Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

Étude protéomique de *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 lors de l'induction pour la déshalogénation réductrice en position *ortho* du 2,4,6-TCP.

Par
Rachel Pagé-Bélanger

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

Jury d'évaluation

Examinateur externe	Daniel Boismenu
Examinateur interne	François Shareck
Directeur de recherche	Réjean Beaudet

Janvier 2002

© droits réservés de Rachel Pagé-Bélanger, 2002

Résumé

Rachel Pagé-Bélanger

Desulfitobacterium frappieri PCP-1 est le seul microorganisme connu capable de déchlorer le pentachlorophénol aux positions *ortho*, *meta* et *para*. *D. frappieri* PCP-1 dégrade également un large spectre de composés aromatiques substitués avec un groupement hydroxyle ou aminé. Cette activité de déchloration implique au moins deux déshalogénases réductrices associées à la membrane. La déshalogénase I, qui effectue essentiellement de la déshalogénation en position *ortho*, a été récemment purifiée d'une culture de la souche PCP-1 dégradant le 2,4,6-trichlorophénol (2,4,6-TCP). Afin de mieux comprendre le mécanisme de déshalogénation réductrice en position *ortho* chez *D. frappieri* PCP-1, une étude protéomique comparative de la souche PCP-1 cultivée en absence et en présence de 2,4,6-TCP a été entreprise. Des fractions membranaires et cytoplasmiques ont été recueillies pour chaque culture et les protéines de ces fractions ont été séparées dans des gels électrophorétiques en deux dimensions (2D). La comparaison des fractions membranaires des lots induits et non-induits a révélé la présence de deux protéines réprimées (47 et 57 kDa) ainsi qu'une protéine induite (15 kDa) lors de la déshalogénation en position *ortho* du 2,4,6-TCP. La déshalogénase I s'est retrouvée tant dans les cellules induites que non-induites pour le mécanisme étudié, suggérant que cette protéine est constitutive. La déshalogénase I se retrouvait en quantité moins abondante dans les fractions cytoplasmiques que membranaires, ce qui laisse croire que cette protéine est faiblement reliée à la membrane. La séparation de la déshalogénase I (protéine 37 kDa) par électrophorèse 2D a également montré que cette protéine se présente sous plusieurs isoformes. Les protéines d'intérêt identifiées dans les gels après électrophorèse 2D ainsi que la déshalogénase I ont été par la suite digérées à la trypsine avant d'être analysées par spectrométrie de masse sur un triple quadripôle couplé à une nanoélectrovaporisation. Les séquences peptidiques de la déshalogénase I ont permis d'isoler et de séquencer le gène de la déshalogénase I chez *D. frappieri*. Cette séquence ne présente aucune homologie significative avec une protéine dont la fonction est connue dans les banques de données. Cependant, un gène similaire a été retrouvé dans le génome de *Desulfitobacterium hafniense*. La protéine réprimée de 47 kDa a été identifiée comme étant la sous-unité β de l'ATP synthétase alors que la protéine réprimée de 57 kDa a été identifiée comme une sous-unité de la glycolate oxydase.

Remerciements

Tout au long de cette maîtrise j'ai eu la chance de bénéficier du support technique et moral de nombreuses personnes. Je tiens à remercier avant tout monsieur Réjean Beaudet de m'avoir accueillie dans son laboratoire pour la durée de mes travaux de maîtrise, de m'avoir encouragée, conseillée et soutenue financièrement tout au long de ce projet. Je veux également remercier plus particulièrement :

Madame Rita Alary pour l'assistance offerte lors de la production des lots de *D. frappieri* PCP-1, pour le don de déshalogénase I pure ainsi que pour ses encouragements.

Monsieur François Shareck et madame Stéphanie Trudel pour l'enseignement technique quant à la production de gels pour l'électrophorèse en deux dimensions.

Monsieur François Lépine pour m'avoir initiée à la spectrométrie de masse.

Monsieur Richard Villemur pour m'avoir aidée dans l'identification des protéines à partir des banques de données.

Je souhaite également remercier l'ensemble des personnes que j'ai côtoyées dans le Groupe en microbiologie de l'environnement du Centre de microbiologie et biotechnologie de l'INRS-Institut Armand-Frappier tant pour l'esprit scientifique qui y règne que pour l'esprit de collaboration et de convivialité qui ont su rendre cette maîtrise des plus stimulantes.

Finalement, je tiens à remercier l'INRS-IAF pour son soutien financier.

Table des matières

RÉSUMÉ II

REMERCIEMENTS IV

TABLE DES MATIÈRES VI

LISTE DES FIGURES XI

LISTE DES TABLEAUX XIV

LISTE DES ANNEXES XVI

LISTE DES ABRÉVIATIONS XVIII

1. INTRODUCTION 1

2. REVUE DE LITTÉRATURE 4

2.1 LA DÉSHALOGÉNATION RÉDUCTRICE 5

2.1.1 Les macromolécules impliquées dans la déshalogénation réductrice 6
2.1.1.1 Les déshalogénases 7
2.1.1.2 Les transporteurs d'électrons 13
2.1.1.3 L'halorespiration et les réductases impliquées dans le maintien de l'état d'oxydoréduction 14

2.1.2 Desulfitobacterium, un genre bactérien important dans la déshalogénation réductrice 17

2.1.2 Desulfitobacterium, un genre bactérien important dans la déshalogénation réductrice 17
2.1.1.4 *Desulfitobacterium frappieri* 17
2.1.1.5 *Desulfitobacterium dehalogenans* 20

2.2 LA PROTÉOMIQUE 22

2.2.1 La technique au cœur de la protéomique 24
2.2.1.1 L'électrophorèse en deux dimensions 24
2.2.1.1.1 Les propriétés physico-chimiques des protéines 25
2.2.1.1.2 Les techniques de révélation des protéines après électrophorèse en deux dimensions 26
2.2.1.1.3 Des solutions aux problèmes rattachés à l'électrophorèse en deux dimensions 27

2.2.1.2 La digestion 29
2.2.1.3 L'analyse par spectrométrie de masse 29
2.2.1.4 Des techniques pour aller au-delà de l'électrophorèse en deux dimensions . 34

2.2.2 La recherche et la protéomique 37
2.2.2.1 La protéomique au service des banques de données 37
2.2.2.2 La protéomique comme outil d'analyse biologique 38

3. MATÉRIEL ET MÉTHODES 40

3.1 ASPECT MICROBIOLOGIQUE ET ACTIVITÉ DE DÉSHALOGÉNATION . 41

3.1.1 Origine de la souche de *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 41

3.1.2 Milieu de culture de *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 41

3.1.3 Travail en conditions anaérobies 42

3.1.4 Production de la biomasse 43

3.1.5 Fractionnement cellulaire 45

3.1.6 Dosage de l'activité de déshalogénation 46

3.1.7 Analyse des chlorophénols par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) 47

3.2 ÉLECTROPHORÈSE EN DEUX DIMENSIONS 48

3.2.1 Solubilisation des protéines membranaires 48
3.2.1.1 Identification des agents de solubilisation les plus efficaces 48
3.2.1.2 Solubilisation des protéines membranaires 49

3.2.2 Dosage des protéines 50

3.2.3 Isofocalisation 50
3.2.3.1 Isofocalisation à l'aide du « Flat Bed Apparatus FBE-3000 » 52
3.2.3.2 Isofocalisation à l'aide du « IPGphor Isolectric Focusing System » 53

3.2.4 Équilibration 54

3.2.5 Séparation par SDS-PAGE 55
3.2.5.1 Séparation des protéines par SDS-PAGE pour les électrophorèses en une dimension 55
3.2.5.2 Séparation des protéines par SDS-PAGE pour les électrophorèses en deux dimensions 56

3.2.6 Colorations des protéines 57
3.2.6.1 Coloration au nitrate d'argent 57
3.2.6.2 Coloration des hémoprotéines 58

3.2.7 Conservation des gels 58

3.2.8 Analyse des gels 59

3.2.9 Digestion des protéines à la trypsine à même le gel 60

3.2.10 Purification des peptides 62

3.2.11 Analyse en spectrométrie de masse 63

3.2.12 Analyse des spectres 63

4. RÉSULTATS 68

4.1 ACTIVITÉ DE DÉSHALOGÉNATION DES DIFFÉRENTS LOTS PRODUITS. 69

4.2 MÉTHODE DE SOLUBILISATION DES PROTÉINES MEMBRANAIRES .. 69

4.3 IDENTIFICATION DES CONDITIONS D'ÉQUILIBRATION LORS DES ÉLECTROPHORÈSES EN DEUX DIMENSIONS 70

4.4 L'ANALYSE DES GELS 71

4.4.1 La détection d'hémoprotéines par coloration à l'o-dianisidine 71

4.4.2 La détermination du point isoélectrique et de la masse moléculaire de la déshalogénase I purifiée de *D. frappieri* 71

4.4.3 L'analyse des fractions cytoplasmiques après électrophorèse en deux dimensions 73

4.4.4 L'analyse des fractions membranaires après électrophorèse en deux dimensions 75

4.5 IDENTIFICATION DES PROTÉINES D'INTÉRÊT À PARTIR DE L'ANALYSE EN SPECTROMÉTRIE DE MASSE 78

4.5.1 La protéine 37 kDa - déshalogénase I 78

4.5.2 La protéine 45 kDa 82

4.5.3 La protéine 55 kDa 85

5. DISCUSSION 90

5.1 PROTÉINES ÉTUDIÉES ET ISOFORMES 91

5.2 LA PROTÉINE 37 KDA - DÉSHALOGÉNASE I 92

5.3 LA PROTÉINE 47 KDA 96

5.4 LA PROTÉINE 55 KDA 98

5.5 LA PROTÉINE 15 KDA 100

5.6 L'OPTIMISATION DE LA MÉTHODE 101

6. CONCLUSION 104

BIBLIOGRAPHIE 108

ANNEXES 120

Liste des figures

Figure 1 : Exemples de déshalogénation réductrice..... **5**

Figure 2 : Fonctionnement suggéré des déshalogénases avec cobalamine. **11**

Figure 3 : Modèle d'halorespiration chez *D. tiedjei*..... **16**

Figure 4 : Carte physique du locus des gènes *cpr* chez *D. dehalogenans*..... **21**

Figure 5 : Schéma de l'analyse de peptides avec un triple quadripôle..... **33**

Figure 6 : Structure du réactif « Isotope-Coded Affinity Tags » (ICAT). **35**

Figure 7 : Le réactif « Isotope-Coded Affinity Tags » (ICAT) et la semi-quantification de l'expression différentielle de protéines. **36**

Figure 8 : Traitement d'un spectre afin de déterminer la valeur *m/z* des ions. .. **67**

Figure 9 : Coloration des hémoprotéines dans les fractions membranaires des lots induit et non-induit pour la déshalogénation en position *ortho* du 2,4,6-TCP de *D. frappieri*..... **72**

Figure 10 : Les isoformes c, d et e de la protéine purifiée 37 kDa (déshalogénase I) de *D. frappieri* séparée par électrophorèse 2D..... **73**

Figure 11 : Protéines cytoplasmiques provenant de lots induit et non-induit de *D. frappieri* lors de la déshalogénation réductrice du 2,4,6-TCP en position *ortho* après coloration au nitrate d'argent des gels d'électrophorèse 2D **74**

Figure 12 : Comparaison de l'expression de la protéine 37 kDa (déshalogénase I) dans la fraction membranaire des différents lots de *D. frappieri*..... **76**

Figure 13 : Identification des protéines membranaires d'intérêt et de leurs isoformes provenant de lots induit et non-induit de *D. frappieri* lors de la déshalogénation réductrice du 2,4,6-TCP en position *ortho* après coloration au nitrate d'argent des gels d'électrophorèse 2D. **77**

Figure 14 : Comparaison des spectres de masse des peptides tryptiques de cinq isoformes de la protéine 37 kDa (déshalogénase I) de *D. frappieri*..... **79**

Figure 15 : Comparaison entre les séquences de la protéine 46 kDa de *D. hafniense* et la séquence de la protéine 37 kDa (déshalogénase I) de *D. frappieri*..... **80**

Figure 16 : Comparaison des spectres de masse des peptides tryptiques des isoformes b et c de la protéine 45 kDa de *D. hafniense*..... **83**

Figure 17 : Comparaison entre les séquences de la protéine 51 kDa de *D. hafniense* et la séquence de la sous-unité β de l'ATP synthétase de *Moorella thermoacetic*.. ..... **85**

Figure 18 : Comparaison des spectres de masse des peptides tryptiques des isoformes a, b, c, d et e de la protéine 55 kDa de *D. hafniense*. **87**

Figure 19 : Comparaison entre les séquences de la protéine de 50 kDa de *D. hafniense* et la séquence de la sous-unité de la glycolate oxydase de *Bacillus halodurans*.. ..... **89**

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques de différentes déshalogénases impliquées dans la déshalogénation réductrice de bactéries anaérobies. **8**

Tableau 2 : Protéases et composé chimique utilisés pour digérer les protéines à différents sites **30**

Tableau 3 : Comparaison entre les masses des peptides obtenus suite à une digestion théorique à la trypsine de la séquence protéique déduite à partir du gène de la protéine 37 kDa (déshalogénase I) de *D. frappieri* avec les masses et les séquences obtenues expérimentalement en spectrométrie de masse pour les peptides de cette même protéine digérée à la trypsine..... **81**

Tableau 4 : Comparaison entre les masses des peptides obtenus suite à une digestion théorique à la trypsine de la protéine 51 kDa de *D. hafniense* et les masses obtenues en spectrométrie de masse pour les peptides de la protéine 45 kDa de *D. frappieri* digérée à la trypsine. **84**

Tableau 5 : Comparaison entre les masses des peptides obtenus suite à une digestion théorique à la trypsine de la protéine 50 kDa de *D. hafniense* et les masses obtenues en spectrométrie de masse pour les peptides de la protéine 57 kDa de *D. frappieri* digérée à la trypsine. **88**

Liste des annexes

Annexe a : Empreinte peptidique et séquences de la protéine 37 kDa (déshalogénase I) de *D. frappieri* **121**

Annexe b : Empreinte peptidique et séquences de la protéine 45 kDa de *D. frappieri* **129**

Annexe c : Empreinte peptidique et séquences de la protéine 55 kDa de *D. frappieri* **13636**

Liste des abréviations

3-[(3-cholamidopropyle)diméthylammonio]-1-propanesulfate	CHAPS
2-heptyl-4-hydroxyquinoline-*N*-oxyde	HOQNO
biphényle polychloré	BPC
charge	*z*
chromatographie liquide à haute pression	CLHP
deux dimensions	2D
dithiotréitol	DTT
électrophorèse en gel de polyacrylamide avec SDS	SDS-PAGE
hexachlorobenzène	HCB
« integration host factor »	IHF
« Isotope-Coded Affinity Tags »	ICAT
lauryl sulfate de sodium	SDS
masse	m
« Matrix-Assited Laser Desorption Ionisation »	MALDI
ménaquinone	MQ
N,N,N',N'-Tétra-méthyl-éthylènediamine	TEMED
pentachlorophénol	PCP
point isoélectrique	pI
quadripôle	Q
spectromètre de masse	SM
tétrachloroéthènes	PCE
« Time of Flight »	TOF
trichlorophénol	TCP
Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane	Tris

1. Introduction

Les composés organiques halogénés sont utilisés quotidiennement en industrie entraînant ainsi un apport important de xénobiotiques dans l'environnement. Fetzner (1998) estime à 2,7471 x 10^7 tonnes la quantité d'organochlorés produite annuellement aux États-Unis. Le traitement de ces composés, souvent toxiques, s'est retrouvé sur la liste des priorités de l'Agence de protection environnementale des États-Unis. Or, la persistance de ces produits dans l'environnement est principalement fonction de la capacité des microorganismes à les dégrader (Charles *et al.*, 1991). Cela indique l'importance de mieux comprendre les mécanismes impliqués lors de la déshalogénation microbienne.

En condition aérobie, les composés organiques halogénés dits persistants sont peu ou pas dégradés. Parmi ces composés, on retrouve les biphényles polychlorés (BPC) avec plus de sept atomes de chlore par molécule, les tétrachloroéthènes (PCE), l'hexachlorobenzène (HCB) et le pentachlorophénol (PCP) (Fetzner, 1998). Toutefois, certaines bactéries, en conditions anaérobies, peuvent s'attaquer aux groupements halogènes de ces molécules. Elles laissent généralement un composé plus faiblement substitué qui pourra alors être complètement dégradé par les bactéries aérobies (Mohn et Tiedje, 1992).

Parmi les bactéries capables de dégrader des composés halogénés dits persistants en absence d'oxygène, une bactérie se démarque par son spectre d'activité : *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. Elle est la seule bactérie anaérobie connue à pouvoir transformer le PCP en 3-chlorophénol et à s'attaquer aux groupements halogènes de ces molécules tant aux positions *ortho*, *meta* que *para*. C'est en 1996 que cette bactérie a été isolée d'un consortium méthanogénique capable de dégrader le PCP, un préservatif du bois aux propriétés tératogène et cancérigène (Bouchard *et al.*, 1996). En plus du PCP, la souche PCP-1 dégrade un large spectre de composés halogénés (Dennie et al, 1998). Cette souche a aussi l'avantage de persister dans des bioréacteurs en présence de la flore indigène anaérobie des sols contaminés et celle de consortium dégradant le PCP (Beaudet *et al.*, 1998, Lanthier *et al.*, 2000 et Tartakovsky *et al.*, 1999).

Devant le potentiel de *D. frappieri* PCP-1 en tant qu'agent pour la biorestauration des sols, une caractérisation préliminaire des déshalogénases impliquées a été effectuée par Boyer en 1999. Déjà lors de l'isolement de la souche, il avait été suggéré qu'au moins deux enzymes participaient à l'activité de déshalogénation : la déshalogénase I principalement responsable de la déshalogénation en position *ortho* et la déshalogénase II responsable de la déshalogénation en position *meta* et *para* (Bouchard *et al.*, 1996). En cultivant *D. frappieri* en présence de 2,4,6-trichlorophénol ou de 3,5-dichlorophénol, Boyer (1999) a induit respectivement les déshalogénase I et II. Il a été déterminé que ces deux protéines étaient membranaires et possédaient possiblement un cofacteur métallique (Boyer, 1999). Boyer (1999) a purifié partiellement la déshalogénase II alors que la déshalogénase I a été purifiée dans le Laboratoire de Réjean Beaudet (INRS-Institut Armand-Frappier) (donnée non-publiée).

Des études ayant été effectuées entre autres chez *D. dehalogenans* (Smidt *et al.*, 2000) et *Desulfomonile tiedjei* (Louie et Mohn, 1999), deux bactéries utilisant des mécanismes de déshalogénation réductrice semblables à ceux de la souche PCP-1, montrent que les déshalogénases ainsi que d'autres protéines membranaires seraient impliquées dans le processus d'halorespiration. Nos connaissances sur les mécanismes impliqués lors de la déshalogénation réductrice et l'halorespiration en conditions anaérobies demeurent cependant limitées.

L'approche protéomique a été retenue pour ce projet qui consistait dans un premier temps à identifier, par électrophorèse en deux dimensions, les protéines induites ou réprimées lors de la déshalogénation réductrice du 2,4,6-TCP en position *ortho* chez *D. frappieri* PCP-1 cultivée en absence et en présence de ce chlorophénol. Dans un deuxième temps, les protéines induites ou réprimées ainsi que la déshalogénase I ont été caractérisées et identifiées par spectrométrie de masse. Ces travaux nous ont également permis d'optimiser les techniques d'électrophorèse en deux dimensions et d'analyse pour les protéines d'origine membranaire.

2. Revue de littérature

2.1 La déshalogénation réductrice

Le mécanisme de dégradation privilégié en anaérobiose est la déshalogénation réductrice au cours de laquelle l'addition d'électrons à la molécule permet de substituer l'halogène et ce, de deux façons. Lors de l'hydrogénolyse, un atome d'hydrogène remplace l'halogène sur la molécule tandis que lors de la réduction vicinale, deux halogènes substituant des atomes carbones adjacents d'un alkyle sont enlevés permettant la formation d'une liaison double entre les atomes de carbones. Alors que la réduction vicinale n'a lieu que sur les alkyles, l'hydrogénolyse peut aussi se faire sur des aryles (figure 1) (Mohn et Tiedje, 1992). Dans tous les cas, il faut être en présence d'agents réducteurs pour que la réaction puisse avoir lieu.

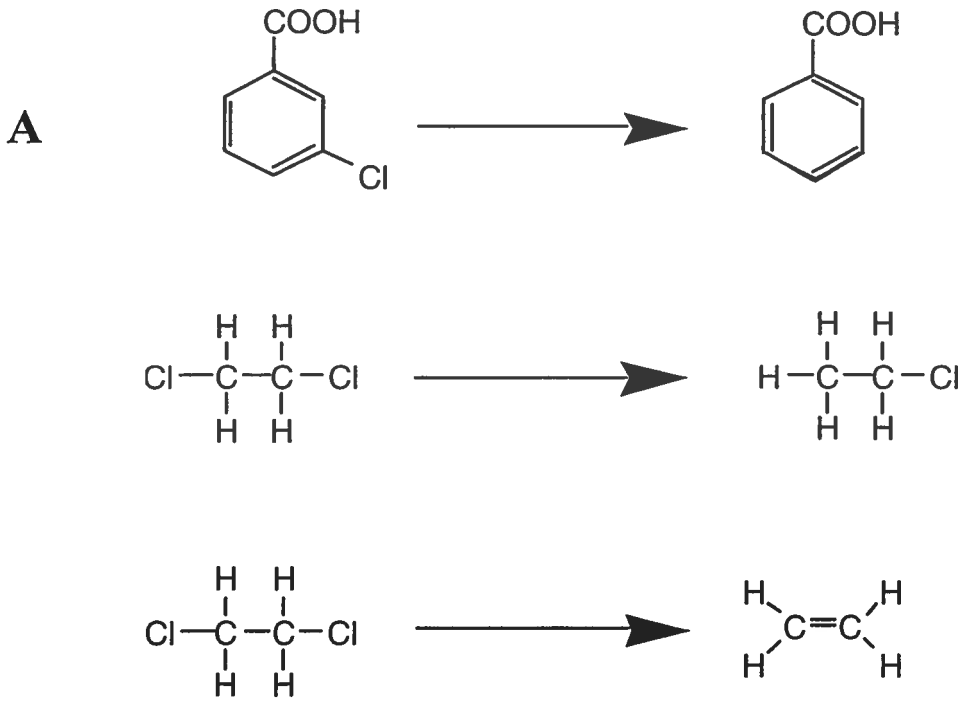


Figure 1 : Exemples de déshalogénation réductrice. (A) L'hydrogénolyse d'un aryle : le 3-chlorobenzoate en benzoate ; (B) hydrogénolyse d'un alkyle : le 1,2-dichloroéthane en chloroéthane ; (C) réduction vicinale d'un alkyle : le 1,2-dichloroéthane en éthène. Modifié de Mohn et Tiedje, 1992.

La déshalogénation réductrice chez les microorganismes anaérobies peut être de nature fortuite, faisant partie du processus de respiration ou encore du métabolisme du carbone. Lorsque des enzymes ou des cofacteurs impliqués dans des voies métaboliques autres que la déshalogénation réductrice proprement dite dégradent des composés halogénés par ce mécanisme, il y a co-métabolisme. C'est fortuitement que le polluant est dégradé car il n'amène aucun bénéfice énergétique au microorganisme, tant par l'apport d'une nouvelle source de carbone que par la production d'ATP (Fantroussi, Naveau et Agathos. 1998). En plus d'être un évènement plutôt rare, la dégradation réductrice par co-métabolisme possède, d'ordre général, des taux de déshalogénation faibles en comparaison avec ceux de l'halorespiration (Fetzner, 1998). L'halorespiration implique l'utilisation d'un composé halogéné comme accepteur final d'électrons dans une chaîne respiratoire. La résultante de ce mécanisme est alors une production d'énergie pour le microorganisme sous forme d'ATP. Finalement, certains microorganismes peuvent utiliser les atomes de carbone d'hydrocarbures halogénés en C1 et C2 comme sources de carbone et d'énergie (Fantroussi, Naveau et Agathos. 1998).

Plusieurs espèces bactériennes anaérobies peuvent effectuer la déshalogénation réductrice. Il s'agit de bactéries du sol qui doivent souvent travailler en consortium pour dégrader complètement un xénobiotique halogéné. Seules les espèces dont au moins une macromolécule impliquée dans la déshalogénation réductrice a été caractérisée seront retenues dans cette revue et permettront de mieux comprendre les mécanismes biologiques impliqués dans la dégradation de composés organiques halogénés.

2.1.1 Les macromolécules impliquées dans la déshalogénation réductrice

Les macromolécules impliquées dans la déshalogénation réductrice peuvent être classées en trois catégories selon leur fonction : (i) les macromolécules responsables de la déshalogénation proprement dite (des déshalogénases), (ii) celles impliquées dans le

transport des électrons et lors de l'halorespiration, (iii) les autres réductases impliquées dans le maintien du gradient d'oxydoréduction de chaque côté de la membrane. La nature de ces macromolécules varie également. Lors de la déshalogénation réductrice, protéines et cofacteurs se côtoient. Les cofacteurs peuvent être liés ou non-liés aux protéines. Les protéines comme les cofacteurs peuvent contenir un métal.

2.1.1.1 Les déshalogénases

Les premières macromolécules d'intérêt sont les déshalogénases. Ces enzymes sont capables d'enlever un groupement halogène d'une molécule organochlorée. Les déshalogénases, selon leur spectre d'activité, peuvent ainsi substituer l'halogène en *cis* ou en *trans* sur les chloroalcènes ou en *ortho*, *meta* et *para* sur les composés aromatiques halogénés. C'est grâce à leurs cofacteurs métalliques que ces enzymes peuvent dégrader une vaste gamme de polluants. Les déshalogénases possèdent comme cofacteur soit un hème soit un corrinoïde. Ce dernier est généralement couplé à des centres fer/soufre. Ces cofacteurs servent soit au transport des électrons vers le site actif de l'enzyme, soit à l'enlèvement de l'halogène du composé organochloré. Le tableau 1 dresse un portrait des déshalogénases ayant été caractérisées ainsi que de leurs activités.

La déshalogénase 3-chlorobenzoate réductrice de *D. tiedjei* est la seule déshalogénase purifiée à ce jour possédant un hème de type chromophore à son site actif. L'hème, situé sur sa sous-unité de 37 kDa, teinte la protéine en jaune. Cette enzyme diffère des autres déshalogénases non seulement par son cofacteur mais aussi par sa structure. Du groupe, elle est la seule à être formée d'un hétérodimère et à être intégralement liée à la membrane (Ni, Fredickson et Xun. 1995). Sa structure lui confère une résistance à l'oxygène que ne possèdent pas les autres déshalogénases à l'exception de la déshalogénase de *D. chlororespirans* Co23 (Löffler, Sanford et Tiedje. 1996). Cette dernière enzyme n'a cependant été l'objet que de caractérisations sommaires et la nature de ses cofacteurs n'a pas encore été déterminée.

Tableau 1: Caractéristiques de différentes déshalogénases impliquées dans la déshalogénation réductrice de bactéries anaérobies

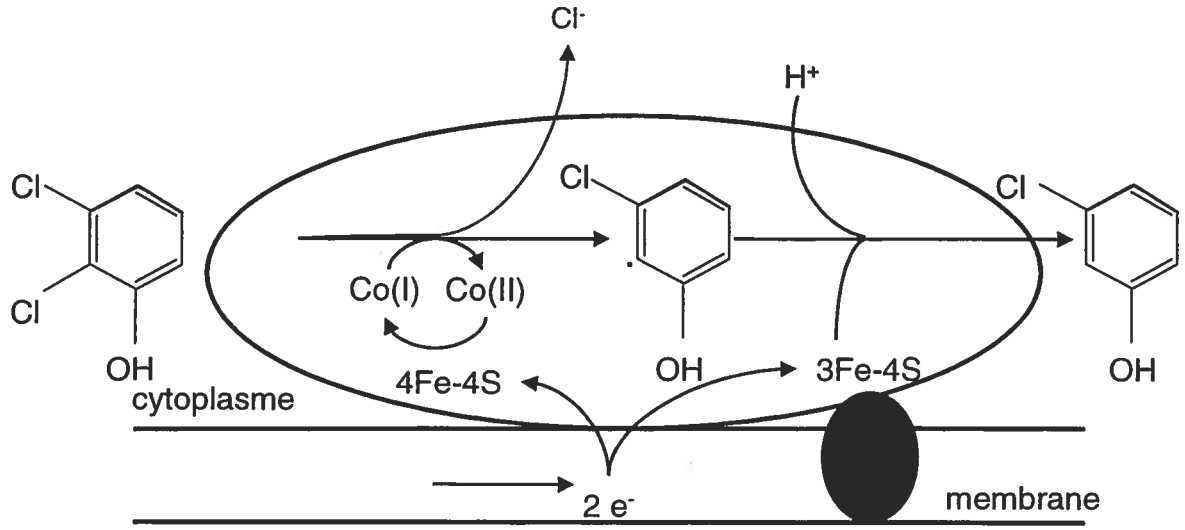
Déshalogénase	Origine	P.M. (kDa)	Nbr de sous-unités	Cofacteur(s) pour une sous-unité	Substrat(s)	Type(s) de substitution	Localisation dans la cellule
[1] Tétrachloroéthène réductase	*Dehalobacter restrictus*	60	1	1 cobalamine $Co^{1+/2+}$ et $Co^{2+/3+}$ 2 centres $[4Fe\text{-}4S]^{(2+;1+)}$	- Chloroalcènes	*Cis*	- Cytoplasmique -Liée à la membrane
[2, 3] Déshalogénase tétrachloroéthène réductrice	*Dehalococcoides ethenogenes*	51	ND	1 cobalamine 2 centres Fe_4S_4 [h.à.c.]	- Chloroalcènes	*Cis* *Trans*	-Cytoplamique -Liée à la membrane avec une protéine d'ancrage
[2,3] Déshalogénase trichloroéthène réductrice	*Dehalococcoides ethenogenes*	61	ND	1 cobalamine [h.à.c.]	- Chloroalcènes	*Cis*	-Cytoplasmique -Liée à la membrane
[4,5]Tétrachloroéthène réductrice	*Dehalospirillum multivorans*	55,9	1	2 centres Fe_4S_4 [h.à.c.] 1 cobalamine	- Chloroalcènes	*Cis*	- Cytoplasmique -Liée à la membrane avec une protéine d'ancrage
[6] Déshalogénase 3-chlorobenzoate réductrice	*Desulfomonile tiedjei*	37 et 64	2	1 hème de type chromophore	- Chlorobenzoates - Fluorobenzoates - Chloroalcènes	*Meta* *Cis*	-Membranaire intégrale du côté cytoplasmique
[7] Déshalogénase *ortho*-chlorophénol réductrice	*Desulfitobacterium dehalogenans*	48	ND	1 centre Fe_4S_4 1 centre Fe_3S_4 1 cobalamine	- Chlorophénols - Chlorohydroxyl-pheylacétate	*Ortho*	-Cytoplasmique -Liée à la membrane avec une protéine d'ancrage

Tableau 1: Caractéristiques de différentes déshalogénases impliquées dans la déshalogénation réductrice de bactéries anaérobies, la suite.

