (3), *para* (4) ou *ortho* (6) de la molécule facilite la déshalogénéation en position *ortho* (2) alors qu'un chlore en position *meta* (5) a un effet négatif sur le taux de déshalogénéation et peut même empêcher la déchloration en position *ortho* (2).

Enfin, dans les conditions où le formate sert de donneur d'électrons et le 3-Cl-4-OHPA est utilisé comme accepteur d'électrons, les rendements de croissance ont démontré que *D. dehalogenans* JW/IU-DC1 conserve l'énergie pour sa croissance à travers le processus de déshalogénéation réductrice couplé à l'oxydation du formate (Mackiewicz et Wiegel, 1998). Plus récemment, Van de Pas et ses collaborateurs (2001c) ont démontré qu'une quantité d'énergie pouvait être conservée via l'halorespiration en comparant les taux de croissance des cellules avec le 3-Cl-4-OHPA et différents donneurs d'électrons.

Desulfitobacterium chlororespirans souche Co23 a été isolée à partir de sols compostés en utilisant sa capacité à croître avec du 2,3-dichlorophénol (DCP) comme accepteur d'électrons (Sanford *et al.*, 1996). Cette bactérie peut croître en couplant l'oxydation du lactate en acétate et la déshalogénéation réductrice du 3-chloro-4-hydroxybenzoate (3-Cl-4-HBA) en 4-hydroxybenzoate. La déshalogénéation réductrice effectuée par *D. chlororespirans* ne s'effectue qu'en position *ortho* des composés phénoliques polychlorés à l'exception du 2,4-DCP, du 2,5-DCP, du 2,3,5-TCP et du PCP.

Desulfitobacterium hafniense DCB-2 a été isolée d'un consortium stable effectuant la déchloration de TCP qui provenaient de boues municipales (Madsen et Licht, 1992). Cette bactérie est capable de déshalogéner plusieurs composés chlorés en position *ortho* tels que le PCP, le 2,4,5-TCP, le 2,4,6-TCP et le 2,4-DCP. Toutefois, elle peut aussi effectuer la déshalogénéation du 3,5-DCP en position *meta*. Aucune déchloration en position *para* n'a été observée (Madsen et Licht, 1992).

En ce qui concerne *Desulfitobacterium frappieri*, plusieurs souches ont été isolées à ce jour telles que la souche TCE1, TCP-A, DP7 et PCP-1. Cette dernière est la souche type de cette espèce et sera décrite à la fin de cette section. *D. frappieri* TCE1 qui croît de la déchloruration réductrice du PCE et du TCE, a été isolée d'un bioréacteur anoxique dégradant le PCE (Gerritse *et al.*, 1999). Le taux maximal spécifique de déchloruration réductrice est de 4 à 16 fois supérieur à ceux de *Desulfitobacterium* sp. souche PCE1 et *D. hafniense* avec une valeur pouvant aller jusqu'à 1,4 μmol de chlore relâché par minute par mg de protéines lorsque le PCE est l'accepteur d'électrons.

D'autre part, *D. frappieri* souche TCP-A a été isolée à partir d'une culture mixte anaérobie enrichie de sédiments de la rivière Saale (Allemagne) et dégradant, en position *ortho*, le 2,4,6-trichlorophénol (Breitenstein *et al.*, 2001). Elle utilise le pyruvate comme source de carbone et donneur d'électrons. Parmi les composés déshalogénés par la souche TCP-A, se retrouve le PCE en TCE, mais pas le 3-Cl-4-OHPA. En plus du 2,4,6-TCP qui est déshalogéné en position *ortho*, certains autres chlorophénols sont déshalogénés en position *ortho* et *meta* tels que le PCP, le 2,3,4,5-TeCP partiellement déshalogénés et le 2,3,5,6-TeCP rapidement déshalogéné en 3-CP et en faible quantité de phénol.

Récemment, *D. frappieri* souche DP7 a été isolée d'un échantillon de fèces humaines dans un milieu minéral contenant du formate et 0,02 % d'extrait de levures comme source de carbone et d'énergie (Van de Pas *et al.*, 2001b). La source d'où provient la souche DP7 ne contient normalement pas de grandes quantités de composés chlorés. Au contraire des souches de *Desulfitobacterium* déjà décrites, la nouvelle souche n'a pas été isolée d'un environnement pollué et selon les auteurs n'utilise pas les chloroéthylènes ou chlorophénols comme accepteurs d'électrons (Van de Pas *et al.*, 2001b). En effet, plusieurs chlorophénols ont été testés et aucune dégradation n'a eu lieu en présence du 2-CP, 3-CP, 4-CP, 2,3-DCP, 2,4-DCP, 2,5-DCP, 2,6-DCP, PCP, PCE et 3-Cl-4-OHPA. Enfin, selon l'analyse de la séquence du gène de l'ARNr 16S, la souche DP7 possède 99,4% de similitudes avec *D. frappieri* TCE1 et 83% de réassociation lors de l'hybridation ADN-ADN (Van de Pas *et al.*, 2001b).

Pour compléter la description des bactéries du genre *Desulfitobacterium*, il ne reste que quatre souches à présenter, soit *Desulfitobacterium* sp. souche PCE-1, PCE-S, Y51 et GBFH. Ainsi, *Desulfitobacterium* sp. souche PCE1 a été isolée d'une culture enrichie au tétrachloroéthylène (Gerritse *et al.*, 1996). La déshalogénéation réductrice effectuée par cette bactérie pour les composés phénoliques chlorés a lieu en position *ortho*. De plus, le PCE est déshalogéné en trichloroéthylène ainsi qu'en faibles proportions (< 5 %) de *cis*-1,2-dichloroéthylène et *trans*-1,2-dichloroéthylène (Gerritse *et al.*, 1996). D'après l'analyse de la séquence de l'ARNr 16S, la souche PCE1 possède 99,3% de similitudes avec *D. dehalogenans*. Cette forte similarité signifie que les deux bactéries sont de la même espèce ou des espèces très rapprochées (Gerritse *et al.*, 1996).

Par ailleurs, *Desulfitobacterium* sp. souche PCE-S a été isolée à partir d'échantillons de sol contaminé au tétrachloroéthylène (Miller *et al.*, 1997a). Lorsque la bactérie croît en présence de pyruvate et de fumarate, elle effectue la déshalogénéation réductrice du PCE en TCE, puis du TCE en *cis*-1,2-DCE en présence du méthyl viologène ou du triquat, les donneurs d'électrons artificiels (Miller *et al.*, 1998). Les composés aromatiques chlorés ne sont pas convertis par la souche PCE-S dans les conditions utilisées (Miller *et al.*, 1998).

Desulfitobacterium sp. souche Y51 a aussi été isolée de sol contaminé au tétrachloroéthylène (Suyama *et al.*, 2001). La souche Y51 est capable de déshalogéner efficacement le PCE à des concentrations aussi élevées que 960 μ M et aussi faibles que 0,6 μ M. Elle effectue aussi la déshalogénéation des polychloroéthanes tels que les hexa-, les penta- et les tétrachloroéthanes qui donnent, comme produits finaux, des dichloroéthylènes (Suyama *et al.*, 2001). D'après l'analyse de la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S, la souche Y51 possède des similitudes avec plusieurs souches de *Desulfitobacterium*, mais la plus rapprochée est *D. hafniense* avec 96,9% d'homologie.

Enfin, *Desulfitobacterium* sp. souche GBFH a été récemment isolée à partir de sédiments contaminés à l'arsenic provenant du lac Cœur d'Alene (Idaho) (Niggemyer *et al.*, 2001). La souche couple l'oxydation du formate à la réduction de l'As(V)

lorsque le formate est la seule source de carbone et le donneur d'électrons. Elle peut aussi réduire le Fe(III), le Se(VI), le Mn(IV) et divers types de sulfures oxydés (SO_x) (Niggemyer *et al.*, 2001). De plus, d'après les analyses de la séquence de l'ARNr 16S la souche GBFH a le plus de similarité avec *D. hafniense* et *D. frappieri* avec un pourcentage supérieur à 99%. Des expériences d'hybridation ADN-ADN ont révélé que la souche GBFH possède 81,2% de réassociation avec *D. frappieri* et 79,7% avec *D. hafniense* (Niggemyer *et al.*, 2001).

3.1 *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1

Une étude de la biodégradation anaérobie du PCP a été réalisée grâce à un consortium méthanogène enrichi de sols contaminés au PCP (Juteau *et al.*, 1995a, 1995b). Un procédé efficace utilisant un réacteur à film fixe a été développé pour dégrader le PCP dans une liqueur d'extraction de poudre de bois et de copeaux contaminés au PCP (Beaudet *et al.*, 1997). Ce consortium pouvait déshalogéner complètement le PCP jusqu'au phénol qui était par la suite complètement dégradé. *D. frappieri* PCP-1 a été isolée de ce consortium méthanogène et est responsable de la déshalogénéation du PCP jusqu'au 3-CP. Cette bactérie anaérobie est un bâtonnet de 2,2 à 4,5 µm de longueur par 0,7 µm de largeur, sporulant, non mobile, asaccharolytique, et possède une paroi de type Gram positif malgré qu'il se colore comme un Gram négatif (Bouchard *et al.*, 1996). Les accepteurs d'électrons qu'elle utilise sont le sulfite, le thiosulfate, le nitrate (mais pas le sulfate) et plusieurs métaux tels que l'As(V), le Fe(III), le Se(VI), le Mn(IV) (Niggemyer *et al.*, 2001). Elle nécessite pour sa croissance du pyruvate et de l'extrait de levures. Les conditions optimales de croissance sont un pH de 7,5 et une température de 38°C (Bouchard *et al.*, 1996). Le contenu en G+C de son ADN génomique est de 46 mol%. D'après l'analyse de la séquence de l'ARNr 16S, la souche PCP-1 possède 95% d'homologie avec *Desulfitobacterium dehalogenans* JWIU-DC1 (Bouchard *et al.*, 1996). Ces résultats suggéraient que la souche PCP-1 était différente de cette dernière et constituait une nouvelle espèce qui fut appelée *D. frappieri* (Bouchard *et al.*, 1996). Récemment, Niggemyer *et al.* (2001) ont proposé en se basant sur leurs propriétés physiologiques et des tests d'hybridation ADN-ADN, que *D. hafniense* et *D. frappieri* devraient être unies en une seule et même espèce.

La souche PCP-1 effectue la déchloruration de plusieurs chlorophénols en positions *ortho*, *meta* et *para* à l'exception du 2,3-DCP, 2,5-DCP, 3,4-DCP et des monochlorophénols. La voie principale de dégradation du pentachlorophénol est la suivante : PCP → 2,3,4,5-TeCP → 3,4,5-TCP → 3,5-DCP → 3-CP. Pour mener à terme ces réactions, un système à deux enzymes serait impliqué. C'est-à-dire qu'une première enzyme est responsable de la déchloruration en position *ortho* tandis que la deuxième effectue la déchloruration en positions *meta* et *para* de la molécule. *D. frappieri* est la seule bactérie connue à ce jour pouvant dégrader le PCP jusqu'au 3-CP et ce, dans les trois positions. *D. frappieri* possède un large spectre d'activité, car en plus de pouvoir déshalogéner le tétrachloroéthylène et le pentachloropyridine, la souche PCP-1 peut également déshalogéner en positions *ortho*, *meta* et *para* une grande variété de molécules aromatiques substituées d'un groupement hydroxyle ou amine (Dennie *et al.*, 1998). Des réactions de *o*-déméthylation et la réduction de groupements nitro en groupements aminé sur des molécules aromatiques ont aussi été observées. Voici la liste de ces composés : 2,4,6-tribromophénol, tétrachlorocatéchol, tétrachlorogaiacol, tétrachlorovératrole, pentachloroanisole, 3,5-dichloro-4-hydroxybiphényl, pentachloroaniline, 2,3,5,6-tétrachloroaniline, pentachloro-nitrobenzène, pentachloropyridine, tétrachloroéthylène et 3-chloro-4-hydroxyphénylacétate. Bref, selon les chlorophénols testés et la position du chlore enlevé, des taux de déshalogénéation variant de 25 à 1,158 $\eta\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ de protéines ont été observés (Dennie *et al.*, 1998).

D. frappieri s'est également montré efficace pour la déchloruration du PCP en 3-CP dans des sols contaminés (Beaudet *et al.*, 1998; Lanthier *et al.*, 2000). En effet, la dégradation du PCP provenant d'échantillons de sol d'une industrie de traitement du bois a été étudiée dans des microcosmes de type « slurry » inoculés avec un consortium méthanogène dégradant le PCP ainsi qu'avec la souche PCP-1 (Beaudet *et al.*, 1998). Il en résulte donc que lorsque les microcosmes comportant 10 à 40% (w/v) de sol étaient inoculés avec le consortium, plus de 90% du PCP était éliminé en moins de 30 jours à 29°C. Lorsque les microcosmes étaient inoculés avec *D. frappieri* PCP-1 il y avait aussi une dégradation rapide du PCP en 3-CP. Une technique de réaction compétitive de polymérisation en chaîne (RcPCR) a permis de déterminer que la souche était présente à une concentration constante tout au long des 21 jours du biotraitement (Beaudet *et al.*, 1998). Enfin, la souche PCP-1 était capable de dégrader

le PCP du sol à des concentrations jusqu'à 200 mg PCP/kg de sol. Toutefois, la réinoculation de la souche était nécessaire pour obtenir des rendements de plus de 95% de déchloruration du PCP à des concentrations de 300 et 500 mg PCP/kg de sol (Beudet *et al.*, 1998). Dans des bioréacteurs anaérobies rotatifs, la souche PCP-1 a été détectée pendant plus de 21 jours dans les réacteurs contenant 500 mg PCP/kg de sol alors qu'elle était éliminée durant la même période dans les réacteurs contenant 750 mg PCP/kg de sol (Lanthier *et al.*, 2000).

Il a également été démontré que *D. frappieri* PCP-1 pouvait être incorporé à une communauté bactérienne mixte d'un réacteur en continue à boue granulaire (de type UASB) dégradant le PCP. La souche PCP-1 s'est bien implantée dans les granules microbiens présents et sa population a augmenté de 10^6 à 10^{10} cellules/g de VSS sur une période de 70 jours. L'addition de la souche PCP-1 a permis d'obtenir une augmentation d'efficacité car la charge de PCP est passée de 5 à 80 mg/L de volume de réacteur par jour. Une efficacité d'enlèvement du PCP de 99% et une déchloruration de 90,5% ont été obtenues et la présence de 3-CP et de phénol a été détectée comme intermédiaires de dégradation (Tartakovsky *et al.*, 1999).

Récemment, Lanthier et ses collaborateurs (2001) ont réalisé une étude sur la distribution géographique de *D. frappieri* PCP-1 dans les sols de la province de Québec. En effet, 44 échantillons de sols ont été prélevés dans des sites variés du sud de la province et 4 à l'extérieur du Québec. De ces échantillons, 24 ont été prélevés dans des sites industriels et, au total, 31 ont présenté une réaction positive au PCR pour des amorces visant l'ARNr 16S des séquences de gène de *Desulfitobacterium* spp. et de *D. frappieri* PCP-1. Les sols positifs se retrouvaient principalement dans la vallée du St-Laurent et la partie sud du Québec. *D. frappieri* a été retrouvé autant dans les sols contaminés que non contaminés suggérant qu'il n'existe pas de relation entre la présence de ces microorganismes et la présence de polluants.

Tableau 1. Résumé des caractéristiques de souches bactériennes anaérobies autres que *Desulfitobacterium* effectuant la déshalogénéation réductrice

Bactéries	Caractéristiques	Accepteurs d'électrons	
			Spectre d'activité
<i>Desulfomonile tiedjei</i> Souche DCB-1	Bâtonnet, Gram négatif non sporulant, non mobile anaérobie stricte	Sulfate Sulfite Thiosulfate	3-CB, PCE, CPs en position <i>meta</i>
<i>Dehalobacter restrictus</i> souche PER-K23	Bâtonnet, Gram négatif anaérobie	PCE DCE	PCE, TCE, DCE chloroéthylène
<i>Dehalospirillum multivorans</i>	Spirillum, Gram négatif non-sporulant, anaérobie stricte	Nitrate Fumarate PCE	PCE TCE
<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> Souche 195	Coque anaérobie	PCE H ₂	PCE, TCE, DCE 1,2-dichloroéthylène
Souche TT4B	Bâtonnet, Gram négatif non-sporulant, anaérobie	Fumarate TCE	PCE, TCE, fumarate nitrilacétate ferrique
Souche 2-CP1	Bâtonnet, Gram négatif anaérobie facultatif	Fumarate PCE	chlorophénols en position <i>ortho</i>

Tableau 2. Résumé des caractéristiques de souches bactériennes anaérobies du genre *Desulfitobacterium* effectuant la déshalogénéation réductrice

Bactéries	Caractéristiques	Accepteurs d'électrons	
			Spectre d'activité
<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i>	Bâtonnet, Gram+ mobile, non-sporulant anaérobie	Sulfite nitrate thiosulfate fumarate	3-Cl-4-OHPA 2-BP, 2,6-DBP et chlorophénols en position <i>ortho</i>
<i>D. chlororespirans</i>	Bâtonnet, Gram- mobile, sporulant anaérobie	Sulfite thiosulfate soufre	3-Cl-4-HBA 2,4,6-TBP et CPs en position <i>ortho</i>
<i>D. hafniense</i>	Bâtonnet, Gram+ mobile, sporulant anaérobie stricte	Sulfite thiosulfate nitrate	CPs en position <i>ortho</i> et <i>meta</i> (3,5-DCP)
<i>D. frappieri</i> Souche PCP-1	Bâtonnet, Gram - non-mobile, sporulant anaérobie stricte	Sulfite thiosulfate nitrate	CPs et autres en position <i>ortho</i> , <i>meta</i> et <i>para</i> PCE
<i>D. frappieri</i> Souche TCE-1	Bâtonnet, Gram+ mobile, non-sporulant anaérobie stricte	PCE, TCE sulfite thiosulfate nitrate fumarate	PCE TCE
<i>D. frappieri</i> Souche TCP-A	Bâtonnet, Gram+ mobile, sporulant anaérobie	Nitrate fumarate	PCE, cPs en positions <i>ortho</i> et <i>meta</i>
<i>D. frappieri</i> Souche DP7	Bâtonnet, Gram+ mobile, non-sporulant anaérobie	Sulfite thiosulfate nitrate fumarate	aucun chloroéthylène ou chlorophénol
<i>D. sp. souche PCE-1</i>	Bâtonnet, Gram+ mobile, non-sporulant anaérobie	Sulfite thiosulfate fumarate	CPs en position <i>ortho</i>
<i>D. sp. souche PCE-S</i>	Gram+ anaérobie stricte	PCE, TCE fumarate	PCE TCE
<i>D. sp. souche Y51</i>	Bâtonnet, Gram- mobile, non-sporulant anaérobie stricte	Fumarate	PCE polychloroéthanes
<i>D. sp. souche GBFH</i>	Bâtonnet sporulant	—	As(V), Fe(III), Se(VI), Mn (IV) sulfures oxydés

(*) Ces bactéries donnent une coloration négative au Gram, mais elles ont une paroi de type Gram positif

4- Les déshalogénases

Les propriétés des principales déshalogénases, produites par des microorganismes anaérobies qui ont été purifiées et caractérisées, sont présentées dans les pages suivantes alors qu'un résumé de leurs propriétés se retrouvent dans les tableaux 3 et 4 à la fin de la section (p. 41 et 42).

4.1 La 3-chlorobenzoate déshalogénase réductrice de *Desulfomonile tiedjei* DCB-1

La 3-chlorobenzoate déshalogénase réductrice de *D. tiedjei* DCB-1 est la première enzyme pouvant accomplir la déshalogénéation aryl-réductrice à avoir été purifiée (Shuisong *et al.*, 1995). L'enzyme a été purifiée et caractérisée à partir de la fraction membranaire solubilisée avec soit du CHAPS ou du Triton X-100 comme détergeant et en présence de glycérol (Shuisong *et al.*, 1995). L'activité de déshalogénéation a été mesurée par la conversion de 3-chlorobenzoate en benzoate avec de l'hydrogène moléculaire et, comme agent réducteur, le méthyl viologène. Le meilleur taux de conversion du 3-CB en benzoate a été obtenu dans les conditions suivantes : tampon phosphate de potassium 10 mM à pH 7.2 et à 38°C (Ni *et al.*, 1995). L'enzyme possède deux sous-unités de masse moléculaire différente, soit une de 64kDa et une de 37kDa. Elle est active à des pH entre 6,5 et 8,7, des températures entre 20 et 55°C et pour des concentrations en phosphate de potassium allant de 10 à 300 mM. D'autre part, il a été démontré que la 3-chlorobenzoate déshalogénase réductrice de *D. tiedjei* DCB-1 serait une protéine composée d'un hème contenant un atome de fer.

Une autre étude a permis de démontrer que l'activité enzymatique est influencée par la présence d'oxyanions soufrés. Ainsi, l'effet du sulfate, sulfite et thiosulfate a été testé sur la déshalogénéation du 3-CB. Il en ressort que l'activité est fortement réduite dans les extraits cellulaires induits simultanément au 3-CB et soit au sulfate, sulfite ou thiosulfate (Townsend et Suflita, 1997). Ceci indique que les oxyanions soufrés sont préférés comme accepteurs d'électrons au lieu du 3-CB et que cette situation influence négativement l'activité de déshalogénéation en régulant la quantité d'enzyme active dans les cellules (Townsend et Suflita, 1997). De plus, dans les extraits où *D. tiedjei* DCB-1 est cultivé en présence de 3-CB, le sulfite et le

thiosulfate inhibent l'activité *in vitro* de la déshalogénase alors que le sulfate ne démontre aucun effet. L'inhibition *in vitro* de l'activité enzymatique par les oxyanions soufrés serait causée par une interaction directe de ces derniers avec les enzymes impliquées dans la déshalogénéation et la possibilité qu'il y ait compétition entre deux mécanismes de respiration pour les mêmes agents n'est pas exclue (Townsend et Suflita, 1997). Enfin, la déshalogénéation du PCE était aussi inhibée par les oxyanions soufrés selon les mêmes mécanismes, ce qui suggère que la 3-chlorobenzoate déshalogénase réductrice de *D. tiedjei* catalyse la réaction de déshalogénéation du PCE en TCE (Townsend et Suflita, 1997).

Louie et ses collaborateurs (1997) ont montré que *D. tiedjei* DCB-1 conserve de l'énergie pour sa croissance à partir de la déshalogénéation réductrice de 3-CB via l'halorespiration. Afin de mieux comprendre comment est régit ce processus respiratoire, plusieurs transporteurs d'électrons de différents compartiments cellulaires ont été examinés. Ainsi, un cytochrome *c* de 50 kDa co-induit avec l'activité de déshalogénéation a été isolé de la fraction membranaire (Louie *et al.*, 1997). Celui-ci est substantiellement différent de tous les autres cytochromes *c* connus et préalablement caractérisés.