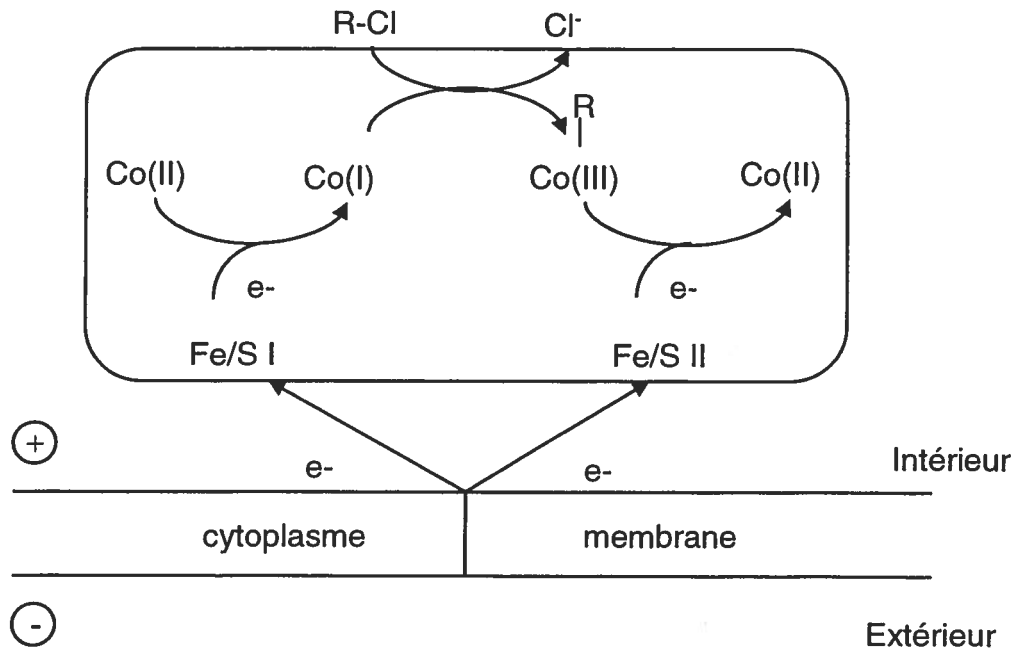
Déshalogénase	Origine	P.M. (kDa)	Nbr de sous-unités	Cofacteur(s) pour une sous-unité	Substrat(s)	Type(s) de substitution	Localisation dans la cellule
[8] Déshalogénase 3-chloro-4hydroxy-phénylacétate réductrice	*Desulfitobacterium hafniense*	46,5	ND	3 centres fer/soufre 1 cobalamine	-Hydroxyphényl-acétate	*Ortho*	- Membranaire
[9] Déshalogénase tetrachloroéthène réductrice	*Desulfitobacterium* PCE-S	65	3	1 cobalamine 8 mol de fer/mol d'enzyme 10 mol de soufre/mol d'enzyme	- Chloroalcènes	*Cis*	-Cytoplasmique -Liée à la membrane

h.à.c. : hypothèse à confirmer
N.D. : non déterminé
Références : (1) Schumacher *et al.*, 1997 ; (2) Magnuson *et al.*, 2000 ; (3) Magnuson *et al.*, 1998 ; (4) Neumann, Wohlfarth et Diekert, 1996 ; (5) Neumann, Wohlfarth et Diekert, 1998; (6) Ni, Fredrikson et Xun, 1995 ; (7) van de Pas *et al.*, 1999b ; (8) Christiansen *et al.*, 1998 ; (9) Miller, Wohlfarth et Diekert, 1998.

La majorité des déshalogénases purifiées possèdent à leur centre actif un corrinoïde. C'est ce groupe de protéines qui a été le mieux caractérisé. Les déshalogénases de *Dehalospirillum multivorans* et de *Desulfitobacterium dehalogenans* sont les déshalogénases qui ont été les plus étudiées. La tétrachloroéthène réductrice de *D. multivorans* est une enzyme de 55,9 kDa attachée à la membrane par une protéine d'ancrage de 8,4 kDa possédant deux hélices transmembranaires. Deux électrons provenant d'un transporteur d'électrons, non-identifié à ce jour, parviendraient aux centres fer/soufre. Un premier centre fer/soufre transfèrerait son électron vers la cobalamine(II) pour le réduire en cobalamine(I). C'est sous cette forme que le cobalt ferait un lien direct avec le trichloroéthène et enlèverait ainsi un chlore à la molécule. Entrerait alors en jeu le deuxième centre fer/soufre qui transfèrerait à son tour son électron à la cobalamine(III) lié à l'organochloré pour le réduire sous sa forme cobalamine(II). De paire avec l'ajout d'un proton, cette réduction permettrait de libérer l'organochloré avec un chlore en moins (figure 2.A) (Neumann, Wohlfarth et Diekert, 1996). La déshalogénase *ortho*-chlorophénol réductrice, une enzyme de 48 kDa de *D. dehalogenans*, est également reliée à la membrane par une protéine d'ancrage. La protéine d'ancrage chez *D. dehalogenans* possèderait cependant trois hélices transmembranaires et a une masse de 11,5 kDa estimée à partir de la séquence en nucléotides du gène *cpr B*. Une fois encore, deux électrons provenant d'un transporteur d'électrons, non-identifié à ce jour, parviendraient aux centres fer/soufre. Un premier centre Fe_4S_4 transfèrerait son électron vers la cobalamine(II) pour le réduire en cobalamine(I). Un chlore serait alors arraché au dichlorophénol qui prendrait une forme radicalaire. L'ajout d'un proton au radical serait rendu possible grâce au transfert d'un électron vers celui-ci par le deuxième centre Fe_4S_3. Un monochlorophénol serait alors libéré (figure 2.B) (A. van de Pas *et al.* 1999a). Quoique chacun des deux modèles ait été présenté pour une enzyme particulière, les intermédiaires, soit le radical ou le lien organochloré/cobalt n'ont pas encore été démontrés. On ne peut supposer dès lors lequel de ces modèles représentent vraiment ce qui se passe au cœur de ces déshalogénases (A. van de Pas *et al.* 1999b).



A



B

Figure 2 : Fonctionnement suggéré des déshalogénases avec cobalamine. (A) Le modèle impliquant un lien direct entre le cobalte et l'organochloré chez la déshalogénase *ortho*-chlorophénol réductive de *D. deshalogenans* (modifié de A. van de Pas *et al.* 1999a) ; (B) Le modèle impliquant la formation d'un radical libre chez la tétrachloroéthane réductrice de *D. multivorans* (modifié de Neumann, Wohlfarth et Diekert, 2000).

L'analyse des séquences en acides aminés des déshalogénases de *D. multivorans* et de *D. dehalogenans* supporte toutefois l'analyse structurale qui a été effectuée chez ces deux enzymes. On retrouve ainsi dans la séquence de chacun des gènes des déshalogénases un motif RRXFXK en N-terminal qui est caractéristique de certaines protéines membranaires complexées à un cofacteur redox. Le motif CXXCXXCXXCP permettant la fixation de deux centres Fe_4S_4 caractéristiques des ferrédoxines se trouve également dans les séquences des gènes (Neumann, Wohlfarth et Diekert, 1998 ; van de Pas *et al.* 1999b ; Magnuson *et al.*, 2000). Cependant, l'analyse de la séquence de la déshalogénase *ortho*-chlorophénol réductrice démontre que la troisième cystéine du motif CXXCXXCXXCP pour la fixation des centres fer/soufre est absente. Cela corrobore le fait qu'on ait observé chez cette enzyme par spectroscopie un centre Fe_4S_4 et un centre Fe_4S_3, contrairement aux deux centres Fe_4S_4 normalement retrouvés en présence du motif (van de Pas *et al.* 1999b). La tétrachloréthène réductrice de *D. multivorans* et la déshalogénase *ortho*-chlorophénol réductrice de *D. dehalogenans* partagent ces patrons avec une autre déshalogénase, la trichloroéthène réductrice de *D. ethenogenes*. La présence d'une cobalamine et de deux centres fer/soufre chez la trichloroéthène réductrice de *D. ethenogenes* a été déduite à partir de ces patrons dans le gène de l'enzyme (Magnuson *et al.*, 2000).

Les recherches effectuées en 1997 par Schumacher *et al.*, sur la PCE réductase de *D. restrictus* portent sur la nature de sa cobalamine. *D. restrictus* ne peut croître dans un milieu de culture qu'en présence de vitamine B_{12}. De ce fait, les auteurs supposent que la cobalamine présente chez la PCE réductase est la vitamine B_{12} (cyanocobalamine). Des essais en chromatographie et en spectroscopie optique faits sur des extraits de cobalamine tendent à confirmer cette affirmation. Chez *D. multivorans*, l'hypothèse voulant que le corrinoïde soit une vitamine B_{12} a été soulevée mais aucune expérience n'a été effectuée pour la confirmer (Neumann, Wohlfarth et Diekert, 1996). En ce qui concerne les déshalogénases chez les autres espèces bactériennes, aucune hypothèse n'a été formulée quant à la nature de la cobalamine.

2.1.1.2 Les transporteurs d'électrons

Les déshalogénases ne peuvent pas fonctionner sans transporteurs d'électrons. Pour effectuer la déshalogénation réductrice, les déshalogénases ont besoin du pouvoir réducteur des transporteurs d'électrons. Ces derniers sont également des acteurs de premier plan lors du phénomène de l'halorespiration. En plus d'acheminer les électrons jusqu'à la déshalogénase, ils participent au maintien du gradient d'oxydoréduction de chaque côté de la membrane. Ce gradient est nécessaire à la production d'ATP. À preuve du lien étroit entre les transporteurs d'électrons et l'halorespiration, le cytochrome *c* de *D. tiedjei* est induit par le 3-chlorobenzoate lors de la déshalogénation et de la production subséquente d'ATP au cours de l'halorespiration (Louie *et al.*, 1997). En plus des cytochromes, deux autres types de transporteurs d'électrons ont été identifiés à ce jour, soient les quinones et les ferrédoxines. Des transporteurs d'électrons étudiés, aucun n'a encore été formellement désigné comme étant le transporteur d'électrons physiologique direct d'une déshalogénase. Cependant, des hypothèses ont été émises dans le cas de *D. restrictus* et de *D. multivorans*. L'implication d'une ménaquinone (MQ) chez *D. restrictus* comme transporteur d'électrons direct pour la PCE réductase est supportée par plusieurs expérimentations. La différence des spectres UV entre l'hydrogénase de *D. restrictus* réduite et sa PCE réductase oxydée correspond au spectre de la MQ membranaire de *Wolinella succinogenes*. De plus, les résultats chez *D. restrictus* obtenus avec un analogue de la MQ, la 2,3-dimethyl-1,4-naphtaquinone, laisse penser que la ménaquinone pourrait agir comme le donneur direct d'électrons de la PCE réductase (Schumacher et Holliger, 1996). Miller, Wohlfarth et Diekert (1997b) ont cherché à savoir si la MQ pouvait être le transporteur d'électrons direct de la PCE réductase de *D. multivorans*. Lors de leurs tests, ils ont utilisé la 2-méthyl-1,4-naphtaquinone réduite, un analogue de la MQ. Il s'est avéré que la ménadione, un analogue de la MQ, réduite a été incapable d'agir comme transporteur d'électrons artificiel pour la réduction du PCE en présence d'extraits cellulaires de *D. multivorans*. Le 2-heptyl-4-hydroxyquinoline-*N*-oxyde (HOQNO), un inhibiteur du transport d'électrons de la ménaquinone vers le cytochrome *b*, n'est pas parvenu à inhiber la réduction du PCE en présence de formate ou d'hydrogène comme donneur d'électrons dans des suspensions cellulaires de

D. multivorans. Toutefois, les auteurs n'ont pas voulu rejeter la ménaquinone comme transporteur d'électrons direct de la PCE réductrice chez *D. multivorans*. L'incompatibilité ou l'inaccessibilité de l'HOQNO à l'enzyme ou au transporteur d'électrons pourrait expliquer l'échec de l'essai. Toujours chez *D. multivorans*, la ferrédoxine a été testée comme transporteur d'électrons pour la PCE réductase. Une activité spécifique correspondant à 1 % de l'activité spécifique obtenue avec la pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase, démontre que la ferrédoxine serait plutôt le donneur d'électrons direct de cette dernière enzyme (Miller, Wohlfarth et Diekert, 1997a). Faute d'avoir identifié et purifié le transporteur direct des déshalogénases, c'est le méthyle viologen qui est utilisé lors des essais enzymatiques *in vitro*. C'est en effet avec ce donneur d'électrons artificiel que les meilleures activités spécifiques ont été obtenues et ce pour toutes les déshalogénases.

2.1.1.3 L'halorespiration et les réductases impliquées dans le maintien de l'état d'oxydoréduction

Tout comme les transporteurs d'électrons, la formate déshydrogénase et l'hydrogénase participent au maintien du gradient d'oxydoréduction de chaque côté de la membrane lors de l'halorespiration. Ces deux enzymes se situent du côté périplasmique de la membrane et sont faiblement attachées à celle-ci. Le rôle de ces protéines est double : en oxydant des donneurs d'électrons dans le milieu, ces protéines libèrent des protons qui réduisent le périplasme alors que les électrons libérés lors de la réaction sont récupérés par des transporteurs qui les acheminent à la déshalogénase. Le modèle de l'halorespiration chez *D. tiedjei* montre bien le rôle de ces protéines de même que celui des transporteurs d'électrons dans l'halorespiration (figure 3). La formate déshydrogénase et l'hydrogénase oxydent respectivement le formate et l'hydrogène. Il s'ensuit la libération dans le périplasme de trois protons. Les électrons libérés lors de la réaction sont quant à eux transférés à un cytochrome *c*. L'ajout de protons et l'enlèvement d'électrons dans le périplasme favorisent l'augmentation de la force protomotrice. Cette même force protomotrice est parallèlement accrue par la translocation de protons du cytoplasme vers le périplasme lors du transfert des électrons par une quinone. La réduction de la quinone

par les électrons en provenance du cytochrome *c* libère deux protons dans le périplasme. Pour transférer ses électrons vers la déshalogénase, la quinone doit à nouveau être réduite par des protons. Ces derniers proviennent du cytoplasme. Une fois les électrons transportés vers la 3-chlorobenzoate réductrice, cette dernière peut alors enlever le chlore au 3-chlorobenzoate. Enfin, la force protomotrice générée au cours de la réaction permet la production d'ATP via une ATPase située dans la membrane (Louie et Mohn, 1999).

Pour subvenir à leur besoin énergétique, les bactéries capables de déshalogénation réductrice peuvent aussi utiliser une vaste gamme d'accepteurs d'électrons autres que les composés halogénés. Par conséquent, ces bactéries synthétisent d'autres types de réductases impliquées dans leur métabolisme énergétique. Tout comme les déshalogénases et contrairement aux réductases impliquées dans la formation d'un gradient de protons, ces enzymes se retrouvent du côté cytoplasmique de la cellule. Ainsi, *D. tiedjei* synthétise l'adénosine phosphosulfate réductase et la désulfoviridine sulfite réductase capables de réduire le sulfate (Louie et Mohn, 1999). Quant à *D. multivorans*, elle utilise la lactate déshydrogénase, la nitrate réductase, la nitrite réductase et la fumarate réductase selon le substrat sur lequel elle croît (Miller, Wohlfarth et Diekert, 1997a). Il en va de même pour la souche PCE-S chez qui on a retrouvé une activité pour la pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase et pour la fumarate réductase (Miller, Wohlfarth et Diekert, 1997b). Les réductases présentées ci haut ne constituent qu'un portrait sommaire des enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique des bactéries capables de déshalogénation réductrice.

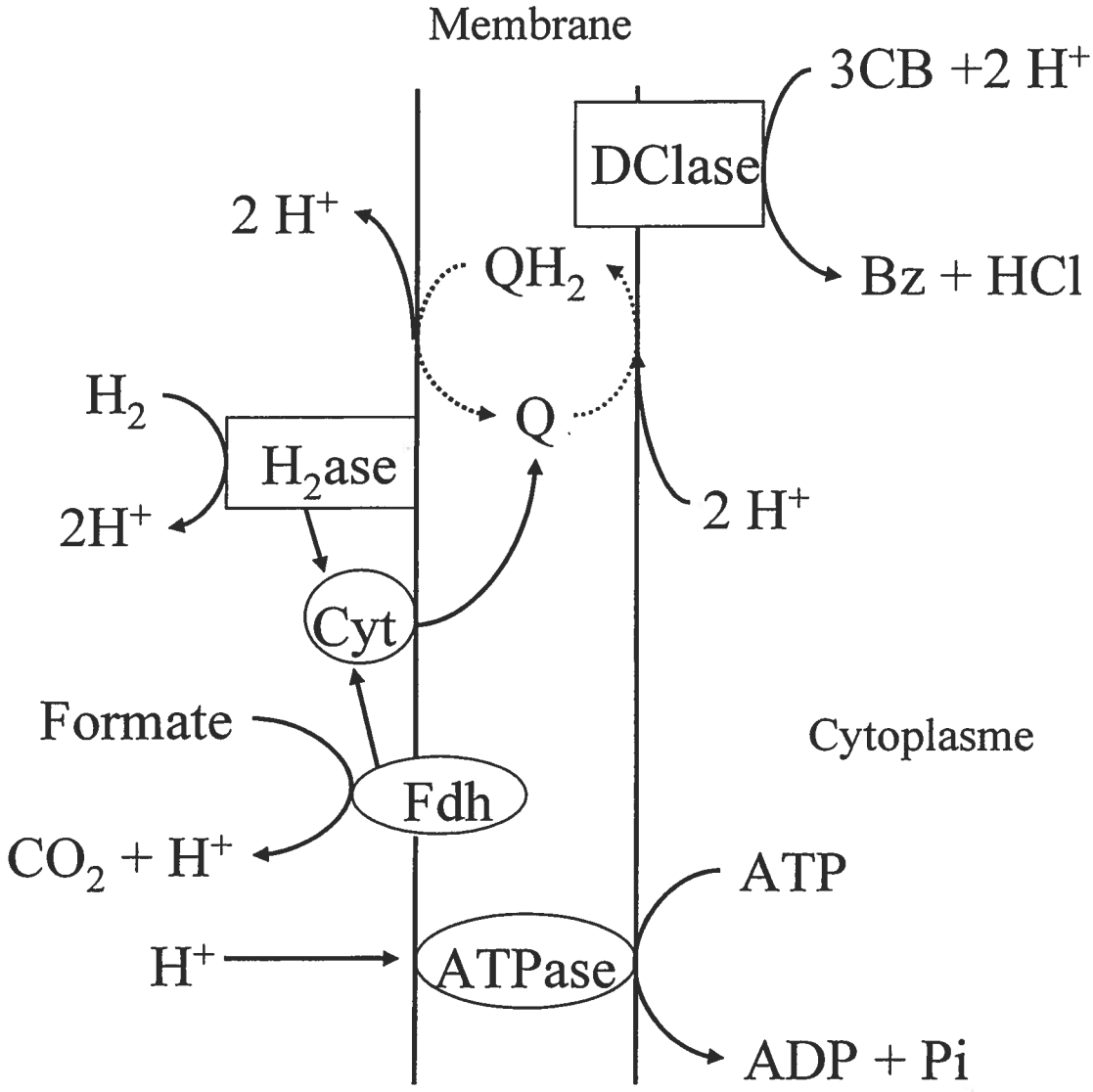


Figure 3 : Modèle d'halorespiration chez *D. tiedjei* : H_2ase, hydrogénase inductible ; Fdh, formate déhydrogénase inductible ; Cyt, cytochrome *c* inductible ; Q, une quinode ; DClase, 3-chlorobenzoate réductrice ; 3CB, 3-chlorobenzoate ; Bz, benzoate (modifié de Louie et Mohn, 1999).

2.1.2 Desulfitobacterium, un genre bactérien important dans la déshalogénation réductrice

Avec ses quatre espèces et ses neuf souches, le genre *Desulfitobacterium* apparaît comme l'un des plus importants parmi les bactéries présentement isolées capables de déshalogénation réductrice (Lie, Godchaux et Leadbetter, 1999 ; Breitenstein *et al.*, 2001 ; Miller, Wohlfarth et Diekert, 1997b). Les microorganismes appartenant au genre *Desulfitobacterium* ont été isolés tant dans des sols pollués, dans des sédiments en eaux vives, dans des boues d'égout que dans du sol composté (Breitenstein *et al.*, 2001). *Desulfitobacterium* a été retrouvé aux États-Unis (Sanford, 1996), au Danemark (Christiansen et Ahring, 1996) et aux Pays-Bas (Gerritse *et al.*, 1996). Au Québec, une étude sur la distribution de *Desulfitobacterium* effectuée par Martin Lanthier en 1999 montrait que ce genre se retrouvait principalement dans la Vallée du Saint-Laurent aussi bien dans des sols contaminés par des organochlorés que non-contaminés. C'est sans doute sa capacité à utiliser un vaste spectre d'accepteurs d'électrons allant des composés halogénés tant aromatiques qu'aliphatiques à des composés plus simples tels le sulfite, le thiosulfite, le sulfure, le nitrate et le fumarate qui lui a permis de s'implanter dans des environnements divers et d'enter en compétition avec les autres microorganismes du milieu (Dambosky, 1999 ; Dennie *et al.*, 1998). Il en va de même pour sa capacité à utiliser plusieurs types de donneurs d'électrons (Smidt *et al.*, 2000).

2.1.1.4 Desulfitobacterium frappieri

PCP-1 est la première souche de *Desulfitobacterium frappieri* à être isolée. C'est en 1996 que Bouchard *et al.* isolaient cette bactérie Gram positif sporulant et non-flagellée d'un consortium méthanogénique capable de dégrader le pentachlorophénol. La souche PCP-1 s'est avérée posséder un atout important par rapport aux autres bactéries capables de déshalogénation réductrice : cette nouvelle souche est en effet la seule bactérie connue pouvant dégrader des molécules aromatiques substituées avec un groupement hydroxyle ou aminé tant aux positions *ortho* que *meta* et *para*. De plus, la souche PCP-1 dégrade le tétrachloroéthylène, le pentachloropyridine et peut faire de

l'*ortho* déméthylation et substituer les groupements nitro en amino sur des molécules aromatiques (Dennie *et al.*, 1998). En plus d'utiliser une vaste gamme de composés organiques halogénés (des polluants importants de l'environnement), *D. frappieri* PCP-1 utilise comme accepteurs d'électrons également des composés inorganiques tels les sulfites, thiosulfates et nitrate (mais non les sulfates). Le pyruvate est le composé organique identifié capable de supporter la croissance de la souche PCP-1 en présence de 0,02 % d'extrait de levures (Bouchard *et al.*, 1996).

La souche PCP-1 pouvant dégrader le pentachlorophénol (PCP) en 3-monochlorophénol (PCP → 2,3,4,5-tétrachlorophénol → 3,4,5-trichlorophénol → 3,5-dichlorophénol → 3-chlorophénol), plusieurs essais ont été réalisés afin de déterminer son efficacité lors de la biorestauration de sols en présence de ce composé toxique. Il a été démontré que la souche PCP-1 persiste dans les bioréacteurs à la flore indigène anaérobie des sols contaminés comme à des consortiums dégradant le PCP ajoutés en même temps que la souche PCP-1 pour accroître l'activité de dégradation (Beaudet *et al.*, 1998, Lanthier *et al.*, 2000 et Tartakovsky *et al.*, 1999). En bioréacteur, la souche PCP-1 dégrade efficacement jusqu'à des concentrations de 200 mg de PCP/kg de sol. Au-delà de cette concentration, une réinoculation de la souche s'avère nécessaire (Beaudet *et al.*, 1998). Afin de suivre la présence de la souche PCP-1 dans les bioréacteurs, divers outils moléculaires permettant la détection et la quantification de la souche ont été développés. Une première méthode de détection, mise au point par Lévesque *et al.* (1997), permet l'extraction de l'ADN du sol puis l'amplification de l'ARNr 16S de la souche PCP-1 à partir d'amorces spécifiques. Une seconde technique, le PCR compétitif, permet la quantification de la souche au sein d'une population microbienne mixte (Beaudet *et al.*, 1998 et Lévesque *et al.*, 1998).

Pour obtenir une meilleure activité de dégradation à l'aide de cet organisme, une étude plus poussée de son activité enzymatique a été effectuée. Au moins deux enzymes inductibles situées dans la membrane sont responsables de la déshalogénation chez *D. frappieri* PCP-1. La déshalogénase I agit principalement en position *ortho* alors que la déshalogénase II agit principalement en positions *meta* et *para* (Bouchard *et al.*, 1996).

La déshalogénase I a été purifiée et son extrémité N-terminale a été séquencée. Sa masse moléculaire sur SDS-PAGE est de 37 kDa. La déshalogénase II n'a été que partiellement purifiée. En présence citrate de titanium et de méthyl viologen comme agents réducteurs, la préparation enzymatique de la déshalogénase I (extrait brut) dégrade le PCP en 2,3,4,5-TCP à un taux de 40,9 nmoles min^{-1} mg de $protéines^{-1}$ et la préparation brute de la déshalogénase II dégrade le PCP en tétrachlorophénol à un taux de 0,161 nmoles min^{-1} mg de $protéine^{-1}$. Les conditions optimales de température et de pH sont 50 °C et pH 6,9 pour la déshalogénase I et 45 °C et pH 7,4 pour la déshalogénase II. L'inhibition de l'activité de la déshalogénase I et II par le 1-iodopropane et la restauration de celle-ci suite à une exposition à la lumière suggère que ces enzymes possèdent une cobalamine comme cofacteur. La caractérisation préliminaire des déshalogénases donne une première information sur le mécanisme de dégradation des composés organiques halogénés par *D. frappieri* PCP-1.

En plus de la souche PCP-1, trois autres souches de *D. frappieri* ont été isolées à ce jour. La souche TCE1 a été isolée à partir d'une culture mixte en chémostat déchlorant le tétrachloroéthène (TCE). Cette bactérie flagellée, en forme de bâtonnet, peut utiliser comme donneurs d'électrons l'hydrogène, le formate, le L-lactate, le butyrate, le crotonate ou l'éthanol. Le pyruvate et la sérine peuvent également être utilisés comme substrats fermentables. En présence de L-lactate comme donneur d'électrons, la souche TCE1 peut utiliser le sulfite, le thiosulfate, le nitrate, le fumarate ainsi que comme composés halogénés le tétrachloréthène et le trichloréthène qu'elle dégrade en *cis*-1,2-dichloroéthène (Gerritse *et al.*, 1999). La souche TCP-A a quant à elle été isolée d'une culture mixte dégradant le 2,4,6-TCP enrichie de sédiments du fleuve Saale en Allemagne. La souche TCP-A dégrade le 2,4,6-TCP en position *ortho* (Breitenstein *et al.*, 2001). DP7, contrairement aux autres souches de son espèce, n'utilise pas de chlorophénols ou de chloroéthènes comme accepteurs d'électrons. Cette bactérie mobile en forme de bâtonnet utilise par contre le fumarate, le sulfite, le nitrate, le thiosulfate comme accepteurs d'électrons à l'instar des autres *Desulfitobacterium*. Les donneurs d'électrons connus permettant la croissance de la souche DP7 sont le pyruvate, le lactate, le formate, l'hydrogène, le butyrate et l'éthanol (van de Pas *et al.*, 2001a).

2.1.1.5 *Desulfitobacterium dehalogenans*

Afin d'élucider comment sont régis les mécanismes utilisés pour combler les besoins énergétiques chez les microorganismes du genre *Desulfitobacterium*, Smidt *et al.* en 2000 ont analysé la régulation de la transcription des gènes chez *D. dehalogenans* lors de la déshalogénation réductrice. C'est ainsi qu'ils ont retrouvé six gènes entourant les séquences *cprA* et *cprB* correspondant respectivement aux gènes de la déshalogénase *ortho*-chlorophénol réductrice et de sa protéine d'ancrage potentielle à la membrane (figure 4). À cela s'ajoute un cadre de lecture ouvert non-transcrit (ORFU). Tous ces gènes du locus sont transcrits dans la même direction que *cprAB* exception faite de *cprT*. Le gène *cprC* se retrouve directement en aval de *cprA*. Sa séquence partage des similarités avec un régulateur de liaison à la membrane de type NosR/NirI. En aval de *cprC*, se trouve le gène *cprD* codant possiblement pour une chaperonine de type GroEL. La même fonction a été attribuée pour CprE dont le gène, *cprE*, se situe en amont du gène *cprB*. En remontant la séquence, se trouve le gène *cprZ* qui chevauche le gène *cprE* sur quatre nucléotides. Le produit du gène *cprZ* n'a pu être attribué qu'à une protéine hypothétique de *Synechocystis* sp. (BAA17004). En amont de *cprZ*, il y a *cprK* dont le produit montre des similarités importantes avec les membres de la famille de régulateurs de transcription CRP-FNR. CprK partage avec cette famille en C-terminal un motif de liaison à l'ADN palindromique. Le site de liaison se trouve dans le promoteur des gènes ciblés et est nommé boîte FNR ou anaérobie. Le gène *cprT*, quant à lui, est situé en amont de *cprK*. Son produit possède des similarités avec un facteur déclencheur, soit une isomérase peptidyle propyle impliquée dans la catalyse du repliement des protéines. Finalement, l'ORFU n'a pu être rattaché à aucun homologue à partir de bases de données (figure 4). L'halorespiration induit la transcription de la plupart de ces gènes alors que lors de la fermentation du pyruvate ou de la respiration sur nitrate ou fumarate, aucune expression significative de ces gènes n'a été relevée. Le régulateur le plus probant lors de l'induction serait CprK. En effet, *crpK* qui est faiblement exprimé de façon constitutive pourrait se fixer aux boîtes anaérobies situées en amont de *cprZ*, *cprT*, au promoteur de *cprB* ou, avec un degré de conservation moindre, en amont de *cprD*. De plus, cela serait en conformité avec l'organisation transcriptionnelle des cistrons. Lors de l'halorespiration,

une première unité bicistronique est constituée de *cprBA* et une seconde de *cprC*. Le site de fixation de CprK étant moins fort en amont de *cprC*, l'unité polycistronique *cprBACD* a été retrouvée, laissant croire qu'une deuxième unité bicistronique, soit *cprCDI*, pourrait exister. Les deux autres cistrons transcrits lors de l'induction sont *cprZE* et *cprT*. Le tricistron, *cprZEK*, est le seul à être transcrit de façon constitutive. Cependant, sa transcription était faible et ce pour toutes les conditions utilisées (figure 4) (Smidt *et al.*, 2000).

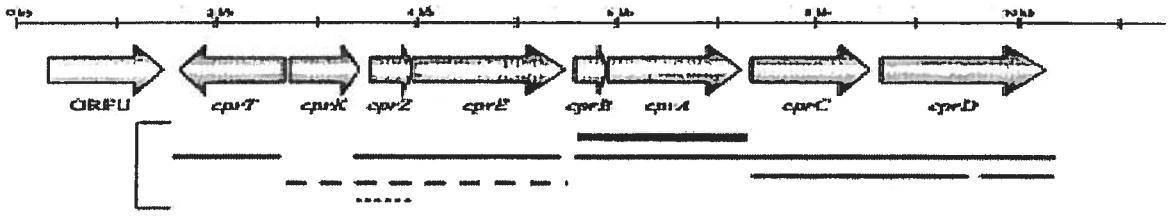


Figure 4 : Carte physique du locus des gènes *cpr* chez *D. dehalogenans*. Les flèches horizontales correspondent aux cadres de lecture ouverts, les barres aux ARNm, les barres pleines aux produits de transcription apparemment spécifiques à l'halorespiration, les lignes rompues et les lignes pointillées correspondent respectivement aux produits de transcription constitutifs et réprimés lors de l'halorespiration. Modifié de Smidt *et al.*, 2000.

Cette analyse moléculaire de la régulation des gènes lors de l'halorespiration est la première à être effectuée en son genre. Toutefois, avec le séquençage en cours des génomes de *Desulfitobacterium hafniense* (Doe Joint Genome Institute à l'adresse suivante : http://www.jgi.doe.gov/tempweb/JGI_microbial/html/index.html) et de *Dehalococcoides ethenogenes* (The Institute for Genomic Research à l'adresse suivante : http://www.tigr.org), les études portant sur les systèmes employés par les bactéries capables de déshalogénation réductrice risquent de se multiplier. Ces bases de données deviennent un outil de recherche utile pour la compréhension de l'halorespiration, un phénomène jusqu'à tout récemment méconnu.

2.2 La protéomique

Depuis une vingtaine d'années, les génomes de divers organismes sont analysés. Les gènes étant constitutifs, ils ne donnent qu'une information statique de la biologie de l'organisme. Depuis 1995, à la génomique s'est ajoutée une nouvelle discipline : la protéomique (Wasinger *et al.*, 1995). La protéomique se définit comme étant l'étude du complément protéique d'un génome pour un organisme ou un tissu dans un état physiologique donné. Elle permet de suivre dans le temps et dans l'espace l'expression des gènes sous forme de protéines et par conséquent, donne une description moléculaire de l'état de la cellule plus précise mais surtout plus représentative du caractère dynamique du vivant (Lottspeich, 1999).

C'est avec l'arrivée de l'électrophorèse en deux dimensions (2D), mise au point par O'Farell (1975) et Klose (1975), que la protéomique prend ses racines. Pendant de nombreuses années, les protéines ont été étudiées individuellement ou par complexes sans qu'il ne soit possible d'avoir une véritable vue d'ensemble de l'état physiologique de la cellule (VanBogelen *et al.*, 1999). L'électrophorèse 2D faisant migrer les protéines en fonction de leur point isoélectrique (pI) lors de la première dimension puis selon leur masse moléculaire dans la seconde dimension, elle permet de séparer couramment plus de 1 000 protéines par gel (Arnott *et al.*, 1997). Les scientifiques dispose dès lors d'un moyen d'avoir un portrait global des protéines participant au maintien de la cellule dans des conditions de croissance données. L'apparition sur le marché de gradients de pH immobilisés dans l'acrylamide pour effectuer la première dimension a permis d'accroître la reproductibilité de ces gels et par le fait même les comparaisons de travaux sur un protéome provenant de différents laboratoires (Quadroni et James, 1999). Au départ, les protéines séparées par électrophorèse 2D ont été identifiées par la séquence de leur extrémité N-terminale déterminée par la dégradation d'Edman ou par immunoempreinte. Toutefois, c'est la spectrométrie de masse qui a fini par s'imposer puisqu'en plus de permettre une identification plus rapide des protéines, cette technologie offre la possibilité de voir les modifications qu'elles peuvent acquérir dans un contexte cellulaire (Roepstorff, 1997).

D'un gène, il est impossible de déduire quelles seront les modifications sur la séquence en acides aminés d'une protéine, ni le site où se feront ces modifications, ni le moment auquel elles se produiront. La protéomique a cet avantage sur la génomique de pouvoir suivre l'expression des différents isoformes d'une protéine dans la cellule. Un autre atout important de la protéomique, est sa capacité à mesurer l'abondance relative des différentes protéines et de leurs isoformes. Ce type de renseignement ne peut pas être fourni à partir des gènes et l'abondance relative des ARNm ne donne qu'une évaluation approximative de l'expression des protéines. En effet, plusieurs études montrent qu'il y a absence de corrélation ou une faible corrélation entre l'abondance relative en ARNm et l'abondance relative de certaines protéines dans la cellule (Anderson et Seilhamer, 1997 ; Skidmore et Beebee, 1990). La protéomique s'impose donc comme discipline de suivi des protéines dans la cellule.

Pour suivre les protéines, l'analyse par protéome se fait généralement selon les six étapes suivantes : l'obtention des protéines en solution, la séparation de ces protéines par électrophorèse 2D, l'excision des protéines d'intérêt du gel, la digestion de ces protéines dans le gel à l'aide d'une endoprotéase, l'analyse par spectrométrie des masses des peptides ou de leurs fragments (pour en déduire la séquence), l'identification des protéines par comparaison entre les données obtenues en spectrométrie de masse et les données retrouvées dans des banques de données non-redondantes. Au cours des prochaines pages, les avantages et les limites de cette façon de faire la protéomique seront abordés ainsi que les derniers outils mis au point pour aller au-delà des limites de l'électrophorèse 2D. Il sera également question de la manière dont les biologistes ont utilisé les protéomes soit par création de banques de données soit par l'étude de systèmes biologiques précis.

2.2.1 La technique au cœur de la protéomique

2.2.1.1 L'électrophorèse en deux dimensions

L'électrophorèse 2D est le moyen privilégié pour la séparation des protéines en protéomique. Deux facteurs en particulier sont responsables de cette popularité. Le premier facteur est la possibilité de séparer de façon relativement simple et uniforme jusqu'à 10 000 polypeptides par gel (Klose et Kobalz, 1995). Les gels d'électrophorèse 2D offrent donc une vue d'ensemble des protéines exprimées et ainsi facilitent la compréhension des relations complexes entre protéines (Haynes et Yates III, 2000). Deuxièmement, l'électrophorèse 2D demeure le meilleur moyen de séparer et de visualiser différents isoformes d'une même protéine (Harry *et al*, 2000). Par exemple, des protéines différentes entre elles que par un seul acide aminé peuvent être séparées. Les principales sources de la formation d'isoformes sont l'épissage alternatif du produit d'un même gène, la troncation en N ou en C terminale et les modifications co-traductionnelles ou post-traductionnelles, ce qui inclut entre autres : l'acétylation en N terminale, la glycosylation, la méthylation, la myristoylation, la palmitoylation, la phosphorylation et l'ubiquitination (Celis *et al.* 1996 et Celis *et al.* 2000). Par ce type d'analyse directe, le suivi de l'état de maturation de protéines, de leur transcription à leur dégradation en passant par leur forme active, se voit grandement facilité.

Malgré ces caractéristiques, l'électrophorèse 2D n'est pas une technique optimale pour la protéomique. Le temps important nécessaire à la réalisation de ces gels limite la possibilité de faire de la mise à grande échelle telle que pratiquée en génomique actuellement. La nature fragile des gels d'acrylamide limite également l'automatisation de la technique (Quadroni et James, 1999). Cependant, là où la critique est la plus sévère à l'endroit de l'électrophorèse 2D, c'est qu'il ne permet toujours pas de visualiser et de quantifier à lui seul l'ensemble des protéines exprimées par un génome alors que la protéomique se veut être la meilleure discipline pour ce genre d'études. Les propriétés physico-chimiques de certaines protéines, leur quantité dans le gel et les techniques de révélations sont les principales sources de ce problème.

2.2.1.1.1 Les propriétés physico-chimiques des protéines

Il est difficile de séparer adéquatement les protéines ayant des propriétés physico-chimiques extrêmes par électrophorèse 2D. Par propriétés physico-chimiques extrêmes, on entend des masses moléculaires élevées ou faibles, de l'hydrophobicité ou des pI très bas ou très hauts (O'Connor *et al.*, 2000).

Pour séparer des protéines par électrophorèse 2D, celles-ci doivent être avant tout solubilisées (Chambers *et al.*, 2000). Les protéines hydrophobes, dont font partie la plupart des protéines membranaires, s'avèrent particulièrement réfractaires à la solubilisation et donc sont peu étudiées en protéomique. Pourtant leurs rôles biologiques sont non-négligeables. Dans l'industrie pharmaceutique, les cibles les plus communes sont les récepteurs et les enzymes. Ces deux types de protéines étant souvent de nature hydrophobe, il devient primordial de résoudre ce problème (Schindler, Dorsselaer et Falick, 1993 ; Cutler *et al.*, 1999a). Non seulement les protéines doivent être solubilisées au moment de commencer la séparation par électrophorèse 2D mais elles doivent également le demeurer tout au long du processus. À ce sujet, les protéines hydrophobes ont tendance à précipiter lors de l'isofocalisation à l'approche de leur point isoélectrique (Hartinger *et al.*, 1996). Ces précipitations peuvent entraîner une importante perte d'échantillon.

Une fois les protéines solubilisées, elles doivent pouvoir pénétrer les gels pour y migrer. Ici, c'est la masse moléculaire qui cause problème. Les protéines de masse moléculaire élevée pénètrent difficilement le gel pour l'isofocalisation lors de la réhydratation de ce dernier en présence de l'échantillon. Au cours de la deuxième dimension, le problème de pénétration se répète avec les protéines dont la masse est supérieure à 200 kDa. Les protéines dont la masse est inférieure à 8 kDa migrent quant à elles avec le front. Il devient alors impossible de visualiser ces protéines par SDS-PAGE utilisant un tampon glycine généralement employé pour la deuxième dimension (Harry *et al.*, 2000).

Les protéines très basiques provoquent de l'électro-osmose et font varier indûment le courant lors de l'isofocalisation. Il s'en suit une moins bonne résolution de l'ensemble des protéines (Harry *et al.*, 2000).

Les limites de séparation par électrophorèse 2D font en sorte qu'il y a toujours masquage entre les protéines de masse moléculaire et de pI rapprochés. Sur la base d'algorithmes, il a été déterminé que 20 % des spots sur un gel d'électrophorèse 2D correspondaient à plus d'une protéine chez les procaryotes. Ce pourcentage passe à 40 % chez les eucaryotes (Parker *et al.*, 1998 ; Link *et al.*, 1997). Quoique les gels d'électrophorèse 2D puissent séparer un nombre important de protéines, cette technique n'offre pas encore la résolution nécessaire pour qu'elles soient toutes visualisées.

2.2.1.1.2 Les techniques de révélation des protéines après électrophorèse en deux dimensions

Une des limites importantes de l'électrophorèse 2D est la capacité de détection des protéines dans le gel. Ceci s'applique particulièrement pour les protéines qui se retrouvent en faibles quantités dans la cellule. Plusieurs de ces protéines sont responsables de la régulation cellulaire. L'impossibilité de révéler ces protéines devient une contrainte importante lorsqu'il s'agit de comprendre la régulation de voies métaboliques ou de signalisation (Gygi *et al.*, 2000). Idéalement, une technique de révélation devrait détecter l'ensemble des protéines dans un gel. Le choix d'une technique de révélation des protéines dans les gels après électrophorèse 2D est donc particulièrement important. Les colorants, les fluorophores et le marquage par radioactivité sont parmi les agents de révélation les plus utilisés en protéomique. Ces agents, en fonction de leur nature chimique, doivent être utilisés avant la première dimension, entre la première dimension et la seconde ou encore après la seconde dimension. Rabilloud (2000) traite de ce sujet en profondeur.

La coloration au bleu de Coomassie est la plus facile d'emploi et la plus reproductible. Cependant, la limite de détection de ce colorant est de l'ordre du subpicomole alors que le nitrate d'argent a une sensibilité allant jusqu'au femtomole. Il permet par conséquent de visualiser un plus grand nombre de protéines par gel (Quadroni et James, 1999). Les composés fluorescents tel le SYPRO, quoique étant légèrement moins sensibles que le nitrate d'argent, ont l'avantage de colorer en peu de temps les protéines sur un gel sans étape de fixation. Cette étape est requise avec les deux premiers types de coloration mentionnés. Le plus grand avantage des composés fluorescents est cependant la réponse linéaire entre l'intensité de la coloration de chaque spot dans le gel et la quantité de protéines qui s'y trouve (Lopez, 2000). Ces techniques de révélation n'offrent toutefois pas la sensibilité nécessaire pour détecter les protéines en faible quantité dans la cellule. Il reste alors le marquage à l'aide d'isotopes radioactifs. Cette méthode détecte des subattomoles de protéines (Quadroni et James, 1999). Cette technique présente aussi des désavantages dont le marquage par isotopes lors de la croissance des cellules qui demande un milieu de culture défini (ce qui n'est pas toujours le cas), le fait que certaines protéines au renouvellement faible dans la cellule ne soient pas marquées par cette technique et le danger inhérent à la manipulation de ce type de matériel (Celis *et al.*, 2000). Selon Rabilloud (2000), les techniques de révélation présentées ci-haut ont presque atteint leur sensibilité maximale. Il faudra donc se tourner vers de nouvelles techniques pour surmonter ces limites.

2.2.1.1.3 Des solutions aux problèmes rattachés à l'électrophorèse en deux dimensions

Conscients des problèmes rattachés à l'électrophorèse 2D, mais aussi de la valeur de cette technique pour l'analyse de protéomes, plusieurs chercheurs tentent d'améliorer cet outil. Le maintien des protéines en solution et l'augmentation de la quantité de protéines mise par gel sont les deux principaux facteurs étudiés.

Un premier travail a été effectué pour faciliter la solubilisation des protéines et éviter la précipitation de celles-ci en cours de route. La thiourée, un chaotrope utilisé

depuis peu, s'est avérée très efficace en présence d'urée. L'urée, le chaotrope utilisé à l'origine, sert maintenant à faciliter la solubilisation du nouveau venu. Le 3-[(3-cholamidopropyle)diméthylammonio]-1-propanesulfate (CHAPS), un détergent, est utilisé comme surfactant de choix puisque très soluble en présence de fortes concentrations d'urée. D'autres surfactants ayant de longues queues alkyles linéaires, un sulfobétaine, sont moins solubles que le CHAPS à de fortes concentrations de chaotropes mais ont un pouvoir surfactant plus élevé. Rabilloud *et al.* (1997) suggèrent différentes solutions de solubilisation pour prendre avantage de ces nouveaux sulfobétaines et de la thiourée. Ces nouveaux produits permettent d'augmenter la concentration en protéines de l'échantillon et donc de visualiser un plus grand nombre de protéines par gel. Il ne faut pas oublier que les détergents choisis pour solubiliser les protéines ne doivent pas modifier la charge de celles-ci pour obtenir une bonne séparation lors de la première dimension. Toujours pour optimiser la solution de solubilisation, Herbert *et al.* (1998) proposent enfin de remplacer le dithiotréitol (DTT) et le mercaptoéthanol par le tributylphosphine comme agent de réduction.

Pour visualiser les protéines en plus faibles quantités dans les cellules et obtenir une meilleure séparation des préparations protéiques, le préfractionnement des protéines est une option souvent retenue. Le préfractionnement peut s'effectuer selon plusieurs méthodes, en voici des exemples : la solubilisation séquentielle (Molloy *et al.*, 1998), la centrifugation différentielle ou avec gradient de Percoll pour séparer les organelles (Patton, 1999) et l'isofocalisation (Zuo et Speicher, 2000). En enrichissant un certain groupe de protéines, le préfractionnement réduit la complexité de l'échantillon et ainsi limite les risques de co-migration. De plus, il permet de visualiser certaines protéines présentes en plus petites quantités dans la cellule qui se retrouveraient autrement en trop faible concentration pour être identifiées. Quoique avantageuse, il ne faut pas abuser de cette technique. Chaque étape ajoutée diminue la reproductibilité, accroît les pertes en échantillons et augmente le temps de travail (Zuo et Speicher, 2000). L'utilisation de bandes d'acrylamide avec un gradient de pH très étroit est un autre outil permettant de visualiser plus de protéines et d'avoir une meilleure séparation de celles-ci (Corthals *et al.*, 2000).

2.2.1.2 La digestion

Une fois les protéines d'intérêt identifiées par l'électrophorèse 2D, celles-ci sont digérées. Ce sont les peptides obtenus qui seront analysés en spectrométrie de masse. Les protéines sont digérées soit à l'aide de protéases, soit avec des composés chimiques ayant une activité spécifique. Les protéases utilisées pour la digestion des protéines possèdent un K_M entre 5 et 50 mM (Quadroni et James, 1999). De celles-ci, c'est la trypsine qui est le plus couramment employée. En effet, les peptides obtenus suite à une digestion à la trypsine facilitent l'analyse par spectrométrie de masse (Jensen *et al.*, 1999). Des composés chimiques, c'est le bromure de cyanogène (CNBr) en solution acide qui est le plus souvent adopté. Il coupe spécifiquement les protéines après un résidu méthionine. Quadroni et James (1999) proposent plusieurs autres composés chimiques pouvant digérer de façon spécifique les protéines.

2.2.1.3 L'analyse par spectrométrie de masse

L'analyse par spectrométrie de masse des peptides obtenus peut fournir deux types d'informations : la masse des peptides et celle de leurs fragments (pour en déduire la séquence). C'est à partir de l'une ou l'autre de ces informations ou de ces deux informations combinées qu'il est possible d'identifier les protéines séparées par électrophorèse 2D (Yates III, 2000) uniquement par l'empreinte de leurs masses peptidiques, l'appareil utilisé sera le « Matrix-Assited Laser Desorption Ionisation » (MALDI) couplé à un spectromètre de *al.*, 1993). Parmi ces logiciels, on retrouve PepIdent et FidMod sur le site http://expasy.hcuge.ch (Quadroni et James, 1999). Si l'identification des protéines se fait masse dit « temps de vol » (« Time of Flight » (TOF)) (Henzel *et al.*, 1993). Le MALDI sert à l'ionisation des peptides et à leur passage en phase gazeuse. Les peptides fixés à une matrice cristalline sont soumis à l'énergie d'un laser. Suite à l'excitation rapide des molécules de la matrice, les peptides sont libérés sous formes d'ions gazeux. C'est sous cette forme qu'ils atteignent le TOF. Le TOF mesure le ratio de la masse du peptide sur sa charge (*m/z*) en fonction du temps pris

Tableau 2 : Protéases et composé chimique utilisés pour digérer les protéines à différents sites

Enzyme ou réactif	Site de clivage	Exceptions
Trypsine	C-term de K ou R	si P est en C-term de K ou R
Trypsine (C-term de K et R, même avant P)	C-term de K ou R	
Trypsine (haute spécificité)	C-term de K ou R	si P est en C-term de K ou R; dans les séquences suivantes : CKY, DKD, CKH, CKD, KKR, RRH, RRR, CRK, DRD, RRF ou KRR
Lys C	C-term de K	si P est en C-term de K
CNBr	C-term de M	
Arg C	C-term de R	si P est en C-term de R
Asp N	N-term de D	
Asp N + N-terminal Glu	N-term de D ou E	
Glu C (tampon bicarbonate)	C-term de E	si P est en C-term de E ; si E est en C-term de E
Glu C (tampon phosphate)	C-term de D ou E	si P est en C-term de D ou E ; si E est en C-term de D ou E
Chymotrypsine (C-term de F/Y/W/M/L, pas avant P, pas après Y si P est en C-term de Y)	C-term de F, L, M, W ou Y	si P est en C-term to F, L, M, W ou Y ; si P est en N-term de Y
Chymotrypsine (C-term to F/Y/W/, not before P, not after Y if P is C-term to Y)	C-term de F, Y ou W	si P est en C-term de F, Y ou W ; si P est en N-term de Y
Trypsine/Chymotrypsine (C-term de K/R/F/Y/W, pas avant P, pas après Y si P est en C-term de Y)	C-term de K, R, F, Y ou W	si P est en C-term de K, R, F, Y ou W ; si P est en N-term de Y
Pepsine (pH 1.3)	C-term de F ou L	
Pepsine (pH > 2)	C-term de F, L, W, Y, A, E ou Q	
Protéinase K	C-term de A, C, G, M, F, S, Y ou W	

N-term = N-terminale, C-term = C-terminale
Modifié de http://www.matrixscience.com/cgi/index.pl?page=../home.html

par l'ion pour parcourir une trajectoire précise. Le spectre obtenu permet de déduire la masse de tous les peptides de la protéine ayant été ionisés (Yates III, 1998). Le MALDI-TOF présente l'avantage d'être moins affecté que la nanoélectrovaporisation par les agents dénaturants et les tampons utilisés pour la préparation des peptides. Les protéines en faible quantité dans la cellule peuvent être alors plus facilement analysées (Beavis et Chait, 1990). Toutefois, l'identification des protéines par la masse de leurs peptides a souvent été considérée comme insuffisante puisque les masses des peptides peuvent varier suite à des modifications post-traductionnelles ou à des modifications induites par le traitement des protéines pour leur séparation par électrophorèse 2D (Müller *et al.*, 1999).

Pour faciliter l'identification des protéines, il est possible de séquencer leurs peptides. Le spectromètre de masse en tandem (SM/SM) avec une cellule de collision est alors l'instrument approprié. Les peptides qui pénètrent le SM/SM sont généralement ionisés par nanoélectrovaporisation. Les peptides en solution d'une protéine sont alors soumis à un champ électrique intense qui évapore rapidement le solvant et entraîne les peptides sous formes d'ions gazeux à l'intérieur du premier spectromètre de masse. Ce premier spectromètre est un quadripôle (Q) composé de quatre tiges de métal parallèles. Un champ électrique est créé entre les tiges en faisant varier le voltage DC sur celles-ci. Le champ ainsi généré permet de filtrer les ions peptidiques. Les peptides sont ensuite dirigés vers un détecteur qui mesure leur valeur de *m/z*. À cette étape, le résultat est similaire à celui obtenu sur un MALDI/TOF (figure 5). Pour obtenir la séquence d'un peptide, celui-ci doit être filtré par le premier quadripôle et être dirigé vers la cellule de collision. Dans cette cellule, le peptide se fragmente suite au transfert d'énergie provenant des atomes d'argon qui s'y trouvent. Les fragments peptidiques résultants sont dirigés vers un deuxième spectromètre de masse qui peut être un autre quadripôle (on parle alors de triple quadripôle) ou un TOF (on parle alors de Q-TOF) (Morris *et al.*, 1996). Chaque différence de masses des fragments peptidiques correspond à la masse d'un acide aminé. Il est dès lors possible de retrouver une partie de la séquence du peptide (Yates, 1998) (figure 5). De ces courtes séquences en acides aminés, appelées

étiquettes, une protéine peut être identifiée. Plusieurs logiciels permettent l'identification de protéines en comparant les étiquettes d'une protéine aux séquences retrouvées dans les banques de données. Certains de ces logiciels sont à même d'interpréter les spectres de SM/SM dont FragFit (http://prowl.rockfeller.edu/) et MS-Tag (http://prospector.ucsf.edu/) (Quadroni et James, 1999). L'analyse par Q-TOF offre une sensibilité similaire au MALDI-TOF, possède une résolution dix fois supérieure à ce dernier et en plus de donner la masse des peptides permet d'avoir la séquence de ceux-ci. Par conséquent, ce type d'appareillage s'avère le plus approprié pour faire de la protéomique. En ce qui concerne le triple quadripôle, il possède les mêmes avantages que le Q-TOF exception faite de sa sensibilité qui est moindre (Schindler, Van Dorsselaer et Falick, 1993). L'identification de protéines à partir des séquences de leurs peptides couplée à l'identification à partir de l'empreinte des masses peptidiques offre encore les résultats les plus sûrs.

Qu'importe la technique d'analyse choisie pour l'identification des protéines, celle-ci demeure assujettie aux protéines déjà répertoriées dans les banques de données. Ainsi, il est plus difficile d'identifier les protéines d'organismes moins populaires (Harry *et al.*, 2000).

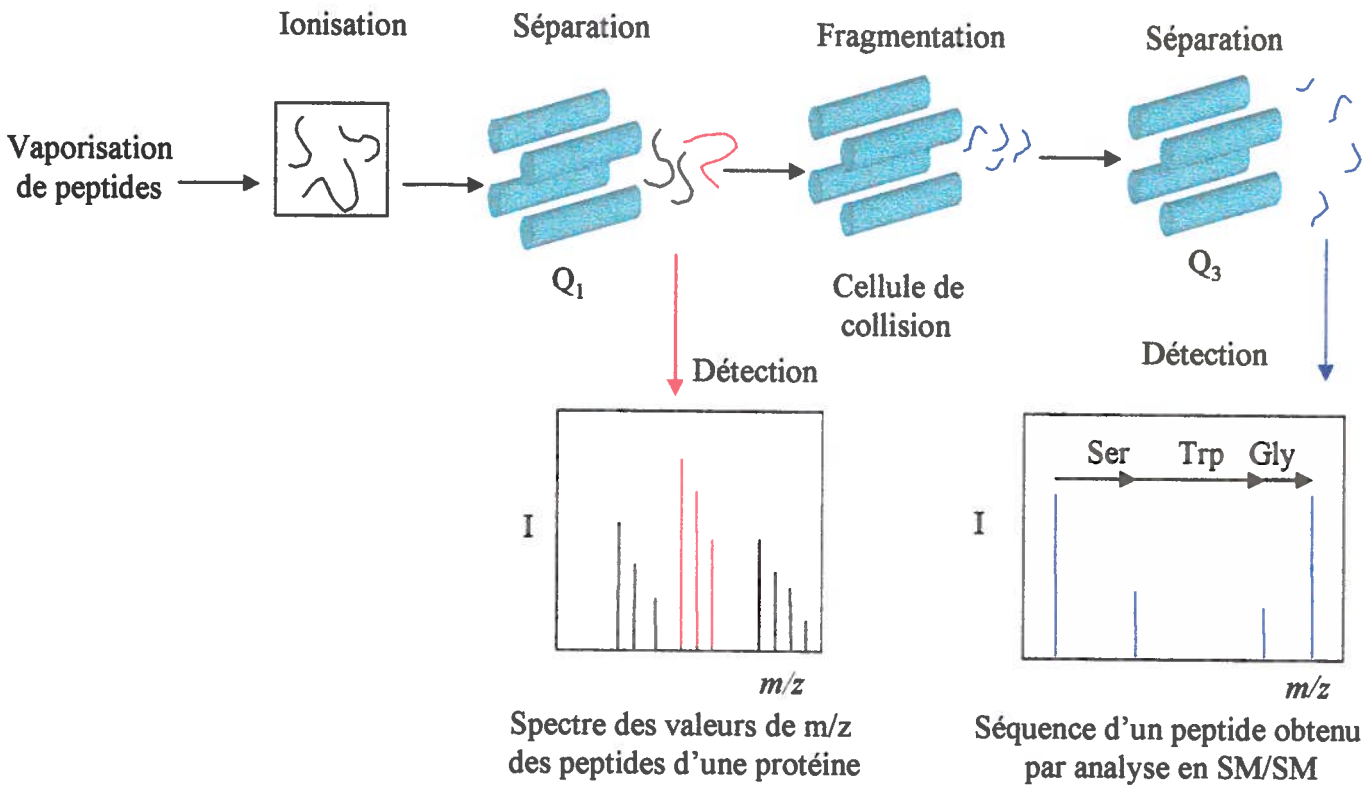


Figure 5 : Schéma de l'analyse de peptides sur un triple quadripôle. Les peptides sont d'abord ionisés puis vaporisés. Lors du passage dans le premier quadripôle les peptides sont filtrés selon le ratio masse sur charge (*m/z*) vers un détecteur. Si le balayage des valeurs de *m/z* est large, il en sort un spectre avec l'empreinte des masses peptidiques d'une protéine. Par la suite, le premier quadripôle peut filtrer un à un les ions peptidiques pour les fragmenter dans la cellule de collision. La fragmentation se faisant au lien peptidique, les pics du spectre obtenu à la sortie du dernier quadripôle correspondent aux valeurs de *m/z* du peptide amputé aléatoirement de certains de ces acides aminés. La différence de masse entre les fragments peptidiques donne la masse des acides aminés constituant le peptide et donc sa séquence.

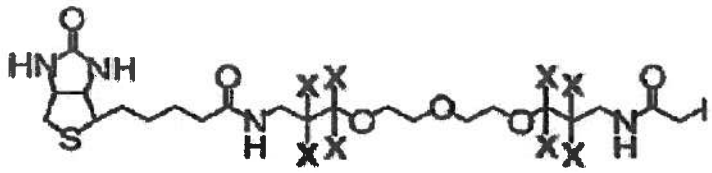
2.2.1.4 Des techniques pour aller au-delà de l'électrophorèse 2D en deux dimensions

Comme vu précédemment, l'électrophorèse 2D, quoique permettant la visualisation d'un large spectre de protéines, possède des limites. Pour accélérer l'analyse de protéomes et visualiser les protéines ayant des propriétés physico-chimiques extrêmes, de nouvelles techniques de séparation sont apparues. Seulement deux de ces techniques seront présentées ici.

La première de ces techniques consiste à une séparation des peptides par chromatographie liquide à haute pression (CLHP) multidimensionnelle. Les protéines d'une cellule sont réduites puis digérées avec la trypsine. Le mélange de peptides est ensuite déposé sur une colonne microcapillaire fortement échangeuse de cations. Une première fraction de ces peptides est éluée vers une colonne en phase inverse à l'aide d'un gradient de sel. Dans la colonne en phase inverse, les peptides sont nettoyés de leurs sels et de leur tampon puis sont élués avec de l'acétonitrile vers un SM/SM où se fait l'analyse de séquence. Le procédé reprend de nouveau en augmentant la concentration de sel dans la colonne échangeuse de cations. Le procédé peut ainsi séparer les peptides en plus de dix fractions différentes selon le type d'échantillon. (Link *et al.*, 1999). Cette technique en plus d'être plus rapide que l'électrophorèse 2D permet d'analyser un plus large spectre de protéines puisque non-restreinte dans l'utilisation de détergents.

La seconde technique est basée sur le marquage des protéines par des étiquettes d'affinité avec un code isotopique (ICAT pour « Isotope-Coded Affinity Tags »). Un site d'attachement à une colonne d'affinité, un groupement réagissant de façon spécifique avec les cystéines et un corps auquel sont incorporés les marqueurs isotopiques composent le ICAT (figure 6). Ce dernier vient en deux formes : lourde avec huit deutériums et légère où les deutériums sont substitués par des hydrogènes. Les protéines représentant deux états cellulaires différents sont marquées respectivement par le ICAT lourd et léger. Celui-ci s'attache aux groupements thiols des cystéines. Les protéines provenant des deux états cellulaires sont combinées après le marquage pour la protéolyse.

Les peptides résultants passent alors à travers une colonne d'affinité. Seuls les peptides marqués avec le ICAT, donc contenant une ou des cystéines, sont alors retenus par la colonne. Par la suite, les peptides marqués sont élués à travers un CLHP micro-capillaire pour être séparés en fonction de leur hydrophobicité. Des peptides ayant la même séquence en acides aminés mais issus d'états physiologiques différents sont facilement identifiables sur le chromatogramme puisque essentiellement co-élués. Après le passage sur CLHP, les peptides sont analysés par un SM/SM. Il est alors possible de voir la différence de masse de 8 Da entre les peptides provenant de cultures cellulaires différentes ainsi que leur abondance relative (figure 7). L'utilisation du ICAT offre les mêmes avantages que l'identification des protéines par CLHP multidimensionnelle avec moins de données à analyser puisque seuls les peptides contenant des cystéines sont retenus. Toutefois, c'est la possibilité de faire une analyse semi-quantitative qui rend cette technique attrayante. Par contre, cette technique ne permet pas de visualiser les différents isoformes d'une même protéine comme par l'électrophorèse 2D. Ceci est particulièrement vrai si la différence entre les isoformes se situe sur un peptide n'ayant pas de cystéine (Gygi *et al.*, 1999).



Biotine Lien (lourd ou léger) Groupement réactif spécifique aux thiols

Figure 6 : Structure du réactif « Isotope-Coded Affinity Tags » (ICAT). Le réactif ICAT est composé de trois sections. Une biotine qui sert lors de la purification des peptides liés au réactif, un lien pouvant être marqué d'isotopes stables et un groupement réactif spécifique aux thiols (cela permet de marquer spécifiquement les peptides ayant des cystéines). Le réactif se trouve sous deux formes : lourde (contant huit deutériums «X») ou légère (contenant huit hydrogènes «X»).

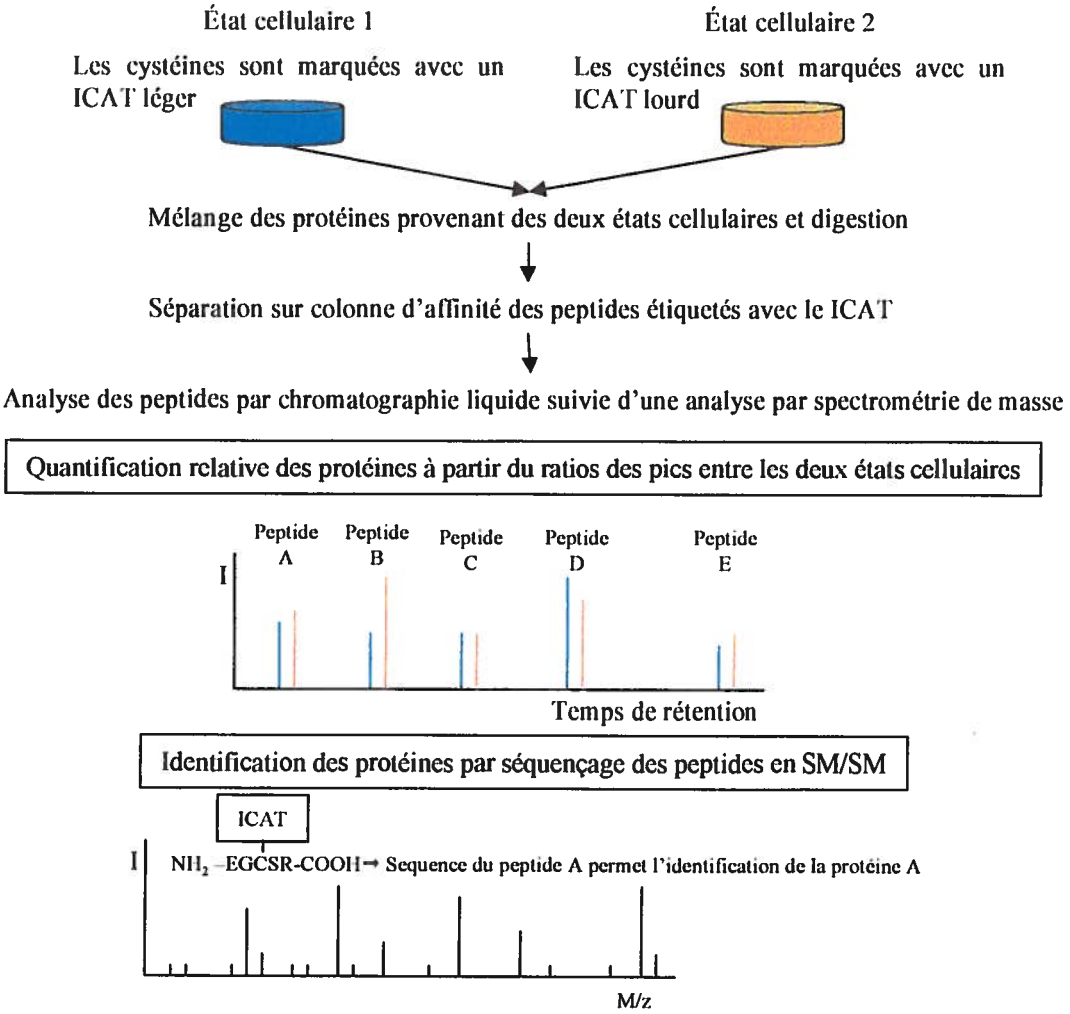


Figure 7 : Le réactif « Isotope-coded affinity tags » (ICAT) et la semi-quantification de l'expression différentielle de protéines. Les protéines de deux états cellulaires sont respectivement marquées avec des ICAT d'isotopes légers et lourds : le réactif ICAT se lie aux cystéines des protéines. Les protéines marquées des deux états cellulaires sont mélangées avant la protéolyse. Les peptides marqués par un ICAT sont isolés sur une colonne d'affinité en utilisant le groupement biotine. Ces peptides sont séparés par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en microcapillaires. Les peptides identiques étiquetés d'un ICAT provenant des deux états cellulaires sont facilement identifiables puisque co-élués en CLHP et présentant une différence de 8 Da sur spectre de masses. Le ratio des quantités de protéines retrouvées dans les deux états cellulaires est maintenu dans les fragments peptidiques. Ce ratio est calculé à partir des aires sous la courbe dans le chromatogramme des paires peptidiques et permet d'évaluer l'abondance relative des protéines dans les deux états cellulaires. Une analyse SM/SM sur les peptides en permet le séquençage (modifié de Gygi *et al.*, 1999).