Puisque *D. tiedjei* DCB-1 conserve l'énergie pour sa croissance de la déshalogénéation réductrice du 3-CB, comme accepteur d'électrons, couplée à l'oxydation du formate par un procédé chimiosmotique, une étude a donc été réalisée afin de déterminer les composés impliqués dans la chaîne de transport d'électrons. Il en ressort que la déshalogénéation réductrice est inhibée par le 2-heptyl-4-hydroxyquinoline *N*-oxyde, un inhibiteur de quinones respiratoires, suggérant qu'une quinone respiratoire est impliquée dans la chaîne de transport d'électrons couplée à la déshalogénéation réductrice (Louie et Mohn, 1999). De plus, l'activité de déshalogénéation était dépendante du 1,4-naphtoquinone, un précurseur possible de quinone, mais aucune ubiquinone ou menaquinone n'ont pu être extraites de *D. tiedjei* (Louie et Mohn, 1999). Afin de caractériser les diverses composantes de la chaîne de transport d'électrons, les bactéries ont été cultivées dans des conditions leur permettant d'accomplir soit la déshalogénéation réductrice, la fermentation du pyruvate ou la réduction du sulfate. Ainsi, une hydrogénase périplasmique ainsi qu'une formate déshydrogénase cytoplasmique ont été détectées chez les cellules cultivées en

conditions de déshalogénéation réductrice ou de fermentation du pyruvate tandis qu'une formate déshydrogénase liée à la membrane et orientée du côté périplasmique a été détectée seulement chez les cellules utilisant le formate comme donneur d'électrons. Finalement, les auteurs ont pu démontrer que la déshalogénase réductrice, liée à la membrane, était orientée du côté cytoplasmique. À la lumière de toutes ces données, un modèle chimiosmotique de déshalogénéation réductrice du 3-CB en benzoate a pu être établi (Figure 2). Il en résulte que la déshalogénase réductrice, liée à la membrane et orientée du côté cytoplasmique, agit comme accepteur final d'électrons et qu'il y a production d'une force motrice de protons lorsque d'une part, des protons sont produits, dans le périplasm, par l'oxydation du formate ou de l'hydrogène moléculaire et que d'autre part, ces protons sont consommés dans le cytoplasme pendant la réduction du 3-CB par la déshalogénase réductrice (Louie et Mohn, 1999).

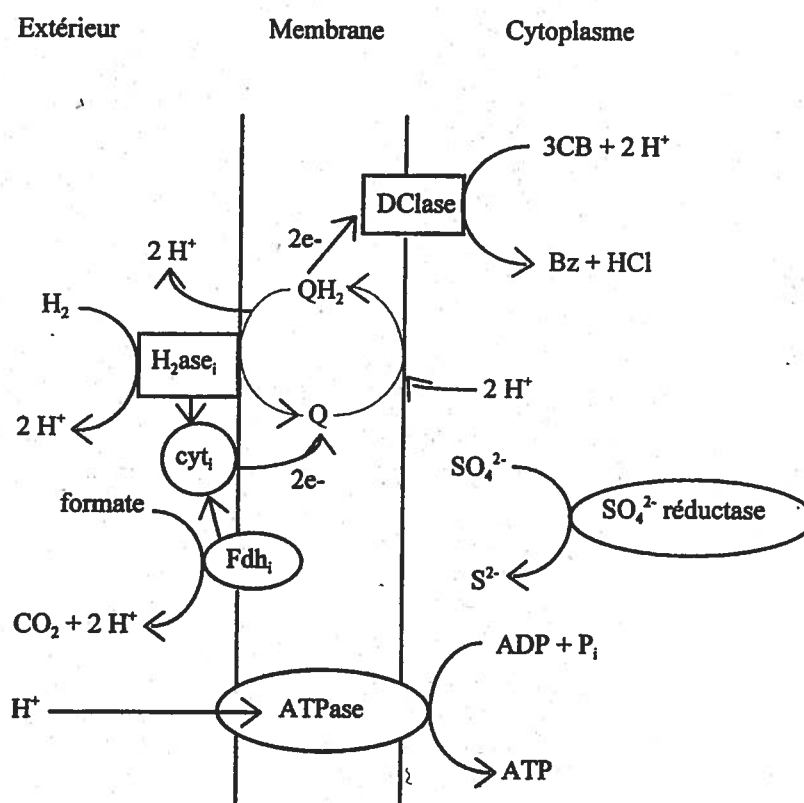


Figure 2. Modèle chimiosmotique de la déshalorespiration de *D. tiedjei* DCB-1. H_2ase : hydrogénase inductible, Fdh_1 : formate déshydrogénase inductible, cyt_1 : cytochrome *c* inductible de 50 kDa, Q : quinone, $Dclase_1$: 3-CB-déshalogénase réductrice, 3CB : 3-chlorobenzoate, Bz : benzoate. Adaptée de Louie et Mohn (1999).

4.2 La déshalogénase réductrice de *Dehalobacter restrictus*

Une étude réalisée par Schumacher et Holliger (1996) a permis de décrire la chaîne respiratoire retrouvée chez *D. restrictus* (Figure 3). D'abord, des expériences préliminaires ont suggéré que l'hydrogénase est située à l'extérieur de la cellule alors que la PCE réductase est située du côté cytoplasmique. Il y a aussi présence d'une menaquinone liée à la membrane qui servirait de médiateur d'électrons entre les deux enzymes. Un potentiel électrochimique de protons est créé lorsqu'il y a formation de deux protons dans l'espace périplasmique due à l'oxydation du dihydrogène par l'hydrogénase. Ces deux protons sont relâchés dans le périplasme pendant que deux électrons traversent la membrane vers la PCE réductase située dans le cytoplasme. La menaquinone se trouve donc réduite par l'oxydation du dihydrogène et réoxydée par la réduction du PCE. Bref, la réduction du tétrachloroéthylène résulte en la consommation d'un proton du cytoplasme par atome de chlore relâché (Schumacher et Holliger, 1996).

C'est en 1997 que la tétrachloroéthylène réductase, l'enzyme membranaire et la composante terminale de la chaîne respiratoire de *D. restrictus*, a été purifiée et caractérisée (Schumacher *et al.*, 1997). L'enzyme a une masse moléculaire de 60 kDa et l'étude de certains groupements prosthétiques révèle qu'elle possède une cobalamine et deux centres fer-soufre [4Fe-4S] impliqués dans le transfert d'électrons.

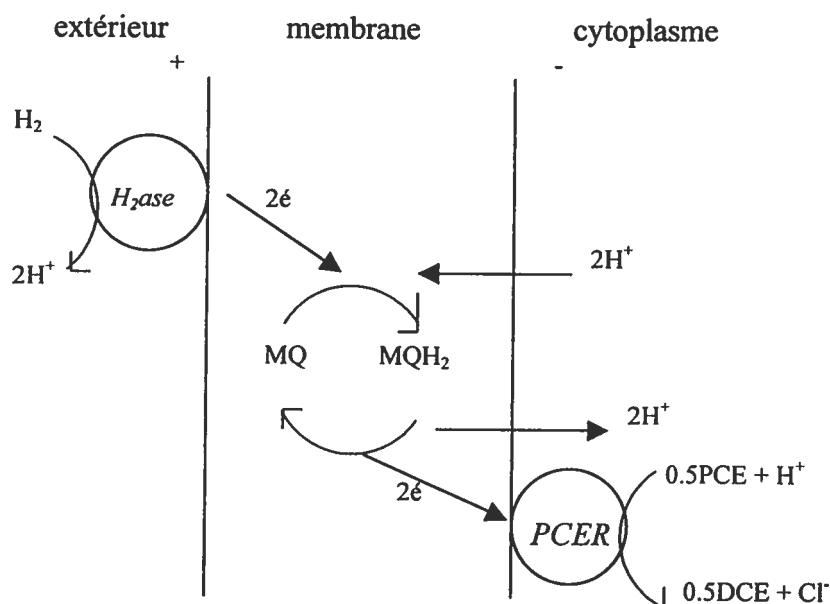


Figure 3. Modèle pour la chaîne respiratoire de *D. restrictus*. H_2ase : hydrogénase, MQ : ménaquinone, PCER : tétrachloroéthylène réductase, PCE : tétrachloroéthylène et DCE : *cis*-1,2-dichloroéthylène. Traduit de Schumacher et Holliger (1996).

4.3 La tétrachloroéthylène déshalogénase réductrice de *Dehalospirillum multivorans*

Les propriétés de la déshalogénase responsable de la déshalogénéation du PCE en TCE puis du TCE en *cis*-1,2-dichloroéthylène (*cis*-1,2-DCE) ont été étudiées dans les extraits cellulaires en présence de pyruvate et de fumarate (Neumann *et al.*, 1995). L'effet d'inhibition réversible par le 1-iodopropane a été testé lorsque mis en présence de citrate de titane comme agent réducteur, l'enzyme était rapidement inactivée, ce qui suggère l'implication d'un corrinnoïde dans la déchloruration réductrice du PCE..

L'activité de la déshalogénase était inhibée après 2 minutes en présence de cyanure, suggérant la présence d'une cob(III)alamine (Neumann *et al.*, 1995). Ainsi, sous forme oxydée, il est connu que les corrinnoïdes lient le cyanure pour former un complexe avec l'atome de cobalt. De plus, d'autres composés inhibaient l'activité de la déshalogénase tels que l'EDTA, le N_2O et le nitrite alors que le monoxyde de carbone et l'azoture de sodium n'avaient aucun effet. Enfin, les deux isomères du produit de la déchloruration *cis*-1,2-DCE, le *trans*-1,2-DCE et le 1,1-DCE n'inactivaient ou n'inhibaient pas la déshalogénase (Neumann *et al.*, 1995).

La tétrachloroéthylène déshalogénase réductrice (PCE-Rdase) de *D. multivorans* a une expression constitutive et possède une activité spécifique de 2,6 microkatal/mg protéines (où un microkatal est égal à une micromole de chlore relâchée ou 2 micromoles de méthyl viologène oxydées par seconde à 25°C) (Neumann *et al.*, 1996). Elle a été purifiée environ 100 fois jusqu'à homogénéité et la masse moléculaire a été déterminée, d'une part, à 58 kDa par filtration sur gel et, d'autre part, l'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE) a révélé une seule protéine à 57 kDa (Neumann *et al.*, 1996). Les valeurs de K_m obtenues sont de 0,20 mM pour le PCE et de 0,24 mM pour le TCE. De plus, une mole de déshalogénase contient 1,0 mole de corrinnoïde, 9,8 moles de fer et 8,0 moles de soufre. L'enzyme était légèrement sensible à l'oxygène et son activité maximale a été obtenue à un pH de 8,0 et une température de 42°C. Enfin, la présence d'ions ammonium stimulait l'activité de l'enzyme de plus du double et les méthanes chlorés l'inhibaient sévèrement (Neumann *et al.*, 1996).

Miller et ses collaborateurs (1997b) ont étudié le phénomène de déshalorespiration à partir de PCE chez *D. multivorans*. La respiration est habituellement un processus associé à la membrane dans lequel un transfert exergonique d'équivalents réducteurs d'un accepteur d'électrons à un donneur d'électrons est couplé à la formation d'un gradient de protons électrochimique à travers la membrane (Miller *et al.*, 1997b). Les auteurs ont donc proposé un modèle de déshalogénéation du PCE impliquant un flot réversible d'électrons où la translocation des électrons a lieu en même temps que celle d'un proton. La figure 4 illustre ce modèle. En premier lieu, l'hydrogène moléculaire est oxydé à l'extérieur de la cellule libérant deux protons. Les électrons ($2 e^-$ sur la figure 4) dérivés à partir de l'oxydation du H_2 sont transférés à un accepteur primaire d'électrons, à potentiel positif. Ensuite, un premier électron est envoyé, dans un processus non-endergonique, vers un accepteur secondaire d'électrons à potentiel positif (Y) alors que l'autre électron est transféré à un autre accepteur secondaire d'électrons, mais à potentiel rédox négatif (X). Cette échelle de transport d'électrons est endergonique et peut être conduite par un potentiel électrochimique de protons (Miller *et al.*, 1997b). Puisqu'un flot réversible d'électrons est impliqué dans la respiration utilisant le PCE comme accepteur d'électrons chez *D. multivorans*, il est essentiel qu'au plus un proton par deux électrons transférés à travers la membrane puisse être transféré. Autrement, la

formation d'un potentiel électrochimique de protons serait impossible et la bactérie ne pourrait coupler la synthèse de l'ATP à la déshalogénéation réductrice (Miller *et al.*, 1997b). Cette affirmation implique qu'un électron traverse la membrane avec un proton alors que l'autre traverse grâce à la différence de potentiel entre le donneur d'électrons extérieur (H_2) et l'accepteur d'électrons à l'intérieur de la cellule (Y). En conséquence, deux étapes différentes dans la réduction du PCE peuvent être distinguées, soit la réduction de la cob(II)alamine en cob(I)alamine, qui nécessite un donneur d'électrons à faible potentiel rédox et la réduction de l'alkyl-cob(III)alamine en cob(II)alamine et en produit déchloré (Miller *et al.*, 1997b). Finalement, ces deux étapes permettent la déshalogénéation réductrice du PCE ou du TCE (R-Cl sur la figure 4).

Une étude récente a permis de déterminer la spécificité de substrat de la PCE déshalogénase réductrice native et de son facteur corrinoïde (Neumann *et al.*, 2002). En plus du méthyl viologène réduit, le titanium(III) citrate pourrait servir de donneur d'électrons pour la déshalogénéation réductrice du PCE et du TCE en *cis*-1,2-DCE. Le *trans*-1,3-dichloropropène, le 1,1,3-trichloropropène et le 2,3-dichloropropène étaient réduits en un mélange de mono-chloropropènes, 1,1-dichloropropène et 2-chloropropène, respectivement. Les chlorures de propylènes étaient déshalogénés seulement par l'enzyme native (Neumann *et al.*, 2002). D'autres composés halogénés rapidement réduits par l'enzyme étaient aussi déshalogénés abiotiquement par l'enzyme inactivée à la chaleur et par le cyanocobalamine (vitamine B_{12}). Le taux de cette réaction abiotique était dépendant du nombre et du type de substituant halogéné et du type de catalyse. Le cofacteur corrinoïde purifié de la PCE-RDase montrait une activité environ 50 fois supérieure à celle du cyanocobalamine en présence du trichloroacétate comme accepteur d'électrons. Ce résultat indique que le cofacteur corrinoïde de la PCE-RDase n'est pas un cyanocobalamine (Neumann *et al.*, 2002). Les corrinoïdes catalysaient aussi la déshalogénéation rapide de l'acide trichloroacétique. Enfin, puisque le taux était proportionnel à la quantité de cyanocobalamine, cet essai de déshalogénéation réductrice peut être utilisé pour une quantification rapide et sensible de ce cofacteur (Neumann *et al.*, 2002).

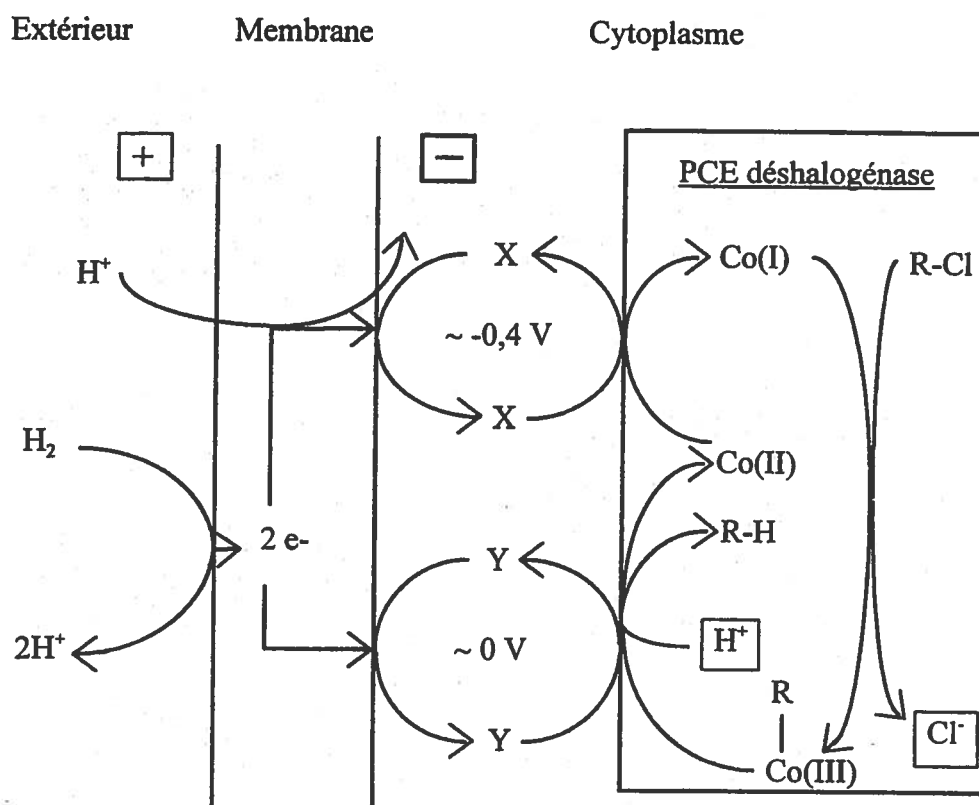


Figure 4. Modèle de la déshalogénation réductrice du PCE, à flot réversible d'électrons, de *D. multivorans*. Adaptée de Miller *et al.* (1997b).

Les gènes codant pour la PCE-Rdase, une protéine corrinnoïde-Fe/S, ont été clonés et séquencés (Neumann *et al.*, 1998). En effet, deux gènes co-transcrits, *pceA* et *pceB*, codent pour des protéines contenant 501 et 74 acides aminés, respectivement. Leur masse moléculaire a été calculée à 55,887 (*pceA*) et 8,354 Da (*pceB*) (Neumann *et al.*, 1998). Le gène *pceA* contient une séquence nucléotidique hautement similaire au motif de liaison pour deux centres Fe_4S_4 ou pour un Fe_4S_4 ou un Fe_3S_4 . Aucune similarité significative n'a été obtenue autant pour *pceA* que *pceB* avec d'autres gènes lors de la comparaison des séquences dans les banques de données. Enfin, le gène *pceA* a pu être exprimé seulement dans la souche *E. coli* tRNA₄^{Arg} enrichie de pUBS 520 (Neumann *et al.*, 1998).

4.4 Les tétrachloroéthylène et trichloroéthylène déshalogénases réductrices de *Dehalococcoides ethenogenes* souche 195

C'est à partir d'un enrichissement d'une culture microbienne anaérobie de *D. ethenogenes* souche 195 qu'ont été partiellement purifiées deux déshalogénases membranaires qui constituent une nouvelle voie pour la déchloruration complète du PCE en éthylène (Magnuson *et al.*, 1998). La première enzyme, PCE déshalogénase réductrice (PCE-RDase), catalyse spécifiquement la réaction de déchloruration du PCE en TCE à un taux de 20 $\mu\text{mole}/\text{min}\cdot\text{mg}$ protéines. Cette dernière a été solubilisée des membranes à l'aide du Triton X-100 (0,1%) et purifiée par un facteur de 75 fois par chromatographie à interactions hydrophobiques. Son poids moléculaire a été évalué à 51 kDa par SDS-PAGE (Magnuson *et al.*, 1998). La deuxième enzyme, la TCE déshalogénase réductrice (TCE-RDase), assure la déchloruration du TCE en éthylène. Elle a aussi été solubilisée à l'aide de 0,1% de Triton X-100 et partiellement purifiée par un facteur de 24 fois par chromatographie à interactions hydrophobiques. Il a fallu, dans le cas de cette enzyme, identifier la protéine active à l'aide d'une électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions non-dénaturantes puis la déposer sur SDS-PAGE. Le résultat a démontré une bande prédominante à 61 kDa et une bande de plus faible intensité à 110 kDa (Magnuson *et al.*, 1998). De plus, la TCE-RDase s'est révélée moins spécifique puisqu'elle pouvait déshalogéner le TCE, le *cis*-1,2-DCE et le 1,1-DCE à des taux similaires de 8 à 12 $\mu\text{mole}/\text{min}\cdot\text{mg}$ protéines. D'autre part, elle pouvait aussi déshalogéner le *trans*-1,2-DCE et le

chlorure de vinyle, mais à un taux deux fois plus faible que les trois premiers (Magnuson *et al.*, 1998).

Les auteurs ont aussi vérifié la présence de cofacteur corrinnoïde chez les deux enzymes par des essais d'inactivation de l'activité en présence d'iodoalcanes. Ainsi, la TCE-RDase a perdu 93% de son activité après incubation à la noirceur avec le 1-iodopropane et le citrate de titane(III). Après exposition à la lumière, l'activité a été restaurée à 80% de l'activité de départ (Magnuson *et al.*, 1998). Ce résultat démontre l'implication d'un cofacteur corrinnoïde contenant un cobalt(I) dans la réaction de déchloruration effectuée par cette enzyme. D'autre part, l'incubation de la PCE-RDase avec le citrate de titane(III) et le 1-iodopropane n'avait aucun effet sur l'activité enzymatique. Par contre, l'incubation en présence d'iodoéthane et citrate de titane(III) a provoqué une inhibition de l'activité de 85% de l'activité initiale et après exposition à la lumière, l'activité a été restaurée de 83%. Il y aurait donc un corrinnoïde avec un atome de cobalt(I) agissant comme cofacteur chez cette enzyme (Magnuson *et al.*, 1998).

Enfin, d'autres inhibiteurs des déshalogénases ont été testés. La TCE-RDase est donc inhibée à 50% par 2,5 mM de cyanure de sodium ou 7 mM d'azoture de sodium. La PCE-RDase, pour sa part, était inhibée de 20% par 20 mM de cyanure (Magnuson *et al.*, 1998). Les deux enzymes étaient complètement inhibées par 2 mM de sulfite de sodium ou de dithionite de sodium. Le chlorure cuprique à 1 mM et le chlorure de zinc à 5 mM inhibaient la TCE-RDase tandis que la PCE-RDase était faiblement inhibée. Par ailleurs, l'activité des deux enzymes n'était pas inhibée par 2 mM de sulfate de sodium, de sélénate de sodium, de sulfure de sodium, de 100% de monoxyde de carbone, d'EDTA (5 mM), de bathophénanthroline disulfonate et de 2,2-dipyridyl (Magnuson *et al.*, 1998). Ainsi, l'inhibition de l'activité enzymatique par le cyanure et non par le monoxyde de carbone correspond à la présence de vitamine B₁₂ comme cofacteur. De plus, le patron d'inhibition par le cuivre et le zinc indique la présence d'un ou plusieurs centres métalliques, en plus de la vitamine B₁₂. Ces derniers seraient probablement des centres fer-soufre puisque l'ammonium sulfate ferreux et la cystéine stabilisent l'activité des déshalogénases (Magnuson *et al.*, 1998).

Magnuson et ses collaborateurs (2000) ont mené une étude plus approfondie sur la TCE-RDase. Ainsi, cette enzyme peut déshalogéner le 1,2-dichloroéthane et le 1,2-dibromoéthane en éthylène à des taux respectifs de 7,5 et 30 $\mu\text{mole}/\text{min}\cdot\text{mg}$ protéines. Ces taux sont similaires à ceux obtenus pour le TCE, le *cis*-1,2-DCE et le 1,1-DCE. Une variété d'autres haloalkanes et haloalkenes, contenant 3 à 5 atomes de carbone, ont été déshalogénés à des taux inférieurs (Magnuson *et al.*, 2000).

De plus, le gène codant pour la TCE-RDase de *D. ethenogenes* souche 195 soit *tceA* a été cloné et séquencé. Il en ressort que la TCE-RDase partage 24% d'homologie avec la PCE-RDase de *D. multivorans* et 22% avec la *ortho*-chlorophénol RDase de *D. dehalogenans* (Magnuson *et al.*, 2000). Ces faibles similarités sont confinées à la région C-terminale qui contient le motif de liaison de deux groupements Fe_4S_4 . Le séquençage direct de la portion N-terminale a indiqué que les 42 premiers acides aminés constituent une séquence signal contenant le motif double arginine, ce dernier est associé au système de translocation membranaire Sec-indépendant. Cette information ainsi que des études de localisation membranaire indiquent que la TCE-Rdase est localisée à l'extérieur de la membrane cytoplasmique (Magnuson *et al.*, 2000). Enfin, un petit cadre de lecture ouvert, *tceB*, serait impliqué dans l'association membranaire de l'enzyme et ce dernier serait co-transcrit avec *tceA* (Magnuson *et al.*, 2000).