2.2.2 La recherche et la protéomique

Même si la protéomique est une discipline encore jeune, deux façons de la pratiquer se côtoient déjà. D'un côté, des chercheurs établissent des banques de données sous forme de gels d'électrophorèse 2D annotés représentatifs d'organismes, d'organes ou de tissus dans des états physiologiques donnés. Ces banques de données sont à l'image de ce qui se fait en génomique. De l'autre côté, des chercheurs utilisent les outils fournis par la protéomique afin de mieux comprendre une à une les voies métaboliques et de signalisations d'organismes. Les projets protéomes, que ce soit sous une forme ou une autre, se multiplient. Parmi les projets d'envergure, on retrouve entre autres : *Saccharomyces cerevisiae* (Hodges, Payne et Garrels, 1998), *Mycobacterium tuberculosis* (Urquhart *et al.*, 1997), *Haemophilus influenzae* (Link *et al.*, 1997), *Escherichia coli* (VanBogelen *et al.*, 1997), *Rhizobium leguminosarum* (Guerreiro *et al.*, 1997), le foie humain, le plasma humain (Appel *et al.*, 1993), les fibroblastes humains, le sérum de rat (Celis *et al.*, 1996) et les reins de souris (Haynes *et al.*, 1998a).

2.2.2.1 La protéomique au service des banques de données

Avec l'arrivée de banques de données sur le protéome d'organismes, il est désormais possible d'obtenir des informations complémentaires au génome. Le développement de ce type de données vise à faciliter le travail de recherche. À partir du moment où les banques de données seront bien inter-reliées via le Web, les chercheurs auront non seulement accès à la séquence d'une protéine mais également à sa structure, aux modifications post-traductionnelles qu'elle a subies, à sa localisation dans la cellule, aux voies auxquelles elle participe, etc. Déjà, des banques de données de ce type sont disponibles (Celis, *et al.*, 2000). Aucune d'elles ne peut cependant se targuer de fournir toutes les informations citées ci-haut. Selon Haynes *et al.* (1998b), les banques de données suivantes montrent une avance intéressante en ce qui concerne l'analyse de protéome puisque contenant un large éventail d'informations sur chacune des protéines

identifiées positivement : « yeast protein database » (YPD) (http://www.proteome.com/YPDhome.html) (Garrels, 1995) et « human 2D-PAGE databases » du «Danish Center for Human Genome Research » (http://biobase.dk/cgi-bin/celis) (Celis *et al.* 1996).

L'utilisation des protéomes pour constituer des banques de données demeure une approche difficile. Vu le caractère dynamique du protéome d'un organisme, comment choisir quels seront les gels obtenus après électrophorèse 2D qui le représenteront ? Ces banques de données risquent de limiter un type de cellule à un état physiologique donné. Pour pouvoir utiliser ces banques de données, une description précise des cellules utilisées, de leur croissance et du traitement de l'échantillon devra accompagner chaque résultat présenté (Haynes *et al.*, 1998b). L'autre problème rattaché à l'établissement de banques de données sur les protéomes est d'ordre technique. Afin de construire des banques de données en protéomique ayant l'envergure de celles en génomique, encore faut-il pouvoir générer et analyser dans un temps raisonnable les informations nécessaires à leur construction. Il n'existe pas à ce jour de système entièrement automatisé efficace pour faire l'étude de protéome à partir de gels après électrophorèse 2D qui permettrait d'accroître l'efficacité de cette technique (Lottspeich, 1999).

2.2.2.2 La protéomique comme outil d'analyse biologique

Une approche pragmatique de la protéomique est de l'utiliser afin de mieux comprendre des systèmes biologiques donnés. Contrairement à la biochimie classique, plusieurs variables peuvent être étudiées à la fois (par exemple : la phosphorylation, le taux de synthèse, le niveau d'expression, etc.) et ce, théoriquement, sur autant de protéines qu'il y en a dans l'échantillon (Haynes, 1998b). La signature protéomique d'une cellule dans un état physiologique donné est à la base de ce type d'analyse. Cette signature est obtenue par la séparation des protéines dans un gel après électrophorèse 2D (VanBogelen, 1999). Puisque la séparation par électrophorèse 2D n'est pas encore

adaptée à tous les types de protéines, une incertitude demeure sur le caractère achevé de la description de systèmes biologiques via une étude protéomique (Haynes, 1998b).

Les milieux pharmaceutique et médical se sont avérés particulièrement intéressés par l'utilisation de la protéomique comme outil d'analyse biologique. Ce nouvel outil leur permet, entre autres, de mieux comprendre la résistance aux antibiotiques chez les bactéries et d'identifier ces bactéries résistantes via leur signature protéique (Cash *et al.*, 1999), d'identifier les facteurs de virulence chez les microorganismes pathogènes (Cash, 2000), de voir l'effet toxique de médicaments sur les tissus et les organes lors de test chez les animaux (Cutler *et al.*, 1999b), d'identifier des souches bactériennes très rapprochées (Gormon et Phan-Thanh, 1995), de mieux comprendre des maladies tels les cancers (Franzen *et al.*, 1996) ou les maladies neurodégénératives (Tsuji, 1999) afin d'identifier de nouvelles cibles pour lutter contre celles-ci ou développer des tests diagnostiques précoces.

3. Matériel et méthodes

3.1 Aspect microbiologique et activité de déshalogénation

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

La souche *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 (ATCC 700357) a été isolée par Bouchard *et al.* (1996) d'un consortium bactérien anaérobie capable de dégrader le PCP par fermentation méthanique (Juteau *et al.*, 1995a, 1995b). La souche a été conservée sous forme lyophilisée. Pour les fins de la présente recherche, la souche a été maintenue en milieu de culture anaérobie dans des bouteilles sérologiques de 70 mL.

3.1.2 Milieu de culture de Desulfitobacterium frappieri *PCP-1*

Desulfitobacterium frappieri PCP-1 a été cultivé dans un milieu liquide anaérobie (MLA) inspiré de celui de Boyd *et al.* (1983). Dans un litre de milieu, on retrouve les composés suivants : 0,27g de KH_2PO_4 ; 0,35g de K_2HPO_4 ; 0,53g de NH_4Cl (J.T. Baker, Phillpsburg, N.J.) ; 0,14g de $MgCl_2 \bullet 6H_2O$; 0,05g de $Na_2S \bullet 9H_2O$ (Mallinckrodt, Paris, K.Y.) ; 0,073g de $CaCl_2 \bullet 2H_2O$ (Fisher Scientific Company, Fair Lawn, N.J.) ; 0,002 g de $FeCl_2 \bullet 4H_2O$ (Merck, Montréal, Qc) ; 0,001g d'extrait de levures (Difco, Détroit, MI) ; 6,05g de pyruvate (Sigma, St-Louis, MO) ; 0,01g de 2,4,6- TCP (Aldrich, Milwaukee, WI) et 0,001 g de résazurine (Sigma, St-Louis, MO). À cette solution, un volume de 10 mL d'une solution stock de minéraux est ajouté. Cette solution stock comprenait 0,1g par litre de chacun des minéraux suivants : $MnCl_2 \bullet 2H_2O$; $ZnCl_2$; $CoCl_2 \bullet 6H_2O$; H_3BO_3 (J.T. Baker, Phillipsburg, N.J.) ; $Na_2MoO_2 \bullet 2H_2O$ (Anachemia, Montréal, Qc). Ces solutions ont été préparées dans de l'eau déionisée comme pour l'ensemble des solutions qui seront présentées au cours des prochaines pages. Le pH du MLA a été ajusté à 7,5 avec du K_2HPO_4. Le MLA a été rendu anaérobie par ébullition durant 1 h dans un ballon fixé à une colonne de refroidissement. Afin de chasser l'oxygène résiduel, le MLA a été barboté pendant 5 min. avec un mélange gazeux composé de 10 % de H_2, 10 % de CO_2 et 80 % de N_2 (Médigas, St-Laurent, Qc). Le milieu a été stérilisé par autoclavage. Le

pyruvate, le Na_2S, le $FeCl_2 \bullet 4H_2O$ et le 2,4,6-TCP ont été solubilisés dans de l'eau bouillie puis stérilisés par filtration (0,2 µm) avant d'être ajoutés au MLA autoclavé. Il en a été de même avec le $CaCl_2 \bullet 4H_2O$ uniquement pour les deuxièmes productions de *D. frappieri* induit et non-induit pour la déshalogénation réductrice en position *ortho*. La résazurine a été utilisée comme indicateur de potentiel rédox. Le Na_2S a servi à la réduction du milieu pour maintenir les conditions anaérobies. Le pyruvate et l'extrait de levures ont fourni les apports en carbone et en énergie essentiels à la croissance de la souche PCP-1. La déshalogénation réductrice en position *ortho* a été induite par le 2,4,6-TCP. Ce dernier composé a donc été omis pour les cultures témoins où la souche PCP-1 n'était induite pour aucun type de déshalogénation.

Trois volumes de MLA ont été utilisés. La souche a d'abord été maintenue par repiquages successifs dans des bouteilles sérologiques de 70 mL (Canlab, Pointe-Claire, Qc) contenant 36,5 mL de MLA. Lors des productions de biomasse utilisée pour le fractionnement cellulaire et la préparation des fractions cytoplasmiques et membranaires, des bouteilles de Schott d'un litre contenant 484 mL de milieu et des bouteilles de verre de quatorze litres contenant 8,77 L de milieu ont été utilisées. Pour ces derniers volumes, des modifications ont été apportées par rapport à la description faite ci-haut. L'étape d'ébullition des milieux a été substituée par l'autoclavage de ceux-ci avant le barbotage avec le mélange gazeux (H_2 : CO_2 : N_2) pendant 1 h. Une fois le milieu réduit, le pH a été équilibré avec une solution stérile et saturée de $NaHCO_3$ à raison de 5,75 mL/L pour les bouteilles Schott et 6,29 mL/L pour les bouteilles de verre de 14 L.

3.1.3 Travail 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, Orégon). Le mélange gazeux dans la chambre anaérobie est composé de 10 % de H_2, 10 % de CO_2 et 80 % de N_2 (Médigas,

St-Laurent, Qc). Cette enceinte est non-stérile et permet le travail à mains nues pour plus de dextérité.

En ce qui concerne les solutions servant à la production du MLA et des fractions cellulaires, celles-ci ont été rendues stériles généralement selon la procédure suivante. Un bécher en verre contenant la solution à rendre anaérobie et un barreau magnétique ont été déposés dans une jarre anaérobie ayant une entrée et une sortie pour les gaz de même qu'un manomètre permettant de suivre la pression à l'intérieur du contenant. L'ensemble a été déposé sur une plaque agitatrice (Corning Hot Plate Stirrer, modèle PC 351) afin de mélanger la solution à vitesse élevée. La sortie était reliée à une pompe à vide alors que l'entrée était fixée à une bonbonne de gaz contenant le mélange décrit plus tôt de H_2 : CO_2 : N_2. La solution est demeurée sous vide pendant 5 à 10 min. avant de faire une dizaine de lavages avec le mélange gazeux en alternant l'entrée de gaz et le vide. Le dernier cycle se termine par une entrée du mélange gazeux. Par la suite, la jarre anaérobie et son contenu sont introduits dans la chambre anaérobie. La solution est alors sortie pour être distribuée dans des bouteilles sérologique de 70 mL (Canlab, Pointe-Claire, Qc) qui sont scellées avec des bouchons de butyle (Geo-Microbial Technologies, Ochelata, N.J.). Les bouteilles peuvent être alors retirées de la chambre anaérobie. Ces solutions anaérobies furent prélevées par la suite en transperçant le bouchon à l'aide d'une seringue.

3.1.4 Production de la biomasse

Le protocole utilisé pour l'obtention des fractions membranaires de la souche PCP-1 est inspiré de Ni, Fredrickson et Luying Xun (1995). La souche PCP-1 a d'abord été repiquée de façon successive dans les bouteilles sérologiques de 70 mL en présence ou en absence de 2,4,6-TCP afin d'obtenir des cultures dont la déshalogénation en position *ortho* serait induite ou non. Quatre lots de la souche PCP-1 ont été produits : pour deux de ces lots, il y avait absence d'activité de déshalogénation alors que pour les deux autres lots, l'activité de déshalogénation en position *ortho* était présente. Le premier lot non-induit pour la déshalogénation a été préparé à partir d'une culture de PCP-1 qui a

été maintenue par repiquage dans le MLA en présence de 2,4,6-TCP depuis près de deux ans. Le second lot non-induit et les deux lots induits pour la déshalogénation en position *ortho* ont été réalisés à partir d'une culture de PCP-1 qui avait été décongelée un mois plus tôt puis maintenue dans le MLA en présence de 2,4,6-TCP. Pour le premier lot non-induit, onze repiquages ont été effectués en absence de 2,4,6-TCP avant la production de la biomasse alors que pour le second lot non-induit, il y en a eu quatre. Ces repiquages avaient pour but de s'assurer que la réaction de déshalogénation réductrice en position *ortho* était bien réprimée chez la souche. Tout le travail a été effectué avec des duplicatas pour les lots non-induits et induits pour la déshalogénation en position *ortho*. Les milieux de culture ont toujours été inoculés avec 5 % (v/v) d'une culture liquide de la souche PCP-1 en phase exponentielle de croissance. La souche a été maintenue à 37 °C sans agitation.

À partir des bouteilles de 70 mL, un volume de 30 mL a été prélevé pour inoculer une bouteille Schott contenant 484 ml de milieu. Cette pré-culture, après incubation pendant 22 h sans agitation à 3 °C, a été utilisée pour ensemencer la bouteille de verre de 14 L contenant 8,77 L de MLA. La première culture non-induite a été incubée pendant 6 h 45 à 37 °C puis à 29 °C; la seconde culture non-induite ainsi que les deux cultures induites n'ont été incubées qu'à 29 °C. Toutes les cultures ont été incubées jusqu'à ce qu'une densité optique de 0,6 soit atteinte. Toutes ces cultures ont été incubées en absence d'agitation.

À la fin de chacune de ces étapes, les paramètres suivants ont été évalués grâce à des échantillons prélevés stérilement à l'aide d'une aiguille et d'une seringue. La mesure de la densité optique des cultures a été faite à partir d'échantillons de 1,5 mL. La densité optique a été mesurée au spectrophotomètre (SP6-550 UV/VIS, Canlab PYE UNICAM) à une longueur d'onde de 600 nm. Le témoin négatif utilisé pour la lecture de la densité optique était de l'eau déionisée. La pureté des cultures était évaluée via une observation en microscopie photonique après une coloration de Gram (Difco, Détroit, MI) d'un échantillon. Le pH des cultures a été mesuré avec un pH mètre (pH meter 125, Corning) : 1 mL d'échantillon était nécessaire pour effectuer cette mesure. Si le pH du MLA

s'éloignait trop de la valeur 7,5, il était ajusté avec une solution stérile de $NaHCO_3$ solubilisé à saturation.

3.1.5 Fractionnement cellulaire

Lorsque les cultures ont atteint une densité optique de 0,6, soit après une période allant de 21 à 45 h selon que la température d'incubation était de 37 °C ou de 29 °C, les biomasses ont été récoltées par centrifugation. Les cultures de 9,25 L ont été distribuées dans des bouteilles de polycarbonate de 500 mL pour une centrifugation de 20 min., à 9 000 x g, à 4 °C (Avanti J-25 Centrifuge, Beckman). Le rotor utilisé était le JLA-10.5. Les surnageants ont été jetés. Ces opérations ont été effectuées à l'air libre en minimisant les entrées en oxygène.

Dans la chambre anaérobie, les culots ont été resuspendus dans 300 mL d'un tampon entre 4 et 10 °C de phosphate potassium 0,05 M, pH 7,5 contenant 1mM de dithiothréitol (DTT) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Le DTT agissait ici comme agent réducteur pour le milieu. Les cellules resuspendues ont à nouveau été centrifugées dans une bouteille de polycarbonate pendant 20 min., à une vitesse de 9 000 x g, à 4 °C (Avanti J-25 Centrifuge, Beckman). Les culots ont été, par la suite, resuspendus dans 100 mL du même tampon mais additionné de phénylméthylsulfonylfluoride (PMSF) (Sigma, St-Louis, MO) à une concentration de 1 mg par 100 mL de tampon. Le PMSF a été ajouté sous forme de 1,25 mL d'une solution contenant 5 mg de PMSF dissouts dans 4,5 mL d'éthanol anhydre et de 0,5 mL d'eau. Le PMSF est un inhibiteur de protéases. Les suspensions cellulaires ont été homogénéisées à l'aide d'une pipette de 10 mL en verre borosilicate.

Les cellules ont par la suite été brisées par deux passages à la presse de French (5-598A, Aminco, Silver Spring, MA) à une pression de 18 000 psi. Pour que cette opération se fasse en anaérobie, les suspensions cellulaires ont été transvidées dans un flacon Erlenmeyer de 125 mL relié à l'entrée de la presse de même qu'à un ballon contenant le mélange gazeux (H_2 : CO_2 : N_2) décrit plus tôt. À la sortie de la presse, un

second flacon Erlenmeyer était fixé et prêt à recevoir les lysats cellulaires. Tout ce système est demeuré clos. Pour faire le second passage à la presse de French, les flacons Erlenmeyer ont été tout simplement interchangés, toujours à l'abri de l'oxygène.

Dans l'enceinte anaérobie, les lysats cellulaires ont été transvidés dans des tubes en plastique pour être centrifugés pendant 30 min., à 17 000 x g, à 4 °C (Avanti J-25 Centrifuge, Beckman). Le rotor utilisé était le JA-20. La centrifugation terminée, les surnageants ont été redistribués dans des tubes de polycarbonate de 40 mL en condition anaérobie puis centrifugés pendant 90 min., à 40 K, à 4 °C (Ultra centrifugeuse L5-65, Beckman). Le rotor utilisé était le Avanti Ti 60. Les surnageants constituaient les fractions cytoplasmiques. Ces fractions ont été aliquotées dans des bouteilles sérologiques de 70 mL puis conservées dans un congélateur (Revco) à -80 °C. Les culots qui constituaient les fractions membranaires de la souche PCP-1 ont été resuspendus dans 10 mL d'un tampon de phosphate de potassium (0,05 M, pH 7,5) additionné de DTT 1 mM et de glycérol 20 % (v/v). Ces suspensions ont été aliquotées à raison de 1 mL par bouteille sérologique de 5 mL. Ces bouteilles ont été fermées hermétiquement avec des bouchons de butyle puis conservées à -80 °C.

3.1.6 Dosage de l'activité de déshalogénation

Le dosage de l'activité de déshalogénation en position *ortho* des fractions membranaires a été effectué à partir des préparations décongelées pour chacun des lots. Pour chacun de ces préparations, un prélèvement de 0,1 mL a été resuspendu dans 1 mL d'un tampon de phosphate de potassium 0,05 M, pH 7 contenant 1 mM de DTT. L'essai d'activité de déshalogénation du 2,4,6-TCP a été effectué en ajoutant 5 µl de chacune des suspensions membranaires à 1,95 mL d'un tampon d'activité enzymatique (TAE) dans des bouteilles en borosilicate de 12 mL fermées hermétiquement avec des bouchons de butyle. Le TEA est composé d'un tampon de phosphate de potassium 0,1 M, pH 7, 20 % (v/v) de glycérol (qualité CLHP, BDH Inc., Toronto, Ont.) ; 2 mM de méthyl viologen (Sigma, St-Louis, MO) ; 2 mM de citrate de titane (III) et de 1 mM de 2,4,6-TCP (modifié de Ni *et al.*, 1995). La solution de citrate de titane a été préalablement préparée

dans la chambre anaérobie. Dans un premier temps, le chlorure de titane (III) (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) a été solubilisé dans de l'eau déionisée anaérobie dans une proportion de 15 % (p/v). À 5 mL de cette solution, 45 mL d'une solution 0,2 M de citrate de sodium (J.T. Baker, Phillispsburg, N.J.) ont été ajoutés. Le pH de la solution a finalement été ajusté à 7 avec une solution anaérobie saturée en carbonate de sodium (Fisher Scientific Company, Fair Lawn, N.J.). La solution de citrate de sodium a été conservée à 4 °C à l'obscurité dans une bouteille sérologique en borosilicate.

Les bouteilles contenant le TAE et un échantillon des fractions membranaires ont été incubées pendant 2 h dans un bain-marie à 37 °C. Une fois l'incubation terminée, les réactions ont été arrêtées par l'ajout de 1 mL d'une solution d'acétonitrile (qualité CLHP, Mallinckrodt, Pointe-Claire, Qc) contenant de l'acide acétique 0,33 % (v/v) (Mallinckrodt, Pointe-Claire, Qc). Avec une pipette Pasteur, les solutions ont été transférées dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL et centrifugées 5 min. à 15 000 x g (Biofuge A, Canlab, Pointe-Claire, Qc). Les surnageants ont été recueillis pour faire l'analyse du contenu en chlorophénols par CLHP (voir la section 3.1.7). Au cours de ces essais, s'il y avait activité de déshalogénation en position *ortho*, le 2,4,6-TCP était dégradé en 2,4-dichlorophénol (2,4-DCP). Tous les dosages ont été faits en duplicata.

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

Le matériel utilisé pour l'analyse était composé d'un CLHP (modèle 600), d'un spectrophotomètre (modèle 486) et d'un injecteur automatique (modèle 717 Plus) tous de la compagnie Waters (Mississauga, Ont.). Le logiciel Millenium Software Chromatography Manager, version 2.15.01 installé sur un ordinateur Digital Celebris (modèle 590) a contrôlé le système. La colonne hydrophobe utilisée était une NovaPak C_{18} (3,9 x 150 mm).

Pour créer le gradient nécessaire à la séparation des chlorophénols sur la colonne, deux phases mobiles ont été utilisées. La phase mobile A était composée d'eau déionisée

et d'acide acétique 0,1 % (v/v) alors que la phase mobile B était composée d'acétonitrile et d'acide acétique 0,1 % (v/v). La phase A a été filtrée sur un filtre Gelman FP-450 (FP-vericel pour CLHP) 0,45 µm alors que des filtres Gelman Nylaflo 0,2 µm ont été utilisés pour la phase B. Par la suite, les deux phases ont été barbotées avec de l'hélium (Médigas, St-Laurent, Qc) pendant 15 min.

La séparation et la quantification des chlorophénols ont été effectuées selon le programme suivant : la colonne était équilibrée avec un mélange composé à 70 % de la phase mobile A et de 30 % de la phase mobile B à un débit de 2 mL/min. Ce débit était maintenu tout au long du programme d'une durée de 13 min. Au cours des 4^{ières} min., la concentration de la phase mobile B augmentait à 55 % alors que la concentration de la phase mobile A chutait à 45 % et ce de façon linéaire. Ces concentrations ont été maintenues jusqu'à la 10ième min. À cet instant, les conditions de départ étaient restaurées par un gradient concave afin de rééquilibrer la colonne. L'analyse des chlorophénols a été effectuée à une longueur d'onde de 220 nm. Le temps de rétention des chlorophénols ainsi que l'étalonnage ont été suivis régulièrement.

3.2 Électrophorèse en deux dimensions

3.2.1 Solubilisation des protéines membranaires

3.2.1.1 Identification des agents de solubilisation les plus efficaces

Différentes conditions de solubilisation ont été essayées afin de déterminer quels étaient les agents chimiques qui offraient la solubilisation la plus optimale des protéines membranaires. Deux premiers essais ont été effectués par solubilisations séquentielles en Eppendorf de 1,5 mL. Dans un premier temps, 10 µL de membranes ont .été mis dans 10 µL d'une solution de lauryl sulfate de sodium (SDS) 10 % (SIGMA Chemical Company, St-Louis, MO) et de DTT 2,3 % pendant 5 min. à 100 °C. Dans un deuxième

temps, 80 µL d'une solution d'urée 8 M (qualité pour l'électrophorèse, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA), de CHAPS 5 % (p/v) (Boehringer Mannheim, Allemagne), de Tris(hydroxymethyl)-aminomethane 0,48 % (p/v) (Tris) (qualité pour l'électrophorèse, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) et de DTT 0,3 % (p/v) a été ajouté pour le premier essai et 80 µL de la même solution additionnée de glycérol 10 % a été ajouté pour le second essai. Le tout a été vortexé brièvement avant d'être mis en agitation douce pendant 1 h à la température de la pièce. Le troisième et le quatrième essai de solubilisation ont été faits selon le même modèle. Toutefois, la solution de SDS 10 % et de DTT 2,3 % a été substituée par 10 µL d'eau déionisée et il n'y a eu aucune incubation à 100 °C. À la fin de la période de solubilisation, les solutions ont été centrifugées 10 min. à 15 000 x g (Biofuge A, Canlab, Pointe-Claire, Qc).

L'efficacité des agents de solubilisation a été évaluée selon trois critères : la simplicité de la technique, la quantité de protéines solubilisées et la diversité des protéines solubilisées. Pour ce faire, les culots ont été observés visuellement et un prélèvement de chacun des surnageants a été analysé par électrophorèse en gel de polyacrylamide avec SDS (SDS-PAGE) tel que décrit à la section 3.2.5.

3.2.1.2 Solubilisation des protéines membranaires

Les protéines membranaires ont été solubilisées dans une solution contenant: de l'urée 9 M, CHAPS 5 % (p/v), du Tris 0,48 % (p/v) et du DTT 0,4 %. Cette solution a été conservée à -20 °C sans le DTT et a été vortexée après chaque décongélation pour remettre en solution l'urée. Des volumes de fractions membranaires de 20 µl et de 30 µl ont été solubilisés avec respectivement 160 µl et 224 µl de la solution de solubilisation additionnée respectivement de 0,6 mg et 0,9 mg de DTT. Les volumes totaux ainsi obtenus étaient de 180 µL et de 254 µL respectivement. Le tout a été vortexé brièvement avant d'être mis en agitation douce pendant 1 h à la température de la pièce. À la fin de la période de solubilisation, les solutions ont été centrifugées 10 min. à 15 000 x g (Biofuge A, Canlab, Pointe-Claire, Qc) si un échantillon de 30 µL a été prélevé pour le dosage des

protéines. Les volumes totaux ont passé alors respectivement à 150 µL et à 204 µL. Le cas échéant, aucune centrifugation n'était effectuée.

Certains essais ont été effectués en additionnant à la température de la pièce 1 µL de ARNse A (USB) 0,01 g/L à 20 µL de fractions membranaires pendant 5 min. avant l'ajout du tampon de solubilisation.

3.2.2 Dosage des protéines

Les protéines ont été dosées avec la trousse « Bio-Rad Protein Assay » (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) : ce test est basé sur la méthode de Bradford (1976). Les volumes de solution protéique et de réactif ont été diminués de cinquante fois par rapport aux recommandations du fabricant. L'échantillon a été dosé en triplicata après avoir été dilué dans l'eau dix, quinze et vingt fois respectivement. La courbe d'étalonnage a été calculée à partir de sept concentrations (0,2 à 0,8 mg/mL) d'albumine sérique bovine (Sigma, St-Louis, MO) solubilisée dans de l'eau déionisée (lors du dosage des protéines cytoplasmiques) ou dans la solution de solubilisation décrite à la section 8.2 diluée dix fois (lors du dosage des protéines membranaires).

3.2.3 Isofocalisation

Lors des électrophorèses en première dimension, les protéines ont été séparées en fonction de leur point isoélectrique au cours d'une isofocalisation. Les isofocalisations ont été exécutées sur deux appareils : le « Flat Bed Apparatus » (Pharmacia Fine Chemicals, Suède) relié à un bloc d'alimentation (EPS 3500 XL, Pharmacia Biotech) et à un système de refroidissement (Lauda K-2/R, Brinkmann Instruments, Allemagne de l'Ouest) avec un thermostat (LAUDA type V, Messgeräte-Werk Lauda) (cet assemblage s'apparente au « Multiphor II » de Pharmacia Biothech) et le « IPGphor Isoelectric Focusing System » (Pharmacia Biotech, Suède). Lors des isofocalisations, les protéines ont été séparées sur des bandes d'acrylamide sur un support de plastique avec un gradient

de pH linéaire et immobilisé disponibles commercialement (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède).

Avant de commencer l'isofocalisation, les protéines membranaires solubilisées et les protéines cytoplasmiques ont été placées dans un tampon de réhydratation constitué d'urée 9 M, de CHAPS 5 %, de quelques grains de bleu de bromophénol (Fisher Scientifique Company, Fair Lawn, N.J.) et d'un tampon contenant un mélange d'ampholytes transporteurs ayant une plage linéaire (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suède). Le tampon de réhydratation était conservé à -20 °C sans le mélange d'ampholytes et était vortexé avant utilisation pour remettre l'urée en solution. La concentration du mélange d'ampholytes (pH 4 à 7 linéaire) pour les migrations dans les bandes d'acrylamide de 13 cm ayant un gradient de pH linéaire et immobilisé de 4 à 7 était de 3 %. Pour les bandes d'acrylamide de 18 cm ayant un gradient de pH linéaire et immobilisé pH 4,5 à 5,5, la concentration du mélange d'ampholytes appropriés était de 0,5 %. Les bandes de 13 cm ont été réhydratées avec un volume de 250 µL. À 20 µL de protéines cytoplasmiques et aux 180 µL ou 150 µL de protéines membranaires solubilisées ont été ajoutés 7,5 µL du mélange d'ampholytes puis le volume était complété à 250 µL avec le tampon de réhydratation. Les bandes de 18 cm devaient être réhydratées avec un volume de 350 µL. Aux 254 µL ou 204 µL de protéines membranaires solubilisées a été ajouté 1,75 µL du mélange d'ampholytes puis le volume était complété à 350 µL avec le tampon de réhydratation. Le tout était vortexé brièvement avant d'être mis en agitation douce pendant 1 h à la température de la pièce. À la fin de la période de solubilisation, les solutions ont été centrifugées 10 min. à 15 000 x g (Biofuge A, Canlab, Pointe-Claire,Qc).

En plus des protéines des fractions membranaires et cytoplasmiques, une protéine purifiée de 37 kDa (déshalogénase I, laboratoire de Réjean Beaudet, INRS-IAF) a également été étudiée par électrophorèse en deux dimensions. Pour l'isofocalisation sur le « Flat Bed Apparatus », 36 µl de déshalogénase purifiée (0,3 mg/ml) a été mis dans 212 µl de tampon de réhydratation et 5 µl du mélange d'ampholytes transporteurs ayant une plage de pH 4 à 7. Pour l'isofocalisation à l'aide du « IPGphor Isolectric Focusing

System », 50 µl de déshalogénase purifiée (0,3 mg/ml) ont été ajoutés à 298 µl de tampon de réhydratation et 1,75 µl du mélange d'ampholytes transporteurs ayant une plage de pH 4,5 à 7,5. Le tout a été vortexé brièvement avant d'être mis en agitation douce pendant 1h à la température de la pièce.

3.2.3.1 Isofocalisation à l'aide du « Flat Bed Apparatus FBE-3000 »

L'isofocalisation a été effectuée sur des bandes d'acrylamide de 13 cm ayant un gradient de pH linéaire et immobilisé de 4 à 7 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède). Les solutions de protéines dans le tampon d'équilibration ont été prélevées en prenant soin de laisser les culots puis elles ont été déposées tout au long des fentes du plateau de réhydratation (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède). Les bulles qui pouvaient apparaître au cours de l'opération étaient enlevées à l'aide d'un embout de pipette de 200 µL. Les bandes d'acrylamide ont été sorties du congélateur à -20 °C au dernier moment et leur protection en plastique a été enlevée en allant de l'extrémité acide (pointue) vers l'extrémité basique (carrée). En tenant l'extrémité basique à l'aide d'une pince, l'extrémité acide des bandes a été déposée à 5 mm de la limite de la solution protéique, le gel faisant face à la solution. Les bandes ont, par la suite, été abaissées de telle sorte que le liquide puisse entrer doucement en contact avec l'ensemble du gel par capillarité. Une fois les bandes déposées, elles ont été bougées légèrement pour s'assurer qu'il y avait bien du liquide sur toute la longueur. Les bandes ont été alors recouvertes d'environ 2 mL d'huile minérale (IPG Cover Fluid, Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suède) puis le couvercle a été remis sur le plateau de réhydratation. La réhydratation durait 20 h à la température de la pièce.

Une fois la réhydratation terminée, l'huile minérale a été épongée des arrêtes latérales et du côté plastifié des bandes. Ensuite, les bandes ont été rincées à l'eau déionisée avant d'être déposées, le gel vers le haut, sur une surface plastifiée avec des alignements (DryStrip aligner, Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suède) et un pourtour de mastic. À chaque extrémité des bandes, une double épaisseur de morceaux de papiers buvards (IEF electrode strip, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède) humides

mais non-mouillés a été déposée de façon perpendiculaire. Le tout était orienté sur le « Flat Bed Apparatus » de telle sorte que l'extrémité acide des bandes soit du côté de l'anode. Les bandes et les papiers buvards ont alors été couverts d'huile minérale puis les électrodes ont été déposées sur les papiers buvards. L'isofocalisation s'est effectuée à 20 °C selon le programme suivant :

Étape	Voltage (V)	Courant (mA)	Puissance (W)	V/h
1	300	2	5	1
2	2 900	2	5	2 900
3	35 000	2	5	70 000

Une fois l'isofocalisation terminée, les bandes ont été immédiatement mises à équilibrer ou encore conservées à -80 °C.

3.2.3.2 Isofocalisation à l'aide du « IPGphor Isolectric Focusing System »

L'isofocalisation s'est effectuée sur des bandes d'acrylamide de 18 cm ayant un gradient de pH linéaire et immobilisé de 4,5 à 5,5 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède). Les échantillons ont été prélevés avec les mêmes précautions qu'à la section 3.2.3.1 à l'exception faite qu'ils ont été déposés sur la section centrale du contenant pour les bandes (Strip holder, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède). Pour que le contact entre le gel et le liquide soit optimal, les bandes ont été déposées en les tenant par les deux extrémités de telle sorte que le centre des bandes touche d'abord la solution. Les extrémités étaient ensuite rabattues délicatement pour que le liquide couvre l'ensemble du gel par capillarité. L'extrémité acide de la bande a été orientée vers le côté pointu du contenant. Le liquide résiduel de chaque côté des bandes a été étalé tout au long de celles-ci à l'aide d'un scalpel. Une fois que les bandes déposées, elles ont été bougées légèrement. Les bandes ont été alors recouvertes d'environ 1,5 mL d'huile minérale puis le couvercle a été remis sur le contenant de réhydratation. Le contenant lui-même a été alors déposé sur le « IPGphor Isolectric Focusing System » pour que le côté acide des bandes soit vis-à-vis de l'anode. La réhydratation durait 12 h à 25 °C.

Une fois la réhydratation terminée, l'isofocalisation débutait. L'isofocalisation a été effectuée à 20 °C à raison de 50 µA par bande selon le programme suivant :

Étape	Voltage (V)	Puissance (W)	V/h
1	500	5	500
2	1 000	5	1 000
3	35 000	5	80 000
4	0	0	0

le changement de voltage entre chacune des étapes effectuait sous la forme d'escalier.

Une fois l'isofocalisation terminée, les bandes ont été immédiatement misent à équilibrer ou encore conservées à -80 °C.

3.2.4 Équilibration

Après l'isofocalisation, les protéines ont été chargées négativement et réduites de nouveau en agitant (Clinical Rotator, Fisher, États-Unis) les bandes en présence d'un tampon d'équilibration. Les bandes de 13 cm ont été équilibrées dans 10 mL de tampon contenu dans des tubes (KIMAX) à bouchons vissés, alors que les bandes de 18 cm ont été équilibrées dans 15 mL de tampon contenu dans des tubes de 21 cm avec un étranglement à 6 cm du fond et fermé avec un bouchon de caoutchouc (bouchon # 3, Fisher Scientifique). La solution stock de tampon était composée de 3 % (p/v) glycérol, de 6 M urée, de tampon Tris HCl (1,5M ; pH 8,8) 33 % (v/v), de 4 % SDS et de quelques grains de bleu de bromophénol. Cette solution mère a été conservée à la température de la pièce pour une période maximale de deux semaines. Lors de la première équilibration de 15 min., 1 % de DTT (p/v) était ajouté pour réduire les protéines. Lors de la seconde équilibration, le DTT a été substitué par 2,5 % d'iodoacétamide (Sigma, St-Louis, MO) afin d'alkyler les groupements thiol sur les protéines et ainsi prévenir leur réoxydation.

Afin d'optimiser cette étape, plusieurs facteurs ont été variés : les concentrations en SDS (2 % et 4 %), le temps d'incubation par équilibration (15, 30 et 60 min.) ainsi que les températures d'incubation (20 et 27 °C). La coloration des bandes au nitrate d'argent (section 3.2.6.1) a permis d'effectuer une analyse qualitative de la quantité de protéines n'ayant pu passer de la première à la seconde dimension.

3.2.5 Séparation par SDS-PAGE

Toutes les électrophorèses en gel de polyacrylamide 12 % contenant 0,1 % de SDS et 0,375 M de Tris-HCl à 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, États-Unis ; Laemmli, 1970). Dans tous les cas, l'acrylamide a été substituée par du piperazine diacrylamide (qualité pour l'électrophorèse, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Aucune préparation n'a été dégazée avant l'ajout du N,N,N',N'-Tétra-méthyl-éthylènediamine (TEMED) (qualité pour l'électrophorèse, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Afin d'égaliser les gels de séparation et de les maintenir anoxiques, ils ont été recouverts de butan-1-ol (J.T. Baker, Phillispsburg, N.J.) saturé en eau une fois coulé dans la cassette. La polymérisation des gels complétée, ceux-ci ont été nettoyés avec du butan-1-ol saturé en eau puis avec de l'eau déionisée juste avant de passer à la prochaine étape. Des électrophorèses en gel de polyacrylamide à 10 % à une dimension ont été effectuées pour vérifier la présence de protéines membranaires contenant un groupement hème en utilisant une coloration spécifique. D'autres modifications au protocole sont rapportées aux sections 3.2.5.1 et 3.2.5.2.

3.2.5.1 Séparation des protéines par SDS-PAGE pour les électrophorèses en une dimension

Des gels de 8 x 7 x 0,1 cm ont été utilisés à trois reprises pour des électrophorèses 1D : pour l'identification d'agents de solubilisation de protéines, pour confirmer la présence de protéines à la fin de chaque production de fractions membranaires et pour

vérifier la présence de protéines membranaires avec des groupements hème. Les gels de migration et de retardement ont été préparés tel que décrit à la section 3.2.5. La concentration en TEMED a cependant été augmentée à 0,15 % par rapport au protocole présenté à la section 3.2.5. Dans un bain à ébullition, les échantillons de 6,25 µL ont été réduits pendant 5min. en présence de 25 µL du tampon suivant : 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 20 % glycérol, 2 % SDS, 5 % β-mercaptoéthanol (qualité pour électrophorèse, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) et quelques grains de bleu de bromophénol. Par la suite, les échantillons ont migré dans des gels en présence de tampon Tris-HCl 25 mM, pH 8,3 contenant 192 mM de glycine (qualité pour électrophorèse ; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) et 0,1 % de SDS. Des étalons de faible masse moléculaire (Bio-Rad, Hercules, CA) ont été utilisés.

3.2.5.2 Séparation des protéines par SDS-PAGE pour les électrophorèses en deux dimensions

Après l'équilibration, les protéines contenues dans les bandes servant à l'isofocalisation ont été séparées en fonction de leur masse moléculaire. Les gels utilisés à cette fin ne possédaient pas de gel de retardement contrairement au protocole présenté à la section 3.2.5. Pour des bandes d'acrylamide de 13 cm ayant un gradient de pH linéaire et immobilisé de 4 à 7, des gels de 1,5 x 160 x 200 mm ont été coulés dans les cassettes. La migration pour ces gels a été comme suit : 1 h à 15 mA par gel puis 16 h à 20 mA par gel. Des étalons de faible masse moléculaire (Bio-Rad, Hercules, CA) ont été utilisés. Ces étalons ont été déposés sur un papier buvard de 2 x 4 mm (IEF electrode strip, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède) placé à côté de l'extrémité acide de la bande Pour des bandes d'acrylamide de 18 cm ayant un gradient de pH linéaire et immobilisé de 4,5 à 5,5, les gels avaient les dimensions suivantes : 1,5 x 195 x 200 mm. La migration pour ces gels a été comme suit : 1 h à 15 mA par gel puis 16 h à 28 mA par gel. Dans tous les cas, la migration s'est effectuée à environ 13 °C dans le même tampon de migration que celui décrit à la section précédente.

3.2.6 Colorations des protéines

Les petits gels ont été colorés dans des volumes de 100 mL pour chacune des solutions alors que ces volumes étaient de 400 mL pour les plus gros gels. Pour les deux colorations présentées, toutes les étapes ont été effectuées sous agitation (Clinical Rotator, Fisher, États-Unis).

3.2.6.1 Coloration au nitrate d'argent

La coloration au nitrate d'argent est inspirée principalement du protocole de Pappin et Perkins (1999) et la solution d'arrêt de la coloration provient du protocole de Blum, Beier et Gross (1987). Afin de fixer les protéines dans les gels, ces derniers ont été placés pendant 1 h en présence d'une solution de 50 % (v/v) de méthanol (alcool de commerce du Québec, Ville St-Laurent, Qc) et 5 % (v/v) d'acide acétique glacial (Anachemia, N.J.). Par la suite, les gels ont été agités pendant 10 min. dans une solution de méthanol à 50 % (v/v). Les gels ont été lavés deux fois pendant 10 min. dans de l'eau déionisée. Une fois rincés, les gels ont été agités pendant 1 min. en présence de 0,02 % (p/v) thiosulfate de sodium (J.T. Baker Chemical Co. Phillipsburg, N.J.) avant d'être rincés de nouveau à l'eau déionisée. La coloration proprement dite s'effectuait pendant 20 min. en présence de 0,2 % (p/v) de nitrate d'argent (AR BHD, Toronto, Ont.). À la fin de cette période, les gels ont été lavés deux fois pendant 1 min. dans l'eau déionisée. Le développement était effectué dans une solution de carbonate de sodium 0,2 % (p/v) (Fisher Scientifique Co., Fair Lawn, N.J.) additionnée de formaldéhyde 0,1 % (v/v) (37 à 41 %, BDH, État-Unis). Lorsque cette solution était déposée sur les gels, un précipité se forme. La solution était alors changée. Une fois la coloration désirée atteinte, le développement a été arrêté avec une solution d'acide acétique 5 % (v/v). Afin de comparer les gels faits à partir des fractions membranaires des lots induits et non-induits pour la déshalogénation réductrice en position *ortho*, ceux-ci ont été colorés en parallèle pendant même période de temps.

3.2.6.2 Coloration des hémoprotéines

La coloration des hémoprotéines a été effectuée à partir d'un protocole de Francis et Becker (1984). Cette coloration a été utilisée pour colorer les gels après électrophorèse en 1D et en 2D. Lorsque la coloration se faisait sur des gels en une dimension, les échantillons de 6,25 µL ont été incubés en présence de 25 µL de tampon (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, glycérol 20 %, SDS 2 %, β-mercaptoéthanol 5 %) et non dans le tampon suggéré par les auteurs. Les protéines ont été fixées pendant une 30 min. dans une solution d'acide trichloracétique 12,5 % (p/v) (qualité cristal, J.T. Baker Chemical Co., Phillisburg, N.J.). Par la suite, les gels ont été rincés pendant 30 min. dans de l'eau déionisée. Pour les gels d'électrophorèse 2D, 400 mg de *o*-dianisidine (Sigma, St-Louis, MO) ont été mis en agitation vigoureuse dans 360 mL d'eau déionisée pendant au moins 15 min. avant la révélation des hémoprotéines. Au moment de la coloration, 40 mL de tampon sodium citrate 0,5 M pH 4,4 et 0,8 mL de H_2O_2 (34 à 3 %, qualité technique, Fisher Chemicals, FairLawn, N.J.) ont été ajoutés au 360 mL de *o*-dianisidine en suspension. Après 1 h dans cette solution, les hémoprotéines ont pris une teinte verte très pâle qui avait tendance à s'estomper avec le temps. Les volumes et les quantités données pour préparer les solutions de coloration ont été divisés par quatre lors de la coloration de petits gels.

3.2.7 Conservation des gels

Après la coloration, une digitalisation de l'image des gels a été faite en format TIFF à 300 ppp. Certains gels d'électrophorèse 2D 1,5 x 160 x 200 mm ont été séchés par la suite entre deux films de 25,5 x 28 cm (Gel drying film, Promega, Madison, WI) selon les recommandations du fabricant.

3.2.8 Analyse des gels

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

Pour chaque spot dans les gels correspondant à des protéines induites ou réprimées, le point isoélectrique et la masse moléculaire ont été mesurés en triplicata. Ce sont les valeurs moyennes des triplicatas des points isoélectriques et des masses moléculaires qui ont été retenues pour chacun de ces spots d'intérêt.

Les points isoélectriques des protéines réprimées lors de la déshalogénation et de la protéine 37 kDa ont été calculés à partir de trois électrophorèses 2D de la fraction membranaire non-induite pour la déshalogénation dont la première dimension a été effectuée avec des bandes de 18 cm ayant un gradient de pH linéaire de 4,5 à 5,5. Les points isoélectriques des protéines induites lors de la déshalogénation ont été calculés à partir de trois gels obtenus après électrophorèse 2D de la fraction membranaire induite pour la déshalogénation dont la première dimension a été effectuée sur des bandes de 13 cm ayant un gradient de pH linéaire de 4 à 7. Les formules suivantes ont respectivement été utilisées pour trouver les points isoélectriques :

$[x\ (5{,}5 - 4{,}5)/18\ \text{cm}] + 4{,}5 = \text{pI}$

$[x\ (7 - 4)/13\ \text{cm}] + 4 = \text{pI}$

x = la distance (horizontale) en cm entre l'extrémité acide du gel et l'endroit où se situe la protéine d'intérêt

pI = point isoélectrique

Les masses moléculaires des protéines induites lors de la déshalogénation réductrice de même que la masse moléculaire de la protéine de 37 kDa ont été déterminées à partir de trois gels obtenus après électrophorèse 2D de la fraction membranaire induite pour la déshalogénation. Les masses des protéines réprimées lors de la déshalogénation réductrice ont été déterminées à partir de trois gels obtenus après électrophorèse 2D de la fraction membranaire non-induite pour la déshalogénation réductrice. Dans tous les cas, la première dimension a été faite sur des bandes de 13 cm ayant un gradient de pH linéaire de 4 à 7. Afin d'identifier la masse moléculaire des protéines, pour chaque gel une courbe d'étalonnage de la distance parcourue en centimètres en fonction des étalons de faible masse moléculaire a été tracée. L'équation de la courbe a été déterminée à l'aide du logiciel Excel pour Office 2000 et a pris la forme d'une polynomiale d'ordre trois. La masse moléculaire de chaque protéine sur un gel a été approximée à partir de cette équation et de la distance parcourue par celle-ci dans le gel bien que n'ayant pas les étalons appropriés.

Les points d'intérêt de même que des morceaux de gels exempts de protéine utilisés comme témoins ont été prélevés à l'aide d'un scalpel avant que les gels ne soient mis à sécher. Les spots ont alors été conservés à -80 °C dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL.

3.2.9 Digestion des protéines à la trypsine à même le gel

Chaque protéine d'intérêt de même que des morceaux de gels exempts de protéines ont été digérés en quadruplicata à la trypsine et les peptides ainsi obtenus ont été extraits des gels pour les fins de l'analyse en spectrométrie de masse. Les protéines provenaient des gels d'électrophorèse 2D de grands formats (1,5 x 195 x 200 mm). Tous les instruments de verre utilisés pour préparer les solutions nécessaires à la digestion ont été lavés de façon successive avec de l'eau déionisée, du méthanol, de l'acétone et de l'hexane, tous de qualité CLHP. La verrerie a été asséchée entre chaque lavage.

Les morceaux de gels ont d'abord été mis à laver dans un tube Eppendorf de 1,5 mL dans 500 µL d'une solution de NH_4CO_3 (Fisher Chemicals, Fair Lawn, N.J.) 100 mM à raison d'un morceau par Eppendorf. Après 1 h, le 500 µL de chaque tube a été substitué par 150 µL de la même solution additionnée de 10 µL d'une solution de DTT 45 mM pour réduire à nouveau les protéines lors d'une incubation dans un bain à 60 °C pendant 30 min. Le mélange a ensuite été ramené à la température de la pièce pour y ajouter 10 µL d'une solution d'iodoacétamide 100 mM. L'incubation a été faite sur une période de 30 min. à l'obscurité. La solution a été jetée et les morceaux de gel ont été agités vigoureusement pendant 1 h en présence d'une solution 50 % (v/v) d'acétonitrile (qualité pour CLHP, EM Science, Gibbstown, N.J.) et 50 % de NH_4CO_3 100 mM. Le solvant a été par la suite jeté et chaque morceau a été coupé en deux ou trois pièces à l'aide d'un scalpel avant d'être transféré dans un tube Eppendorf de 200 µL contenant 50 µL d'acétonitrile. Cette étape avait pour but de commencer la déshydratation des gels. Les morceaux de gels devant baigner pendant 15 min., de l'acétonitrile a été ajoutée au besoin. Le séchage des morceaux de gels s'est terminé à l'aide d'un évaporateur à vide. Cet évaporateur était composé de trois pièces : la trappe de condensation réfrigérée (Savant Instrument Inc., Farmingdale, N.Y.), la centrifugeuse de marque SpeedVac (model SVC 100H, Savant Instrument Inc., Farmingdale, N.Y.) et d'une pompe (Cenco-Magavac Vacuum Pump, Central Scientific Co., Chicago, États-Unis). Pour la digestion proprement dite, les morceaux ont été réhydratés dans 20 µL (ou jusqu'à ce que les morceaux soient recouverts) d'une solution de NH_4CO_3 25 mM additionnée de 1 µL de trypsine porcine à 0,1 g/L (qualité pour le séquençage, Promega, Madison, WI). La trypsine avait préalablement été solubilisée selon les recommandations du manufacturier dans une solution d'acide acétique 50 mM. Après 15 min., 20 à 30 µL de NH_4CO_3 25 mM ont été ajoutés afin de préserver l'humidification des morceaux de gels pour l'incubation qui durait toute la nuit dans un bain à 37 °C. Le lendemain, les surnageants correspondant à une même protéine ont été prélevés et rassemblés dans un même tube Eppendorf de 1,5 mL. Pour maximiser la récupération des peptides, deux autres extractions ont été effectuées par morceau en présence d'acétonitrile 60 % (v/v) et d'acide trifluoroacétique (TFA) 0,1 % (v/v) (Fisher Chemical, Fair lawn, N.J.) pendant

20 min. dans un bain à 37 °C. Après chaque extraction, le surnageant est récupéré et déposé dans l'Eppendorf de 1,5 mL ayant déjà des produits de digestion de la même protéine. Les échantillons sont finalement asséchés complètement à l'évaporateur à vide puis conservés à -80 °C.

3.2.10 Purification des peptides

Les échantillons digérés ont été purifiés des sels accumulés sur des mini-colonnes (ZipTip C_{18}, Millipore Corporation, Bedford, MA) qui sont insérées dans des embouts de pipette de 20 µL. Tous les instruments de verre utilisés pour préparer les solutions nécessaires à la purification ont été lavés de façon successive avec de l'eau déionisée, du méthanol, de l'acétone et de l'hexane. Toutes les solutions, exception faite de la solution de stock de TFA 20 % (v/v), ont été filtrées à l'aide d'une seringue sur un filtre de 0,2 µm. Toutes les solutions ayant du TFA 0,1 à 1 % (v/v) ont été préparées à partir de la solution stock de TFA. Toute entrée d'air dans la colonne a été évitée à chaque fois qu'un volume a été pipetté avec celle-ci.

Les produits de digestion ont été resuspendus dans 20 µL d'une solution de TFA 1 % (v/v) dont le pH était inférieur à 4. Les colonnes ont été pré-mouillées en pipettant cinq fois 10 µL d'une solution d'acétonitrile 50 % et de TFA 0,1 %. Par la suite, les colonnes ont été équilibrées en pipetant cinq fois une solution de TFA de 0,1 %. Une fois les colonnes équilibrées, les solutions peptidiques ont été déposées leur surface. Les solutions peptidiques ont été aspirées et repassées dix fois sur la colonne afin d'y fixer les peptides. Cela fait, les colonnes ont été lavées des sels en pipettant dix fois la solution de TFA 0,1 %. Les peptides ont été élués dans des Eppendorfs de 200 µL avec 6 µL d'une solution d'acétonitrile 80 % (v/v) et de TFA 0,1 % (v/v) en pipettant de cinq à six fois pour optimiser la récupération des peptides. Les échantillons ont été dégazés par sonification pendant 5 min. puis ont été récupérés par une centrifugation de 5 min. à 12 000 x g.

3.2.11 Analyse en spectrométrie de masse

Les échantillons ont été analysés par spectrométrie de masse. Pour ce faire, les échantillons ont été prélevés à l'aide d'une seringue de 10 µL (Hamilton) puis transférés dans un capillaire de verre plaqué d'or (type D, Micromass). L'aiguille a été installée sur une interface Z-Spray™ d'un spectromètre de masse à triple quadripôle (Quatro II, Micromass). L'analyse en spectrométrie de masse a été effectuée sous le contrôle du logiciel MassLynx version 3.3 de Micromass. Les voltages appliqués sur le capillaire et sur le cône ainsi que l'énergie de collision ont été ajustés pour chaque peptide afin d'optimiser le signal. L'argon (Médigas, St-Laurent, Qc) a été utilisé comme gaz de collision et l'azote (Médigas, St-Laurent, Qc) pour assécher l'échantillon.

Seuls les pics ayant une charge double ou triple et ne se retrouvant pas dans le témoin (produit de digestion d'un gel exempt de protéine) ont été analysés en SM/SM. Pour chaque peptide, au moins trois acquisitions ont été effectuées avec trois énergies de collision différentes.

3.2.12 Analyse des spectres

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

Les premiers spectres analysés étaient les spectres SM afin d'identifier la charge et la masse des peptides. La charge des peptides a été identifiée à partir de la différence de *m/z* entre les ions pseudo-moléculaires et les ions isotopiques de ces peptides. Le carbone constitue un élément important de la protéine se retrouvant dans la nature

principalement sous deux formes isotopiques : C^{12} (six protons et six neutrons) et C^{13} (six protons et sept neutrons). La première forme isotopique est la plus abondante et l'ion pseudo-moléculaire n'est constitué que de cette forme alors que l'ion isotopique choisi pour déterminer la charge d'un peptide possède un carbone sous la deuxième forme isotopique. Il en résulte que la différence de masse entre l'ion pseudo-moléculaire et l'ion isotopique est de 1 Da étant donné la différence de un neutron. Sur un spectre de masse, l'abscisse représentant des valeurs de *m/z*, la différence de *m/z* entre l'ion moléculaire et l'ion isotopique est égale à 1 (1 Da/1+ = 1 *m/z*). Cette différence de *m/z* est de 0,5 lorsque les ions sont chargés deux fois (1 Da/2+ = 0,5 *m/z*), de 0,33 lorsque les ions sont chargés trois fois (1Da/3+ = 0,33 *m/z*) et ainsi de suite. Une fois la charge d'un peptide déterminée, il est possible de trouver la masse du peptide chargé. Pour ce faire, la valeur de *m/z* fournie par le spectre est multipliée par la charge (*m/z* * z = m). Pour connaître la masse du peptide non-chargé, il ne reste plus qu'à soustraire autant de Daltons qu'il y a de charges sur le peptide, chaque charge résultant de l'addition d'un proton (H^+) dont la masse est de 1 Da. Les pics se trouvant dans les spectres témoins SM et dans les spectres SM des produits de digestion des protéines d'intérêt n'ont pas été considérés comme des peptides appartenant aux protéines d'intérêt.

Le séquençage des peptides a été effectué à l'aide du logiciel Biolynx version 3.4 à partir des spectres SM/SM. Les spectres SM/SM ont été traités avant d'être utilisés dans le logiciel Biolynx version 3.4. Le traitement consistait à soustraire le bruit de fond des spectres, à arrondir la courbe et finalement à centrer les pics tel que présenté à la figure 8. La carboxyaminométhylcystéine et la méthioninesulfoxide ont été retenues comme modifications lors de l'analyse des séquences. L'erreur tolérée par le logiciel Biolynx sur l'ion pseudo-moléculaire était de 0,5 Da par rapport à la valeur monoisotopique théorique et de 0,5 *m/z* par rapport à la valeur monoisotopique théorique du fragment ionique. Les erreurs tolérées ont augmenté respectivement à 1 Da et 1 *m/z* lors de l'analyse en absence du logiciel. Au cours de l'analyse dite en absence de logiciel, les différences de *m/z* entre les pics centrés ont été calculées à la main. Pour s'assurer de la valeur des pics sélectionnés par le logiciel, trois acquisitions en SM/SM d'un même peptide ont été comparées. L'analyste et non Biolynx a eu le dernier mot en ce qui concerne la

détermination de la séquence finale à partir des spectres en SM/SM, le logiciel n'étant utilisé que comme support à l'analyse.

Les séquences préliminaires de *D. hafniense* (obtenues sur le site JGI) ont été traduites dans les deux directions et dans les trois cadres de lecture à l'aide du logiciel Artemis. Les séquences peptidiques trouvées lors de l'analyse en SM/SM ont été utilisées pour identifier la séquence complète des protéines induites ou réprimées parmi les séquences préliminaires de *D. hafniense*. Un minimum de trois peptides séquencés en spectrométrie de masse devaient se retrouver au moins en partie dans une séquence protéique de *D. hafniense* pour que cette séquence soit considérée comme étant la bonne.

Pour confirmer la validité de séquences trouvées, les séquences protéiques provenant de *D. hafniense* ont été digérées théoriquement à la trypsine de haute spécificité à l'aide du logiciel PeptideMass du site Internet Expasy (http://ca.expasy.org/tools/peptide-mass.html). Les résultats ont donné les masses monoisotopiques des peptides non-ionisés. Le logiciel a tenu également compte d'une oxydation possible des méthionines et du traitement des cystéines à l'iodoacétamide. Si au moins quatre des masses théoriques concordaient avec les masses retrouvées lors de l'analyse en spectrométrie de masse, les séquences protéiques de *D. hafniense* étaient retenues comme étant les séquences potentielles d'une protéine d'intérêt chez *D. frappieri*.

Ces séquences protéiques ont été alors utilisées dans le logiciel Standard protein-protein BLAST [blastp] (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/). Ce logiciel permet de comparer une séquence protéique à un ensemble de séquences déjà répertoriées afin d'en identifier la nature. Les paramètres choisis pour la recherche étaient ceux par défaut exception faite de la section « select from » où le règne « Bacteria [org] » a été sélectionné afin de restreindre la recherche aux protéines de ce groupe. Un score minimal de 60 devait être obtenu pour qu'un résultat soit pris en considération.

Puisqu'il n'a pas été possible de copier les séquences en acides aminés directement du logiciel Artemis, ce sont les séquences des gènes codant pour les séquences protéiques identifiées qui ont été copiéea pour être traduites à partir du logiciel Clone Manager. Ce sont ces séquences traduites qui ont été utilisées avec les logiciels Standard protein-protein BLAST [blastp] et PeptideMass.

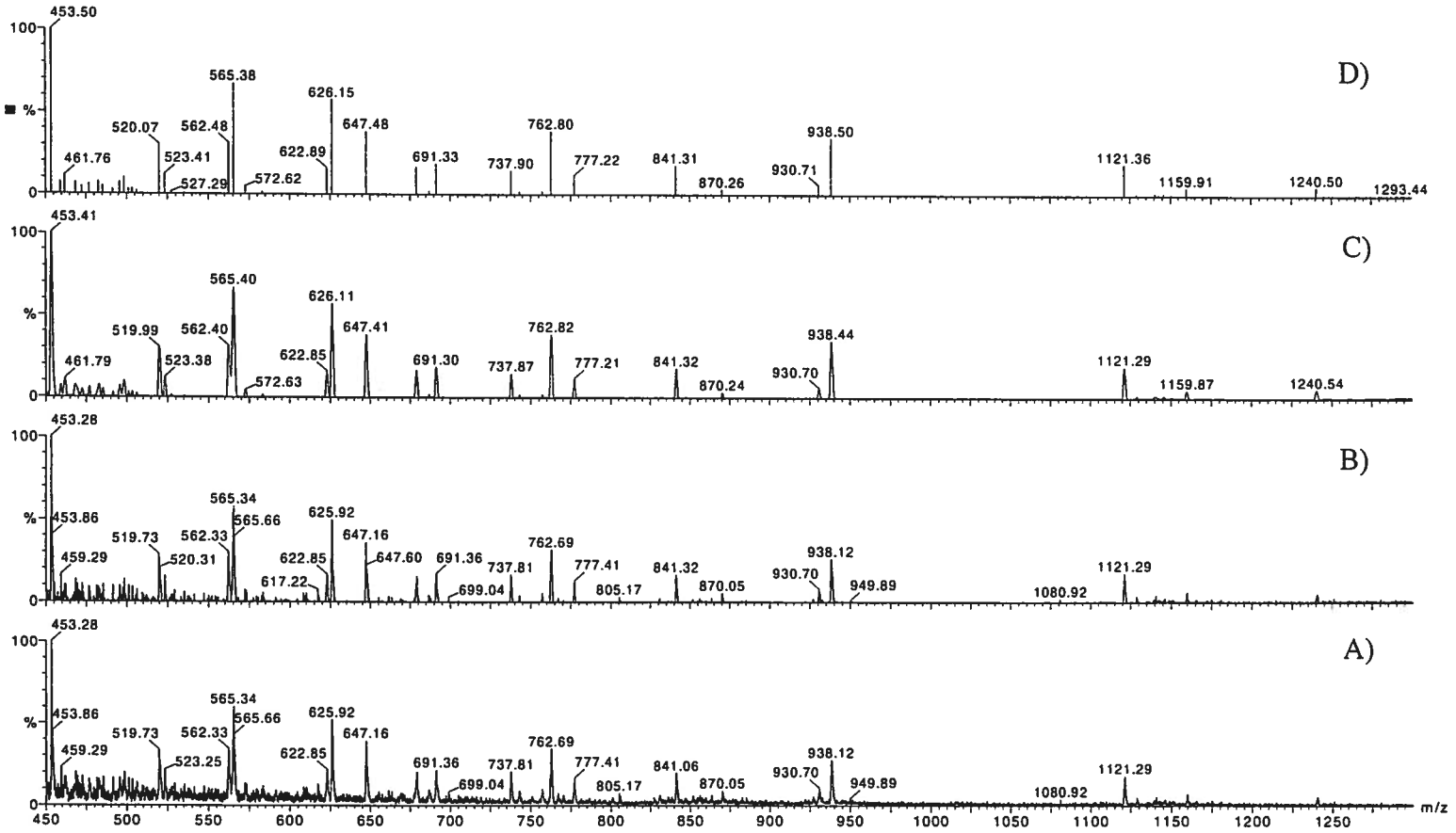


Figure 8 : Traitement d'un spectre afin de déterminer la valeur *m/z* des ions. A) Spectre brut ; B) Spectre en « A » dont le bruit de fond est soustrait ; C) Spectre en « B » dont la courbe est adoucie et D) Spectre en « C » pour lequel les pics ont été ramenés à une valeur unique (centrés).

4. Résultats

4.1 Activité de déshalogénation des différents lots produits.

Afin d'identifier les protéines induites ou réprimées au cours de la déshalogénation réductrice en position *ortho* chez la souche PCP-1 de *D. frappieri*, quatre lots différents de préparations membranaires et cytoplasmiques ont été produits. Deux de ces lots ont été préparés en absence d'inducteur dans les cultures de telle sorte qu'il n'y ait aucune activité de déshalogénation contrairement aux deux autres lots pour lesquels la présence de l'inducteur (2,4,6-TCP) devait générer une activité de déshalogénation réductrice. L'activité enzymatique des préparations membranaires obtenues de chacun de ces lots a été dosée en utilisant le 2,4,6-TCP comme substrat. Tel que prévu, les deux lots non-induits pour la déshalogénation ne présentaient aucune activité alors que la préparation membranaire provenant du premier lot induit avait une activité de 1,37 nmole de 2,4-DCP/min/mL et le second lot induit une activité de 1,53 nmole de 2,4-DCP/min./mL.

4.2 Méthode de solubilisation des protéines membranaires

Afin d'identifier la méthode de solubilisation des protéines membranaires qui allait être retenue pour toutes les autres expériences, quatre essais différents de solubilisation des protéines membranaires ont été réalisés. Deux des essais consistaient en une solubilisation en présence de 8 M urée, de 0,3 % (p/v) DTT additionnée de 5 % (p/v) CHAPS seul ou de CHAPS et de 10 % glycérol. Les deux autres essais consistaient en une pré-solubilisation avec 10 % (p/v) SDS et 2,3 % (p/v) DTT suivi de l'une ou l'autre des solubilisations des deux premiers essais. La quantité et la diversité des protéines solubilisées de même que la simplicité de la technique ont été les trois critères de sélection de la technique de solubilisation.