4.5 La *ortho*-chlorophénol déshalogénase réductrice de *Desulfitobacterium dehalogenans* souche JW/IU-DC1

La *ortho*-chlorophénol déshalogénase réductrice de *D. dehalogenans* a été purifiée de 90 fois jusqu'à homogénéité à partir de bactéries en croissance dans un milieu contenant du lactate et du 3-Cl-4-OHPA (Van de Pas *et al.*, 1999a). La purification a été réalisée par des passages sur une colonne échangeuse ionique en utilisant le Triton X-100 comme détergent. L'enzyme catalyse la réaction de déshalogénéation en position *ortho* du 3-Cl-4-OHPA, du 2-CP, du 2,3-DCP, du 2,4-DCP, du 2,6-DCP, du PCP et du 2-bromo-4-chlorophénol avec le méthyl viologène réduit comme donneur d'électrons (Van de Pas *et al.*, 1999a). La déshalogénéation du 3-Cl-4-OHPA est catalysée à un V_{max} de 28 unités/mg protéines et un K_m de 20 μM . Le pH optimal est de 8,2 et la température optimale de 52°C. Des analyses

spectroscopiques (EPR) ont démontré que l'enzyme possède un centre Fe_3S_4 , un centre Fe_4S_4 et une cobalamine par monomère de 48 kDa (Van de Pas *et al.*, 1999a).

De plus, des comparaisons de séquence dans le génome de *D. dehalogenans* ont permis d'identifier deux gènes très apparentés. Le premier, *cprA*, code pour la *o*-chlorophénol déshalogénase réductrice qui contient une séquence signal de type double arginine. Le gène code pour un polypeptide de 450 acides aminés et de masse moléculaire de 45 kDa. Le deuxième gène, *cprB*, code pour une protéine membranaire intégrale qui permettrait d'ancrer la déshalogénase à la membrane, c'est aussi un polypeptide, mais de 103 acides aminés et de masse moléculaire calculée à 11 kDa (Van de Pas *et al.*, 1999a). La comparaison de la séquence de *cprA* avec celles de *D. multivorans* et *D. restrictus*, *pceA*, a révélé un haut degré de similarité des acides aminés de la portion C-terminale et les motifs de liaison pour les centres fer-soufre sont les mêmes (Van de Pas *et al.*, 1999a).

Van de Pas et ses collaborateurs (1999b) ont établi un modèle pour la déshalogénéation réductrice effectuée par la *ortho*-chlorophénol déshalogénase réductrice de *D. dehalogenans* (Figure 5). D'abord, deux électrons (dont le donneur est inconnu) proviennent de la membrane cytoplasmique et sont utilisés par l'enzyme. Un premier électron se rend au premier centre Fe_4S_4 , à faible potentiel rédox, et ce dernier le transmet à la cob(II)alamine. La cob(II)alamine est réduite en cob(I)alamine et ce dernier permet l'enlèvement du chlore de la molécule halogénée laissant un radical libre instable. Le radical (halo)-phénol réagit avec l'électron qui est donné par le centre Fe_3S_4 , à potentiel élevé, ce qui permet à un atome d'hydrogène de prendre place (Van de Pas *et al.*, 1999b).

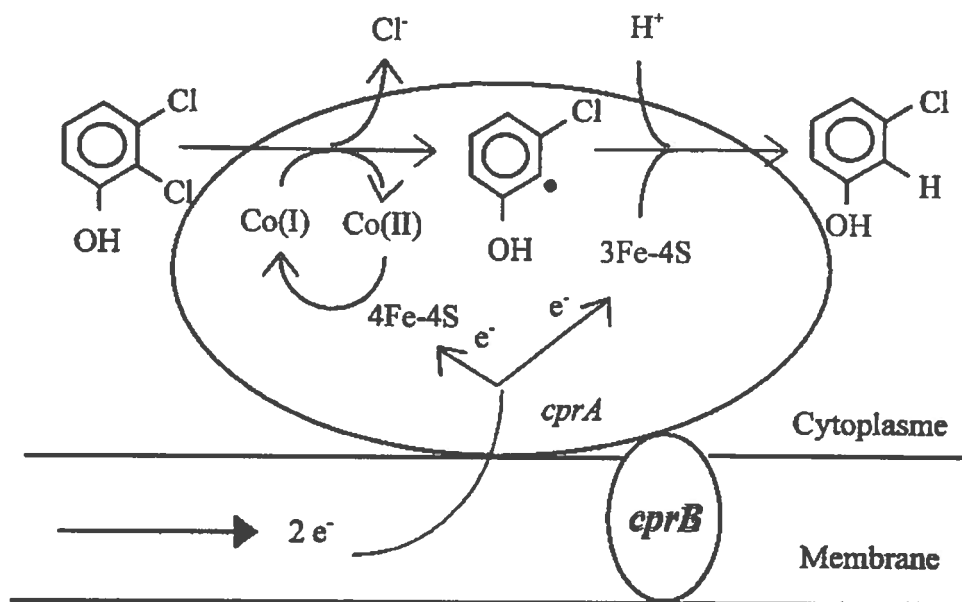


Figure 5. Mécanisme proposé pour la *ortho*-chlorophénol déshalogénase réductrice chez *D. dehalogenans*. Modifié de Van de Pas *et al.*, (1999b).

4.6 La déshalogénase aryle-réductrice de *Desulfitobacterium chlororespirans* souche Co23

La déshalogénase aryle-réductrice est une enzyme membranaire qui catalyse la réaction de déshalogénéation du 3-Cl-4-OHPA en 4-hydroxybenzoate (4-HBA) à un taux de 3,9 η mole/min*mg protéines lorsque les cellules sont en croissance dans un milieu contenant du pyruvate et du 3-Cl-4-OHPA (Löffler *et al.*, 1996). Le taux initial maximal de catalyse a été obtenu à un pH de 6,5 et une température de 60°C et l'enzyme était stable à 57°C pendant au moins deux heures. Plusieurs donneurs d'électrons ont été testés tels que le benzyl viologène réduit, le NADH, le NADPH, la flavine adénine dinucléotide réduite (FAD) et la flavine mononucléotide réduite (FMN), mais aucun n'a pu remplacer le méthyl viologène qui avait un taux de déchloruration cinq fois supérieur (Löffler *et al.*, 1996). Le sulfite inhibait l'activité de la déshalogénase alors que le sulfate n'avait aucun effet. De plus, l'enzyme est capable de déshalogéner d'autres substrats tels le 3,5-dichloro-4-hydroxybenzoate, le 3-Cl-4-OHPA, le 2,3-DCP, le 2,4-DCP, le 2,6-DCP, 2,3,4-TCP, le 2,3,5-TCP, le

2,4,6-TCP, le 2,3,4,5-TeCP, le 2,3,4,6-TeCP, le 2,3,5,6-TeCP et le PCP, mais seulement en position *ortho* (Löffler *et al.*, 1996).

Plus récemment, la déshalogénase aryle-réductrice a été purifiée et caractérisée (Krasotkina *et al.*, 2001). La déshalogénase a été purifiée à partir de cellules en croissance avec du pyruvate, comme source de carbone, et du 3-chloro-4-hydroxybenzoate, comme accepteur d'électrons. Plus de 90% de l'activité enzymatique était retrouvée dans la fraction membranaire et l'enzyme a été solubilisée à l'aide du détergent Triton X-100. La purification a permis d'augmenter l'activité spécifique de 181 fois et, d'après le SDS-PAGE, une seule protéine a été retrouvée ayant une masse moléculaire d'environ 50 kDa (Krasotkina *et al.*, 2001). La séquence N-terminale a révélé des similitudes avec les autres déshalogénases du genre *Desulfitobacterium*. L'enzyme contiendrait aussi un corrinnoïde et deux centres Fer-Soufre (Krasotkina *et al.*, 2001). L'hypothèse d'une cobalamine a aussi été confirmée puisque l'enzyme est inhibée en présence d'iodopropane et que l'activité est restaurée après exposition à la lumière. L'activité enzymatique est inhibée de 90% lors de l'incubation avec 45 mM de KCN et est complètement inhibée par 4 mM de sulfite de sodium ou 7 mM d'EDTA, tandis que des concentrations jusqu'à 170 mM de citrate de sodium n'ont aucun effet. Enfin, l'aryle déshalogénase réductrice de *D. chlororespirans* peut catalyser la déshalogénéation d'un BPC hydroxylé (3,3',5,5'-tetrachloro-4,4'-biphényldiol) (Krasotkina *et al.*, 2001).

4.7 La 3-chloro-4-hydroxyphénylacétate (3-Cl-4-OHPA) déshalogénase réductrice de *Desulfitobacterium hafniense* souche DCB-2

La 3-chloro-4-hydroxyphénylacétate déshalogénase réductrice de *D. hafniense* DCB-2 a été purifiée de 11,3 fois jusqu'à homogénéité à partir de cellules mises en présence de pyruvate et de 3-Cl-4-OHPA. Elle a été purifiée en présence de CHAPS comme détergent et par une colonne échangeuse ionique et une colonne d'hydrophobicité (Christiansen *et al.*, 1998). L'enzyme membranaire catalyse la réaction de déshalogénéation du 3-Cl-4-OHPA en 4-OHPA à un taux de 103,2 η kat/mg protéines (1 η kat égal à 1 η mole de chlore relâché ou 2 η moles de méthyl viologène oxydées par seconde) avec le méthyl viologène réduit comme donneur d'électrons. Sa masse moléculaire de 46,5 kDa et son point isoélectrique est inférieur à 4,45.

L'enzyme contient $0,68 \pm 0,2$ mole de corrinnoïde, $12,0 \pm 0,7$ mole de fer et $13,0 \pm 0,7$ mole de soufre par mole de sous-unité (Christiansen *et al.*, 1998).

4.8 Les chlorophénol et tétrachloroéthylène déshalogénases réductrices de *Desulfitobacterium* sp. souche PCE1

Desulfitobacterium sp. souche PCE1 est la seule espèce de *Desulfitobacterium* qui utilise autant le PCE et les chlorophénols comme accepteurs finaux d'électrons pour la croissance (Van de Pas *et al.*, 2001a). Les profils de spécificité de substrats des déshalogénases provenant d'extraits cellulaires de la souche PCE1 mise en croissance dans différentes conditions ont montré que les profils obtenus étaient différents dépendamment si les cellules étaient en présence de PCE ou de 3-Cl-4-OHPA comme accepteur d'électrons. Lorsque la souche utilise les chlorophénols comme accepteurs d'électrons, les chlores sont enlevés seulement en position *ortho* (Van de Pas *et al.*, 2001a). Les extraits cellulaires en croissance avec le PCE comme accepteur d'électrons n'ont démontré aucune activité de déshalogénéation avec le 3-Cl-4-OHPA et d'autres composés *ortho*-chlorophénoliques dans les essais *in vitro*. Par contre, les extraits cellulaires en croissance avec le 3-Cl-4-OHPA comme accepteur d'électrons ont déshalogéné le PCE à 10% du taux de déshalogénéation du 3-Cl-4-OHPA. Puisque la plupart des déshalogénases réductrices décrites dans la littérature possèdent des corrinnoïdes et des centres Fe-S, les auteurs ont testé l'effet d'inhibiteurs d'activité pour les déshalogénases possédant une cobalamine. Dans les deux types d'extraits cellulaires l'activité de déshalogénéation a été inhibée en présence du 1-iodopropane et du protoxyde d'azote (Van de Pas *et al.*, 2001a).

Les enzymes responsables de la déshalogénéation du PCE et du 3-Cl-4-OHPA ont été partiellement purifiées par des colonnes échangeurs ioniques en présence de Triton X-100 comme détergent. La 3-Cl-4-OHPA déshalogénase réductrice a été purifiée d'un facteur de 100 fois et le SDS-PAGE a révélé une seule protéine de masse moléculaire de 48 kDa. Ces caractéristiques sont similaires à celles de *D. dehalogenans*. D'autre part, la PCE déshalogénase réductrice a été partiellement purifiée et sa masse moléculaire a été évaluée aussi à 48 kDa, mais les analyses de la séquence N-terminale n'indiquent aucune similarité avec la chlorophénol déshalogénase réductrice ou même d'autres déshalogénases. Ainsi, ces résultats

démontrent une forte évidence que deux enzymes différentes sont responsables de la déshalogénation du PCE et du 3-Cl-4-OHPA chez *Desulfitobacterium* souche PCE1 (Van de Pas *et al.*, 2001a).

4.9 La tétrachloroéthylène déshalogénase réductrice de *Desulfitobacterium* sp. PCE-S

La PCE déshalogénase réductrice de *Desulfitobacterium* souche PCE-S a été purifiée d'un facteur de 165 fois jusqu'à homogénéité à partir de cellules enrichies en présence de pyruvate et de fumarate (Miller *et al.*, 1998). L'enzyme membranaire et d'expression constitutive a été purifiée en présence de Triton X-100 comme détergent par des colonnes échangeuses ioniques. Cette enzyme catalyse la déshalogénation réductrice du PCE et TCE et du TCE en *cis*-1,2-DCE avec le méthyl viologène comme donneur d'électrons. Cette réaction a une activité spécifique de 650 η kat/mg de protéines. Les valeurs de K_m de l'enzyme pour le PCE, le TCE et le méthyl viologène sont de 10 μ M, 4 μ M et 0,3 mM, respectivement (Miller *et al.*, 1998). Une seule bande a été révélée par SDS-PAGE et la masse moléculaire a été évaluée à 65 kDa tandis que, par filtration sur gel, la masse moléculaire de l'enzyme native a été déterminée à 200 kDa. Le pH optimal de la déshalogénase était de 7,2, la température optimale d'environ 50°C et l'enzyme était très sensible à l'oxygène avec une demi-vie d'environ 50 minutes (Miller *et al.*, 1998). De plus, d'autres expériences ont permis de démontrer que la PCE déshalogénase réductrice possède $0,7 \pm 0,3$ mole de corrinnoïde, $1,0 \pm 0,3$ mole de cobalt, $7,8 \pm 0,5$ moles de fer et $10,3 \pm 0,2$ moles de soufre par mole de sous-unité. La séquence NH₂-terminale a été déterminée, mais aucune similarité significative n'a pu être établie avec la séquence en acides aminés de la PCE déshalogénase réductrice de *D. multivorans* (Miller *et al.*, 1998).

4.10 Les déshalogénases réductrices de *Desulfitobacterium frappieri* souche PCP-1

D. frappieri PCP-1 effectue la déshalogénation réductrice du PCP jusqu'au 3-CP grâce à un système constitué deux enzymes membranaires (Bouchard *et al.*, 1996; Dennie *et al.*, 1998). La déshalogénase I a fait l'objet d'une étude concernant sa caractérisation et son spectre d'activité. Une préparation brute de déshalogénase I a été obtenue à la suite de la solubilisation de la fraction membranaire récoltée d'une

culture de la souche PCP-1 induite au 2,4,6-TCP. Cette préparation a été utilisée pour une caractérisation préliminaire de la déshalogénase I par Boyer (1999). Il en ressort que l'enzyme a un pH optimal de 6,9 dans un tampon phosphate de potassium 0,1 M et une température optimale de 55°C pour la fraction membranaire et de 50°C pour la fraction solubilisée avec 0,1% de Triton X-100 (Boyer, 1999). Aucune inhibition de l'activité de déshalogénéation était notée en présence de 100 mM sulfate. Par contre, le sulfite inhibait totalement l'activité à une concentration aussi faible que 1 mM tandis que le nitrate diminuait l'activité d'environ 50% à une concentration de 5 mM, mais était maintenue par la suite jusqu'à 100 mM (Boyer, 1999). La préparation brute de déshalogénase I est très sensible à l'oxygène puisqu'une incubation avec 10% d'air pendant une heure diminuait l'activité de 70%. Le MgCl₂, le KCl, le ZnCl₂, le MnCl₂, le NaCl, le CoCl₂, le Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ (5 mM), comme métaux, et l'EDTA (10 mM), comme agent chélateur, n'ont démontré aucun effet significatif d'inhibition de l'activité alors que le NaN₃ (5 mM) a diminué l'activité de 55%. Le citrate de sodium, à des concentrations de 100 mM et 200 mM, a diminué l'activité de la préparation d'enzyme de 40,1% et 58,4%, respectivement (Boyer, 1999).

Le spectre d'activité de la préparation brute de déshalogénase I a démontré que cette préparation effectue la déshalogénéation principalement en position *ortho* des molécules halogénées, malgré qu'elle a une faible activité de déshalogénéation en position *para* du 3,4,5-TCP (Boyer, 1999). Enfin, les composés qu'elle peut déshalogéner sont les suivants: PCP, 2,4,6-TCP, 2,3,5-TCP, 2,3,4-TCP, 2,3,6-TCP, 2,4,5-TCP, 2,3-DCP, 2,4-DCP et le 2,4,6-tribromophénol en dibromophénol, tandis qu'elle ne peut déshalogéner aucun monochlorophénol (Boyer, 1999).

La déshalogénase I a été purifiée jusqu'à homogénéité et sa masse moléculaire a été évaluée à 37 kDa par SDS-PAGE. La séquence NH₂-terminale en acides aminés de même que des séquences peptidiques internes après traitement à la trypsine ont été déterminées. Le gène correspondant à cette protéine a été cloné et séquencé. Cette enzyme ne montre aucune homologie avec les autres déshalogénases connues (Boyer, 1999). La présence d'une cobalamine a été démontrée par son spectre d'absorbance dans le visible ainsi que par des essais d'inhibition par le 1-iodopropane. Dans ce dernier cas, 76% de l'activité était perdue lors de l'incubation avec le 1-iodopropane

et lorsque mis en présence de lumière, l'activité était restaurée à 92% de l'activité initiale (comm. pers. : Réjean Beaudet).

D'autre part, des essais de caractérisation préliminaire de la déshalogénase II ont été effectués avec une préparation brute de membrane solubilisée en utilisant 0,1% de Triton X-100 comme détergent (Boyer, 1999). Malgré que les cultures de la souche PCP-1 montraient une bonne activité de déshalogénéation du 3,5-DCP en 3-CP, les activités mesurées *in vitro* étaient très faibles et nécessitaient des conditions d'incubation pendant 18 heures à une température de 45°C. Ces résultats illustraient le besoin d'améliorer les conditions de culture utilisées lors de la production de cette enzyme afin d'obtenir une activité suffisante pour procéder à des essais de purification et de caractérisation.

4.11 Objectifs de l'étude

Une grande variété de souches bactériennes anaérobies ont été isolées dans les dernières années. Elle sont capables d'obtenir de l'énergie métabolique à partir de la déshalogénéation réductrice de composés halogénés tels que le PCE, le TCE et les chlorophénols. Ces derniers sont toxiques et récalcitrants dans l'environnement et ils contaminent, entre autres, les sols, les eaux de rivières et de lacs. L'importance de mieux connaître le fonctionnement de ces bactéries est primordiale puisqu'elles pourront éventuellement être utilisées dans des procédés de biorestauration. De plus, diverses études ont permis de caractériser ces bactéries, de déterminer les enzymes responsables de la déshalogénéation réductrice et même de proposer certains mécanismes d'action. Puisque *D. frappieri* souche PCP-1 est la seule bactérie connue pouvant déshalogéner le PCP jusqu'au 3-CP, il est intéressant de connaître les enzymes qui catalysent cette réaction. La déshalogénase I effectue la déshalogénéation principalement en position *ortho* des chlorophénols et a été purifiée et caractérisée, alors que la déshalogénase II qui est responsable de la déshalogénéation en positions *meta* et *para* est très peu connue. Les objectifs de cette étude visaient donc (1) l'optimisation des conditions de production de la déshalogénase II par *D. frappieri* PCP-1 afin d'obtenir une préparation membranaire avec une bonne activité de déshalogénéation du 3,5-DCP et (2) d'effectuer la purification et une caractérisation préliminaire de cette enzyme.

Tableau 3. Résumé des caractéristiques des déshalogénases produites par des bactéries anaérobies

Déshalogénases	Souches	Caractéristiques et structure	Substrats transformés
3-chlorobenzoate déshalogénase réductrice	<i>Desulfomonile tiedjei</i> souche DCB-1	Membranaire, inductible 2 ss-unités : 67 et 37 kDa cofacteur : hème	3-CB PCE TCE
Tetrachloroéthylène déshalogénase réductrice	<i>Dehalospirillum multivorans</i>	Expression constitutive 56 kDa cofacteurs : corrinoïde et 2 centres Fe-S	PCE TCE
PCE déshalogénase réductrice	<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> souche 195	Membranaire 51 kDa cofacteurs : corrinoïde et centres Fe-S	PCE
TCE déshalogénase réductrice	<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> souche 195	Membranaire 2 ss-unités : 61 et 110 kDa cofacteurs : corrinoïde et centres Fe-S	TCE 1,1-DCE <i>cis</i> -1,2-DCE trans-DCE chlorure de vinyle

Tableau 4. Résumé des caractéristiques, structure et substrats transformés par les déshalogénases produites par les souches bactériennes anaérobies du genre *Desulfitobacterium*

Déshalogénases	Souches	Caractéristiques et structure	Substrats transformés
<i>ortho</i> -chlorophénol déshalogénase réductrice	<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i>	Membranaire 45 kDa cofacteurs : corrinoïde et 2 centres Fe-S	3-Cl-4-OHPA, 2-CP, 2,3-DCP 2,4-DCP, 2,6-DCP; PCP 2-bromo-4-chlorophénol
Déshalogénase aryle-réductrice	<i>Desulfitobacterium chlororespirans</i> souche Co23	Membranaire 50 kDa cofacteurs : corrinoïde et 2 centres Fe-S	3-Cl-4-HBA 3,5-Cl-4-HBA 3-Cl-4-OHPA certains DCPs, TCPs, TeCPs et PCP
3-chloro-4-hydroxy-phénylacétate déshalogénase réductrice	<i>Desulfitobacterium hafniense</i> souche DCB-2	Membranaire, inductible 46,5 kDa cofacteurs : corrinoïde centres Fe-S	3-Cl-4-OHPA
Déshalogénase I réductrice	<i>Desulfitobacterium frappieri</i> souche PCP-1	Membranaire 37 kDa cofacteur : corrinoïde	PCP et CPs en positions <i>ortho</i> et 2,4,6-TBrP
Chlorophénol déshalogénase réductrice	<i>Desulfitobacterium</i> sp. souche PCE1	48 kDa cofacteur : corrinoïde	3-Cl-4-OHPA CPs en position <i>ortho</i>
Tetrachloroéthylène déshalogénase réductrice	<i>Desulfitobacterium</i> sp. souche PCE1	48 kDa cofacteur : corrinoïde	PCE
Tetrachloroéthylène déshalogénase réductrice	<i>Desulfitobacterium</i> sp. souche PCE-S	Membranaire expression constitutive 65 kDa cofacteurs : corrinoïde et centres Fe-S	PCE TCE

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1- Provenance de *Desulfitobacterium frappieri* souche PCP-1

La bactérie *Desulfitobacterium frappieri* souche PCP-1 a été isolée d'un consortium méthanogène anaérobie dégradant le PCP (Bouchard *et al.*, 1996). Toutes les expériences réalisées ont été effectuées avec cette souche productrice de la déshalogénase II. *D. frappieri* PCP-1 a été conservée sous forme lyophilisée, sous forme congelée à -80°C ainsi que par des repiquages périodiques dans un milieu liquide anaérobie dans des bouteilles de sérum.