Après migration sur SDS-PAGE 12 % et coloration au nitrate d'argent des protéines membranaires solubilisées, il a été établi que les quatre types de solubilisations avaient une capacité équivalente à solubiliser un large éventail de différentes protéines membranaires. À la fin de chaque solubilisation, les préparations ont été centrifugées. Les culots obtenus suite aux centrifugations, soit les membranes et les protéines non-solubilisées, se sont avérés plus abondants pour les solubilisations en présence de SDS. Les solubilisations avec du CHAPS seul ou avec du CHAPS et du glycérol ont présenté des culots semblables. Les solubilisations en présence de CHAPS seul ou en présence de CHAPS et de glycérol étant comparables, la méthode de solubilisation choisie a été la plus simple soit avec 5 % (p/v) de CHAPS, de l'urée 8 M et 0,3 % de DTT.

4.3 Identification des conditions d'équilibration lors des électrophorèses en deux dimensions

Trois paramètres ont été évalués à tour de rôle afin de déterminer les conditions d'équilibration favorisant le passage de la première à la deuxième dimension des protéines dans un gel SDS-PAGE. Ces paramètres étaient le temps, la température et la concentration en SDS. L'efficacité des modifications a été évaluée par la coloration au nitrate d'argent des bandes d'acrylamide obtenues de la première dimension et qui ont par la suite subie une deuxième migration selon la deuxième dimension afin d'y détecter les protéines résiduelles. Une bande équilibrée selon les conditions de départ a toujours été comparée à une bande équilibrée avec l'un des trois paramètres modifiés. Les conditions de départ pour ces paramètres étaient un temps d'incubation de 15 min. par équilibration, une température de 20 °C et une concentration en SDS de 2 %. L'augmentation des temps d'incubation à 30 et à 60min. par équilibration de même que l'augmentation de la température à 27 °C n'ont pas amélioré de façon significative le passage des protéines de la première à la deuxième dimension. Toutefois, les bandes équilibrées en présence de 4 % SDS ont présenté moins de protéines résiduelles après coloration au nitrate d'argent que les bandes équilibrées en présence de 2 % de SDS. Par conséquent, ce dernier paramètre a été modifié par rapport aux conditions de départ pour la suite des expériences.

4.4 L'analyse des gels

4.4.1 La détection d'hémoprotéines par coloration à l'o-dianisidine

La coloration à l'*o*-dianisidine selon un protocole modifié de Francis et Becker (1983) a révélé la présence de deux hémoprotéines dans la fraction de protéines membranaires après migration dans un mini-gel en une dimension. Les masses moléculaires de ces protéines sont évaluées à 30 kDa et à approximativement 137 kDa à partir de leur distance de migration dans un gel 12 % SDS-PAGE. Les deux hémoprotéines étaient plus abondantes dans la fraction membranaire induite par le 2,4,6-TCP pour la déshalogénation réductrice que dans la fraction membranaire non-induite (figure 9).

Lors de la coloration des gels à l'*o*-dianisidine, seule la zone de transfert entre la première et la seconde dimension, a été colorée suggérant que dans les conditions utilisées, ces protéines n'avaient pas migré. Il a donc été impossible de situer dans les gels après électrophorèse 2D ces hémoprotéines afin d'en faire une caractérisation plus approfondie en spectrométrie de masse.

4.4.2 La détermination du point isoélectrique et de la masse moléculaire de la déshalogénase I purifiée de D. frappieri

Afin de pouvoir repérer la déshalogénase I purifiée dans les gels après électrophorèse 2D des fractions de protéines membranaires ou cytoplasmiques, celle-ci a été mise à migrer par électrophorèse 2D 1,5 x 160 x 200 mm. Cette séparation a révélé que la protéine purifiée de 37 kDa se présentait sous trois isoformes ayant les points isoélectriques suivants : 5,05, 5,20 et 5,35 (figure 10).

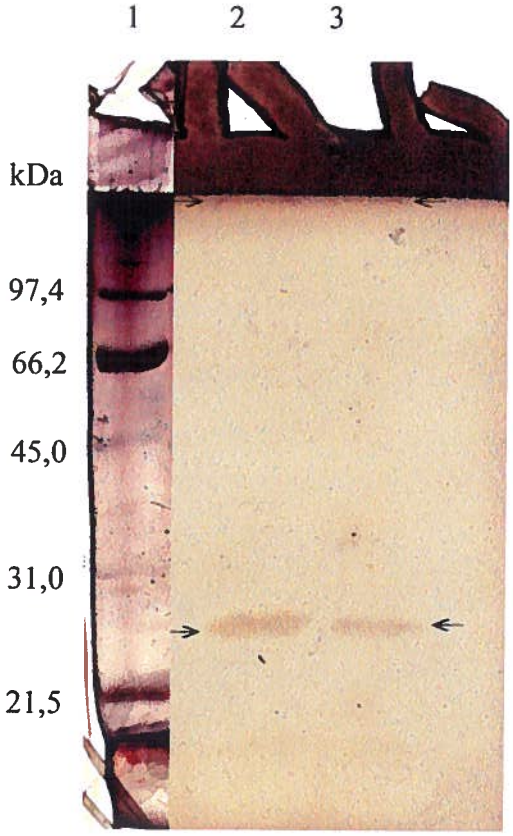


Figure 9 : Coloration des hémoprotéines dans les fractions membranaires. Les flèches désignent les hémoprotéines. 1) Marqueurs de faible masse moléculaire Bio-Rad (coloration au nitrate d'argent). 2) 6,25 µl de la fraction membranaire solubilisée du premier lot induit pour la déshalogénation réductrice en position *ortho* du 2,4,6-TCP (coloration à l'*o*-dianisidine). 3) 6,25 µl de la fraction membranaire solubilisée du premier lot non-induit pour la déshalogénation réductrice en position *ortho* du 2,4,6-TCP (coloration à l'*o*-dianisidine).

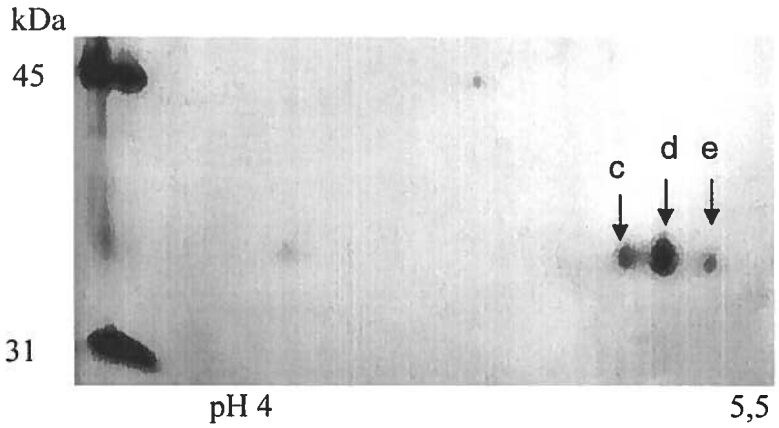


Figure 10 : Les isoformes c, d et e de la protéine purifiée 37 kDa (déshalogénase I) de *D. frappieri* séparée par électrophorèse 2D. Détail du gel 1,5 x 160 x 200 mm coloré au nitrate d'argent (la première dimension a été effectuée avec un gradient de pH de 4 à 7 sur 13 cm).

4.4.3 L'analyse des fractions cytoplasmiques après électrophorèse en deux dimensions

L'analyse des gels après électrophorèse en deux dimensions des fractions cytoplasmiques suggère la présence de trois des isoformes de la protéine 37 kDa (déshalogénase I) dans des proportions équivalentes pour des quantités égales de protéines des fractions cytoplasmiques induites et non-induites pour la déshalogénation en position *ortho* du 2,4,6-TCP. Les isoformes identifiés sont ceux ayant les pI suivants : 5,05, 5,20 et 5,35 dont la masse moléculaire en gel SDS PAGE est de 33 kDa (figure 11).

Près de 350 protéines par gels ont été identifiées dans les gels des fractions cytoplasmiques. Aucune protéine de la fraction cytoplasmique n'a été retrouvée systématiquement que dans les fractions provenant de cultures induites par le 2,4,6-TCP pour la déshalogénation en *ortho* ou que dans les fractions provenant de cultures non-induites.

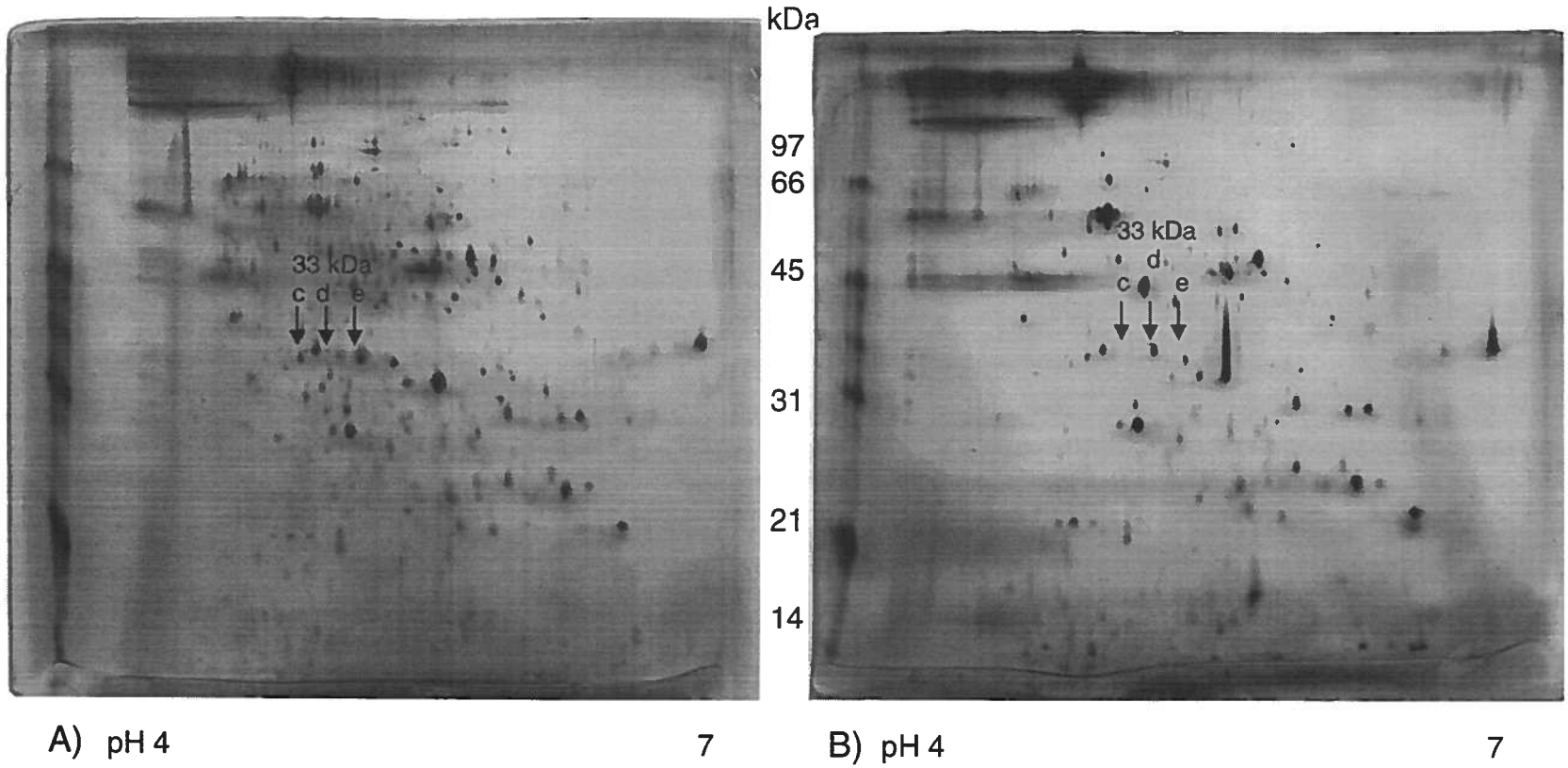


Figure 11 : Protéines cytoplasmiques provenant de lots induit et non-induit de *D. frappieri* lors de la déshalogénation réductrice du 2,4,6-TCP en position *ortho* après coloration au nitrate d'argent des gels d'électrophorèse 2D . A) 105 µg de protéines cytoplasmiques du 2ième lot induit ; B) 106 µg de protéines cytoplasmiques du 2ième lot non-induit. Les lettres c, d et e correspondent à trois isoformes décrites à la figure 12.

4.4.4 L'analyse des fractions membranaires après électrophorèse en deux dimensions

Lors de la comparaison, après électrophorèse 2D, des fractions de protéines membranaires provenant de cultures induites de la première et de la deuxième production et de cultures non-induites de la première production, pour une même quantité totale de protéines, il a été démontré que la protéine 37 kDa (déshalogénase I) se retrouvait en quantité similaire. Cependant, la deuxième fraction membranaire provenant d'une culture non-induite, présente une moins grande quantité de la protéine 37 kDa que les deux fractions membranaires induites pour une même quantité de protéines membranaires migrée en gel (figure 14). Tant dans les fractions membranaires induites et non-induites, cinq isoformes de la protéine 37 kDa ont été repérées bien que la proportion de chacun puisse varier. Ces isoformes se distinguent par leur pI respectif de 4,82, 4,93, 5,05, 5,20 et 5,35 après électrophorèse 2D. Les quantités de protéines totales des gels 1,5 x 160 x 200 mm présentés à la figure 12 ne sont pas assez élevées pour y voir l'isoforme A de la protéine 37 kDa de la déshalogénase I. Toutefois, l'isoforme A est visible dans les gels 1,5 x 195 x 200 mm alors que la quantité totale de protéines membranaires est doublée.

Deux protéines se sont retrouvées systématiquement de façon nettement plus abondante dans les gels des fractions membranaires non-induites et une protéine ne s'est retrouvée systématiquement que dans les gels des fractions membranaires provenant de cultures induites pour la déshalogénation en position *ortho* par le 2,4,6-TCP. Les protéines membranaires réprimées ont une masse moléculaire de 45 kDa et de 55 kDa respectivement en gel SDS-PAGE. La protéine de 45 kDa se présente sous trois isoformes de pI respectifs de 5,08, 5,18 et 5,27 alors que la protéine de 55 kDa se présente sous cinq isoformes de pI respectifs de 5,36, 5,41, 5,50, 5,58 et 5,64. La protéine induite a une masse moléculaire approximative de 15 kDa et se retrouve que sous une seule forme dont le point isoélectrique est de 5,56 (figure 13).

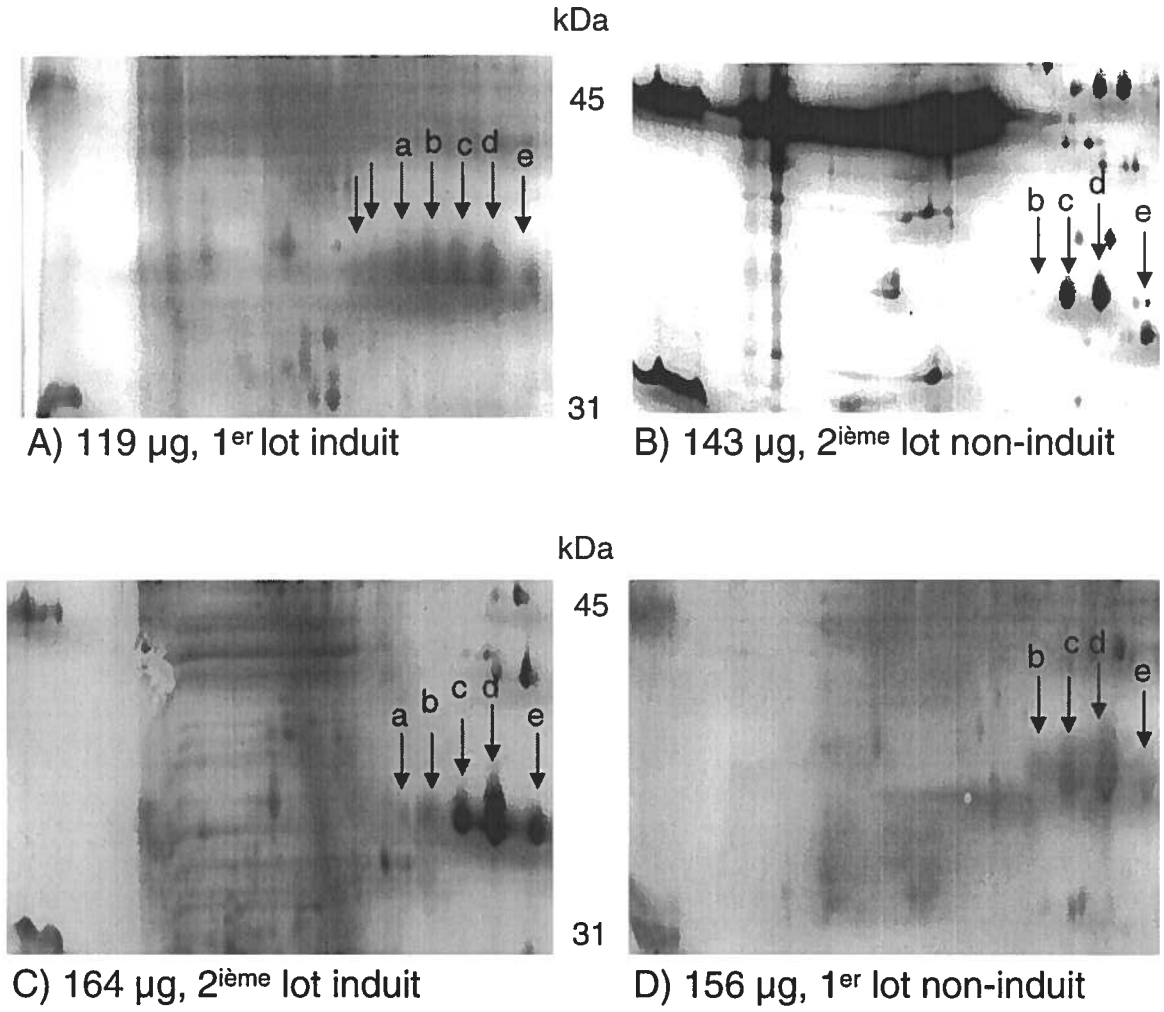


Figure 12 : Comparaison de l'expression de la protéine 37 kDa (déshalogénase I) pour les fractions membranaires des différents lots de *D. frappieri*. Détails de gels 1,5 x 160 x 200 mm colorés au nitrate d'argent (les premières dimensions ont été effectuées avec un gradient de pH de 4 à 7 sur 13 cm).

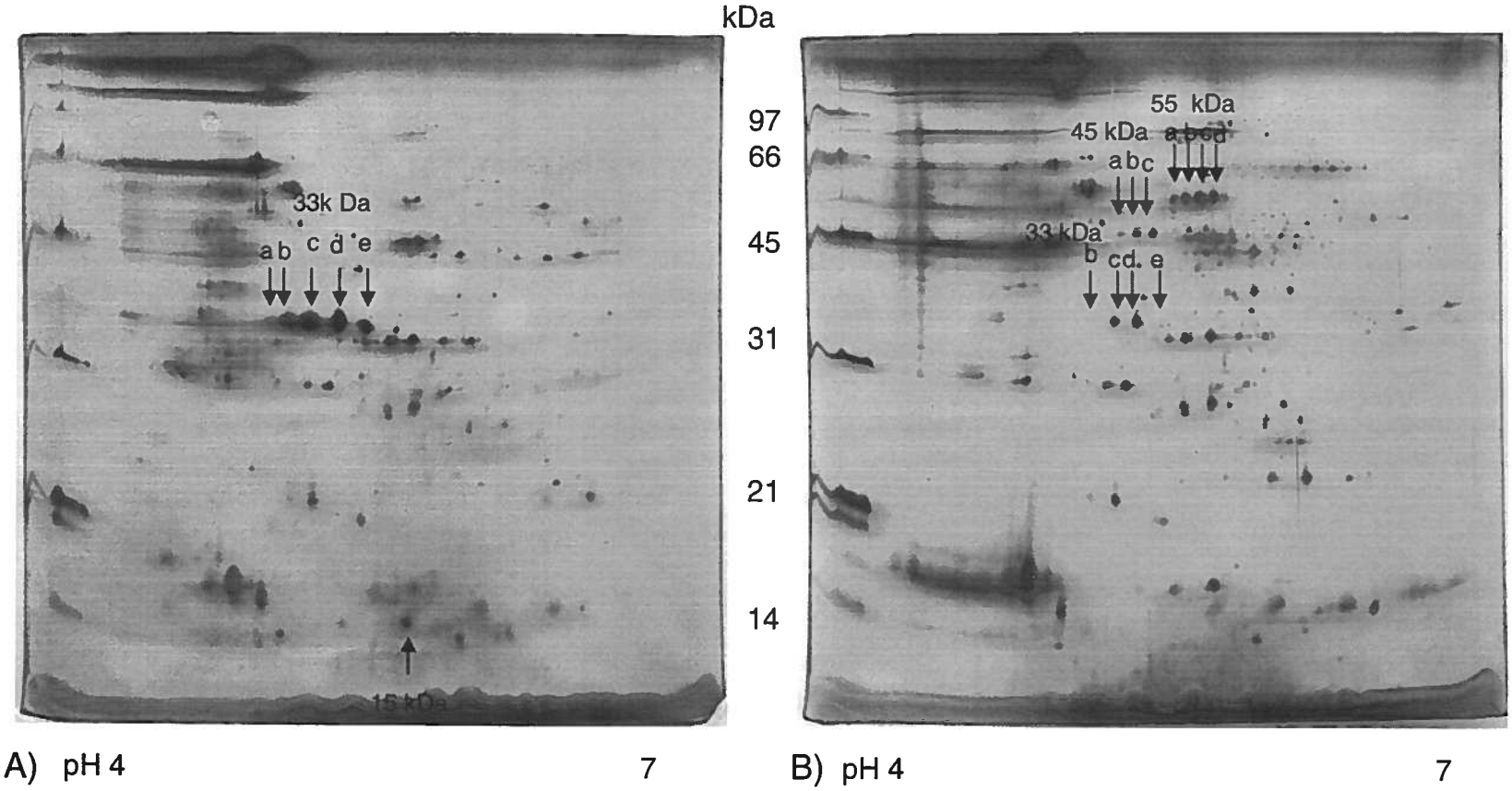


Figure 13 : Identification des protéines membranaires d'intérêt et de leurs isoformes provenant de lots induit et non-induit de *D. frappieri* lors de la déshalogénation réductrice du 2,4,6-TCP en position *ortho* après coloration au nitrate d'argent des gels d'électrophorèse 2D. A) 153µg de protéines membranaires du 2ième lot induit ; B) 143µg de protéines membranaires du 2ième lot non-induit

4.5 Identification des protéines d'intérêt à partir de l'analyse en spectrométrie de masse

4.5.1 La protéine 37 kDa - déshalogénase I

Dans le but de s'assurer que les protéines identifiées dans les gels comme étant des isoformes de la protéine 37 kDa (déshalogénase I) l'étaient bien, les produits de digestion à la trypsine des différents isoformes ont été analysés en SM. Il s'est avéré que les empreintes peptidiques des cinq isoformes partageaient au moins six peptides de mêmes masses (figure 14 et annexe a1).

Le séquençage des peptides de la protéine 37 kDa chez *D. frappieri* a été effectué en parallèle avec le séquençage du gène de cette même protéine dans le laboratoire de Richard Villemur (INRS-Institut Armand-Frappier). Des six séquences peptidiques identifiées en SM/SM (figure 15 et annexes a2, a3, a4, a5, a6 et a7), cinq se retrouvent intégralement dans la séquence déduite du gène. Toutefois, la séquence EADGF retrouvée par spectrométrie de masse correspond à la forme déamidée de la séquence QANGF déduite à partir de la séquence du gène. En effet, la différence de 1,5 Da entre les masses des deux peptides contenant ces séquences peut correspondre à la présence de deux protons si l'on tient compte de l'erreur de ±1 Da sur l'appareil (Tableau 2). La séquence trouvée à partir du gène, sans le peptide signal, est également confirmée par la masse moléculaire et le pI théoriques de la déshalogénase I *D. frappieri* qui sont respectivement de 32,927 kDa et de 5,3. Ces valeurs ne tiennent pas compte d'un co-facteur de type cobalamine qui serait associé à la protéine (apoenzyme). Ainsi, une analyse par spectrométrie de masse de la déshalogénase I purifiée dans le laboratoire de François Lépine (INRS-Institut Armand-Frappier) démontre que cette protéine se trouve sous quatre isoformes et que la forme majeure possède une masse de 33,800 kDa. Ces valeurs s'avèrent du même ordre que celles retrouvées expérimentalement (Tableau 2). De plus, l'empreinte peptidique obtenue par SM de la protéine 37 kDa couvre 43,9 % de

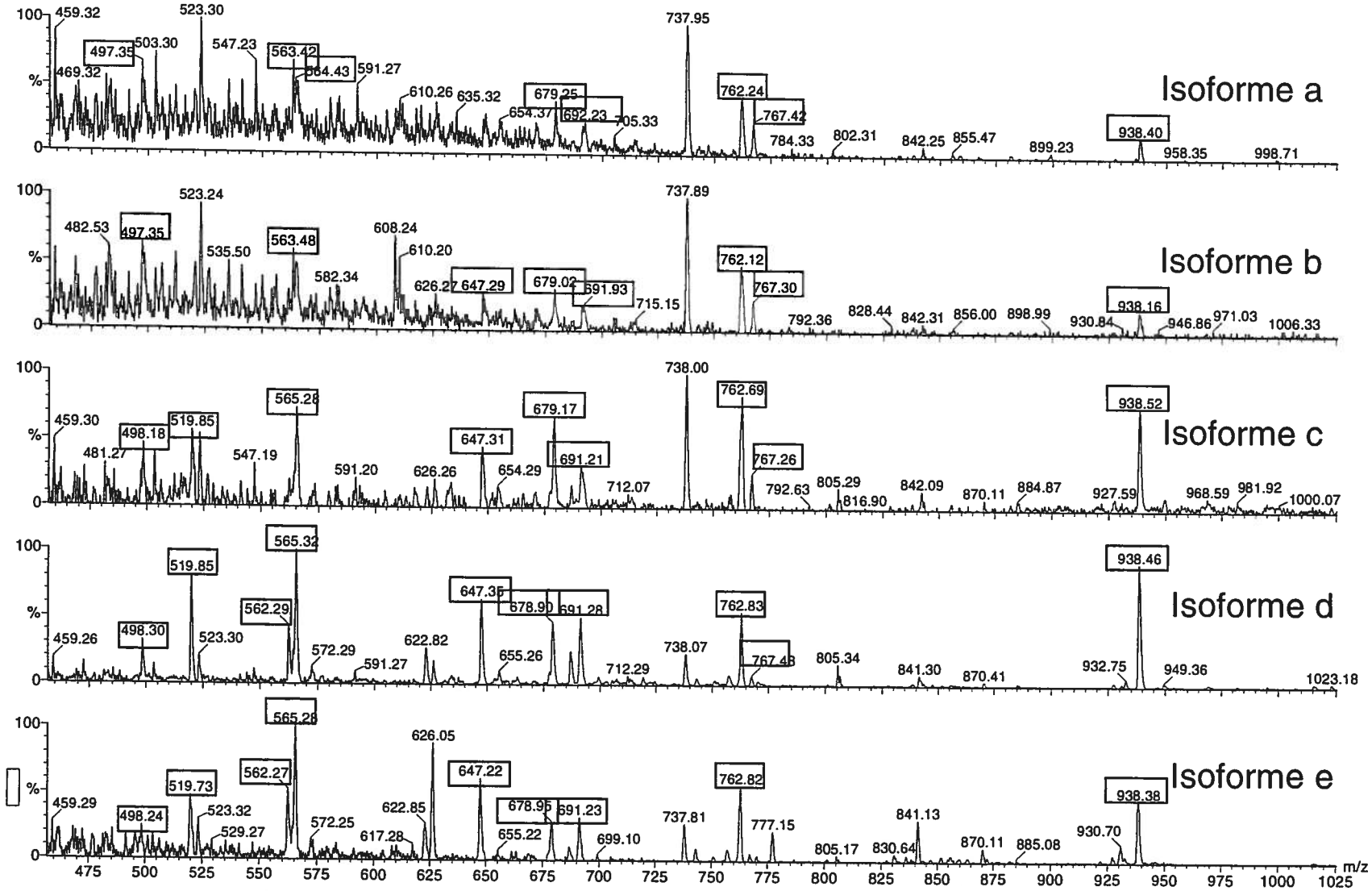


Figure 14 : Comparaison des spectres de masse des peptides tryptiques de cinq isoformes de la protéine 37 kDa de la déshalogénase I de *D. frappieri*. Analyse effectuée par nanoélectrovaporisation couplée à un quadripôle. Pour chacune des isoformes (a,b,c,d et e), les peptides proviennent de quatre digestions tryptiques à même les morceaux de gels SDS-PAGE 12 % colorés au nitrate d'argent.

la séquence théorique déduite à partir du gène (annexe 2a). Les peptides sont répartis sur environ les 3/4 de la séquence (figure 15) (tableau 2).

Les comparaisons entre la séquence de la protéine 37 kDa (déshalogénase I) et les protéines de la banque de données NCBI n'ont pas permis de la rattacher à une protéine déjà répertoriée. Cependant, la séquence peptidique de cette protéine s'avère partager 99,7 % d'identité et de similarité avec une protéine trouvée à partir du génome partiel de *Desulfitobacterium hafniense* (du site Internet JGI) traduit dans les deux directions et dans les trois cadres de lecture. Ce pourcentage de similarité n'a été calculé qu'à partir du début de la séquence de *D. frappieri*.

```
MKKTLGIILSISLAFSVLALPIFAAVDTTTSATVEAATPAAPATPAKPAATAPAAAPSVDTSKIAAGTYYTV
                 |||||||||||||||||||||||||||   ||||||||||||||||||||||||
-----------------LALPIFAAVDTTTSATVEAATPAAPAT---PAATAPAAAPSVDTSKIAAGTYYTV

VSGDFFWQIAAKHGLTIDALAKLNPQIKNVNLIFPGQKILVKAEEAAAASTSTSTSTSTAAVAPAAKKLYQG
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||    ||||||||||||||||||
VSGDFFWQIAAKHGLTIDALAKLNPQIKNVNLIFPGQKILVKAEEAAAA----STSTSTAAVAPAAKKLYQG

IGMVANYRDNTARQKDHDNLNITTVAALFDDAGKIVKLQFDVVEILPDMFPGWMDPEAADKSFYKDAQANGF
||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
IGMAANYRDNTARQKDHDNLNITTVAALFDDAGKIVKLQFDVVEILPDMFPGWMDPEAADKSFYKDAQANGF

NWETKKEEGDAYGMKASAVSGKEWWEQMNFYEEYFKGKTVAEVQDWFAKYCDANGRPYKMAYPEKLTDADKA
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NWETKKEEGDAYGMKASAVSGKEWWEQMNFYEEYFKGKTVAEVQDWFAKYCDANGRPYKMAYPEKLTDADKA

KVATFTEAEKKMLVDVTTGATMSLQDPHSRFIDALVKAYEVRKEVK
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
KVATFTEAEKKMLVDVTTGATMSLQDPHSRFIDALVKAYEVRKEVK
```

Figure 15 : Comparaison entre les séquences de la protéine 46 kDa de *D. hafniense* (caractères gras) et la séquence de la protéine 37 kDa (déshalogénase I) de *D. frappieri*. Peptide signal (orange). Séquences peptidiques trouvées par SM/SM de la protéine 37 kDa de *D. frappieri* (en rouge). Peptides identifiés par empreinte peptidique en SM chez *D. frappieri* ou peptide dont la séquence a été identifiée en SM/SM (en bleu). Peptides séquencés chez *D. frappieri* (soulignés). Absence d'un acide aminé (-). Identité (|).

Tableau 3 : Comparaison entre les masses des peptides obtenus suite à une digestion théorique à la trypsine de la séquence protéique déduite à partir du gène de la protéine 37 kDa (déshalogénase I) de *D. frappieri* avec les masses et les séquences obtenues expérimentalement en spectrométrie de masse pour les peptides de cette même protéine digérée à la trypsine.