2- Préparation du milieu et culture de *D. frappieri* PCP-1 dans des bouteilles de sérum

Le milieu de culture liquide anaérobie (MLA) qui a servi pour la culture de la souche PCP-1 a été inspiré de celui décrit par Boyd *et al.* (1983). Dans un premier temps, une solution constituée des substances suivantes par litre a été préparée: 0,27 g de KH_2PO_4 (J.T. Baker, Phillipsburg, N.J.); 0,35 g de K_2HPO_4 (Fisher Scientific, Fair Lawn, N.J.); 0,53 g de NH_4Cl (J.T. Baker, Phillipsburg, N.J.); 0,10 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (J.T. Baker, Phillipsburg, N.J.); 0,005 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Anachemia, Montréal, Qc) et 0,073 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (J.T. Baker, Phillipsburg, N.J.). Ensuite, 10 ml d'une solution de minéraux contenant 0,1 g/L de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 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) ont été ajoutés ainsi que 0,001 g de résazurin (Sigma, St-Louis, MO), agent indicateur du potentiel redox. Par la suite, le pH du milieu a été ajusté à 7,5 avec du NaHCO_3 (BDH inc., Toronto, Ontario) et le volume a été complété à 1L avec de l'eau distillée déionisée.

Le milieu a été placé à bouillir (250 ml dans un ballon de 500 ml) dans une colonne réfrigérée pendant une heure, puis il a été transféré dans des vials par volumes de 35 ml et barboté avec un mélange de gaz (10% H_2 ; 10% CO_2 ; 80% N_2 (Médigas, St-Laurent, Qc)) pendant 5 minutes. Ces manipulations ont servi à éliminer l'oxygène présent dans le milieu. Les vials ont été fermés hermétiquement à l'aide de bouchons en butyle (Geo-Microbial Technologies, Ochelata, N.J.) puis maintenus à l'aide d'un anneau métallique. Ils ont été placés dans un plat contenant un peu d'eau afin d'éviter

l'éclatement des vials et placés à l'autoclave (American Sterilizer Company, Erie, PA., États-Unis) pendant 15 minutes à 121°C pour stérilisation.

Entre temps, des solutions de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (agent réducteur) (BDH inc., Toronto, Ontario), d'extrait de levures (Difco, Détroit, Mi), de pyruvate (Sigma, St-Louis, MO) et de 3,5-dichlorophénol (3,5-DCP) (Aldrich, Milwaukee, Wis) ont été préparées en solubilisant les produits dans de l'eau déionisée bouillie. Elles ont été ajoutées aux vials stériles après avoir été stérilisées par filtration sur filtre de 0,2 μm (Sarstedt, Montréal, Canada). Pour chaque vial sérologique de 70 ml (Canlab, Pointe-Claire, Qc) contenant 35 ml de milieu, 0,2 ml de la solution de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (pour une concentration finale de 0,05 g/L) a rapidement été ajouté à chaque vial afin d'éliminer l'oxygène restant. Lors de la culture de la souche, 0,5 ml de la solution d'extrait de levures (0,1% final), 0,5 ml de la solution de 3,5-DCP (10 mg/L final) et 1 ml de la solution de pyruvate (concentration finale de 55 mM) ont été ajoutés de façon stérile sous le laminaire. Ces solutions ont été, en tout temps, gardées à +4°C et enveloppées de papier d'aluminium pour les protéger de la lumière. Le pyruvate a servi comme source de carbone et d'énergie alors que le 3,5-DCP a servi d'inducteur à la déshalogénase II.

Les vials contenant le milieu MLA ont été inoculés avec 1,5 ml d'une culture active de la souche PCP-1 et incubés à 37°C au début du projet, puis à 30°C suite aux résultats obtenus des expériences sur l'optimisation des conditions de production de la déshalogénase II (section 4.1). Des repiquages périodiques (2 jours) ont été effectués afin de maintenir la viabilité des bactéries. Pour les analyses des chlorophénols, des aliquots de 1 ml ont été prélevés stérilement et déposés dans des tubes Eppendorf (Sarstedt, Allemagne) auxquels a été ajouté 0,5 ml d'une solution d'acétonitrile (qualité CLHP, Anachemia, Montréal, Qc) contenant 0,33% (v/v) d'acide acétique (Baxter, Toronto, Ont.). Les préparations ont été centrifugées à 15 000 x g pendant 5 minutes (modèle Biofuge A, Canlab, Pointe-Claire, Qc.) et les surnageants ont été analysés par CLHP.

À chaque nouvelle expérience, une coloration de Gram (Difco, Maryland, États-Unis) de la culture de la souche PCP-1 utilisée a été effectuée afin de s'assurer qu'il n'y avait pas de contamination.

3- Manipulations en conditions anaérobies

Tous les travaux nécessitant des manipulations en conditions anaérobies (fractionnement cellulaire, dosage de l'activité enzymatique, etc.) ont été exécutés en grande partie dans une chambre anaérobie (Sheldan Manufacturing Inc., modèle BAC II : Bactron Anaerobic/Environmental Chamber, Oregon). Le mélange gazeux dans la chambre anaérobie est composé de 10 % de H₂ ; 10 % de CO₂ et 80 % de N₂ (Médigas, St-Laurent, Qc). Cette enceinte est non-stérile et permet le travail à mains nues pour plus de dextérité.

La procédure suivante a été utilisée pour rendre les solutions anaérobies. D'abord, la solution a été placée dans un bécher en verre contenant un barreau magnétique. Ce bécher a été placé dans une jarre anaérobie, munie d'un système de sortie (pour le vide) et d'un système d'entrée (pour le gaz) (Quelab, Montréal, Qc), placée sur une plaque agitatrice (Corning Hot Plate Stirrer, modèle PC351) et reliée à un système de vide et à une bonbonne de gaz (10% H₂; 10% CO₂; 80% N₂). Des lavages avec le mélange gazeux de la solution agitée ont été effectués trois fois en alternant l'évacuation du gaz par l'application d'un vide et l'introduction du mélange gazeux à l'intérieur de la jarre. Par la suite, la jarre a été transférée dans l'enceinte anaérobie. La solution a ensuite été transférée dans un vial de 70 ml fermé avec un bouchon en butyle et maintenu à l'aide d'un anneau métallique. Enfin, le vial a été retiré de l'enceinte anaérobie et les prélèvements de solution ont été réalisés, selon les besoins, à l'aide de seringues.

4- Conditions de culture pour la production de la déshalogénase II

Afin de déterminer les conditions optimales pour la production de la déshalogénase II par *D. frappieri* PCP-1, plusieurs expériences ont été réalisées en modifiant les conditions de culture de départ, détaillées à la section 2.

4.1 Température et vitamines

Une première expérience a été effectuée en utilisant trois conditions de culture de *D. frappieri* (Tableau 5). Le mélange de vitamines du milieu B était composé des vitamines suivantes (Sigma, St-Louis, MO): biotine (2 mg/L), acide folique (2 mg/L), hydrochlorure de pyridoxine (10 mg/L), vitamine B₁₂ (0,1 mg/L), riboflavine, thiamine, acide nicotinique, acide panthotinique, acide ρ -aminobenzoïque et acide thioctique (tous à 5 mg/L). Des prélèvements ont été effectués pour la mesure du pH, de la densité optique à une longueur d'onde de 600 nm et l'analyse de la dégradation du 3,5-DCP aux temps 0 et après 48 heures d'incubation. Les cultures (en duplicata) ont, par la suite, été centrifugées à 9 000 x g pendant 10 minutes (Beckman, modèle Avanti J-25). Le culot a été récolté puis resuspendu dans un milieu neuf sans extrait de levures (ce qui empêche la croissance des bactéries) et la densité optique de toutes les cultures a été ajustée à la même valeur (environ 0,5 à 600 nm). Les biomasses provenant des cultures ont été réincubées, toutes à 37°C, afin d'uniformiser les essais de l'activité de déshalogénéation de chaque biomasse. Des prélèvements ont été effectués à 18 heures pour l'analyse de la dégradation du 3,5-DCP, la mesure du pH et de la densité optique. Un dosage de protéines a aussi été effectué (section 10).

Tableau 5. Conditions de culture utilisées lors des essais de production de la déshalogénase II par *D. frappieri* PCP-1.

Conditions de culture	Composition du milieu	Température d'incubation
A	Milieu MLA + 3,5-DCP (10 mg/L)	37°C
B	Milieu A + mélange de vitamines (0,7 ml/70 ml) et 1,4-naphtoquinone (200 µg/L)	37°C
C	Milieu A	30°C

Une deuxième expérience a consisté à incuber des cultures (en duplicata) de *D. frappieri* aux températures suivantes : 22, 30 et 37°C. Des prélèvements (mesure du pH, densité optique à 600 nm et analyse de la dégradation du 3,5-DCP) ont été pris au temps 0, 24 et 48 heures. Les bactéries ont été récoltées stérilement après 48 heures puis centrifugées à 9 000 x g pendant 10 minutes. Le culot a été resuspendu dans un volume de milieu neuf sans extrait de levures et la densité optique a été ajustée à la même valeur (environ 0,5 à 600 nm) pour toutes les cultures. Les cultures ont été réincubées, toutes à 37°C, pendant 3 heures et des prélèvements ont été effectués pour l'analyse de la dégradation du 3,5-DCP, la mesure du pH et de la densité optique. Un dosage des protéines a aussi été effectué (section 10).

4.2 Courbe de croissance

Une courbe de croissance de *D. frappieri* PCP-1 a été effectuée dans des vials de 70 ml contenant 35 ml de milieu MLA (en duplicata) et 10 mg/L de 3,5-DCP. Chaque vial a été inoculé avec une pré-culture de la souche PCP-1 en phase exponentielle de croissance et induite pour la dégradation du 3,5-DCP. Les vials ont été incubés à 25°C. L'ajustement du pH au dessus de 7 avec une solution de NaHCO₃ saturée et stérile a été effectué lorsque celui-ci se trouvait à des valeurs aux alentours de 6,8. La densité optique à 600 nm a été mesurée à différents temps. La déshalogénéation du 3,5-DCP a été suivie et un ajout de 5 mg/L a été effectué lorsque ce dernier était complètement dégradé soit après 38 heures d'incubation.

5- Production d'une biomasse et fractionnement cellulaire

Dans un premier temps, la production d'une biomasse pouvant déshalogéner le 3,5-DCP a été réalisée et utilisée subséquemment pour le fractionnement cellulaire et l'obtention des fractions membranaires contenant la déshalogénase II. La procédure utilisée nécessitait la préparation de milieu MLA dans des vials de 70 ml, dans des bouteilles Schott de 1 L et dans une bouteille en verre de 12 L. Pour les deux dernières cultures, le milieu de base a été préparé dans une bouteille en verre de 12 L en utilisant la

procédure suivante : Pour un volume total de 9 L, le K_2HPO_4 , le NH_4Cl , le résazurin et la solution de sels minéraux ont tout d'abord été dissous dans de l'eau distillée. Le pH a été ajusté à 8 avec la solution de KH_2PO_4 . De cette solution, deux prélèvements de 450 ml de milieu ont été effectués, puis transvidés dans deux bouteilles Schott de 1 L. Toutes les pinces nécessaires pour contrôler les entrées et sorties ont été installées sur les différentes bouteilles, puis le tout a été mis à l'autoclave pendant 3 heures. Ces dernières ont ensuite été placées à 30°C pour une durée de 48 heures. Afin de s'assurer de maintenir les conditions anaérobies, le milieu a été barboté pendant une heure avec le mélange gazeux habituel (10% H_2 ; 10% CO_2 ; 80% N_2). Ensuite, les divers constituents ont été ajoutés, soit le Na_2S , l'extrait de levures (0,1%), le pyruvate (55 mM), le 3,5-DCP (10 mg/L) et le $NaHCO_3$ saturé. Finalement, le reste des minéraux a été ajouté soit, le $MgCl_2$, le $CaCl_2$ et le $FeCl_2$.

La méthodologie employée a débuté par une culture de la souche PCP-1 dans des vials sérologiques de 70 ml incubés à 30°C. Après 2 transferts successifs (48 heures entre chaque repiquage), un volume de 25 ml de culture a été utilisé pour inoculer une bouteille Schott contenant 450 ml de milieu. Après 24 heures d'incubation à 30°C, le volume total de la bouteille a servi pour inoculer la bouteille en verre de 12 L contenant les 8,7 L de milieu. Cette dernière a été incubée à 30°C pendant 25 heures puis transférée à la température de la pièce (environ 22°C) pour un autre 15 heures d'incubation.

Entre chaque passage et durant les périodes d'incubation, des aliquots de la culture ont été prélevés stérilement et les paramètres suivants ont été déterminés : évaluation de la pureté de la culture par un examen au microscope photonique après une coloration de Gram, la densité optique à une longueur d'onde de 600 nm, le pH et la transformation du 3,5-DCP en 3-CP par analyse au CLHP selon la méthodologie décrite à la section 9. Lorsque le pH était plus bas que 7, il était réajusté avec une solution de $NaHCO_3$ saturée, stérile et anaérobie. De plus, des additions de 3,5-DCP (5 mg/L) ont été réalisées lorsque la quantité préalablement ajoutée était presque toute transformée en 3-CP, soit après environ 15 et 25 heures d'incubation.

Lorsque la densité optique de la culture a atteint une valeur avoisinante de 0,5 soit, environ 40 heures après l'ensemencement, la biomasse a été récoltée. Tout d'abord, la culture a été centrifugée dans des bouteilles de polycarbonates de 500 ml (Beckman, Palo Alto, CA) à 9 000 x g et à 4°C pendant 20 minutes (modèle Beckman Avanti J-25 Centrifuge). Les culots ont été repris dans 300 ml de tampon phosphate de potassium en conditions anaérobies 0,05 M à pH 7,5 contenant 1 mM de dithiothréitol (DTT; Bio-Rad Laboratories, CA, Etats-Unis). Ces manipulations ont été effectuées dans l'enceinte anaérobie. Le tout a, de nouveau, été centrifugé à 9 000 x g, à 4°C pendant 15 minutes (modèle Beckman Avanti J-25 Centrifuge). Les culots ont été repris, cette fois, dans 100 ml de tampon phosphate de potassium anaérobie 0,05 M à pH 7,5 auquel avait été ajouté 1 mM de DTT et 0,5 ml d'une solution de PMSF (2,5 mg phenylmethylsulfonylfluoride (Sigma, St-Louis, MO) dissout dans 1 ml d'éthanol 100%). La concentration finale de PMSF était de 1 mg pour 100 ml de la solution de suspension.

La préparation obtenue a été passée deux fois à la presse de French (Aminco, Silver Spring, MA, modèle 5-598 A) à une pression de 1200 psi afin d'assurer un bris maximal des bactéries. Le montage était constitué comme suit, de façon à minimiser l'entrée d'oxygène : la suspension était placée dans un Erlenmeyer de 125 ml relié, d'abord, au piston de la presse en circuit fermé, puis à un ballon contenant le mélange de gaz habituel. Un deuxième Erlenmeyer était relié au piston de la sortie du système ainsi qu'au premier Erlenmeyer et servait à récolter les bactéries fractionnées. À la fin du premier passage, les bactéries ont simplement été transvidées dans le premier Erlenmeyer. Le deuxième passage a été effectué de la même manière.

Par la suite, la préparation a été transférée dans des tubes de 40 ml en plastique, ceux-ci ont été équilibrés dans l'enceinte anaérobie, puis centrifugés à 17 000 x g, à 4°C pendant 30 minutes (modèle Beckman Avanti J-25 Centrifuge). Le surnageant a été recueilli et centrifugé dans des tubes de 40 ml, différents des premiers, à 161 000 x g, à 4°C pendant 90 minutes (modèle Beckman L5-65 ultracentrifuge). Enfin, les culots ont été repris 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 (EM Science, Gibbstown, NJ). La

suspension a été distribuée en aliquots d'environ 1,1 ml dans des bouteilles sérologiques de 12 ml en borosilicate (Canlab, Pointe-Claire, Qc), fermées hermétiquement avec des bouchons en butyle et maintenus à l'aide d'un anneau métallique. Ces aliquots (fraction membranaire) ainsi que le surnageant (fraction cytoplasmique) ont été conservés à -80°C.

6- Solubilisation de la déshalogénase II

La procédure utilisée pour solubiliser les fractions membranaires était la suivante : un échantillon de 1,1 ml a été décongelé et repris dans 10 ml final de tampon de solubilisation (phosphate de potassium 0,05 M à pH 8 comprenant 20% v/v de glycérol, 1mM de DTT et 0,1% v/v de Triton X-100 (Bio-Rad, Richmond, CA) dans l'enceinte anaérobie. Une pile magnétique a été déposée dans le vial qui a été agité sur glace pendant 45 minutes. Le tout a été centrifugé à 161 000 x g, à 4°C pendant 90 minutes (modèle Beckman L5-65 ultracentrifuge). Le surnageant a été conservé et utilisé comme préparation brute de déshalogénase II solubilisée.

7- Dosage *in vitro* de l'activité de déshalogénéation

Le dosage *in vitro* de l'activité de déshalogénéation du 3,5-DCP en 3-CP 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(III), 2 mM de méthyl viologène (Sigma, St-Louis, MO) et 1 mM de 3,5-DCP. La solution de citrate de titane(III) a été préparée, dans l'enceinte anaérobie, à partir d'une solution de 15% p/v de chlorure de titane(III) (Aldrich, Milwaukee, WIS) dans de l'eau déionisée anaérobie. Un volume de 45 ml d'une solution de citrate de sodium (0,2 M) (Baker, Phillipsburg, NJ) a été ajouté à 5 ml de la solution précédente. Le pH a été ajusté à 7 avec une solution saturée de carbonate de sodium (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) et la solution finale a été conservée à +4°C, à l'obscurité dans une bouteille sérologique en borosilicate.

Pour réaliser l'essai enzymatique standard, 1,9 ml de TAE ont été mis dans des vials en verre fermés avec des bouchons butyles et maintenus à l'aide d'un anneau métallique. Ces derniers ont été placés dans un bain à 37°C environ 15 minutes avant l'ajout de 100 µl de la préparation de déshalogénase II à analyser, avec des seringues de 1 ml. Après une période d'incubation qui était généralement de 30 minutes ou 1 heure, selon l'activité des préparations, 1 ml d'acétonitrile 1% v/v d'acide acétique a été ajouté à l'essai enzymatique afin d'arrêter la réaction. Les vials ont été ouverts et 0,2 ml d'acide acétique glacial 100% a été ajouté à chacun afin d'acidifier davantage la préparation. Finalement, un échantillon de 1 ml a été prélevé, déposé dans un tube Eppendorf et le tout a été centrifugé pendant 5 minutes à 15 000 x g (modèle Biofuge A, Canlab, Pointe-Claire, Qc). Le surnageant a été récupéré, transféré dans un vial de 1 ml pour l'injecteur automatique et analysé par CLHP (section 9).

8- Cinétique enzymatique

Cette étape a permis de déterminer la relation linéaire de la quantité de 3-CP formé en fonction du temps d'incubation de la déshalogénase II en présence du 3,5-DCP. Les essais ont été effectués avec des fractions solubilisées de déshalogénase II, l'enzyme a été diluée 1:2 avec du tampon de solubilisation (section 6) et 100 µl d'enzyme dans 1,9 ml de TAE (section 7) ont été utilisés pour l'essai. La température d'incubation était de 37°C et les temps retenus pour l'essai étaient les suivants : 0, 0.5, 1, 2, 3 et 4 heures dans une première expérience et jusqu'à 7 heures dans une deuxième expérience. Les essais ont été effectués en duplicata pour chaque temps. L'arrêt de la réaction ainsi que l'analyse de la dégradation ont été effectués selon la méthode décrite à la section 7.

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

L'appareil CLHP qui a servi pour les analyses était de marque Waters (Mississauga, Ont.) (modèle 600). Il était couplé à un spectrophotomètre (modèle 486) et à un injecteur automatique (Waters, modèle 717 Plus). Le contrôle du système était réalisé par un ordinateur Digital Celebris (modèle 590) et le logiciel utilisé était le

Millenium 32. La colonne hydrophobe utilisée était une NovaPak C₁₈ (3,9 x 150 mm). Le programme qui a été utilisé comportait deux phases mobiles, A (eau déionisée et acide acétique à 0,1% v/v) et B (acétonitrile et acide acétique à 0,1% v/v). Les deux phases ont été barbotées avec de l'hélium (Médigas, St-Laurent, Qc) pendant 15 minutes afin de dégazer les mélanges.

Afin de séparer et quantifier les divers chlorophénols, le programme suivant a été appliqué : La colonne a été équilibrée pendant au moins 5 minutes avec un mélange de 70% de A et 30% de B à un débit de 2 ml/min. Ce débit a été maintenu pendant toute la durée de l'analyse, soit 22 minutes. Une fois l'échantillon injecté, un gradient linéaire d'acétonitrile (phase mobile B) a été appliqué pendant 4 minutes, faisant passer la concentration d'acétonitrile de 30 à 55% et, par le fait même, celle de la phase mobile A à 45%. La concentration ainsi obtenue a été maintenue pendant 10 minutes. Lors des 3 dernières minutes, les conditions initiales ont été réinstallées avec 70% de A et 30% de B, selon un gradient concave. Enfin, les différents chlorophénols ont été quantifiés par leur absorbance à une longueur d'onde de 220 nm.

10- Dosage des protéines

Les dosages de protéines ont été effectués selon la méthode de Bradford (1976). La compagnie Bio-Rad (CA, États-Unis) commercialise le "Bio-Rad Protein Assay" qui est basé sur cette méthode. Lorsque le dosage des protéines a été effectué sur des échantillons provenant d'une fraction membranaire solubilisée, c'est la méthode standard décrite par Bio-Rad qui a été utilisée. Par contre, pour les échantillons provenant des étapes de purification ou autres expériences contenant moins de protéines, la microméthode a été utilisée.

11- Purification de la déshalogénase II

Plusieurs essais de purification ont été effectués avant d'obtenir la déshalogénase II purifiée. Les différents types de colonnes testées sont les suivantes ; une colonne

d'hydrophobicité de type butyl ou méthyl (Macro-Prep Butyl HIC et Methyl HIC support) (Bio-Rad, Hercules, CA), un tamis moléculaire (Protein Pak 300SW, 8,0 x 300 mm) (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, États-Unis), des échangeuses ioniques DEAE-5PW (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, États-Unis) et Mono Q HR 10/10 (10 mm x 10 cm) (Pharmacia) ainsi que des essais sur mini-colonnes échangeuses ioniques sep-pak QMA light et CM light (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, États-Unis). De plus, différents tampons de solubilisation ont été testés tels que le tampon habituel (section 6) à pH 7 et 7,5 ; le tampon habituel avec 0,05 M de CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)diméthyl-ammonio]-1-propanesulfonate) (Roche diagnostics, Laval, Qc) comme détergent au lieu du Triton X-100 ; le tampon Tris-HCl (pH 8) contenant 17,4% de glycérol, 1 mM de DTT et soit 0,05 M de CHAPS soit 0,1% v/v de Triton X-100.

La déshalogénase II a été purifiée jusqu'à homogénéité après passage sur deux colonnes différentes soit une échangeuse ionique (anionique) et une chromatographie d'interactions hydrophobes. La purification a été effectuée avec le système Waters 650 Advanced Purification System (Millipore-Waters, Missisauga, Ont.). Toutes les solutions nécessaires ainsi que les manipulations de l'enzyme ont été réalisées de façon à éliminer ou à minimiser la présence d'oxygène. Certaines manipulations ont été effectuées dans une enceinte anaérobie et les solutions utilisées avaient préalablement été barbotées avec le mélange gazeux habituel. Lors des chromatographies, chacun des pics a été recueilli manuellement à la sortie du CLHP avec une aiguille dans un vial (sans oxygène) préalablement bouchonné dans l'enceinte anaérobie.

Deux aliquots de fractions membranaires (congelées à -80°C) ont été décongelées et solubilisées dans 10 ml de tampon de solubilisation: phosphate de potassium 0,05 M (pH 8) contenant 20% v/v de glycérol, 1mM de DTT et 0,1% v/v de Triton X-100 (section 6). La première colonne utilisée était une échangeuse ionique de type Mono Q HR 10/10 (10 mm x 10 cm). La colonne a d'abord été équilibrée avec un tampon phosphate de potassium 0,05 M (pH 8) contenant 10% de glycérol, 1 mM de DTT et 0,05% de Triton X-100. Le volume total de la fraction solubilisée a été injecté sur la

colonne et l'activité a été retrouvée dans le volume mort de la colonne. Il a été recueilli dans un vial anaérobie à l'aide d'une aiguille et retourné dans l'enceinte anaérobie où 0,5 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (EM Science, Merck, KGaA, Darmstadt, Allemagne) lui ont été ajoutés. La préparation a été filtrée sur 0,2 μm puis injectée sur une colonne hydrophobe de type méthyl (1 cm x 9,5 cm) (Macro-Prep Methyl HIC support). Cette dernière avait été équilibrée avec un tampon phosphate de potassium 0,05 M (pH 7,5) contenant 10% de glycérol, 1mM de DTT et 0,5 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. L'enzyme a été éluée avec un gradient de 10 minutes de 0,5 à 0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (tampon phosphate de potassium 0,05 M (pH 7,5) contenant 10% de glycérol, 1mM de DTT et 6 mM de CHAPS) à un débit de 1 ml/min. Le pic contenant l'activité de déshalogénéation a aussi été recueilli dans un vial anaérobie. À chaque étape de purification un dosage de l'activité a été effectué sur chacun des pics recueillis (section 7). Des échantillons des préparations actives ont été utilisés pour l'électrophorèse en gel de polyacrylamide avec SDS (section 12) ainsi que pour les dosages de protéines (section 10).

12- Électrophorèse en gel de polyacrylamide avec SDS

Afin de vérifier le profil des protéines lors des différentes étapes de purification, des électrophorèses en gel de polyacrylamide 12% contenant 0,1% SDS (Bio-Rad, Hercules, CA) et 0,375 M Tris-HCl (Bio-Rad, Hercules, CA) (pH 8,8) ont été effectuées selon la méthode de Bio-Rad: Reagent and Gel Preparation for Laemmli SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Bio-Rad Laboratories, CA; Laemmli, 1970). Des aliquots de 48 μl des échantillons à analyser ont été mélangés à 12 μl de tampon d'échantillon (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 20% de glycérol, 2% de SDS et 5% de β -mercaptoéthanol (Bio-Rad, Richmond, CA)). Les tubes Eppendorf contenant ces échantillons ont été gardés à -20°C jusqu'à leur utilisation. Les échantillons étaient alors décongelés et incubés pendant 5 minutes dans un bécher d'eau bouillante. Par la suite, le gel a été chargé et placé à migrer, à 200 volts (0,03 Amp), pendant environ 45 minutes dans un tampon de migration (Tris 25 mM (pH 8,3) contenant 192 mM de glycine (Sigma, St-Louis, MO) et 0,1% de SDS). Les standards protéiques de faible poids moléculaire (97, 66, 45, 31, 21 et 14 kDa) vendus par Bio-Rad ont été utilisés.

Une fois la migration terminée, les gels ont été colorés pour les protéines par deux méthodes différentes, soit avec nitrate d'argent et avec le bleu de Coomassie. La coloration avec nitrate d'argent a été effectuée en utilisant les produits et la méthode "Silver Stain Plus" de Bio-Rad (numéro de référence 161-0449). La coloration avec le bleu de Coomassie a été effectuée en immergeant le gel dans une solution de coloration contenant : 40% de méthanol (EM Science, Darmstadt, Allemagne), 10% d'acide acétique et 0,1% de bleu de Coomassie R-250 (Bio-Rad, CA, Etats-Unis) et ce, pendant au moins 20 minutes. Par la suite, le gel a été décoloré dans une solution de décoloration contenant: 40% de méthanol et 10% d'acide acétique. Puis, les gels ont été conservés dans une solution à 5% d'acide acétique. Par la suite, les gels ont été séchés entre deux feuilles de cellulose (Promega, Madison, WI, États-Unis) préalablement trempées dans l'eau pendant une quinzaine de minutes.

13- Caractérisation de la déshalogénase II

Une caractérisation partielle de la déshalogénase II a été entamée. Quelques expériences ont été effectuées afin de déterminer les paramètres pouvant affecter le rendement de déshalogénéation de l'enzyme. Les expériences effectuées sont la détermination du pH optimal de l'enzyme, l'effet du sulfate, sulfite et nitrate sur l'activité, l'essai d'inhibition réversible de l'activité par le 1-iodopropane et le spectre d'activité envers différents chlorophénols.

13.1- Détermination du pH optimal

Le pH optimal de l'activité de déshalogénéation réductrice a été déterminé à partir d'une fraction membranaire solubilisée (section 6). Le TAE utilisé lors des essais enzymatiques a été préparé comme à l'habitude (section 7), sauf que le tampon 0,1 M de phosphate de potassium utilisé a été initialement ajusté aux valeurs de pH suivantes: 6; 6,5; 7; 7,5; 8,0 et 8,5. Les différentes préparations de TAE ont été placées dans l'enceinte anaérobie et 1,9 ml de chaque TAE ont été déposés dans des vials puis, incubés à 37°C environ 30 minutes avant l'addition de l'enzyme. Ensuite, 100 µl de la fraction

solubilisée ont été ajoutés à la préparation à l'aide de seringues et le tout a été incubé à 37°C pendant 30 minutes. Lors de l'essai, des variations de pH importantes ont été observées pour les pH plus alcalins puisque l'effet tampon du phosphate de potassium est maximisé entre pH 6 et 8. Les valeurs retenues sont celles mesurées à la fin de la période d'incubation et ont varié entre 6,2 et 7,5. L'analyse de la dégradation du 3,5-DCP ainsi que le dosage des protéines ont été effectués selon les méthodes déjà décrites. Les essais enzymatiques ont été effectués en triplicata.

13.2- Effet du sulfate, du sulfite et du nitrate sur l'activité de la déshalogénase II

Les solutions anaérobies suivantes ont été préparées dans de l'eau déionisée: 100 mM sulfate (Na_2SO_4 , BDH, Toronto, Ont.), 10 mM sulfite (Na_2SO_3 , Baker, Phillipsburg, N.J.) et 100 mM nitrate (NaNO_3 , BDH, Toronto, Ont.). Les effets du sulfate et du nitrate ont été testés aux concentrations finales suivantes : 0 (témoin), 25, 50 et 75 mM. Les volumes de préparation enzymatique solubilisée ajoutés aux différents vials (en triplicata) variaient de 0 (témoin) à 75 μl (équivalent à 75 mM) et le volume de TAE a été ajouté de façon à ce que le volume final de l'essai enzymatique soit toujours de 2 ml. L'effet du sulfite a été testé aux concentrations finales suivantes : 0 (témoin), 2,5, 5 et 7,5 mM. Les volumes de préparation enzymatique solubilisée ajoutés aux différents vials (en triplicata) variaient de 0 à 7,5 μl (équivalent à 7,5 mM) et le volume final de l'essai enzymatique était aussi de 2 ml et a été complété avec du TAE. Par la suite, 50 μl de la préparation d'enzyme ont été ajoutés à chaque vial et le tout a été incubé à 37°C pendant 45 minutes et analysé au CLHP selon la méthode décrite plus haut.

13.3- Essais d'inhibition de l'activité de la déshalogénase II par le 1-iodopropane

Les tests d'inhibition réversible par le 1-iodopropane ont été effectués avec la fraction solubilisée et avec une préparation de déshalogénase II semi-purifiée (après l'étape de la chromatographie sur la colonne Mono Q). Afin de minimiser l'effet de la lumière, les vials ont été recouverts de papier d'aluminium et les lumières de la pièce où est située l'enceinte anaérobie ont été fermées. La préparation enzymatique a été incubée

(en triplicata) dans une chambre noire à 37°C pendant 30 minutes, en présence de 1 mM de 1-iodopropane (Aldrich, Milwaukee, WIS) et 2 mM de citrate de titane(III). Un vial a servi de témoin où le 1-iodopropane a été remplacé par de l'eau déionisée. Par la suite, dans l'enceinte anaérobie, des aliquots de 100 µl de chaque vial ont été prélevés pour le dosage de l'activité de déshalogénéation. Les vials ont été repris, sans papier d'aluminium et mis en présence de la lumière halogène (300W, 82V) d'un projecteur (Sylvania) pendant 10 minutes sur la glace. Des échantillons de 100 µl de chaque vial ont été repris dans l'enceinte anaérobie et les activités de déshalogénéation ont été mesurées selon la méthode décrite à la section 7.

13.4- Spectre d'activité de la fraction membranaire solubilisée

Le spectre d'activité de la déshalogénase II vis-à-vis différents chlorophénols a été déterminé avec une préparation obtenue après la solubilisation des membranes. Les chlorophénols suivants ont été testés (en triplicata) à des concentrations de 1 mM en remplacement du 3,5-DCP dans l'essai enzymatique standard : 2,4-DCP, 2,4,6-TCP, 3,4,5-TCP et PCP (tous de chez Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, WIS). Pour chaque essai enzymatique, 100 µl de la préparation de protéines membranaires solubilisées ont été utilisés. Les échantillons ont été dosés et analysés par CLHP selon la méthode décrite à la section 7.

La quantification des tétrachlorophénols (TeCP), obtenus de la dégradation du PCP, a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur à ionisation à la flamme (CG-DIF). Pour chaque échantillon et standard (2,3,4,5-TeCP, 2,3,4,6-TeCP et 2,3,5,6-TeCP à 10 mg/L (tous de chez Ultra Scientific, North Kingstown, RI)), 2 ml ont été prélevés puis 20 µl de standard interne (*para*-crésol à 7 500 ppm (J.T. Baker Chemical, Phillipsburg, N.J.)), 0,2 ml de HCl concentré et 1 ml d'acétate d'éthyle (Anachemia, Montréal, Qc) ont été ajoutés. Les tubes en verre fermés avec un bouchon possédant une membrane de téflon ont été agités vigoureusement pendant une minute à l'aide d'un agitateur. Par la suite, le surnageant a été prélevé et mis en contact avec quelques cristaux de Na₂SO₄ (BDH inc., Toronto, Ont.) pendant 10 minutes. De cette

phase, 100 μ l ont été prélevés et 30 μ l de BSTFA (N,O-*bis*(triméthylsilyl)-trifluoroacétamide) (Pierce, Rockford, Illinois) ont été ajoutés dans des bouteilles coniques à CG. Tous les vials ont été incubés à l'étuve à 70°C pendant 30 minutes. Enfin, les échantillons ont été injectés au CG-DIF.

L'appareil utilisé était de marque Hewlett-Packard modèle 5890. Le gaz porteur, l'hélium (Médigas, St-Laurent, Qc) passait dans une colonne de type phényl-méthylsilicone DB-5MS (J&W Scientific, USA) de 30 mètres de longueur et de 0,25 mm de diamètre interne. La pression de tête était constante à 10 psi. La programmation du four était la suivante: la température initiale était de 70°C, puis elle augmentait, en trois phases. Pendant la première phase, la température augmentait de 15°C/minute jusqu'à 100°C. Ensuite, elle augmentait de 5°C/min. jusqu'à 180°C et était maintenue pendant 2 minutes. Pour la dernière phase, la température augmentait de 30°C/min. jusqu'à 310°C et était maintenue pendant 2 minutes. La durée totale du programme était de 28 minutes. La température de l'injecteur était à 250°C tandis que celle du détecteur était à 320°C. Les temps de rétention respectifs pour chacun des tétrachlorophénols testés étaient de 18,04 minutes pour le 2,3,5,6-TeCP, 18,975 minutes pour le 2,3,4,5-TeCP et de 18,267 pour le 2,3,4,6-TeCP. Le standard interne, le *para*-crésol, avait un temps de rétention d'environ 6,286 minutes.

RÉSULTATS

1- Conditions optimales de production de la déshalogénase II

1.1- Effet de l'addition de vitamines et de la température d'incubation

Dans un premier temps, l'effet de l'addition de vitamines et de 1,4-naphtoquinone au milieu de culture ainsi que l'incubation à 30 et 37°C sur l'activité de déshalogénéation du 3,5-DCP par *D. frappieri* PCP-1 a été évalué (Figure 6). Après 18 heures d'incubation, la biomasse de chaque culture a été récupérée et l'activité de déshalogénéation de chacune face au 3,5-DCP a été mesurée à 37°C dans un milieu sans extrait de levures ne permettant pas la croissance. Ainsi, aucune variation de la densité optique n'a été observée dans ces conditions. Les cultures préalablement incubées à 30°C (condition C) ont une activité de déshalogénéation de 3 et 7 fois plus élevée que les cultures réalisées selon les conditions A et B, respectivement. L'activité des cultures incubées à 30°C (condition C) est de 885 ± 150 η mole de 3-CP/hre*mg protéines alors que le milieu habituel (condition A) a une activité de 290 ± 50 η mole de 3-CP/hre*mg protéines et le milieu avec ajout de vitamines et de 1,4-naphtoquinone (condition B) a une activité de 118 ± 70 η mole de 3-CP/hre*mg protéines.

L'effet de la température d'incubation des cultures de *D. frappieri* PCP-1 a été testé à 22, 30 et 37°C (Figure 7). Il en ressort que l'activité de déshalogénéation de la biomasse obtenue des cultures à 22°C est d'environ 10 fois plus élevée que celle des cultures à 37°C. Les valeurs d'activité de déshalogénéation du 3,5-DCP ainsi obtenues pour les cultures incubées à 22, 30 et 37°C sont respectivement de $4\ 030 \pm 1\ 280$; $1\ 830 \pm 590$ et 420 ± 120 η mole de 3-CP/hre*mg protéines.

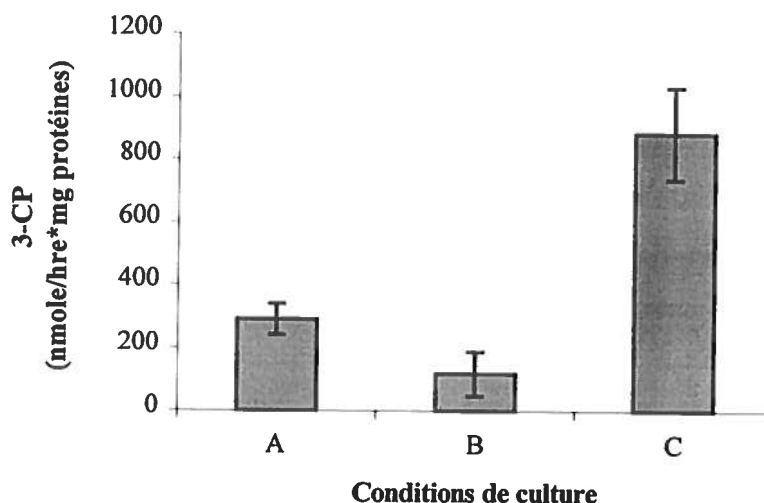


Figure 6. Effet de différentes conditions de culture de *D. frappieri* PCP-1 sur la déshalogénéation du 3,5-DCP (A : milieu habituel + 3,5-DCP ; B : A+ mélange de vitamines et 1,4-naphtoquinone ; C : A incubé à 30°C au lieu de 37°C). Chaque biomasse a été récupérée dans un milieu sans extrait de levures et évaluée pour son activité de déshalogénéation après 18 heures d'incubation à 37°C.

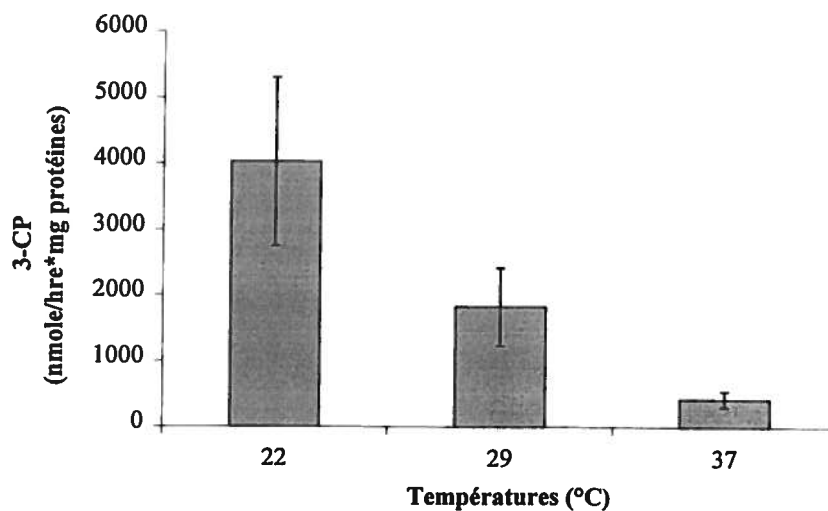


Figure 7. Effet de la température d'incubation des cultures de *D. frappieri* PCP-1 sur la déshalogénéation du 3,5-DCP. Chaque biomasse a été récupérée dans un milieu sans extrait de levures et évaluée pour son activité de déshalogénéation après 3 heures d'incubation à 37°C.

1.2- Courbe de croissance

Une courbe de croissance de *D. frappieri* PCP-1 a été effectuée dans le milieu MLA contenant du 3,5-DCP pour des cultures incubées à 25°C (Figure 8). Les résultats permettent d'observer que le pH de la culture diminue graduellement alors que la densité optique augmente de façon linéaire jusqu'à environ 70 heures. Ce temps correspond à la fin de la phase exponentielle de croissance et au début de la phase stationnaire. Après 60 heures d'incubation, le pH a chuté en dessous de 7. Il a donc été réajusté au dessus de 7 avec une solution de NaHCO₃. D'autre part, la dégradation du 3,5-DCP en 3-CP a rapidement été observée après 5 heures de culture et s'est maintenue tout au long de l'expérience. Un ajout de 3,5-DCP a été effectué après 38 heures d'incubation puisque la concentration totale de 3,5-DCP avait été déshalogénée en 3-CP.

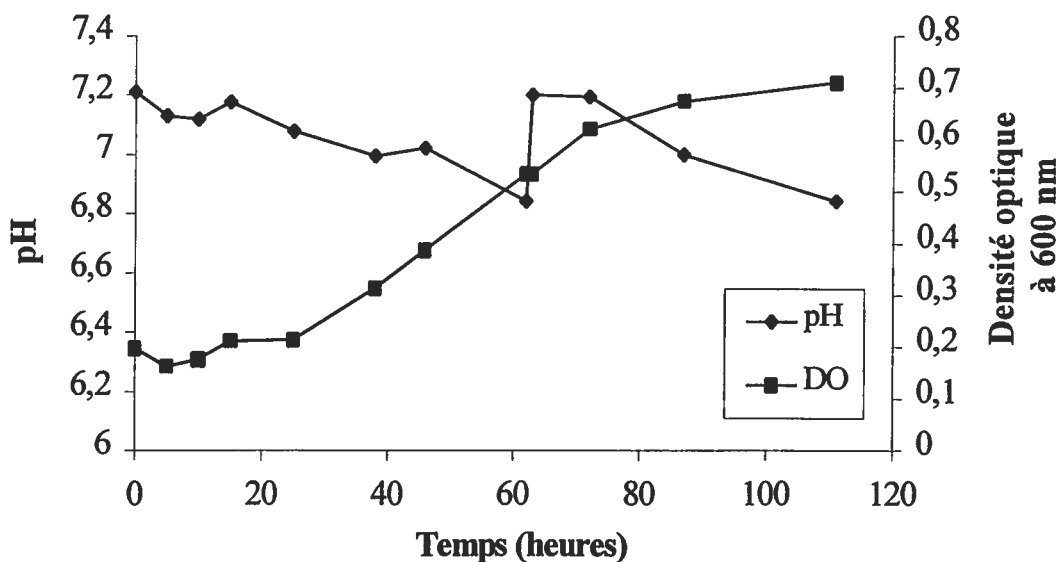


Figure 8. Courbe de croissance de *D. frappieri* PCP-1 avec ajustement de pH après 60 heures de culture pour une température d'incubation de 25°C.

La méthode de culture qui a été retenue pour une production optimale de la déshalogénase II par *D. frappieri* PCP-1 est la suivante: incubation à 30°C pendant les 25 premières heures, puis à 22°C (température de la pièce) pendant les 15 heures suivantes. Des prélèvements sont réalisés à intervalles réguliers afin de vérifier que le pH soit au dessus de 7 (le réajuster au besoin avec du NaHCO₃) ainsi que des analyses du 3,5-DCP afin de s'assurer que sa concentration dans le milieu est suffisante pour maintenir une activité de déshalogénéation. Des ajouts de 5 mg/L sont effectués lorsque le 3,5-DCP est complètement transformé en 3-CP. La biomasse est récoltée après environ 40 heures d'incubation vers la fin de la phase exponentielle de croissance lorsque la densité optique à 600 nm avoisine 0,5.

2- Dosage de l'activité enzymatique de déshalogénéation

La méthode mise au point pour le dosage *in vitro* de l'activité enzymatique a été réalisée selon les paramètres suivants: un volume de 1,9 ml de TAE (0,1 M de phosphate de potassium (pH7,5), 20% v/v de glycérol, 2 mM de citrate de titane(III) et 2 mM de méthyl viologène et 1 mM de 3,5-DCP) auquel 100 µl de la préparation enzymatique de déshalogénase II est ajouté. L'incubation est effectuée à 37°C pendant un temps qui est généralement de 30 ou 60 minutes. Le citrate de titane (III) agit comme agent réducteur et le méthyl viologène comme donneur d'électrons.

La cinétique de déshalogénéation du 3,5-DCP (1 mM) illustrant la relation entre le temps d'incubation et la quantité de produit (3-CP) formé a été réalisée à partir d'une préparation membranaire solubilisée de déshalogénase II. Le résultat présenté à la figure 9B révèle une relation linéaire pouvant aller jusqu'à 4 mg/L de 3-CP après une incubation de 4 heures à 37°C. D'autre part, la figure 9A démontre qu'avec une préparation membranaire plus active, la relation n'est plus linéaire lorsque les concentrations de 3-CP sont supérieures à 8 mg/L.