Valeurs théoriques pour la protéine de 37 kDa		Valeurs observées pour la protéine de 37 kDa			
Séquence	Masse (Da)	Séquence	(*m/z*)	Z	Masse (Da)
LALPIFAAVDTTTSATVEAATPAAPATPAATAPAA APSVDTSK	4006,08				
LQFDVVEILPDMFPGWMDPEAADK	2762,30				
IAAGTYYTVVSGDFFWQIAAK	2307,16				
MLVDVTTGATMSLQDPHSR	2058,00		686,87	3	2057,61
DHDNLNITTVAALFDDAGK	2028,98		1015,5	2	2029,00
EWWEQMNFYEEYFK	2027,84				
AEEAAAASTSTSTAAVAPAAK	1874,92	AAAASTSTST AA	938,4	2	1874,80
DAQANGFNWETK	1379,61	EADGF	691,54	2	1381,54
LYQGIGMAANYR	1355,67	QGIGMAA	679,09	2	1356,18
TVAEVQDWFAK	1292,64	AEVQD	647,41	2	1292,82
YCDANGRPYK	1185,52				
NVNLIFPGQK	1128,63	VNLI	565,38	2	1128,76
HGLTIDALAK	1037,59		519,91	2	1037,82
EEGDAYGMK	998,40				
VATFTEAEK	994,50		498,24	2	994,48
FIDALVK	804,48				
MAYPEK	737,34				
LNPQIK	711,43				
LTDADK	661,33				
AYEVR	636,32				
ASAVSGK	618,33				
DNTAR	575,27				
SFYK	543,27				
QKDHDNLNITTVAALFDDAGK (un mauvais clivage)	2285,13	TTVAAL	762,99	3	2285,97
VATFTEAEKK (un mauvais clivage)	1122,59		562,35	2	1122,70

Seuls les peptides de plus de 500 Da sont ici retenus.

4.5.2 La protéine 45 kDa

L'analyse par SM des produits de digestion des isoformes a et b de la protéine réprimée de 45 kDa illustrée à la figure 13B a permis de confirmer qu'elles étaient des isoformes d'une même protéine. En effet, leurs empreintes peptidiques partagent au moins douze masses (figure 16 et annexe b1). L'isoforme c n'a pas pu être analysée en spectrométrie de masse faute de matériel.

En plus d'offrir une empreinte des masses peptidiques de la protéine de 45 kDa, l'analyse en spectrométrie de masse de type SM/SM a permis de trouver la séquence de cinq des peptides de cette protéine (figure 16 et annexes b2, b3, b4, b5 et b6). Ces séquences ont été utilisées pour retrouver la séquence protéique complète de la protéine à partir du génome partiel de *D. hafniense* (du site Internet de JGI) traduit dans les deux directions et dans les trois cadres de lecture. On ne retrouve les cinq séquences peptidiques que dans une seule séquence protéique traduite du génome partiel de *D. hafniense*. La masse moléculaire et le pI théoriques de cette protéine chez *D. hafniense* sont respectivement de 51 kDa et de 5,3. Ces valeurs s'avèrent du même ordre que celles retrouvées pour la protéine de 45 kDa de *D. frappieri* (tableau 3). De plus, l'empreinte peptidique de la protéine de 45 kDa de *D. frappieri* couvre 51,8 % de la séquence de la protéine de 51 kDa de *D. hafniense* et les peptides sont répartis tout au long de la séquence (figure 17) (tableau 3).

Une recherche comparative entre la protéine de 51 kDa de *D. hafniense* et les séquences déjà identifiées dans les banques de données a été effectuée à l'aide du logiciel Standard protein-protein BLAST [blastp] afin d'identifier la protéine. La protéine de 51 kDa de *D. hafniense* partage le plus de similarité avec la sous-unité β de l'ATP synthétase de *Moorella thermoacetic*. Les deux séquences protéiques possèdent 70 % d'identité et 81 % de similarité (figure 17).

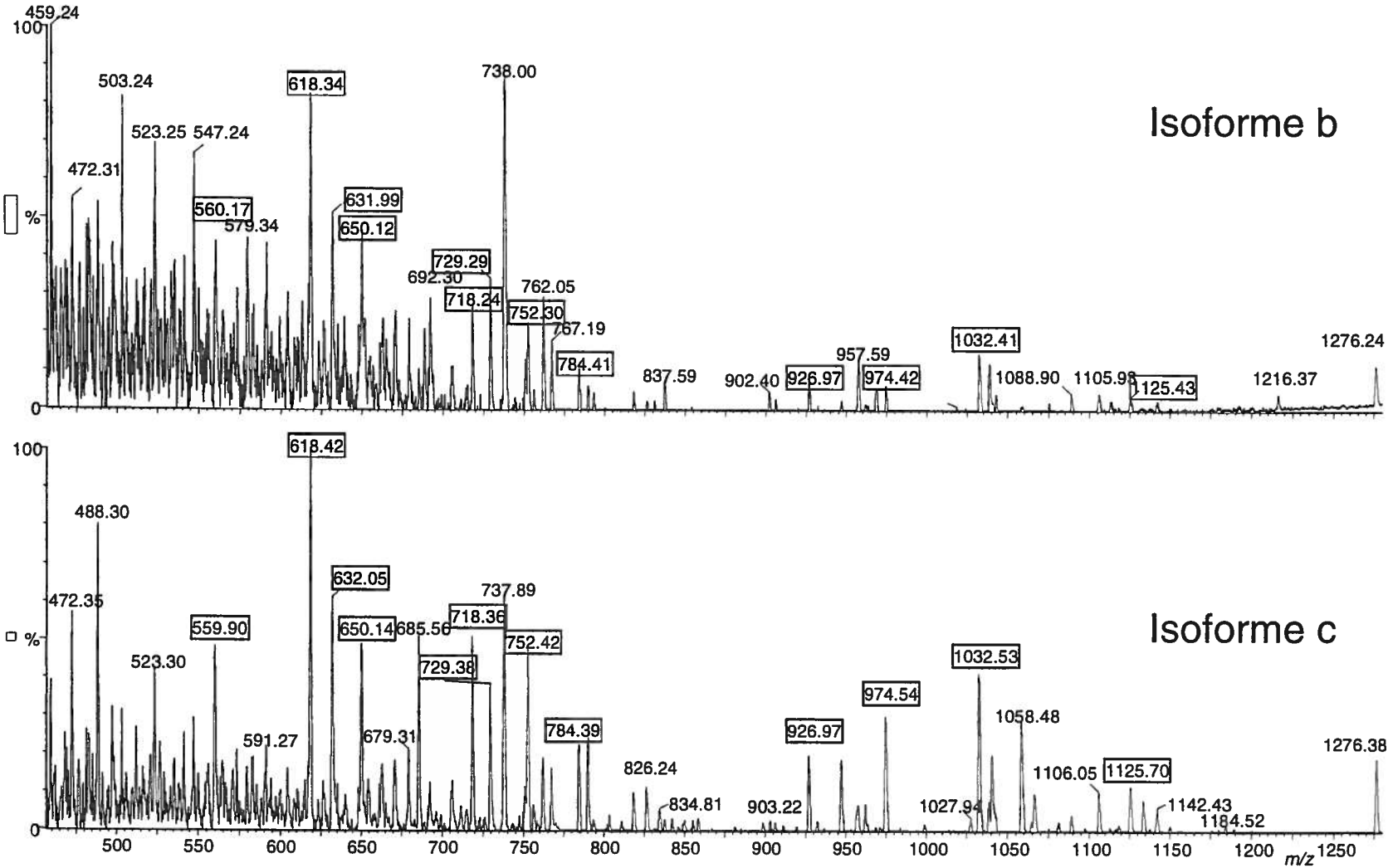


Figure 16 : Comparaison des spectres de masse des peptides tryptiques de deux isoformes de la protéine 45 kDa de *D. frappieri*. Analyse effectuée par nanoélectrovaporisation couplée à un quadripôle. Pour chacune des isoformes (b et c), les peptides proviennent de quatre digestions tryptiques à même les morceaux de gels SDS-PAGE 12 % colorés au nitrate d'argent.

Tableau 4 : Comparaison entre les masses des peptides obtenus suite à une digestion théorique à la trypsine de la protéine 51 kDa de *D. hafniense* et les masses obtenues en spectrométrie de masse pour les peptides de la protéine 45 kDa de *D. frappieri* digérée à la trypsine.

Protéine de 51 kDa de *D. hafniense*		Protéine de 47 kDa de *D. Frappieri*			
Séquence	Masse (Da)	Séquence	(*m/z*)	Z	Masse (Da)
AIDNGEEVHTDTSYPIHRPAPAFVDQDPSTVMLETGIK	4150,00				
NGSITSVQAIYVPADDLTDPAPATAFAHLDATTVLNR	3824,92				
TVLIQELINNIAMEHGGLSVFAGVGER	2866,50				
IVQIMGAVVDVEFASEALPEIYSAVK	2777,46		927,03	3	2778,09
HDNLPEAAFHMVGTIEEAIEK	2350,13		784,39	3	2350,17
HDNLPEAAFHMVGTIEEAIEK MSO = + 276 Da	2366,12		789.86	3	2366,58
MPSAVGYQPTLATEMGALQER	2249,08		1125,70	2	2249,40
ELQDIIAILGMDELSEDEK	2160,05				
GMAALNTGAPITVPVGPATLGR	2063,12	GAPIT	1032,53	2	2063,06
DVQNQDVLLFIDNIFR	1948,01		974.54	2	1947,08
FLSQPFHVAEVFTGSPGK	1946,99		650,14	3	1947,42
IDLTLEVAQHLGNNTVR	1892,01		947,09	2	1892,18
MAMVFGQMNEPPGAR	1634,74		818,44	2	1634,88
ILSPQILGEEHYK	1525,81				
GIYPAVDPLDSNSR	1502,74	PAVD	752,42	2	1502,82
VGLTGLTMAEYFR	1456,74	LTGLTM	729,38	2	1456,76
FTQAGSEVSALLGR	1434,75	AGSEVS	718,36	2	1434,72
CVAMSSTDGLQR	1266,57				
EGNDLWNEMR	1262,54		632,05	2	1262,10
VIDLLAPYSK	1117,64		560,02	2	1118,04
IGLFGGAGVGK	974,56	ILGF	488,30	2	976,60
GGFSPVNIGK	974,52				
DVQQILQK	970,55				
IFNVLGK	789,48				
ESGVIDK	746,38				
EIVEGK	673,37				
VTVPEK	671,39				
YVPIK	618,37				
ITSTR	576,32				
LVVSR	572,37				
AISEK	546,30				
ETIR	517,29				
ILSPQILGEEHYKVAR (un mauvais clivage)	1852,02		618,42	3	1852,26

Seuls les peptides de plus de 500 Da sont ici retenus.

MSO = méthionine oxydée

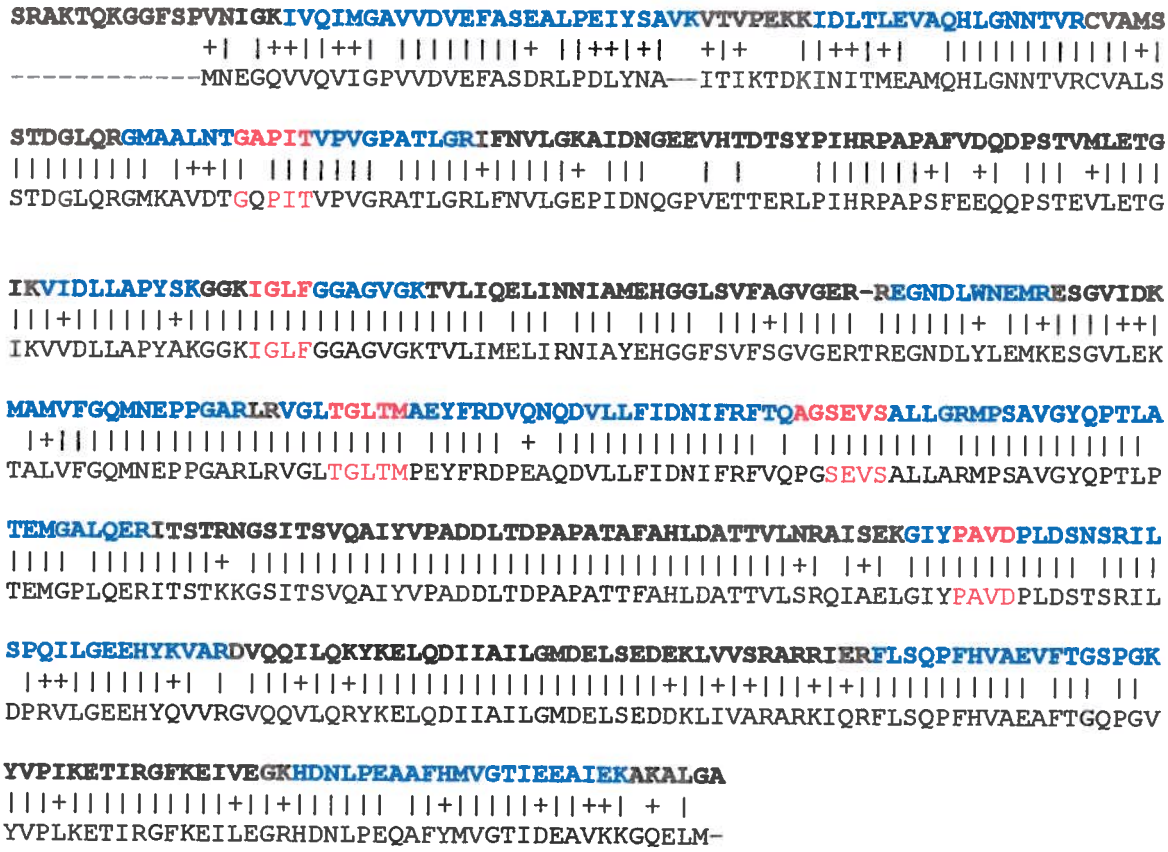


Figure 7 : Comparaison entre les séquences de la protéine de 51 kDa de *D. hafniense* (caractères gras) et la séquence de la sous-unité β de l'ATP synthétase de *Moorella thermoacetic*. Séquences peptidiques trouvées par SM/SM de la protéine 47 kDa de *D. frappieri* (en rouge). Peptides identifiés par empreinte peptidique en SM chez *D. frappieri* ou peptide dont la séquence a été identifiée en SM/SM (en bleu). Peptides séquencés chez *D. frappieri* (soulignés). Absence d'un acide aminé (-). Identité (|). Similarité (+).

4.5.3 La protéine 55 kDa

L'analyse par SM des produits de digestion des cinq protéines (a, b, c, d et e) réprimées de 55 kDa a révélée qu'il s'agissait bien des isoformes d'une même protéine. En effet, leurs empreintes peptidiques partagent au moins trois masses (figure 18 et annexe c1).

L'analyse en SM/SM a quant à elle apporté une information supplémentaire : la séquence de quatre peptides (figure 18 et annexes c2, c3, c4 et c5). Ces séquences ont été

utilisées pour retrouver la séquence protéique complète de la protéine à partir du génome partiel de *Desulfitobacterium hafniense* (du site Internet de JGI) traduit dans les deux directions et dans les trois cadres de lecture. Ces quatre séquences se retrouvent réunies dans une seule séquence protéique traduite du génome partiel de *D. hafniense*. La masse moléculaire et le pI théoriques de cette protéine chez *D. hafniense* sont respectivement de 50 kDa et de 5,3. Ces valeurs s'avèrent du même ordre que celles retrouvées pour la protéine 55 kDa de *D. frappieri* (tableau 4). Un autre fait important, l'empreinte peptidique de la protéine 55 kDa de *D. frappieri* couvre 55,8 % de la séquence de la protéine de 50 kDa de *D. hafniense* et les peptides sont répartis tout au long de la séquence (tableau 4) (figure 19).

Afin d'identifier la protéine, une recherche comparative entre la protéine de 50 kDa de *D. hafniense* et les séquences déjà identifiées dans les banques de données a été effectuée à l'aide du logiciel Standard protein-protein BLAST [blastp]. La protéine de 50 kDa de *D. hafniense* partage le plus de similarité avec une sous-unité de la glycolate oxydase de *Bacillus halodurans*. Les deux séquences protéiques possèdent 52 % d'identité et 71 % de similarité (figure 19).

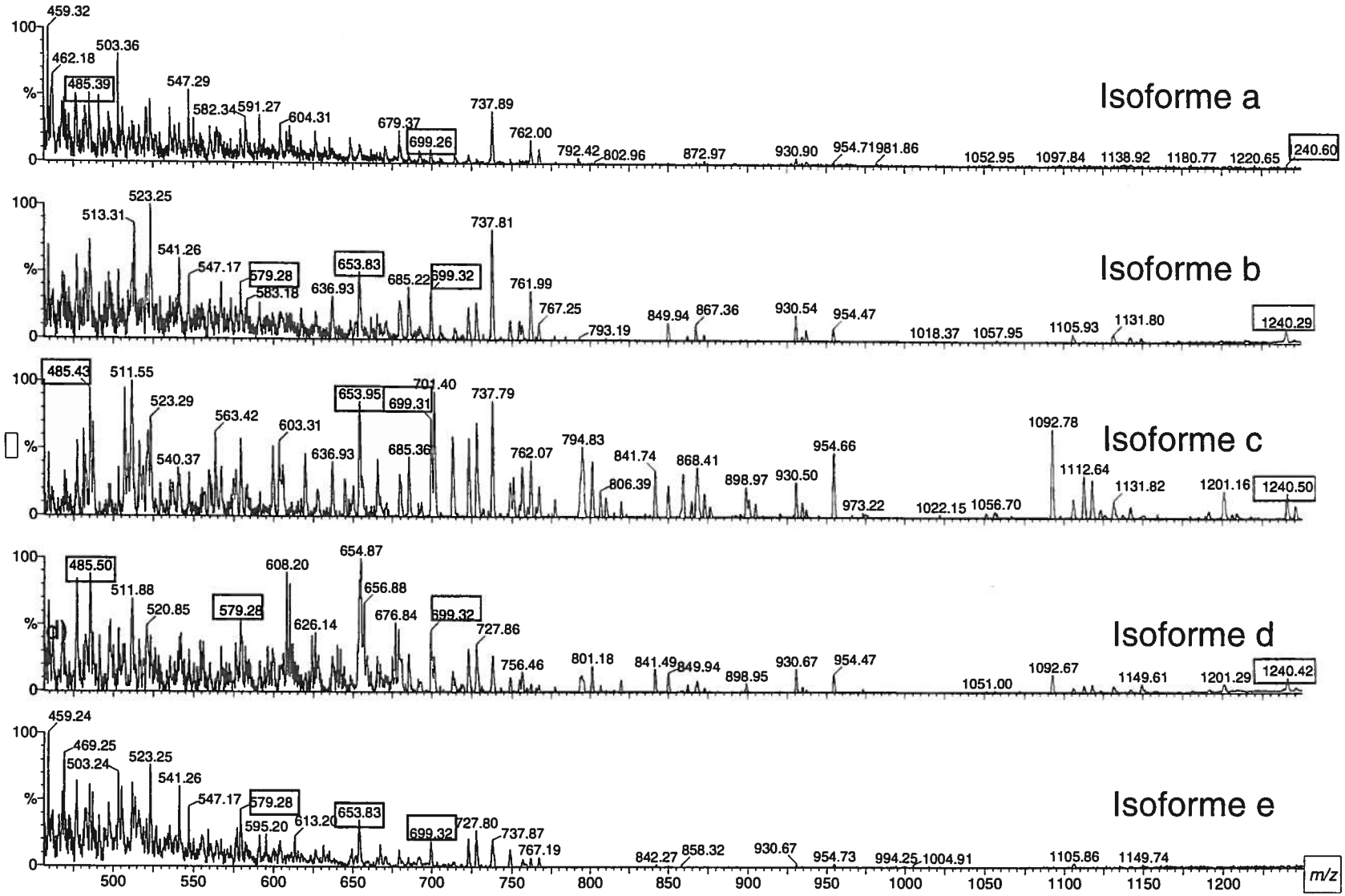


Figure 18 : Comparaison des spectres de masse des peptides tryptiques de cinq isoformes de la protéine 50 kDa de *D. frappieri*. Analyse effectuée par nanoélectrovaporisation couplée à un quadripôle. Pour chacune des isoformes (a, b, c, d et e), les peptides proviennent de quatre digestions tryptiques à même les morceaux de gels SDS-PAGE 12 % colorés au nitrate d'argent.

Tableau 5 : Comparaison entre les masses des peptides obtenus suite à une digestion théorique à la trypsine de la protéine 50 kDa de *D. hafniense* et les masses obtenues en spectrométrie de masse pour les peptides de la protéine 57 kDa de *D. frappieri* digérée à la trypsine.

Protéine de 50 kDa de *D. hafniense*		Protéine de 57 kDa de *D. frappieri*			
Séquence	Masse (Da)	Séquence	*m/z* (Da)	*z*	Masse (Da)
GIVMSMLHMNQIIEVDAENLTATVQPGVIIQDLN	5613,82				
DAALEHGLFYPPDPGTVK					
ENVVTEHEELLSYSYDATAAMPHQTPDVFVTPK	3717,75		1240,50	3	3718,5
YDLLIGTFGHAGDGNLHPTILTDENNK	2924,43				
NVTGYDLTALFTGAEGTLGIITEIIVK	2808,52		937,14	3	2808,42
TVENFTHAGLPVDAEAILLCEVDGYK	2803,37				
AVEEIFQVAVSLGGTLSGEHGIGMAK	2599,33				
VIPATLEIMDNITIR	1697,94	ATLEIMD	850,03	2	1698,06
TATMGGSVSESSGGLR	1495,69		748.72	2	1495,44
RPTTVLEDATVPR	1453,79		727.90	2	1453,80
GSATNLSGGTIPIEK	1443,76	TNLSG	723.04	2	1444,08
AEALNELIQVLGK	1396,79	ALNE	699,37	2	1396,74
FLPLEFGEAGVK	1305,70	PLEFGEA	653,95	2	1305,90
ALLGVFDDIDK	1204,63		603,31	2	1204,62
EQGAVEINVAK	1156,61		579,27	2	1156,54
TTEQVSEVMK	1150,55				
YDLPVYPR	1021,52		511,61	2	1021,22
AGNAIAAIIR	968,58		485,53	2	968,86
EACDPDYR	967,37				
NALPALAQR	952,55		477,32	2	952,22
LNPVPEAR	894,49				
HYVMGMK	864,40				
EAALVEK	758,42				
IPHMIK	737,43				
ANGDIIK	729,40				
EEMER	692,28				
IWLAR	657,40				
TDEER	648,27				
EAVER	602,30				
QIAEK	587,33				
YGVTK	566,31				
INPGK	527,31				

Seuls les peptides de plus de 500 Da sont ici retenus.

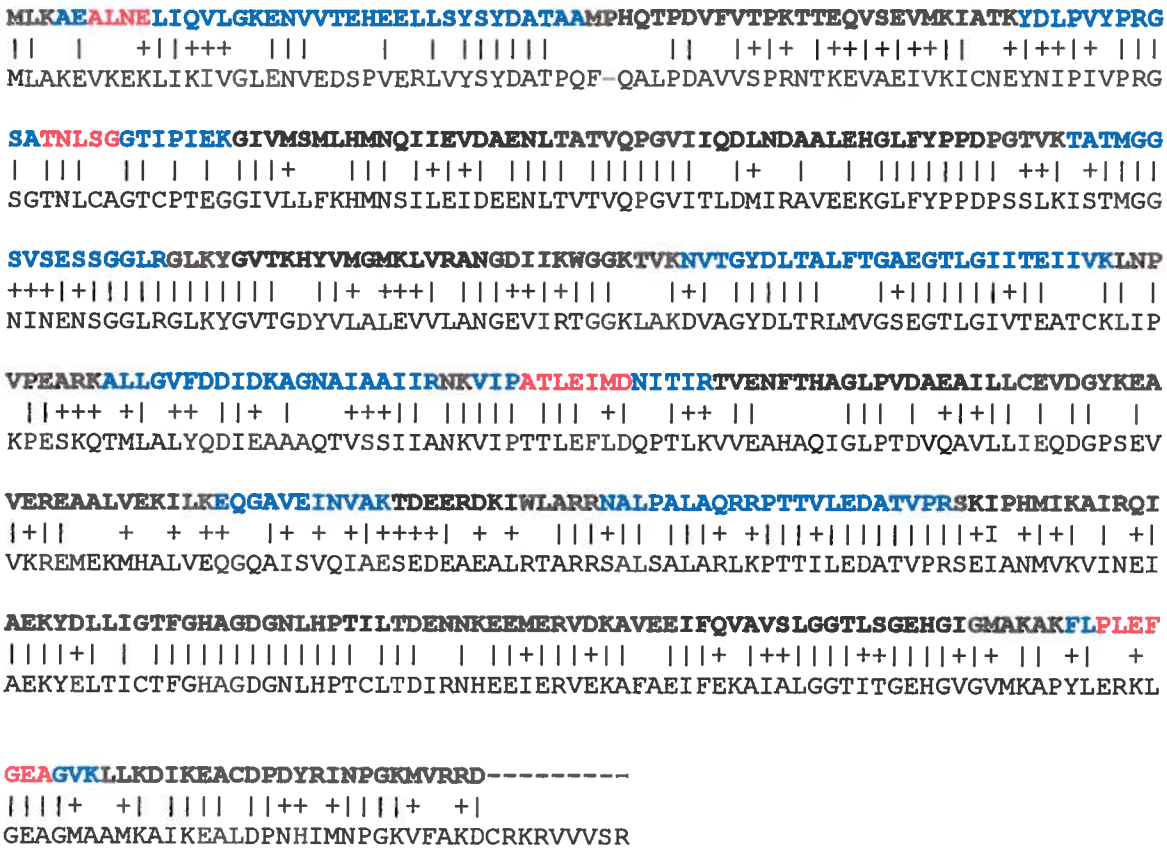


Figure 18 : Comparaison entre les séquences de la protéine 50 kDa de *D. hafniense* (caractères gras) et la séquence de la sous-unité de la glycolate oxydase de *Bacillus halodurans*. Séquences peptidiques trouvées par SM/SM de la protéine de 55 kDa de *D. frappieri* (en rouge). Peptides identifiés par empreinte peptidique en SM chez *D. frappieri* ou peptide dont la séquence a été identifiée en SM/SM (en bleu). Absence d'un acide aminé (-). Identité (|). Similarité (+).

5. Discussion

5.1 Protéines étudiées et isoformes

L'approche protéomique avec électrophorèse 2D choisie pour l'étude de la déshalogénation en position *ortho* du 2,4,6-TCP chez *D. frappieri* a permis de constater que la déshalogénase I, responsable de cette activité, ainsi que deux protéines réprimées, la 45 kDa et la 55 kDa, se présentaient sous plusieurs isoformes. Les différentes isoformes, identifiées tant pour la déshalogénase I que pour les protéines de 45 et 55kDa, possèdent des masses moléculaires calculées à partir de la distance de migration en gel apparemment identique pour une protéine donnée, les isoformes ne se différenciant que par leur pI. Des modifications mineures sur les protéines pourraient être à l'origine des faibles différences de pI et de masse moléculaire entre les isoformes. Toutefois, les empreintes peptidiques obtenues en spectrométrie de masse étant constantes d'une isoforme à une autre pour une même protéine, il n'a pas été possible de déterminer la nature des différences entre elles. Les peptides sur lesquels se situent les modifications n'ont peut-être pas été détectés en spectrométrie de masse soit parce que leur valeur de *m/z* était en dehors de la plage sélectionnée ou encore parce qu'ils n'ont pas été ionisés en quantité suffisante. Une solution pour contourner ce problème serait d'électro-éluer chacun des isoformes pour une même protéine à partir du gel après électrophorèse 2D et de déterminer la masse de chacun des isoformes par spectrométrie de masse à l'aide d'une ionisation par électrovaporisation. Les différences entre les masses des isoformes seraient alors autant d'indices de la nature des modifications sur la protéine. Ces modifications pourraient être attribuées à la dégradation des protéines dans la cellule comme à différentes étapes de maturation. Il a été démontré que la protéine 37 kDa contient un chromophore de type cobalamine. Les différents isoformes pourraient représenter différents stades de maturation de cette protéine. Les modifications co-traductionnelles ou post-traductionnelles s'avèrent des événements courant dans la cellule. Des modifications générées lors du traitement des échantillons de la production des fractions cytoplasmiques et membranaires à l'isofocalisation des protéines pourraient être aussi à l'origine de certains isoformes.

5.2 La protéine 37 kDa - déshalogénase I

La déshalogénase I se retrouve abondamment dans les fractions membranaires mais aussi en quantité non-négligeable dans les fractions cytoplasmiques. En effet, Boyer (1999) avait observé une activité de déshalogénation en position *ortho* dans les deux fractions provenant de lots induits par le 2,4,6-TCP. La présence de la déshalogénase I en plus grande quantité dans la membrane que dans le cytoplasme laisse croire que cette enzyme est liée à la membrane de façon non-intégrale. Plusieurs déshalogénases sont d'ailleurs liées à la membrane via une protéine d'ancrage telles la déshalogénase tétrachloroéthène réductrice de *Dehalococcoides ethenogenes* (Magnuson *et al.*, 2000), la tétrachloroéthène réductrice de *Dehalospirillum multivorans* (Neumann, Wohlfarth et Diekert, 1998) et la déshalogénase *ortho*-chlorophénol réductrice de *Desulfitobacterium dehalogenans* (van de Pas *et al.*, 1999b).

La protéine 37 kDa retrouvée dans la fraction membranaire solubilisée se présente sous au moins cinq isoformes après électrophorèse 2D. Ces isoformes sont présentes tant dans les fractions membranaires induites et non-induites pour la déshalogénation en position *ortho* du 2,4,6-TCP. L'abondance relative des isoformes les unes par rapport aux autres après électrophorèse 2D demeure constante entre les différents lots induits et non-induits. Toutefois, le second lot non-induit pour la déshalogénation en position *ortho* du 2,4,6-TCP présente une quantité moindre de tous les isoformes de la déshalogénase I. Bien que les conditions de culture de *D. frappieri* aient été maintenues constantes (inoculum, température, pH initial), il demeure possible que des différences de l'état physiologique des bactéries lors du prélèvement de la biomasse soient responsables de certaines variations. Au cours de la croissance de la souche PCP-1, le pyruvate est transformé en acétate qui s'accumule dans le milieu et entraîne une baisse importante du pH. La maintenance de la souche PCP-1 par repiquage périodique en présence de 2,4,6-TCP peut également apporter des changements de la bactérie au niveau de son taux de croissance, de son activité de déshalogénation et de son induction. Il est toutefois à noter que seules les isoformes « c », « d » et « e » dont le pI est supérieur à 5 demeurent après purification et encore ici, la même abondance relative entre les isoformes est retrouvée.

Les masses moléculaires des différentes isoformes étant très rapprochées, il est probable que les isoformes « a » et « b » aient un comportement différent soit au niveau de leur solubilisation (conditions différentes que celle utilisée pour les électrophorèses 2D) et/ou qu'ils aient été perdus lors de la purification.

À ce jour, l'ensemble des déshalogénases capables de déshalogéner les halophénols et les chloroéthènes possède un ou plusieurs cofacteurs. Les cofacteurs observés sont soit un hème ou soit une cobalamine avec des centres fer-soufre (tableau 1). L'une des hypothèses pour expliquer la présence de la protéine 37 kDa dans le lot non-induit serait que la déshalogénase I y soit sous une forme inactive. Ainsi, l'activité de la déshalogénase I pourrait être sous-jacente à la présence d'un cofacteur. Les résultats obtenus de la caractérisation de cette protéine suggèrent qu'il y aurait présence d'une cobalamine mais pas de centre fer-soufre (R. Beaudet, résultats non-publiés). L'absence d'un hème chez la déshalogénase I a été à nouveau confirmée par la coloration à l'*o*-dianisidine des protéines membranaires d'un lot induit et d'un lot non-induit pour la déshalogénation en position *ortho* séparées dans un gel en une dimension. Seulement deux bandes dont les masses de 137 kDa et de 30 kDa ne correspondent pas à celui de la déshalogénase I ont été révélées. Ces hémoprotéines semblaient plus abondantes dans le lot induit pour la déshalogénation.

La protéine 37 kDa est non seulement constitutive mais également l'une des protéines les plus abondamment exprimées par *D. frappieri* et ce tant dans les lots induits que non-induits pour la déshalogénation en position *ortho*. Il a été démontré que les souches de *D. frappieri*, dont la souche PCP-1, peuvent utiliser comme accepteur d'électrons une grande variété de composés aromatiques halogénés (Dennie et al 1998) de même que le nitrate, le sulfite, le thiosulfate, l'As(V), le Fe(III), le Fe pyrophosphate et le Se(VI) (Niggemyer *et al.*, 2001). Cette capacité à réduire ces substances suggère donc la présence de nombreuses enzymes dont certaines pourraient avoir des spécificités de réduction étendue. Il a aussi été démontré que les coenzymes ayant un métal tels que la vitamine B_{12} (Co), la coenzyme F_{430} (Ni), et l'hématine (Fe) présentent des activités de déshalogénation réductrice de chlorophénols et de solvants chlorés (Gantzer et Wackett,

1991; Smith et Woods 1994). La protéine 37 kDa pourrait être présente sous une forme constitutive qui serait rapidement activée pour déshalogéner les chlorophénols. Bouchard *et al.*, en 1996, avaient constaté une déchloration rapide en position *ortho* du PCP pour le transformer en 2,3,4,5-tétrachlorophénol puis en 3,4,5-trichlorophénol. Le temps de latence quasi inexistant entre l'ajout du substrat et l'activité enzymatique *in vivo* est peut-être un indice de plus sur le caractère constitutif de l'expression de la protéine 37 kDa qui n'aurait besoin que d'une modification mineure pour devenir active. Une étude ultérieure sur la spécificité de la protéine 37 kDa vis-à-vis différents accepteurs d'électrons serait intéressante pour déterminer si cette protéine n'a pas une autre fonction dans la cellule.