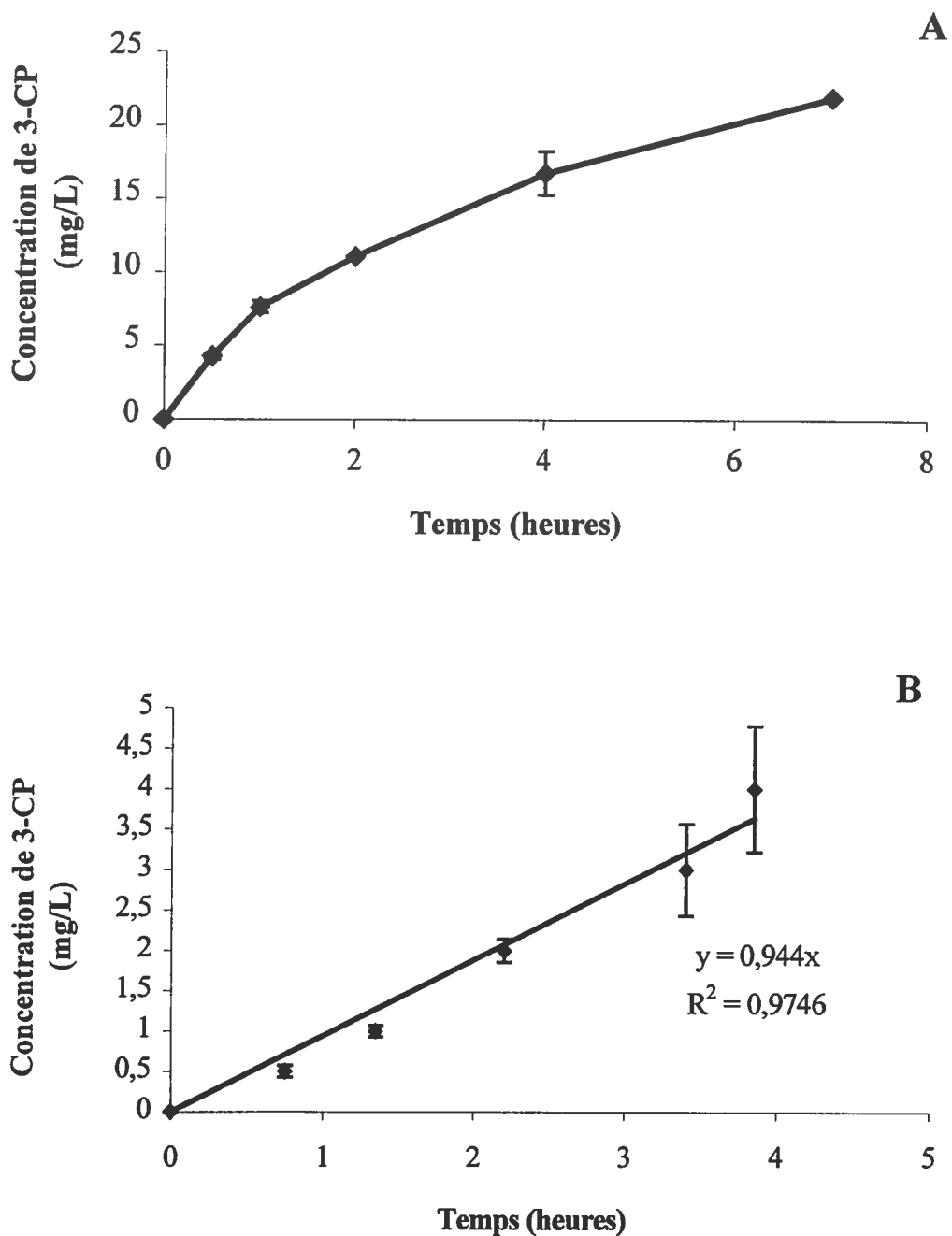


Figure 9. Cinétique enzymatique de la formation de 3-CP en fonction du temps pour deux préparations (A) et (B) de la déshalogénase II de *D. frappieri* PCP-1.

3- Purification de la déshalogénase II

Avant d'obtenir une méthode efficace de purification de la déshalogénase II, plusieurs essais ont été effectués utilisant différentes conditions expérimentales telles que déjà mentionnées (section 11, matériel et méthodes). De tous ces essais, il ressort que des pertes importantes d'activités ont généralement été observées après chaque étape de purification peu importe les colonnes et les conditions utilisées (détergents, tampons, pH). La procédure de purification de cette enzyme devait donc être rapide et nécessiter peu d'étapes pour palier aux pertes d'activité.

Après solubilisation des fractions membranaires dans un tampon constitué de 50 mM de phosphate de potassium (pH8), 20% v/v de glycérol, 1mM de DTT et 0,1% v/v de Triton X-100, une purification jusqu'à homogénéité de la déshalogénase II a été obtenue après deux étapes de chromatographie. Une première chromatographie a été effectuée sur une colonne échangeuse anionique (Mono Q HR 10/10) où l'enzyme n'était pas retenue par la colonne et était éluée dans le volume mort. Les fractions actives étaient recueillies et additionnées de 0,5 M de sulfate d'ammonium. Une deuxième chromatographie a été réalisée sur une colonne d'hydrophobicité (Méthyl-HIC) (Figure 10) où l'enzyme était éluée avec un gradient de 10 minutes de 0,5 à 0 M de sulfate d'ammonium. Cette dernière solution contenait 50 mM de CHAPS qui permettait une élution dans un plus faible volume. Le CHAPS a été utilisé au lieu du Triton X-100, car un précipité se forme lorsque le Triton X-100 et le sulfate d'ammonium sont mis en contact.

Après chaque étape de purification, les protéines retrouvées dans les fractions actives ont été analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide (12%) en conditions dénaturantes (0,1% SDS). Le gel coloré pour les protéines avec le bleu de Coomassie R-250 (Figure 11), révèle une grande quantité de bandes dans la fraction membranaire solubilisée. Après le passage sur l'échangeuse ionique, beaucoup de bandes ont été éliminées par le fait que la protéine active se retrouve dans le volume mort de la colonne alors que plusieurs autres protéines ont été retenues. Les bandes majeures détectées se situent à environ 57, 48 et 14 kDa. La deuxième chromatographie effectuée avec la colonne d'hydrophobicité, a permis de retrouver

une seule protéine dont le poids moléculaire a été évalué à environ 57 kDa par SDS-PAGE.

Le tableau de purification (Tableau 6) montre que, pour la fraction solubilisée, l'activité totale au départ est de 562,8 η mole 3-CP/minute alors qu'elle diminue à 39,5 η mole 3-CP/minute et 2,22 η mole 3-CP/minute pour l'échangeuse ionique et la colonne d'hydrophobicité, respectivement. Les rendements obtenus sont de 6,4% pour l'échangeuse ionique et de seulement 0,39% pour la colonne d'hydrophobicité. D'autre part, l'activité spécifique est passée de 48,6 η mole 3-CP/min*mg protéines pour la fraction solubilisée à 219,03 η mole 3-CP/min*mg protéines pour l'échangeuse ionique. À la dernière étape une perte importante de l'activité est observée ce qui a pour conséquence de faire chuter l'activité spécifique à 46,6 η mole 3-CP/min*mg protéines pour l'échantillon passé sur la colonne d'hydrophobicité. Enfin, le facteur de purification obtenu après l'échangeuse ionique est de 4,5 et de 0,96 après la colonne hydrophobe.

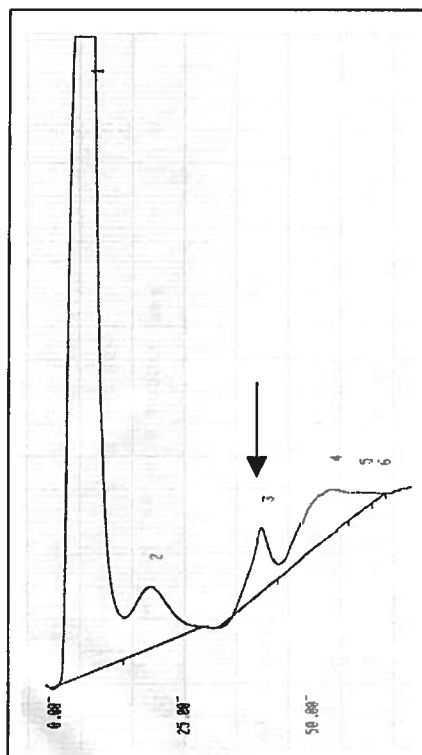


Figure 10. Chromatogramme obtenu lors de la chromatographie sur la colonne d'hydrophobicité (Méthyl-CIH). L'activité a été retrouvée au pic 3 identifié par une flèche.

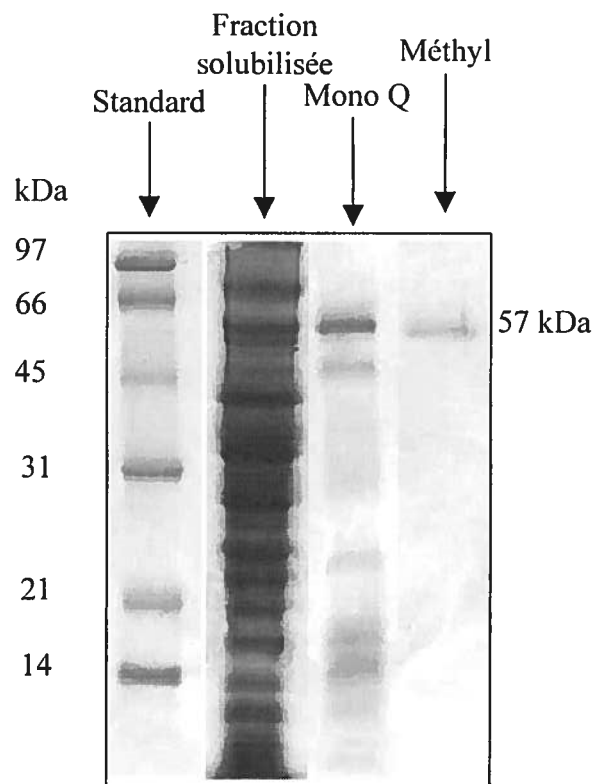


Figure 11. Électrophorèse en gel de polyacrylamide (12%), en conditions dénaturantes (SDS). Le gel a été coloré pour les protéines avec le bleu de Coomassie R-250.

Tableau 6. Tableau de purification de la déshalogénase II

Étape	Activité totale (η moles 3-CP/min)	%	Activité spécifique (η moles 3-CP/ min*mg prot.)	Facteur de purification
Fraction solubilisée	562,8	100	48,6	1
Mono Q	39,5	6,4	219,03	4,5
Méthyl-CIH	2,22	0,39	46,6	0,96

4- Caractérisation de la déshalogénase II

4.1- Détermination du pH optimal

L'effet du pH sur la déshalogénéation du 3,5-DCP a été étudié à partir d'une préparation membranaire solubilisée de déshalogénase II. Le tampon d'activité enzymatique utilisé pour cet essai était composé de phosphate de potassium à 0,1 M et l'intervalle de pH étudié variait entre 6,2 et 7,5 (pH mesuré à la fin de l'essai). La figure 12 montre que l'activité de déshalogénéation augmente graduellement avec le pH pour atteindre sa valeur maximale à environ pH 6,8-7,0. Par la suite, l'activité diminue graduellement.

4.2- Effet du sulfate, sulfite et nitrate

L'effet du sulfate, sulfite et nitrate sur l'activité de déshalogénéation du 3,5-DCP a été étudié à partir d'une préparation membranaire de déshalogénase II solubilisée. Les résultats obtenus sont présentés aux figures 13 et 14. Pour des concentrations variant entre 0 et 75 mM, le sulfate et le nitrate n'ont démontré aucun effet inhibiteur sur l'activité de déshalogénéation (Figure 13). En effet, l'activité s'est maintenue constante peu importe la dose de sulfate ou de nitrate utilisée. D'autre part, à une concentration aussi faible que 2,5 mM, le sulfite a inhibé totalement l'activité de déshalogénéation de la préparation (Figure 14).

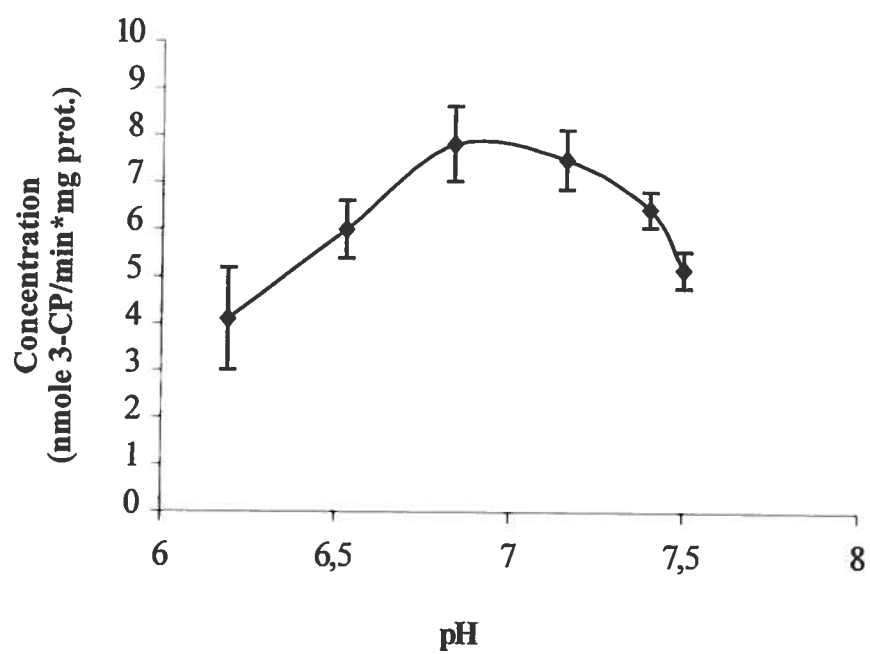


Figure 12. Détermination du pH optimal de la déshalogénase II dans un tampon phosphate de potassium (0,1 M).

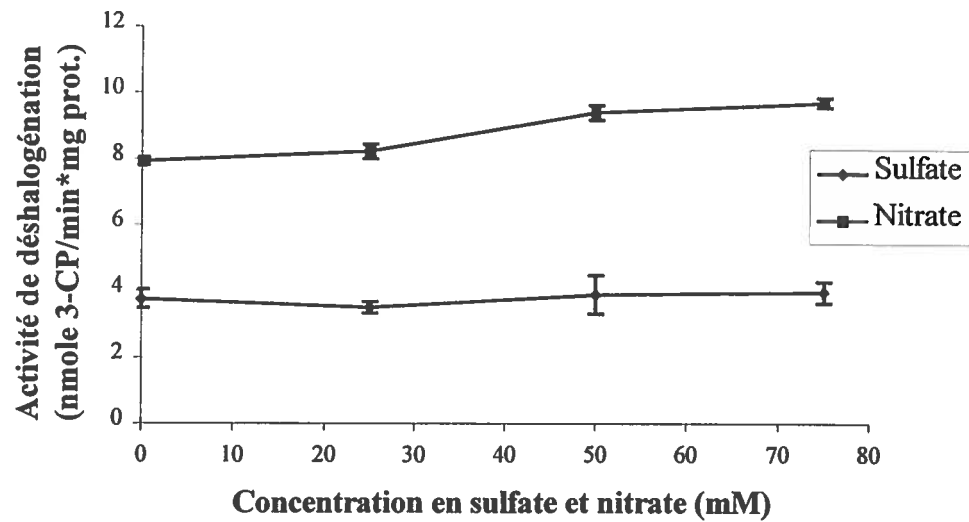


Figure 13. Effet du sulfate et du nitrate sur l'activité de la préparation de la déshalogénase II.

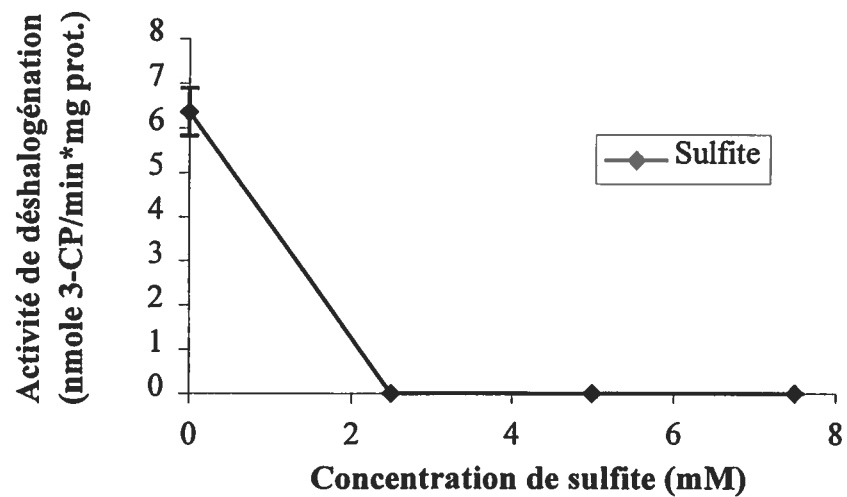
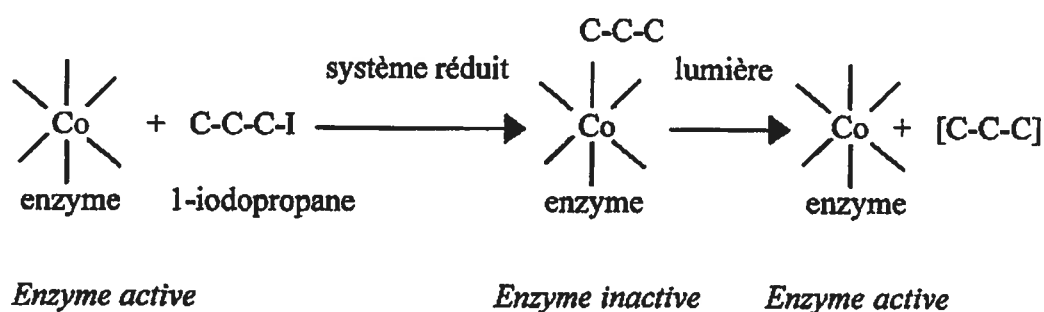


Figure 14. Effet du sulfite sur l'activité de la préparation brute de déshalogénase II.

4.3 Essai d'inhibition réversible de l'activité par le 1-iodopropane

L'essai d'inhibition réversible de l'activité de déshalogénéation du 3,5-DCP par le 1-iodopropane a été effectué avec des préparations membranaires de déshalogénase II solubilisée et semi-purifiée (après une première étape de purification utilisant une colonne échangeuse ionique de type Mono Q). Dans les deux cas, la préparation a été incubée avec 1 mM de 1-iodopropane. Le principe de l'essai est le suivant (Brot et Weissbach, 1965) :



L'enzyme, qui possède un cofacteur cobalamine, est mise en présence de 1-iodopropane. L'activité est alors inhibée par la formation d'un lien covalent entre le cobalt et un carbone du 1-iodopropane (Co-C-C-C). La présence de lumière permet la rupture de ce lien et la restauration de l'activité enzymatique. Pour la préparation brute de déshalogénase II solubilisée, l'activité a été inhibée à 53,8% de l'activité initiale lorsque mise en présence d'iodopropane (Figure 15) puis, en présence de lumière, l'activité a été restaurée à 63,7% de l'activité initiale. Dans le cas de la préparation de déshalogénase II semi-purifiée (Figure 15), l'activité de déshalogénéation a été inhibée à 19,98% de l'activité initiale et a été faiblement restaurée en présence de lumière à 23,28% de l'activité de départ. L'activité spécifique initiale était de 16,86 η mole 3-CP/min.*mg protéines pour la préparation enzymatique membranaire solubilisée et de 21,77 η mole 3-CP/min.*mg protéines pour la préparation semi-purifiée. En ce qui concerne les groupes contrôles, ayant reçu de l'eau au lieu du 1-iodopropane, aucune perte d'activité n'a été observée lors des différentes étapes de l'expérience.

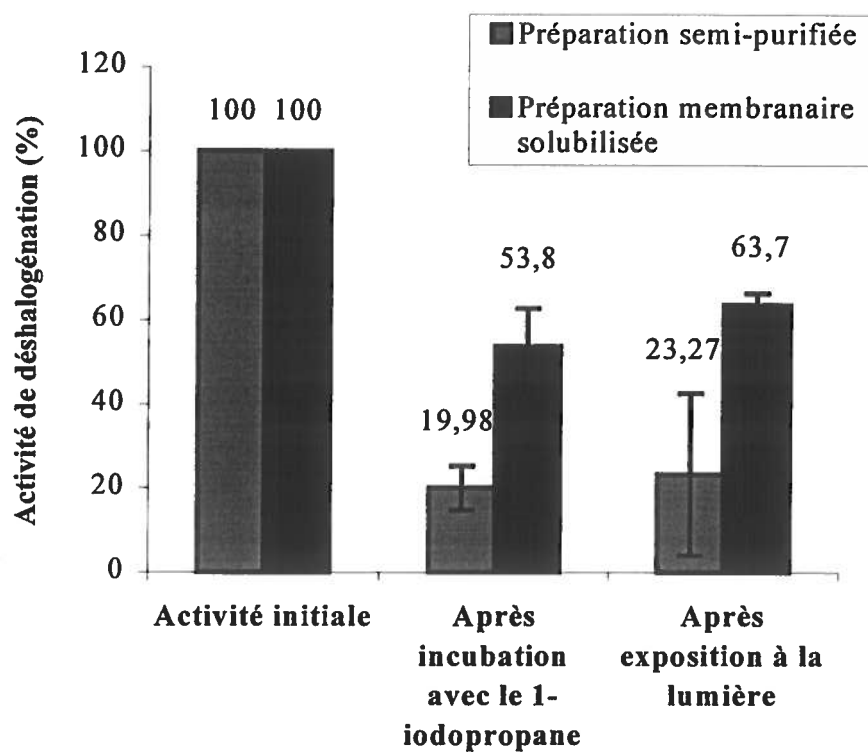


Figure 15. Essai d'inhibition réversible par le 1-iodopropane (1 mM) d'une préparation membranaire solubilisée et d'une préparation semi-purifiée de déshalogénase II.

4.4- Spectre d'activité d'une préparation membranaire de la déshalogénase II solubilisée

Le spectre d'activité pour différents chlorophénols a été déterminé à partir d'une préparation membranaire de déshalogénase II solubilisée. L'essai a été effectué selon les conditions de l'essai enzymatique standard (section 7 du matériel et méthodes) où seul le chlorophénol a été remplacé. Cette préparation peut déshalogéner le PCP, le 3,4,5-TCP, le 2,4,6-TCP, le 3,5-DCP et le 2,4-DCP (Tableau 7). L'activité spécifique la plus élevée a été obtenue pour la déshalogénation du PCP en 2,3,5,6-TeCP avec 57,72 η mole TeCP/min*mg protéines. Toutefois, lors d'une seconde expérience, une faible quantité de 2,3,4,6-TeCP (pour une déshalogénation en position *meta*) a été produite en plus du 2,3,5,6-TeCP pour la dégradation du PCP. Les inducteurs de la déshalogénase II, le 3,4,5-TCP et le 3,5-DCP, sont les chlorophénols qui ont la meilleure activité spécifique après le PCP avec 13,25 et 6,17 η mole/min*mg protéines, respectivement. La déshalogénation a principalement lieu en positions *para* et *meta*, mais une activité légèrement plus faible a aussi été observée en position *ortho* pour le 2,4,6-TCP et le 2,4-DCP. Cette préparation membranaire de déshalogénase II peut donc effectuer la déshalogénation dans les trois positions ; *ortho*, *meta* et *para*.

Tableau 7. Spectre d'activité d'une préparation membranaire solubilisée de la déshalogénase II pour différents chlorophénols.

Substrat	Produit(s)	Position de déshalogénation	Activité spécifique (η moles min ⁻¹ mg prot. ⁻¹)
PCP*	2,3,5,6-TeCP	<i>Para</i>	57,72 \pm 10,67
3,4,5-TCP	3,5-DCP	<i>Para</i>	13,25 \pm 0,23
2,4,6-TCP	2,4-DCP + 4-CP	<i>Ortho</i> <i>ortho-ortho</i>	3,23 \pm 0,04 0,33 \pm 0,04
3,5-DCP	3-CP	<i>Meta</i>	6,17 \pm 0,85
2,4-DCP	4-CP	<i>Ortho</i>	3,10 \pm 0,07

(*) Lors d'une deuxième expérience, du 2,3,5,6-TeCP (50,75 \pm 4,41 η moles min⁻¹ mg prot.⁻¹) et aussi du 2,3,4,6-TeCP (3,60 \pm 0,39 η moles min⁻¹ mg prot.⁻¹) (déshalogénation en *meta*) ont été détectés.

DISCUSSION

1. Conditions optimales de production de la déshalogénase II

Le premier objectif de ce projet consistait à optimiser les conditions de production de la déshalogénase II par *D. frappieri* PCP-1. Cette étape a permis d'obtenir un meilleur rendement d'activité. La déshalogénation du 3,5-DCP en 3-CP par la déshalogénase II a fait l'objet d'une étude précédente et les rendements d'activité obtenus pour une préparation membranaire solubilisée étaient très faibles, soit de l'ordre de 0,069 η mole de 3-CP/min*mg protéines (Boyer, 1999), comparativement à 6,17 η mole de 3-CP/min*mg protéines obtenu au cours de la présente étude. Ainsi, une première expérience, effectuée selon trois conditions (milieu normal incubé à 37°C avec ou sans ajout d'un mélange de vitamines et du 1,4-naphtoquinone et milieu normal incubé à 30°C), a révélé que l'incubation à 30°C permet une déshalogénation jusqu'à 7 fois plus élevée que celle obtenue avec les autres milieux testés, incubés à 37°C. Par la suite, bien que la croissance soit ralentie, il s'est avéré qu'à une température plus basse, soit 22°C, la biomasse obtenue avait une activité de déshalogénation du 3,5-DCP qui était 10 fois plus élevée que celle produite à 37°C. La température optimale de croissance étant de 38°C, il semble qu'un taux de croissance plus élevé ne favorise pas la production de la déshalogénase II, le métabolisme de la bactérie étant alors dirigé principalement vers la fermentation du pyruvate et la division cellulaire. Comme les déshalogénases sont des enzymes ayant un corrinnoïde et des centres fer-soufre, il se peut également que leur synthèse soit plus lente et que leur incorporation dans la membrane soit plus efficace lorsque le taux de division est plus lent. Puisque que *D. frappieri* est un microorganisme provenant du sol, il est probablement adapté à ces conditions où la température est généralement plus basse. Pour la plupart des autres souches bactériennes anaérobies effectuant la déshalogénation réductrice, les auteurs utilisent des cultures qui sont incubées à 37°C et ne font pas mention d'essais effectués à plus basse température. Il serait intéressant de vérifier si le même phénomène est aussi retrouvé chez ces microorganismes. Les faibles activités de déshalogénation obtenues par Boyer (1999) pourraient être dues, en partie, à la température d'incubation utilisée pour les cultures qui étaient de 37°C.

Les conditions optimales de culture sélectionnées incluent une incubation à 30°C pour les 20 premières heures afin de favoriser la croissance des bactéries et les quinze dernières heures à la température de la pièce pour permettre la production de l'enzyme. Le 3,5-DCP étant rapidement déshalogéné, il est important de le doser périodiquement et d'en ajouter lorsqu'il est complètement métabolisé par la culture bactérienne afin de maintenir la production de l'enzyme.

La courbe de croissance de la souche PCP-1 cultivée à 25°C a montré que le pH décroissait à des valeurs inférieures à 7,0. Cette baisse est le résultat de la transformation du pyruvate en acétate qui s'accumule dans le milieu (Dennie *et al.*, 1998). Un ajustement du pH de la culture au dessus de 7,0 par ajout de NaHCO₃ permet de maintenir une meilleure viabilité des bactéries et ainsi favoriser la synthèse de la déshalogénase II. Le pH optimal pour la croissance des bactéries du genre *Desulfitobacterium* tel que *D. dehalogenans* (Utkin *et al.*, 1994), *D. frappieri* TCE1 (Gerritse *et al.*, 1999), PCP-1 (Bouchard *et al.*, 1996) et la souche PCE1 (Gerritse *et al.*, 1996) se situe entre 7,2 et 7,8.

Lors d'une étude préliminaire sur la déshalogénase II effectuée par Boyer (1999), le dosage de l'activité enzymatique *in vitro* était réalisé dans des conditions plutôt extrêmes, soit en utilisant un volume plus faible (0,5 ml) pour l'essai enzymatique, une température d'incubation de 45°C et ce, pendant 18 heures. Dans les conditions utilisées, une relation linéaire était observée entre l'activité de déshalogénéation et la durée de l'incubation. Cette observation était surprenante, car il aurait été possible de s'attendre à une dénaturation de la protéine et à une perte d'activité. Récemment, Neumann *et al.* (2002) ont montré qu'une déshalogénase réductrice du tétrachloroéthylène produite par *D. multivorans* était toujours active après 5 minutes d'incubation à 100°C. Malgré que la protéine ait été dénaturée dans ces conditions, le cofacteur corrinoïde était responsable d'une activité abiotique de déshalogénéation.

Ainsi, l'amélioration des méthodes de production a permis d'obtenir une meilleure activité de déshalogénéation et, par conséquent, l'utilisation d'une méthode de dosage d'activité plus appropriée. Cette méthode utilise moins d'enzyme et l'incubation s'effectue à 37°C pendant une période variant généralement de 30 minutes à une heure. La cinétique de formation du 3-CP en fonction du temps présente une relation linéaire jusqu'à une concentration de près de 8 mg/L de 3-CP (Figure 9, section résultats).

2. Purification de la déshalogénase II

Le deuxième objectif de ce projet était de purifier la déshalogénase II, produite par *D. frappieri* PCP-1 et responsable de la déshalogénéation du 3,5-DCP en 3-CP. La majeure partie du travail a été consacrée à la réalisation de cet objectif. Plusieurs essais ont été effectués avant d'obtenir une procédure adéquate pour la purification de la déshalogénase II. Différents types de colonnes ont été testés (colonne d'hydrophobicité de type butyl et méthyl, tamis moléculaire, échangeuses ioniques DEAE-5PW et Mono Q HR 10/10 et des essais sur mini-colonnes échangeuses ioniques sep-pak QMA light et CM light). De plus, différents tampons de solubilisation ont été expérimentés tels que phosphate de potassium et Tris-HCl en variant le pH (7, 7,5 ou 8) et le détergent (Triton X-100 ou CHAPS). De tous ces essais, aucun n'a permis d'obtenir des rendements d'activité élevés. L'activité était parfois totalement perdue après une étape de chromatographie.

Ainsi, après plusieurs mois d'essais, la purification, jusqu'à homogénéité, a été réalisée à la suite de deux chromatographies. D'abord, la solubilisation effectuée dans un tampon phosphate de potassium 50 mM (pH 8,0) contenant 20% v/v de glycérol, 1mM de DTT et 0,1% v/v de Triton X-100 permettait de solubiliser toute l'activité de déshalogénéation, car peu ou pas d'activité était retrouvée dans la fraction non solubilisée. Lors de la chromatographie réalisée sur une colonne échangeuse anionique (Mono Q HR 10/10) dans un tampon à pH 8,0, l'enzyme n'était pas retenue par la colonne et se retrouvait dans le volume mort ce qui suggérait que son point isoélectrique (pI) était relativement élevé et supérieur à 8,0. Dans les conditions utilisées, peu ou pas d'activité était retrouvée dans les différents pics recueillis

lorsqu'un gradient de NaCl était appliqué sur la colonne. Bien que le rendement d'activité récupéré soit relativement faible (6,4%), cette étape permettait toutefois d'augmenter l'activité spécifique par un facteur de 4,5. Le profil des protéines retrouvées dans cette fraction après SDS-PAGE montrait également la disparition d'un grand nombre de bandes comparativement à la préparation membranaire solubilisée. Le pH alcalin (8,0) utilisé lors de cette étape permet, en effet, à la colonne Mono Q de retenir un grand nombre de protéines dont le pI est inférieur à une valeur de 8,0.

L'addition de 0,5 M de sulfate d'ammonium aux fractions actives permet d'augmenter le caractère d'hydrophobicité des protéines et d'utiliser la chromatographie à interactions hydrophobiques (méthyl) comme étape suivante de purification. L'enzyme a été éluée à l'aide d'un gradient de 0,5 à 0 M de sulfate d'ammonium. Le tampon contenait du CHAPS comme détergent ce qui empêchait la formation d'agrégats entre les protéines et favorisait l'élution de l'enzyme dans un plus faible volume. Cette dernière étape a permis de purifier la déshalogénase II jusqu'à homogénéité tel que révélé par la présence d'une seule bande de protéine évaluée à 57 kDa par SDS-PAGE. Toutefois, cette étape a entraîné des pertes importantes d'activité pour un rendement global de 0,39% et une activité spécifique finale de 46,6 η mole 3-CP/min*mg de protéines comparativement à 219 lors de l'étape précédente. Généralement, l'activité spécifique devrait augmenter après chaque étape de purification. Pour d'autres déshalogénases déjà purifiées, des pertes importantes d'activité et des rendements faibles d'activité ont fréquemment été observés. Par exemple, pour *D. hafniense*, la tableau de purification de la 3-Cl-4-OHPA montre que le pourcentage d'activité obtenu à la fin de la purification était de 18% de l'activité de départ pour un facteur de purification de 11,3 (Christiansen *et al.*, 1998), alors que chez la PceA déshalogénase réductrice de *Desulfitobacterium* sp. souche Y51, un rendement de 0,2% a été obtenu avec un facteur de purification de seulement 2,55 (Suyama *et al.*, 2002). Les causes possibles qui peuvent expliquer ces pertes importantes d'activité sont, entre autre, la sensibilité de la déshalogénase II à l'oxygène. Plusieurs des travaux de purification des déshalogénases décrites dans la littérature ont été réalisés dans des enceintes anaérobies. Puisqu'il n'était pas possible d'effectuer toutes les étapes de purification dans une telle enceinte, une procédure a été développée permettant de recueillir chaque pic et de manipuler chacune des fractions dans des vials contenant un mélange gazeux exempt d'oxygène.

De plus, la déshalogénase II, une enzyme membranaire, pourrait avoir tendance à s'associer à d'autres protéines qui stabiliseraient son activité, mais pourraient aussi rendre plus difficile sa purification. La congélation des aliquots de préparation membranaire solubilisée pourrait, d'autre part, entraîner la formation d'agrégats ou de complexes dans la préparation. Lors des différentes étapes de purification, il pourrait y avoir perte d'un cofacteur nécessaire à l'activité et à la stabilité enzymatique, ce qui causerait les pertes d'activité observées. Afin de prévenir et de diminuer ces pertes d'activité, différentes expériences pourraient être tentées. Il serait intéressant d'augmenter la concentration en DTT, ce qui permettrait une meilleure protection de la protéine contre l'oxygène. Augmenter aussi la concentration en détergents pourrait diminuer la formation de complexes et permettre une plus grande disponibilité de l'enzyme. De plus, certains auteurs utilisent l'ajout d'ions ammonium pour palier aux pertes d'activité (Neumann *et al.*, 1996). Chez *D. hafniense*, l'ajout de sulfate d'ammonium à l'essai enzymatique a permis d'augmenter l'activité de déshalogénation de 40% (Christiansen *et al.*, 1998) alors que chez *D. multivorans* la présence d'ions ammonium (4 mM) a stimulé de plus de deux fois l'activité de l'enzyme (Neumann *et al.*, 1996). Bref, il serait important, dans le futur, d'améliorer la méthode et les conditions de purification de la déshalogénase II afin de minimiser les pertes d'activité. Pour se faire il serait recommandé d'utiliser des préparations membranaires fraîchement préparées, non congelées et de minimiser, voire éliminer, la présence d'oxygène dans le matériel et les solutions utilisés.

Les chromatographies échangeuses ioniques et d'interactions hydrophobiques ont souvent été utilisées lors de la purification des diverses déshalogénases. La 3-chloro-4-hydroxyphénylacétate (3-Cl-4-OHPA) déshalogénase réductrice de *Desulfitobacterium hafniense* est la seule qui a été purifiée jusqu'à homogénéité à la suite de deux chromatographies similaires à celles employées pour la déshalogénase II, soit une chromatographie sur colonne Mono Q puis, une chromatographie à interactions hydrophobiques de type phényl (Christiansen *et al.*, 1998). La plupart des autres déshalogénases ont été purifiées après trois ou quatre chromatographies, souvent sur des colonnes échangeuses ioniques. Par exemple, la *ortho*-chlorophénol déshalogénase réductrice de *D. dehalogenans* a été purifiée à la suite de trois chromatographies échangeuses ioniques, soit une Q-sépharose (tampon phosphate de

potassium à pH 6), une Mono Q (même tampon que la précédente) et une autre Mono Q (tampon Tris-HCl, pH 7,8) (Van de Pas *et al.*, 1999a).

3. Caractérisation partielle de la déshalogénase II

Les résultats obtenus par SDS-PAGE avec la préparation de déshalogénase II purifiée ont révélé la présence d'une seule bande correspondant à un poids moléculaire de 57 kDa. Cette valeur correspond au poids moléculaire fréquemment observé pour les autres déshalogénases. Ainsi, des valeurs de 46,5, 57 et 65 kDa ont été obtenues respectivement pour la 3-Cl-4-OHPA déshalogénase réductrice de *D. hafniense* (Christiansen *et al.*, 1998), la tétrachloroéthylène déshalogénase réductrice de *D. multivorans* (Neumann *et al.*, 1996) et la PCE déshalogénase de *Desulfitobacterium* sp. souche PCE-S (Miller *et al.*, 1998). Par contre, le poids moléculaire de la déshalogénase I de *D. frappieri* a été évalué à 37 kDa (comm. pers. : R. Beaudet).

La faible activité spécifique obtenue avec la déshalogénase II purifiée pouvait laisser croire que l'activité observée était due à la présence d'une autre protéine présente en faible quantité et non à la protéine de 57 kDa observée sur SDS-PAGE. Afin de confirmer que la protéine de 57 kDa était bien une déshalogénase, la bande obtenue du gel SDS-PAGE a été traitée à la trypsine et analysée en spectrométrie de masse par Marie Duguay (étudiante M.Sc. laboratoire R. Beaudet et F. Lépine). Les séquences de peptides obtenues ont permis de trouver un cadre de lecture dans le génome de *D. hafniense* qui correspondrait à une déshalogénase de type PceA. La protéine produite par le gène *pceA* de *D. hafniense* n'a toutefois jamais été étudiée. Les déshalogénases PceA sont reconnues pour posséder un cofacteur corrinnoïde ainsi que des centres fer-soufre. Les autres déshalogénases purifiées dont le gène *pceA* a été cloné et séquencé sont les tétrachloroéthylène déshalogénases réductrices (PCE-RDase) de *D. multivorans* (Neumann *et al.*, 1998) et de *Desulfitobacterium* sp. souche Y51 (Suyama *et al.*, 2002). Chez *D. multivorans* deux gènes co-transcrits, *pceA* et *pceB*, codent pour des protéines contenant 501 et 74 acides aminés, respectivement. Leur masse moléculaire a été calculée à 55,887 (*pceA*) et 8,354 Da (*pceB*) (Neumann *et al.*, 1998). Le gène *pceA* contient une séquence de nucléotides correspondant au motif de liaison pour deux centres Fe_4S_4 ou pour un Fe_4S_4 et un Fe_3S_4 . Par contre,

aucune similarité significative n'a été obtenue autant pour *pceA* que *pceB* avec d'autres gènes lors de la comparaison des séquences dans les banques de données. Enfin, le gène *pceA* a pu être exprimé seulement dans la souche *E. coli* tRNA₄^{Arg} enrichie de pUBS 520 (Neumann *et al.*, 1998). Par ailleurs, le gène *pceA* codant pour la PceA déshalogénase réductrice de *Desulfitobacterium* sp. souche Y51 a récemment été identifié à partir d'un fragment d'ADN de 2,8 kb. Le gène code pour une protéine de 512 acides aminés dont la masse moléculaire a été évaluée à 57,444 Da et a été utilisé pour exprimer cette protéine dans *E. coli* pour la production d'anticorps (Suyama *et al.*, 2002).

Les expériences de caractérisation de la déshalogénase II ont été effectuées avec une préparation membranaire solubilisée. La faible quantité d'enzyme purifiée obtenue ne permettait pas d'utiliser cette dernière préparation pour les essais. La détermination du pH optimal de l'enzyme a permis de constater que, dans un tampon phosphate de potassium (0,1 M), l'activité de déshalogénation de la déshalogénase II est optimale à un pH de 6,8-7,0. La déshalogénase I a un pH optimal similaire de 6,9 aussi dans un tampon phosphate de potassium 0,1 M (Boyer, 1999). La déshalogénase réductrice de *D. chlororespirans* a aussi un pH optimal de 6,8 (Krasotkina *et al.*, 2001) alors que la PCE RDase de *D. multivorans* a un taux de déshalogénation optimal à un pH plus élevé, soit 8,0 (Neumann *et al.*, 1996).

La préparation membranaire solubilisée de déshalogénase II n'a démontré aucun effet d'inhibition face au sulfate et au nitrate pour des concentrations allant jusqu'à 75 mM alors qu'à une concentration aussi faible que 2,5 mM, la préparation était totalement inhibée par le sulfite. La déshalogénase I a démontré le même comportement pour le sulfate et le sulfite. Par contre, pour le nitrate l'activité a diminué d'environ 50% à une concentration de 5 mM pour ensuite être maintenue constante jusqu'à 100 mM (Boyer, 1999). Le même comportement est observé pour l'activité de déshalogénation de la 3-CB RDase de *Desulfomonile tiedjei* qui est inhibée par le sulfite et le thiosulfate, mais pas par le sulfate dans les extraits cellulaires cultivés en présence de 3-CB (Townsend et Suflita, 1997). Les auteurs suggèrent que l'inhibition *in vitro* de l'activité enzymatique par des oxyanions soufrés serait causée par une interaction directe de ces derniers avec les enzymes impliquées dans la déshalogénation et la possibilité qu'il y ait compétition entre deux mécanismes

de respiration pour les mêmes agents réducteurs n'est pas exclue (Townsend et Suflita, 1997). La 3-Cl-4-OHPA RDase de *D. chlororespirans* est complètement inhibée par le sulfite (4 mM), mais pas par le sulfate (Löffler *et al.*, 1996) alors que la PCE RDase de *D. multivorans* est aussi inhibée par le sulfite, mais pas le nitrate (Neumann *et al.*, 1995).

Il est connu que le sulfite se lie aux enzymes qui possèdent une cobalamine et forme un complexe sulfito-cobalamine qui rend l'enzyme inactive (Suyama *et al.*, 2002). Par ailleurs, Miller *et al.* (1997a et b) avaient déjà proposé que l'inhibition de la déshalogénéation du PCE chez *D. multivorans* et *Desulfitobacterium* sp. souche PCE-S, par le sulfite, serait due à la liaison de cet inhibiteur au cobalt d'un corrinnoïde. Si tel est le cas, cette hypothèse indiquerait l'implication d'une cob(III)alamine dans le mécanisme catalytique de la déshalogénéation réductrice. La présence de cette forme de cobalamine peut être vérifiée par l'inhibition de l'enzyme par le cyanure, connu pour se lier à la cob(III)alamine (Miller *et al.*, 1997a). Cependant, une autre explication pour l'inhibition par le cyanure est le fait que le CN⁻ se lie généralement à un métal de transition autre que le cobalt. Dans ce cas, pour vérifier la présence d'un autre métal, un test d'inhibition au monoxyde de carbone doit être réalisé. Cette observation s'est révélée négative pour les PCE RDases de la souche PCE-S et de *D. multivorans* révélant ainsi la présence d'une cob(III)alamine avec cobalt (Miller *et al.*, 1997a). Pour la déshalogénase II de *D. frappieri* PCP-1, les résultats obtenus, soit l'inhibition par le sulfite, suggèrent la présence d'une cobalamine. De plus, des expériences récentes effectuées au laboratoire ont montré qu'une préparation de déshalogénase II semi-purifiée est inhibée à 75,5 % en présence de 2,5 mM de KCN alors qu'à une concentration de 10 mM l'activité est totalement inhibée (comm. pers. : R. Beaudet). Afin de déterminer si le métal présent est bien le cobalt, il faudrait réaliser un test d'inhibition par le monoxyde de carbone, où l'activité enzymatique ne serait pas inhibée. D'autre part, le cobalt d'un corrinnoïde ne devrait pas être affecté par l'agent chélateur, EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique). Si l'activité enzymatique est inhibée, il pourrait y avoir présence d'un deuxième métal de transition (Neumann *et al.*, 1995). La préparation semi-purifiée de déshalogénase II a aussi été récemment testée en présence de l'EDTA et, l'azoture de sodium (NaN₃). L'activité enzymatique n'a aucunement été affectée par 10 mM d'EDTA alors que le NaN₃ inhibait faiblement l'activité puisqu'une activité de 86,8% était retrouvée

(comm. pers. : R. Beaudet). La présence d'un cobalt et non d'un autre métal dans la structure du cofacteur de la déshalogénase II est donc très probable.

L'hypothèse concernant la présence d'une cobalamine a été vérifiée par l'essai d'inhibition réversible au 1-iodopropane. Les deux essais effectués avec soit la préparation membranaire solubilisée, soit la préparation semi-purifiée de déshalogénase II ont démontré une inhibition en présence du 1-iodopropane (1 mM), mais une faible restauration de l'activité enzymatique après exposition à la lumière. Une hypothèse suggérée par Boyer (1999) pour expliquer que l'activité est non restaurée après exposition à la lumière est qu'en plus de réagir avec la cobalamine, le 1-iodopropane pourrait réagir avec une autre composante de l'enzyme, comme les thiols libres des résidus cystéines alkylant ceux-ci et rendant l'enzyme inactive. De plus, cette inactivation ne serait pas réversible à la lumière à cause de la force de la liaison unissant le 1-iodopropane et le composé inconnu (Boyer, 1999).

Les enzymes possédant un corrinnoïde sont reconnues pour être inactivées par les haloalkyles tels que l'iodopropane, exclusivement lorsque le cobalt est dans un état réduit et l'inactivation est réversible par la lumière (Neumann *et al.*, 1995). La présence d'une cobalamine chez la déshalogénase I a été démontrée, car 76% de l'activité était perdue en présence d'iodopropane et, lorsque la préparation était mise en présence de lumière, 92% était restaurée (comm. pers. : R. Beaudet). Chez *Desulfitobacterium* sp. souche PCE-S, l'enzyme, à l'état réduit, est inhibée par l'iodopropane et réactivée en présence de lumière (Miller *et al.*, 1997a). Chez *D. chlororespirans* la 3-Cl-4-OHPA RDase est complètement inhibée avec 450 μ M d'iodopropane et 50% de l'activité initiale est retrouvée après exposition à la lumière (Krasotkina *et al.*, 2001). D'autre part, la TCE RDase de *D. ethenogenes* est inhibée à 93% par l'iodopropane et restaurée à 83% par l'illumination alors que la PCE RDase est inhibée de 85% par l'iodoéthane et restaurée à 83% alors que l'iodopropane n'a pas d'effet (Neumann *et al.*, 1995). Il est possible que le site de liaison du substrat de l'enzyme (PCE-RDase) soit trop petit pour accommoder le composé à trois carbones qu'est le 1-iodopropane (Magnuson *et al.*, 1998). Il pourrait être intéressant, dans le cas de la déshalogénase II, de tester aussi d'autres iodoalkanes tel que l'iodoéthane afin d'obtenir une meilleure inhibition et une plus forte restauration de l'activité de déshalogénéation. Il serait aussi possible d'augmenter la concentration en iodopropane

et de refaire l'expérience avec l'enzyme purifiée, car tous les autres essais d'inhibition permettant de déterminer la présence d'une cobalamine sont concluants.

Les déshalogénases ayant comme structure une cobalamine et des centres fer-soufre ont des caractéristiques en commun, mais ne démontrent pas nécessairement le même spectre d'activité. Les déshalogénases de *D. frappieri* PCP-1, comparativement aux autres déshalogénases, ont un spectre d'activité relativement large. En effet, la déshalogénase I est capable de transformer, principalement en position *ortho*, le PCP, plusieurs trichlorophénols, le 2,3-DCP, le 2,4-DCP, le 2,4,6-tribromophénol et le PCE (Boyer, 1999). Pour la déshalogénase II quelques chlorophénols seulement ont été testés, tels le PCP, le 3,4,5-TCP, le 2,4,6-TCP, le 3,5-DCP et le 2,4-DCP. Le PCP avait l'activité spécifique la plus élevée suivie du 3,4,5-TCP et du 3,5-DCP, où la déshalogénéation se faisait en positions *para* et *meta*. Une activité de déshalogénéation a aussi été observée en position *ortho* pour le 2,4,6-TCP et le 2,4-DCP. Pour compléter cette recherche, il faudrait améliorer l'étude de la spécificité de la déshalogénase II vis-à-vis d'autres chlorophénols, des bromophénols et également pour le PCE et autres solvants chlorés. De plus, avec l'enzyme purifiée il sera possible de déterminer la présence de fer, de soufre, de cobalt et de séquencer la séquence NH₂-terminale.

La *ortho*-chlorophénol RDase purifiée de *D. dehalogenans* catalyse la déshalogénéation en position *ortho* des composés suivants : 3-Cl-4-OHPA, 2-CP, 2,3-DCP, 2,4-DCP, 2,6-DCP, PCP et 2-bromo-4-chlorophénol (Van de Pas *et al.*, 1999a). Le PCE et TCE ne sont pas transformés par cette déshalogénase. De plus, cette enzyme dégrade le PCP à une vitesse de 0,2 unités/mg, alors que le 2,4-DCP est déshalogéné à une vitesse de 4,2 unités/mg où une unité correspond à l'oxydation de 2 µmol de méthyl viologène réduit (Van de Pas *et al.*, 1999a). Le contraire est observé pour la préparation de déshalogénase II qui dégrade le PCP à une vitesse beaucoup plus rapide que les autres chlorophénols avec 57,72 ηmole/min*mg protéines comparativement à 3,10 ηmole/min*mg protéines pour le 2,4-DCP. D'autre part, la déshalogénase de *D. chlororespirans* transforme le PCP (déshalogénéation en position *ortho*) à une vitesse de 1,4 ηmole/min*mg protéines (Löffler *et al.*, 1996) soit environ 41 fois moins rapidement que la déshalogénase II.

En général, la plupart des autres déshalogénases possèdent des spectres d'activité plutôt restreints bien que pour plusieurs, l'étude de leur spécificité ne soit pas encore complétée. Par exemple, la 3-Cl-4-HBA de *D. chlororespirans* est capable de déshalogéner le 3-chloro-4-hydroxybenzoate et certains chlorophénols en position *ortho* (Löffler *et al.*, 1996) alors que la 3-chlorobenzoate RDase de *D. tiedjei* peut déshalogéner, en plus du 3-chlorobenzoate, le PCE et le TCE (Towsend et Suflita, 1997). D'autre part, les PCE RDases de *Dehalococcoïdes ethenogenes* (Magnuson *et al.*, 1998), de *Desulfitobacterium* sp. souche PCE-S (Miller *et al.*, 1997a), *Desulfitobacterium* sp. souche Y51 (Suyama *et al.*, 2002) et de *Dehalospirillum multivorans* (Neumann *et al.*, 1995) ont des spectres d'activité plus étroits. Ceci signifie que ces enzymes sont plus spécifiques, car elles ne peuvent déshalogéner que le PCE et le TCE.

La capacité de *D. frappieri* PCP-1 à déshalogéner efficacement le PCP et d'autres composés halogénés toxiques illustre bien le potentiel d'utilisation de ce microorganisme dans des procédés de biorestauration et de traitement d'effluents contaminés. En effet, l'activité de déshalogéner de la déshalogénase II alliée à celle de la déshalogénase I offre des avantages intéressants permettant d'obtenir un spectre d'activité plus large envers différents composés halogénés. Les nouvelles connaissances acquises sur la déshalogénase II pourront éventuellement permettre de mieux connaître les mécanismes de la déshalogéner réductrice et à moyen terme de produire par bio-ingénierie des déshalogénases ayant d'excellents taux de dégradation et une spécificité plus large envers les composés halogénés récalcitrants retrouvés dans l'environnement.

CONCLUSION

Les conditions de culture de *D. frappieri* PCP-1 ont été optimisées pour la production de déshalogénase II induite au 3,5-DCP. Un taux élevé de déshalogénéation réductrice de ce substrat par la souche PCP-1 a été obtenu d'une culture effectuée sur une période d'environ 40 heures. D'abord, la culture est incubée à 30°C pendant une vingtaine d'heures, puis à la température de la pièce (environ 22°C) pendant une quinzaine d'heures. Le pH de la culture doit être vérifié à intervalles réguliers afin de s'assurer qu'il soit supérieur à 7,0 ainsi que l'analyse de la dégradation du 3,5-DCP en 3-CP afin de s'assurer qu'il y ait toujours du dichlorophénol dans le milieu pour maintenir la production de la déshalogénase II. Après le fractionnement cellulaire, l'enzyme présente dans la fraction membranaire a été solubilisée dans un tampon composé de phosphate de potassium 0,1 M (pH8,0); de 20% glycérol, de 1 mM DTT et de 0,1% Triton X-100. Une méthode de dosage enzymatique *in vitro* utilisant le Ti(III)citrate comme agent réducteur et le méthyl viologène comme donneur d'électrons a été mise au point.

La purification de la déshalogénase II a été réalisée jusqu'à homogénéité à la suite de deux chromatographies; la première était l'échangeuse ionique et la seconde à interactions hydrophobiques. Son poids moléculaire a été évalué à 57 kDa par SDS-PAGE et le tableau de purification démontre d'importantes pertes d'activité à chaque étape de purification. Ces pertes pourraient être causées par la sensibilité de l'enzyme à l'oxygène ou la perte d'un cofacteur lors des étapes de purification. La congélation des fractions membranaires et solubilisées pourrait aussi favoriser la formation de complexes ou d'agrégats ce qui compliquerait également sa purification et pourrait affecter son activité enzymatique.

L'activité enzymatique d'une préparation membranaire solubilisée de la déshalogénase II est optimale à un pH de 6,8-7,0 ce qui correspond au pH optimal de la plupart des autres déshalogénases décrites dans la littérature. Des expériences récentes ont révélé que la déshalogénase II possédait certaines homologues de séquences avec les déshalogénases PceA. Les déshalogénases PceA possèdent un corrinnoïde et des centres fer-soufre comme groupement prosthétique et dégradent le PCE. Le fait que la déshalogénase II soit totalement inhibée par le sulfite et non par le sulfate et le nitrate,

laisse supposer la présence d'un corrinnoïde. De plus, l'inhibition par l'azoture de sodium suggère que des métaux seraient impliqués dans l'activité enzymatique. La déshalogénase II est aussi inhibée par le KCN et non par l'EDTA ce qui suggère que le métal présent au centre du corrinnoïde est le cobalt et qu'il y a absence d'autres métaux de transition. Enfin, les essais d'inhibition réversible par l'iodopropane ont démontré que la déshalogénase II est inhibée en présence de ce composé, mais dans les conditions utilisées, l'activité n'est que faiblement restaurée en présence de lumière. La déshalogénase II possède donc très probablement un corrinnoïde et des expériences ultérieures permettront de déterminer la présence de centres fer-soufre et de cobalt. Éventuellement, l'isolement, le clonage et la séquence du gène *pceA* codant pour cette enzyme chez *D. frappieri* PCP-1 devraient également fournir des informations importantes permettant de comparer sa structure à celle des déshalogénases connues.

Les déshalogénases retrouvées dans le groupe d'enzymes ayant un corrinnoïde comme cofacteur n'ont pas toutes le même spectre d'activité. La déshalogénase II est la seule enzyme connue et purifiée qui peut déshalogéner le PCP, le 3,4,5-TCP et le 3,5-DCP en positions *para* et *meta*. Parmi les chlorophénols testés, le PCP est celui qui possède le plus haut taux de déshalogénéation suivi du 3,4,5-TCP et du 3,5-DCP. Enfin, ces résultats démontrent aussi que l'enzyme est très versatile, car elle peut aussi effectuer la déshalogénéation en position *ortho* du 2,4,6-TCP et du 2,4-DCP, mais à un taux plus faible. Des travaux ultérieurs sur la déshalogénase II devraient porter sur l'étude de sa capacité à déshalogéner différents composés aromatiques halogénés (autres chlorophénols, chlorobenzoates, BPC hydroxylés ou non, etc.) ainsi que certains solvants chlorés tels que le PCE, le TCE et les dichloroéthylènes.

Les microorganismes effectuant la déshalogénéation réductrice offrent un énorme potentiel pour la biorestoration de composés halogénés, qui sont parmi les polluants les plus communs et toxiques présents dans l'environnement à cause de leur vaste utilisation comme pesticides, solvants et agents de transfert de chaleur. C'est pourquoi l'acquisition de nouvelles connaissances biochimiques et moléculaires sur les déshalogénases ayant des spectres d'activité différents, ainsi que la détermination des mécanismes impliqués

dans la déshalogénéation réductrice de ces substances, permettraient le développement éventuel de nouvelles déshalogénases à spectre plus large. Ces dernières pourraient alors être utilisées dans des procédés de biorestauration des composés halogénés, toxiques et récalcitrants tels que les chlorodioxines, chlorofuranes, BPC et autres retrouvés dans l'environnement.

BIBLIOGRAPHIE

BEAUDET R., G. McSween, F. Lépine, S. Milot et J.-G. Bisailon. 1997. « Anaerobic biodegradation of pentachlorophenol in a liquor obtained after extraction of contaminated chips and wood powder ». J. Appl. Microbiol., vol.82, p.186-190.

BEAUDET R., M.-J. Lévesque, R. Villemur, M. Lanthier, M. Chénier, F. Lépine et J.-G. Bisailon. 1998. « Anaerobic biodegradation of pentachlorophenol in a contaminated soil inoculated with a methanogenic consortium or with *Desulfitobacterium frappieri* strain PCP-1 ». Appl. Microbiol. Biotechnol., vol.50, p.135-141.

BOUCHARD B., R. Beudet, R. Villemur, G. McSween, F. Lépine et J.-G. Bisailon. 1996. « Isolation and characterization of *Desulfitobacterium frappieri* sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates pentachlorophenol to 3-chlorophenol ». Int. J. Syst. Bacteriol., vol.46, no.4, p.1010-1015.

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

BOYER A. 1999. « Étude des déshalogénases I et II produites par *Desulfitobacterium frappieri* souche PCP-1 ». Mémoire de maîtrise, Université du Québec, INRS-Institut Armand-Frappier, 140 p.

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., vol.72, p. 248-254.

BREITENSTEIN A., A. Saano, M. Salkinoja-Salonen, J. R. Andreesen et U. Lechner. 2001. « Analysis of a 2,4,6-trichlorophenol-dehalogenating enrichment culture and isolation of the dehalogenating member *Desulfitobacterium frappieri* strain TCP-A ». Arch. Microbiol., vol.175, p.133-142.

BROT N. et H. Weissbach. 1965. « Enzymatic synthesis of methionine : chemical alkylation of the enzyme-bound cobamide ». J. Biol. Chem., vol.240, p.3064-3070.

CHRISTIANSEN N., B. K. Ahring, G. Wohlfarth et G. Diekert. 1998. « Purification and characterization of the 3-chloro-4-hydroxy-phenylacetate reductive dehalogenase of *Desulfitobacterium hafniense* ». FEBS Lett., vol.436, p.159-162.

COLE J. R., A. L. Cascarelli, W. W. Mohn et J. M. Tiedje. 1994. « Isolation and characterization of a novel bacterium growing via reductive dehalogenation of 2-chlorophenol ». Appl. Environ. Microbiol., vol.60, no.10, p.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, vol.6, p.167-172.

DENNIE D., I. Gladu, F. Lépine, R. Villemur, J.-G. Bisailon et R. Beudet. 1998. « Spectrum of the reductive dehalogenation activity of *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 ». Appl. Environ. Microbiol., vol.64, no.11, p.4603-4606.

- El FANTROUSSI S., H. Naveau et S. N. Agathos. 1998. « Anaerobic dechlorinating bacteria ». Biotechnol. Prog., vol.14, p.167-188.
- FATHERPURE B. Z., J. P. Nengu et S. A. Boyd. 1987. « Anaerobic bacteria that dechlorinate perchloroethene ». Appl. Environ. Microbiol., vol.53, no.11, p.2671-2674.
- FETZNER S. et F. Lingens. 1994. « Bacterial dehalogenases : biochemistry, genetics, and biotechnological applications ». Microbiol. Rev., vol.58, no.4, p.641-685.
- GERRITSE J., V. Renard, T. M. Pedro Gomes, P. A. Lawson, M. D. Collins et J. C. Gottschal. 1996. « *Desulfitobacterium* sp. strain PCE1, an anaerobic bacterium that can grow by reductive dechlorination of tetrachloroethene or *ortho*-chlorinated phenols ». Arch. Microbiol., vol.165, p.132-140.
- GERRITSE J., O. Drzyzga, G. Kloetstra, M. Keumel, L. P. Wiersum, R. Hutson, M. D. Collins et J. C. Gottschal. 1999. « Influence of different electron donors and acceptors on dehalorespiration of tetrachloroethene by *Desulfitobacterium frappieri* TCE1 ». Appl. Environ. Microbiol., vol.65, no.12, p.5212-5221.
- HOLLIGER C., D. Hahn, H. Harmsen, 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., vol.169, p.313-321.
- JUTEAU P., R. Beaudet, G. McSween, F. Lépine, S. Milot et J.-G. Bisailon. 1995a. « Anaerobic biodegradation of pentachlorophenol by a methanogenic consortium ». Appl. Microbiol. Biotechnol., vol.44, p.218-224.
- JUTEAU P., R. Beaudet, G. McSween, F. Lépine et J.-G. Bisailon. 1995b. « Study of the reductive dechlorination of pentachlorophenol by a methanogenic consortium ». Can. J. Microbiol., vol.41, p.862-868.
- 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., vol.276, no.44, p.40991-40997.
- KRUMHOLZ L. R., R. Sharp et S. S. Fishbain. 1996. « A freshwater anaerobe coupling acetate oxidation to tetrachloroethylene dehalogenation ». Appl. Environ. Microbiol., vol.62, no.11, p.4108-4113.
- LAEMMLI U.K., 1970. « Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 ». Nature (London), vol.227, p.680-685.
- LANTHIER M., R. Villemur, F. Lépine, J.-G. Bisailon et R. Beaudet. 2000. « Monitoring of *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 in pentachlorophenol-degrading anaerobic soil slurry reactors ». Environ. Microbiol., vol.2, no.6, p.703-708.

- LANTHIER M., R. Villemur, F. Lépine, J.-G. Bisailon et R. Beaudet. 2001. « Geographic distribution of *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 and *Desulfitobacterium* spp. in soils from the province of Quebec, Canada ». FEMS Microbiol. Ecol., vol.36, p.185-191.
- LÖFFLER F. E., R. A. Sanford et J. M. Tiedje. 1996. « Initial characterization of a reductive dehalogenase from *Desulfitobacterium chlororespirans* Co23 ». Appl. Environ. Microbiol., vol.62, no.10, p.3809-3813.
- LOUIE T. M., N. Shuisong, X. Luying et W. W. Mohn. 1997. « Purification, characterization and gene sequence analysis of a novel cytochrome *c* co-induced with reductive dechlorination activity in *Desulfomonile tiedjei* DCB-1 ». Arch. Microbiol., vol.168, p.520-527.
- LOUIE T. M. et W. W. Mohn. 1999. « Evidence for a chemiosmotic model of dehalorespiration in *Desulfomonile tiedjei* DCB-1 ». J. Bacteriol., vol.181, no.1, p.40-46.
- MACKIEWICZ M., J. Wiegel. 1998. « Comparison of energy and growth yields for *Desulfitobacterium dehalogenans* during utilization of chlorophenol and various traditional electron acceptors ». Appl. Environ. Microbiol., vol.64, no.1, p.352-355.
- MADSEN T. et D. Licht. 1992. « Isolation and characterization of an anaerobic chlorophenol-transforming bacterium ». Appl. Environ. Microbiol., vol.58, no.9, p.2874-2878.
- MAGNUSON J. K., R. V. Stern, J. M. Gossett, S. H. Zinder et D. R. Burris. 1998. « Reductive dechlorination of tetrachloroethene to ethene by a two-component enzyme pathway ». Appl. Environ. Microbiol., vol.64, no.4, p.1270-1275.
- MAGNUSON J. K., M. F. Romine, D. R. Burris et M. T. Kingsley. 2000. « Trichloroethene reductive dehalogenase from *Dehalococcoides ethenogenes*: sequence of *tceA* and substrate range characterization ». Appl. Environ. Microbiol., vol.66, no.12, p.5141-5147.
- MAYMO-GATELL X., Y-T. Chien, J. M. Gossett et S. H. Zinder. 1997. « Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene ». Science, vol.276, p.1568-1571.
- MAYMO-GATELL X., T. Anguish et S. H. Zinder. 1999. « Reductive dechlorination of chlorinated ethenes and 1,2-dichloroethane by *Dehalococcoides ethenogenes* 195 ». Appl. Environ. Microbiol., vol.65, no.7, p.3108-3113.
- McALLISTER K. A., H. Lee et J. T. Trevors. 1996. « Microbial degradation of pentachlorophenol ». Biodegradation, vol.7, p.1-40.
- MILLER E., G. Wohlfarth et G. Diekert. 1997a. « Comparative studies on tetrachloroethene reductive dechlorination mediated by *Desulfitobacterium* sp. strain PCE-S ». Arch. Microbiol., vol.168, p.513-519.

MILLER E., G. Wohlfarth et G. Diekert. 1997b. « Studies on tetrachloroethene respiration in *Dehalospirillum multivorans* ». Arch. Microbiol., vol.166, p.379-387.

MILLER E., G. Wohlfarth et G. Diekert. 1998. « Purification and characterization of the tetrachloroethene reductive dehalogenase of strain PCE-S ». Arch. Microbiol., vol.169, p.497-502.

MOHN W. W. et K. J. Kennedy. 1992. « Reductive dehalogenation of chlorophenols by *Desulfomonile tiedjei* DCB-1 ». Appl. Environ. Microbiol., vol.58, no.4, p.1367-1370.

MOHN W. W. et J. M. Tiedje. 1992. « Microbial reductive dehalogenation ». Microbiol. Rev., vol.56, no.3, p.482-507.

NEUMANN A., G. Wohlfarth et G. Diekert. 1995. « Properties of tetrachloroethene and trichloroethene dehalogenase of *Dehalospirillum multivorans* ». Arch. Microbiol., vol.163, p.276-281.

NEUMANN A., G. Wohlfarth et G. Diekert. 1996. « Purification and characterization of tetrachloroethene reductive dehalogenase from *Dehalospirillum multivorans* ». J. Biol. Chem., vol.271, no.28, p.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., vol.180, no.16, p.4140-4145.

NEUMANN A., A. Siebert, T. Tresher, 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., vol.177, p.420-426.

NIGGEMYER A., S. Spring, E. Stackebrandt et R. F. Rosenzweig. 2001. « Isolation and characterization of a novel As(V)-reducing bacterium : implications for arsenic mobilization and the genus *Desulfitobacterium* ». Appl. Environ. Microbiol., vol.67, no.12, p.5568-5580.

ORSER C. S. et C. C. Lange. 1994. « Molecular analysis of pentachlorophenol degradation ». Biodegradation, vol.5, p.277-288.

SANFORD R. 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., vol.62, no.10, p.3800-3808.

SCHOLZ-MURAMATSU H., A. Neumann, M. Meßmer, E. Moore et G. Diekert. 1995. « Isolation and characterization of *Dehalospirillum multivorans* gen. nov., sp. nov., a tetrachloroethene-utilizing, strictly anaerobic bacterium ». Arch. Microbiol., vol.163, p.48-56.

SCHUMACHER W. et C. Holliger. 1996. « The proton/electron ratio of the menaquinone-dependent electron transport from dihydrogen to tetrachloroethene in *Dehalobacter restrictus* ». J. Bacteriol., vol.178, no.8, p.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 Lett., vol.409, p.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., vol.48, no.4, p.840-848.

SHUISONG N., J. K. Fredrickson et L. Xun. 1995. « Purification and characterization of a novel 3-chlorobenzoate-reductive dehalogenase from the cytoplasmic membrane of *Desulfomonile tiedjei* DCB-1 ». J. Bacteriol., vol.177, no.17, p.5135-5139.

SLATER J. H., A. T. Bull et D. J. Hardman. 1995. « Microbial dehalogenation ». Biodegradation, vol.6, p.181-189.

STINSON M., H. S. Skovronek et T. J. Chresand. 1991. « EPA site demonstration of bio trol aqueous treatment system ». J. Air Waste Man. Assoc., vol. 41, p.228-233.

SUYAMA A., R. Iwakiri, K. Kai, T. Tokunage, 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., vol.65, no.7, p.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., vol.184, no.13, p.3419-3425.

TARTAKOVSKY B., M.-J. 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., vol.65, no.10, p.4357-4362.

TOWNSEND G. T. et J. M. Suflita. 1997. « Influence of sulfur oxyanions on reductive dehalogenation activities in *Desulfomonile tiedjei* ». Appl. Environ. Microbiol., vol.63, no.9, p.3594-3599.

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., vol.44, no.4, p.612-619.

UTKIN I., D. D. Dalton et J. Wiegel. 1995. « Specificity of reductive dehalogenation of substituted *ortho*-chlorophenols by *Desulfitobacterium dehalogenans* JW/IU-DC1 ». Appl. Environ. Microbiol., vol.61, no.1, p.346-351.

VAN DE PAS B. A., H. Smidt, W. R. Hagen, J. van der Oost, G. Schraa, A. J. M. Stams et W. M. de Vos. 1999a. « Purification and molecular characterization of *ortho*-chlorophenol reductive dehalogenase, a key enzyme of halorespiration in *Desulfitobacterium dehalogenans* ». J. Biol. Chem., vol.274, no.29, p.20287-20292.

VAN DE PAS B. A., H. Smidt, W. R. Hagen, G. Schraa, A. J. M. Stams et W. M. de Vos. 1999b. « Regulation and properties of *ortho*-chlorophenol reductive dehalogenase of *Desulfitobacterium dehalogenans* ». Abstract for 99th Meeting of American Society for Microbiology. Chicago.

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., vol.176, no.3, p.165-169.

VAN DE PAS B. A., H. J. M. Harmsen, G. C. Raangs, W. M. de Vos, G. Schraa et A. J. M. Stams. 2001b. « A *Desulfitobacterium* strain isolated from human feces that does not dechlorinate chloroethenes or chlorophenols ». Arch. Microbiol., vol.175, p.389-394.

VAN DE PAS B. A., S. Jansen, C. Dijkema, G. Schraa, W. M. de Vos et A. J. M. Stams. 2001c. « Energy yield of respiration on chloroaromatic compounds in *Desulfitobacterium dehalogenans* ». Appl. Environ. Microbiol., vol.67, no.9, p.3958-3963.

VOLKER D., W. Huber, K. Bauer, C. Suesal, J. Mytilineos, A. Melk, C. Conradt et G. Opelz. 2001. « Association of elevated blood levels of pentachlorophenol (PCP) with cellular and humoral immunodeficiencies ». Arch. Environ. Health, vol.56, no.1, p.77-83.