En plus de donner des informations sur les isoformes et leur abondance relative, l'étude protéomique a permis de donner des informations complémentaires à la séquence en acides nucléiques de la déshalogénase I. En effet, après digestion théorique de la séquence de la déshalogénase I de *D. frappieri* PCP-1, on retrouve entre autre un peptide dont la masse est de 1379,61Da et dont la séquence est DAQANGFNWETK alors que la masse obtenue expérimentalement sur tous les isoformes est de 1381Da et la séquence trouvée en spectrométrie de masse est EADGF. Par conséquent, il y a substitution de la glutamine (Q) et de l'asparagine (N) de la séquence déduite par un acide glutamique et un acide aspartique sur le peptide analysé en spectrométrie de masse. Cette modification est soit la résultante d'une modification post-traductionnelle, soit la résultante d'une modification induite par les manipulations considérant que tout le travail jusqu'à la migration en gel a été effectué en milieu réducteur. Dans un cas comme dans l'autre ces modifications ne sont pas généralisées à l'ensemble des glutamines et des asparagines. Chez la déshalogénase I, seul un peptide analysé en spectrométrie de masse présentait ces modifications alors qu'aucun des peptides des protéines de 47 et 57 kDa analysés en spectrométrie de masse ne les possèdent. Toutefois, l'analyse des peptides avec un spectromètre de masse offrant une résolution supérieure au triple quadripôle tel un « Q-TOF » permettrait de s'assurer que cette différence de 2 Da entre la valeur théorique et observée n'est pas due à l'erreur sur les données expérimentale de l'appareil.

Le génome de *D. hafniense* est un outil précieux qui a facilité l'identification de la séquence de la déshalogénase I. Récemment, Niggemyer *et al.* (2001) ont proposé suite à une étude physiologique comparative et d'analyse d'hybridation ADN-ADN entre *D. frappieri* PCP-1 *et D. hafniense* que ces deux souches devraient être unifiées en une seule espèce. Cependant, des différences demeurent entre *D. hafniense* et *D. frappieri* comme en témoigne la séquence de la déshalogénase I de *D. frappieri* qui possède 99,7 % d'identité et de similarité. Deux délétions, une de trois acides aminés et une de quatre acides aminés par rapport à la séquence de la déshalogénase I chez *D. hafniense* de même que par une alanine qui substitue une valine dans la séquence de *D. hafniense* constituent les différences entre les séquences. Ces deux dernières différences entre les déshalogénases I de *D. hafniense* et de *D. frappieri* déduites à partir de la comparaison des séquences des gènes ont été confirmées par les masses, obtenues en spectrométrie de masse, des peptides contenant les différences chez *D. frappieri*. La protéine 37 kDa n'ayant pas été purifiée à ce jour chez *D. hafniense*, on ne peut dire si celle-ci est active ou si les différences entraîneraient une perte ou un gain d'activité de l'enzyme lors de la déshalogénation réductrice en position *ortho* du 2,4,6-TCP.

La déshalogénase I n'est pas la seule enzyme capable de déshalogénation en position *ortho* chez *D. frappieri*. En effet, deux autres enzymes partagent cette activité : la déshalogénase II dont l'activité spécifique en position *ortho* est mineure, dégradant principalement aux positions *meta* et *para* (Boyer, 1999), ainsi qu'une autre protéine en voie d'être purifiée dans le laboratoire de Réjean Beaudet. Une fois que ces autres enzymes auront été caractérisées, il sera intéressant de vérifier si ces protéines ont une conformation s'apparentant aux autres déshalogénases décrites dans la littérature et si elles sont induites lors de la déshalogénation réductrice et retrouvées après électrophorèse 2D. Une déshalogénase pouvant déchlorer en position *ortho*, le 3-chloro-4-hydroxyphénylacétate, a déjà été isolée de *D. hafniense* (Christiansen *et al.*, 1998). Cette enzyme est d'origine membranaire, a une masse moléculaire de 46 kDa et possèderait trois centres fer-soufre.

Bouchard *et al.* (1996) ont déjà constaté lors d'essais *in vivo* chez *D. frappieri* PCP-1 un temps de latence de 36 h avant que le 3,4,5-TCP ne soit dégradé en 3,5-DCP, laissant supposer l'induction d'une déshalogénase par le substrat. Il serait également intéressant de suivre l'expression des déshalogénases de *D. frappieri* PCP-1 à toutes les étapes de sa croissance. Jusqu'à maintenant, l'étude des déshalogénases n'a été effectuée qu'à partir de cultures en phase exponentielle de croissance. De même, il a été déterminé que le sulfite et le nitrate, des accepteurs d'électrons inorganiques de *D. frappieri*, sont des inhibiteurs de l'activité enzymatique des déshalogénases I et II (Bouchard *et al.*, 1996 et Boyer, 1999). Par contre, on ne connaît pas encore l'impact de la présence de certains accepteurs d'électrons de *D. frappieri*, tels les sulfites et les nitrates, sur l'expression des déshalogénases et, inversement, l'impact des accepteurs d'électrons organiques sur l'expression des enzymes participant à la respiration avec un accepteur final d'électrons inorganique.

5.3 La protéine 47 kDa

L'analyse des gels d'acrylamide après électrophorèse 2D a révélé la présence d'au moins deux isoformes d'une protéine de 45 kDa de façon plus abondante dans les lots non-induits pour la déshalogénation réductrice en position *ortho*, suggérant que cette protéine est réprimée en présence de 2,4,6-TCP. L'analyse par spectrométrie de masse a permis de rattacher la protéine de 45kDa à un seul gène du génome partiel de *D. hafniense*. Une comparaison entre la séquence du gène de *D. hafniense* et la banque de données sur le site de NCBI a déterminé que la protéine possédait 70 % d'identité et 81 % de similarité avec la sous-unité β de l'ATP synthétase de *Moorella thermoacetic*.

L'ATP synthétase est une protéine membranaire impliquée dans le maintien du gradient de protons ainsi que de la synthèse dans l'ATP au cours de la respiration cellulaire. Cette protéine est constituée de deux unités fonctionnelles. F_0 est un canal ionique transmembranaire composés de sous-unités hydrophobes permettant le passage des protons au travers de la membrane. F_1 forme l'unité catalytique responsable de la synthèse de l'ATP et est composé de sous-unités hydrophiles périphériques à la

membrane. La sous-unité β fait partie de cette dernière unité fonctionnelle et possède à proprement parler le site catalytique pour la synthèse de l'ATP (Voet et Voet, 1995). Chez *Escherichia coli* l'expression des sous-unités de l'ATP synthétase est régulée par l'opéron *atpIBEFHAGDC*. Le modèle de l'halorespiration chez *D. tiedjei* établi par Louie et Mohn (1999) suggère la présence de l'ATP synthétase pour le contrôle du gradient de protons ainsi que pour la synthèse d'ATP (figure 3). Ce modèle semble de prime abord contradictoire avec la répression de la sous-unité β lors de la déshalogénation du 2,4,6-TCP par *D. frappieri* dans des cultures utilisant le pyruvate comme donneur d'électrons. Toutefois, des travaux récents de van de Pas *et al.* (2001b) suggèrent un modèle différent pour *D. dehalogenans*. Les résultats obtenus suggèrent plutôt qu'un gradient de protons ne serait pas formé lorsque la croissance des microorganismes s'effectuerait avec le pyruvate ou le lactate et le 3-chloro-4-hydroxyphénylacétate comme accepteur d'électrons, la raison étant que la lactate déshydrogénase et la pyruvate ferrédoxine oxydoréductase seraient localisées à l'intérieur de la membrane cytoplasmique et non à l'extérieur. Par contre, lorsque le formate et l'hydrogène sont utilisés comme donneur d'électrons pour l'halorespiration, un gradient de proton est alors formé permettant la génération d'ATP par l'ATP synthétase, car les enzymes impliquées (hydrogénase et formate déshydrogénase) sont localisées à l'extérieur de la membrane cytoplasmique. Les auteurs suggèrent que l'halorespiration à partir des chlorophénols ne serait pas une voie de respiration efficace car seulement une fraction de l'énergie théorique est conservée. Ce modèle pourrait donc s'appliquer aussi chez *D. frappieri* car les cultures ont été effectuées en présence de pyruvate et du 2,4,6-trichlorophénol, ce qui expliquerait en partie la répression de la protéine 47 kDa. D'autres travaux chez *D. frappieri* sont nécessaires pour bien connaître les mécanismes de l'halorespiration selon les conditions de culture utilisées.

Kasimoglu *et al.* (1996) ont observé que le taux de croissance serait un facteur important de la régulation de l'ATP synthétase, un faible taux de croissance entraînant une augmentation de la transcription des gènes de l'opéron. La baisse du pH externe au cours de la croissance en anaérobiose n'accroît que marginalement l'expression de l'opéron *atpIBEFHAGDC* (Kasimoglu *et al.*, 1996). Par ailleurs, une analyse des

protéines de *Streptoccocus oralis* par électrophorèse 2D démontrait que des chaînes polypeptidiques de l'ATP synthétase étaient plus exprimées lorsque le pH du milieu de culture diminuait (Wilkins, Homer et Beighton, 2001). Un suivi plus serré du pH du milieu et du taux de croissance lors des cultures de *D. frappieri* tant en absence qu'en présence de 2,4,6-TCP permettrait d'évaluer l'effet de ces facteurs sur la synthèse de l'ATP synthétase.

5.4 La protéine 55 kDa

L'étude comparative des gels après électrophorèse 2D des protéines membranaires de *D. frappieri* cultivé en présence et en absence de 2,4,6-TCP montrait la présence de cinq isoformes d'une protéine de 55 kDa de façon plus abondante en absence de déshalogénation réductrice en position *ortho* suggérant que cette protéine est réprimée dans le cas contraire. Les séquences peptidiques retrouvées de la protéine de 55 kDa et l'empreinte des masses peptidiques de cette protéine correspondent à un seul gène du génome partiel de *D. hafniense*. Une comparaison entre la séquence du gène de *D. hafniense* et la banque de données sur le site de NCBI a permis déterminer que la protéine de 55 kDa possédait 52 % d'identité et 71 % de similarité avec une sous-unité de la glycolate oxydase de *Bacillus halodurans*. À ce jour, six sous-unités de la glycolate oxydase ont été répertoriées chez *B. halodurans* (Takami *et al.*, 2000).

La glycolate oxydase a été principalement étudiée chez les plantes et les bactéries phototrophes. Il s'agit d'une flavoenzyme dont une des sous-unités contient un centre fer/soufre (Fraaije et Mattevi, 2000). Au cours de la photorespiration, le ribulose-1,5-biphosphate est métabolisé par la rubisco en présence d'oxygène en 2-phosphoglycolate puis par la phosphoglycolate phosphatase en glycolate. Ce dernier composé est oxydé par la glycolate oxydase en H_2O_2 et en glyoxylate. Une partie de ce glyoxylate est à nouveau oxydé par la glycolate oxydase en oxalate (Voet et Voet, 1995).

Chez les bactéries non-photosynthétiques, c'est chez *Escherichia coli* que l'expression de la glycolate oxydase a été le plus étudiée. Les gènes codant pour les sous-unités de cette protéine se trouvent sur le locus *glc* qui contient les gènes *glcB*, *glcG*, *glcF*, *glcE*, *glcD* et *glcC*. Le gène *glcB* code pour une autre enzyme, la malate synthétase. Les gènes *glcE* et *glcD* codent pour des sous-unités de la glycolate oxydase apparentées aux flavoprotéines. Le gène *glcF* code pour une sous-unité contenant un centre fer/soufre. Ces trois gènes doivent être exprimés pour qu'il y ait activité de la glycolate oxydase. L'expression plus faible du gène *glcF* dans la cellule suggère que plus d'un produit *glcE-glcD* sont associés au produit du gène *glcF*. D'autre part, aucune fonction n'a encore été attribuée au produit du gène *glcG*, l'inactivation du gène n'influençant en rien l'activité de l'enzyme. Le gène *glcC* code pour un inducteur activateur de l'opéron *glc* (Pellicer *et al.*, 1996). L'opéron *glc* est également régulé par un facteur d'intégration hôte (IHF pour « integration host factor ») qui doit se lier au promoteur pour qu'il y ait expression de *glc*. Le troisième facteur de régulation étudié chez *E. coli* est un système à deux composantes, ArcB/ArcA, qui est impliqué lors du passage de la respiration cellulaire à la fermentation. ArcB est une protéine kinase qui s'autophosphoryle selon la concentration cellulaire de certains métabolites, entre autre lors de la diminution de la concentration en oxygène, pour transférer son phosphate à ArcA. ArcA, une fois phosphorylée devient un régulateur de l'expression d'une série de gènes dont font partie ceux de l'opéron *glc* (Pelmont, 1993 ; Pellicer *et al.*, 1999). Il a été démontré que l'expression de *glc* est plus abondante lors de la respiration anaérobie que lors de la fermentation chez *E. coli*. Au cours de la fermentation, la protéine ArcA, alors phosphorylée, se fixe au promoteur comme inhibiteur. Toutefois, lors de la respiration anaérobie sur nitrate, l'expression de *glc* revient à celle observée lors de la respiration aérobie. Il est également à noter que l'ajout de pyruvate dans le milieu accroît jusqu'à trois fois la répression de l'expression de *glc* lors de la fermentation (Pellicer *et al.*, 1999). Si l'on se base sur la régulation de *glc* chez *E. coli*, on aurait pu s'attendre à ce que ce locus soit exprimé plus fortement en présence de 2,4,6-TCP dans le milieu chez *D. frappieri* PCP-1 dans la mesure où il y aurait alors halorespiration. Toutefois, tel que présenté antérieurement et suggéré par van de Pas et al (2001b) pour *D. dehalogenans,* il est possible que dans les conditions de culture utilisées pour *D. frappieri*, l'halorespiration ne soit pas le mécanisme utilisé pour la production

d'énergie. Des travaux ultérieurs sur les mécanismes d'halorespiration et de fermentation chez *D. frappieri* sont nécessaires. De même, il faudrait vérifier si la protéine 55 kDa possède une activité s'apparentant à la glycolate oxydase. Le système de régulation ArcB/ArcA ayant essentiellement été étudié chez les bactéries anaérobies facultatives, il serait intéressant de vérifier si ce système se retrouve chez *D. frappieri* et, le cas échéant, l'influence qu'il peut avoir sur l'activité de la glycolate oxydase.

5.5 La protéine 15 kDa

La séparation par électrophorèse 2D des protéines membranaires des fractions induites et non-induites pour la déshalogénation en position *ortho* du 2,4,6-TCP a révélé la présence d'une protéine induite de 15 kDa. Toutefois, aucun peptide de cette protéine n'a pu être visualisé lors de l'analyse en spectrométrie de masse. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cet état de fait. Premièrement, la protéine de 15 kDa étant une protéine membranaire, il y de fortes chances que celle-ci soit riche en acides aminés hydrophobes. Par conséquent, on n'y retrouve que peu ou pas d'arginine et de lysine, les acides aminés avec une chaîne latérale polaire chargée. Une digestion à la trypsine sur une telle protéine laisse la protéine intacte ou ne donne que de gros peptides dont la masse est trop importante pour être suffisamment ionisée par nanoélectrovaporisation et être visualisée sur le spectre de masse. Une solution à ce problème est de coupler la digestion tryptique avec une digestion chimique, soit au bromure de cyanogène qui clive spécifiquement aux méthionines ou encore avec le (2-(2-nitrophenylsulfenyl)-3-methyl-3-bromoindolenine qui est spécifique aux tryptophanes (Quadroni et James, 1999). L'empreinte peptidique de la déshalogénase I obtenue en spectrométrie de masse montre que deux des peptides avaient un mauvais clivage. Une optimisation de la digestion tryptique pourrait permettre de récupérer un plus grand nombre de peptides et ainsi faciliter l'identification de la protéine 15 kDa. Le caractère hydrophobe des protéines membranaires pose un autre problème : les peptides hydrophobes adhèrent plus facilement aux parois des tubes Epperdorf que les peptides hydrophiles, les rendant non-disponibles pour l'analyse en spectrométrie de masse. La sonification de l'échantillon pour faciliter la remise en solution des peptides a été tentée. Cette technique s'est cependant avérée inefficace en ce

qui concerne la protéine de 15 kDa. Qu'il y ait perte ou non de l'échantillon de par son caractère hydrophobe, il faut que celui-ci au moment de l'analyse soit en concentration supérieure à la limite de détection du spectromètre de masse lui-même. La sensibilité de l'appareil est un facteur important dans la caractérisation de protéines inconnues.

5.6 L'optimisation de la méthode

Pour réaliser des travaux ultérieurs en protéomique, il serait bon d'effectuer un suivi plus étroit de la croissance, ce qui permettrait de récolter les cellules en phase exponentielle de croissance et non au début de la phase plateau. Les cellules en phase exponentielle ont l'avantage de représenter une population homogène. Comme la croissance de *D. frappieri* PCP-1 génère une baisse importante du pH, celui-ci devrait autant que possible être maintenu constant. La fabrication du milieu de culture devrait être standardisée de façon à réduire la formation d'un précipité noir observé après stérilisation. Pour faciliter le suivi de tous ces paramètres, les cultures pourraient être préparées dans 1 L au lieu des 9 L utilisés ici. La culture en volume restreint étant moins laborieuse qu'en grand volume, un plus grand nombre de lots induits et non-induits pourraient être produits et ainsi il serait plus facile d'évaluer la reproductibilité des résultats.

Que l'on pense aux déshalogénases, aux transporteurs d'électrons ou à l'ATPase, la majeure partie des protéines impliquées dans la déshalogénation réductrice sont d'origine membranaire. C'est pourquoi l'essentiel de cette recherche s'est effectuée à partir des fractions membranaires même si celles-ci sont reconnues pour être difficiles à séparer par électrophorèse 2D (Santoni, Molloy et Rabilloud, 2000). La difficulté principale consiste à solubiliser efficacement les protéines membranaires sans affecter leur charge. Cette contrainte restreint l'utilisation d'un des agents de solubilisation parmi les plus efficaces, le SDS, au cours de l'isofocalisation. Un tampon de solubilisation avec 5 % (p/v) de CHAPS; 0,48 % (p/v) Tris; 8 M urée et 0,3 % DTT a été développé. Ce tampon présentait une capacité à solubiliser une diversité de protéines comparables aux autres tampons de solubilisation essayés tout en solubilisant une plus grande quantité de

protéines. Toutefois, la présence d'un culot obtenu après centrifugation lors de la solubilisation des protéines membranaires laisse supposer que certaines protéines pourraient ne pas avoir été solubilisées. L'arrivée sur le marché de nouveaux agents de solubilisation non-chargés de la famille des sulfobétaines en combinaison avec la thiourée et l'urée accroît grandement la solubilisation des protéines sans affecter la charge de celles-ci (Rabilloud *et al.*, 1997). Il y a donc encore de la place à l'optimisation d'un tampon de solubilisation pour les protéines membranaires. Lors d'essais ultérieurs de solubilisation, une séparation des protéines dans des gels 1,5 x 195 cm x 200 mm, plutôt que dans des gels 8 x 7 x 0,1 cm utilisés au cours de ce projet, faciliterait l'évaluation de la diversité des protéines mises en solution par les nouveaux tampons. De même, une analyse quantitative des protéines solubilisées serait préférable à l'analyse qualitative du culot contenant les membranes et les protéines non-solubilisées afin d'évaluer l'efficacité des tampons testés.

Lors de la séparation des protéines par électrophorèse 2D, les conditions d'équilibration des bandes après isofocalisation ont dues être optimisées. L'augmentation de la concentration de SDS de 2 à 4 % a ainsi facilité le passage des protéines de la première dimension à la seconde alors que l'augmentation du temps de chaque équilibration de 15 à 30 et à 60 min. ainsi que l'augmentation de la température de 20 °C à 27 °C d'équilibration n'ont eu aucune influence notable. Cependant, la coloration des hémoprotéines après séparation par électrophorèse 2D des protéines membranaires s'est limitée à la zone de transfert entre la première et la seconde dimension, démontrant que certaines protéines ne peuvent toujours pas passer d'une dimension à l'autre dans les conditions utilisées. Le choix des conditions d'équilibration était basé sur la visualisation des protéines résiduelles sur la bande utilisée pour l'isofocalision après transfert des protéines en gel SDS-PAGE, grâce à une coloration au nitrate d'argent. Une coloration au bleu de Coomassie, quoique moins sensible, aurait eu l'avantage de présenter un bruit de fond moins important que la coloration au nitrate d'argent. Une coloration au violet acide développée par Patestos Fauth et Radola (1988) pour les bandes d'acrylamide avec gradient de pH immobilisé limite également le bruit de fond tout en ayant une sensibilité de 1 à 2 ng de protéines/mm^2 de gel.

Une première analyse des gels de polyacrylamide après électrophorèse 2D a été effectuée à partir des fractions cytoplasmiques sans que des protéines induites ou réprimées lors de la déshalogénation réductrice du 2,4,6-TCP en position *ortho* ne soient identifiées. Les déshalogénases étant des métalloprotéines, les protéines cytoplasmiques potentiellement induites lors de la déshalogénation réductrice sont des protéines de régulation ainsi que des protéines impliquées dans les modifications post-traductionnelles. Ces types de protéines sont reconnus pour se trouver en faible quantité dans l'organisme et sont donc plus difficiles à révéler dans les gels après électrophorèse 2D. Les protéines cytoplasmiques n'ont été séparées selon leur pI qu'à partir de bandes de 13 cm avec un gradient de pH de 4 à 7. L'utilisation de bandes de 18 cm permettrait de séparer plus de matériel et donc augmenterait les chances de voir des protéines faiblement exprimées par l'organisme. De même, il serait bon d'utiliser des gels avec des bandes dont les gradients de pH sont supérieurs à 7 ou inférieurs à 4 afin de vérifier si certaines protéines dont le pI correspond à ces plages de pH pouvaient être induites ou réprimées lors de la déshalogénation réductrice en position *ortho*. Il serait également utile de reprendre l'étude des fractions membranaires avec de telles bandes afin de déterminer si un plus grand nombre de protéines induites et de protéines réprimées pouvaient être identifiées.

Dans le but de révéler un plus grand nombre de protéines dans les gels, la coloration au nitrate d'argent a été retenue. Toutefois, une coloration avec un réactif fluorescent de type SYPRO, qui offre aussi une bonne sensibilité, permettrait de réduire le bruit de fond propre à la coloration au nitrate d'argent et aurait fourni une réponse linéaire entre l'intensité de la coloration de chaque spot dans le gel et la quantité de protéines qui s'y trouve (Lopez, 2000).

6. Conclusion

La déshalogénation en anaérobiose constitue une solution intéressante à la restauration de sols contaminés par des composés organiques halogénés. Toutefois, les connaissances sur les mécanismes impliqués lors de ce type de dégradation demeurent restreintes. Afin d'améliorer l'efficacité des biotraitements actuels, il nous a semblé important d'approfondir notre compréhension de ces mécanismes. La protéomique permettant d'étudier les systèmes biologiques de façon globale, cette approche a été retenue pour approfondir les connaissances sur la déshalogénation anaérobie en position *ortho* du 2,4,6-TCP chez *D. frappieri* PCP-1.

La première partie de ces travaux consistait à mettre au point certaines des techniques spécifiques à une étude protéomique. Les protéines impliquées au cours de l'halorespiration étant majoritairement d'origine membranaire, une solution de solubilisation a été développée afin de visualiser en gel d'électrophorèse 2D une quantité et une diversité de protéines les plus grandes possibles. La solution de solubilisation retenue est la suivante : 5 % (p/v) de CHAPS, 0,48 % (p/v) Tris, 8 M urée et 0,3 % DTT. Le passage de la première à la seconde dimension étant critique pour les protéines de haute masse moléculaire, les conditions d'équilibration ont également été réévaluées. Une augmentation de la concentration de SDS de 2 à 4 % s'est avérée bénéfique mais toutefois insuffisante pour le transfert de toutes les protéines. En effet, des hémoprotéines en gel SDS-PAGE 2D n'ont été colorées que sur la zone de transfert entre la première et la seconde dimension étant incapables de pénétrer le second gel. Ces premières mises au point pour la séparation de protéines par électrophorèse 2D ont permis de visualiser jusqu'à 400 protéines par gel d'électrophorèse 2D 1,5 x 160 x 200 mm. Toutefois, ce ne sont pas toutes les protéines qui sont solubilisées par le tampon de solubilisation de même que ce ne sont pas toutes les protéines qui passent de la première à la seconde dimension. Par conséquent, le protocole de séparation des protéines en gel d'électrophorèse 2D pourrait être amélioré. Avec l'intérêt croissant porté à la protéomique, la littérature s'enrichit de solutions aux problèmes posés par l'utilisation de gels d'électrophorèse 2D.

La seconde partie des travaux portait sur l'identification de protéines induites ou réprimées lors de la déshalogénation réductrice du 2,4,6-TCP en position *ortho* ainsi

qu'au suivi de la déshalogénase I chez *D. frappieri* PCP-1 cultivée en absence et en présence de ce 2,4,6-TCP. Il s'est avéré que la protéine 37 kDa (déshalogénase I) est présente tant dans les fractions induites que non-induites pour la déshalogénation en position *ortho* démontrant ainsi son caractère constitutif. Cependant, il a été démontré dans le laboratoire de Réjean Beaudet que la déshalogénase I possède bien une activité de déshalogénation réductrice en position *ortho*. Il a donc été suggéré que la protéine 37 kDa, pour acquérir son activité de déshalogénation, doit être activée ou doit se lier à un cofacteur. D'autre part, la séparation en gel d'électrophorèse 2D a révélé que la déshalogénase I était parmi les protéines les plus abondamment exprimées chez *D. frappieri* PCP-1 tant dans les lots faisant la déshalogénation réductrice que dans les lots exempts de cette activité. Ceci porte à croire que la protéine 37 kDa pourrait aussi avoir une autre fonction que la déshalogénation réductrice chez *D. frappieri* PCP-1. L'analyse des fractions cytoplasmiques après électrophorèse 2D n'a pas permis de révéler des protéines induites ou réprimées. Toutefois, la déshalogénase I s'y est retrouvée en quantité moins importante que dans les fractions membranaires. La déshalogénase I pourrait, à l'instar des autres déshalogénases, être reliée à la membrane par une protéine d'ancrage. Ce type de liaison à la membrane étant plus faible que le lien unissant une protéine membranaire à la membrane, ceci expliquerait que l'on retrouve la déshalogénase I dans la fraction cytoplasmique. L'analyse des gels d'électrophorèse 2D des fractions membranaires a permis de visualiser la présence de deux protéines réprimées (45 kDa et 55 kDa) lors de la déshalogénation réductrice ainsi que d'une protéine induite (15 kDa). Aucun peptide de cette dernière protéine n'a pu être visualisé en spectrométrie de masse. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce résultat. Il se peut que la protéine ne puisse être digérée par la trypsine, que les peptides soient perdus lors des manipulations à cause de leur caractère hydrophobe ou encore qu'ils soient obtenus en quantité insuffisante pour être détectée par le spectromètre de masse. La protéine de 45 kDa réprimée lors de la déshalogénation réductrice a été caractérisée comme étant possiblement la sous-unité β de l'ATP synthétase alors que la protéine de 55 kDa a été identifiée comme étant possiblement une glycolate oxydase. L'identification des gènes de ces protéines chez *D. frappieri* PCP-1 à partir des séquences peptidiques obtenues pourra confirmer avec plus d'assurance l'attribution de ces fonctions à ces deux

protéines. La glycolate oxydase et l'ATP synthétase ont toutes deux en commun d'interagir avec des voies de respiration. Lors de l'halorespiration, il aurait été surprenant de voir ces protéines réprimées. Toutefois, il a été récemment suggéré par van de Pas *et al.* (2001b) qu'au cours de la croissance de *D. dehalogenans* en présence de pyruvate et de 3-chloro-4-hydroxyphenylacétate, il n'y aurait pas de formation d'un gradient de protons. *D. frappieri* ayant été cultivé en présence de pyruvate comme donneur d'électrons, il serait alors possible que le même phénomène se produise. Ces résultats, sans permettre de résoudre les voies de synthèse de l'énergie chez *D. frappieri* PCP-1, fournissent des avenues de recherche intéressantes pour le futur. Des études protéomiques en présence de donneurs d'électrons autres que le lactate et le pyruvate ainsi qu'avec des accepteurs d'électrons tels les sulfites et les nitrates pourraient faciliter la compréhension de la respiration chez *D. frappieri* PCP-1. Afin de faciliter l'interprétation des gels d'électrophorèse 2D, une standardisation des conditions de culture de *D. frappieri* ainsi que du fractionnement cellulaire devrait être réalisée.

Bibliographie

ANDERSON, L. et J. SEILHAMER. 1997. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. Electrophoresis. **18**(3-4) : 533-537.

ARNOTT, D., K.L. O'Connell, K.L. King, J.T. Stults. 1997. An integrated approach to proteome analysis: identification of proteins associated with cardiac hypertrophy. Anal Biochem. **258**(1) : 1-18.

APPEL, R.D., J.C. Sanchez, A. Bairoch, O. Golaz, M. Miu, J.R. Vargas et D.F. Hochstrasser. 1993. SWISS-2DPAGE: a database of two-dimensional gel electrophoresis images. Electrophoresis. **14**(11) : 1232-1238.

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

BEAVIS, R.C. et B.T. CHAIT. 1990. Rapid, sensitive analysis of protein mixtures by mass spectrometry. PNAS. **87**(17) : 6873-6877.

BLUM, H., H. BEIER et H.J. GROSS. 1987. Electrophoresis. **8** : 93-98.

BOUCHARD, D., R. BEAUDET, R. VILLEMUR, G. MCSWEEN, F. LÉPINE, et J.-G. BISAILLON. 1996. Isolation and characterization of *Desulfitobacterium frappieri* sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates pentachlorophenol to 3-chlorophenol. Int. J. Syst. Bacteriol. **46**(4) : 1010-1015.

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

BOYER, A. 1999. «Étude des déshalogénases I et II produites par *Desulfitobaterium frappieri* souche PCP-1». Mémoire de maîtrise, Ville de Laval, Université du Québec, 140 p.

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. **175**(2) : 133-142.

CASH, P., E. ARGO, L. FORD, L. LAWRIE et H. MCKENZIE. 1999. A proteomic analysis of erythromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Electrophoresis. **20**(11) : 2259-68.

CASH, P. 2000. Proteomics in medical microbiology. Electrophoresis. **21** : 1187-1201.

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

CELIS, J.E. 1995. The human keratinocyte two-dimensional gel protein database (update 1995): mapping components of signal transduction pathways. Electrophoresis. **16**(12) : 2177-2240.

CELIS, J.E. P.GROMOV, M. OSTERGAARD, P. MADSEN, B. HONORE, K. DEJGAARD, E. OLSEN, H. VORUM, D.B. KRISTENSEN, I. GROMOVA, A. HAUNSO, J. VAN DAMME, M. PUYPE, J. VANDEKERCKHOVE et H.H. RASMUSSEN. 1996. Human 2-D PAGE databases for proteome analysis in health and disease: http://biobase.dk/cgi-bin/celis. FEBS Lett. **398**(2-3) : 129-134.

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

CHARLES, J.G. et L.P. WACKETT. 1991. Reductive dechlorination catalyzed by bacterial transition-metal coenzymes. Environ. Sci. Technol. **25** : 715-722.

CHRISTIANSEN, N. et B.K. AHRING. 1998. *Desulfitobacterium hafniense* sp. nov., an anaerobic, reductively dechlorinating bacterium. Int. J. Syst. Bacteriol. **46**(2) : 442-448.

CORTHALS, G.L., V.C. WASINGE, D.F. HOCHSTRASSER et J.C. SANCHEZ. 2000. The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research. Electrophoresis. **21** : 1104-1115.

CUTLER, P. H. BIRRELL, M. HARAN, W. MAN, B. NEVILLE, S. ROSIER, M. SKEHEL et I. WHITE. 1999a. Proteomics in pharmaceutical research and development. Biochem. Soc. Trans. **27**(4) : 555-559.

CUTLER, P., D.J. BELL, H.C. BIRRELL, J.C. CONNELLY, S.C. CONNOR, E. HOLMES, B.C. MITCHELL, S.Y. MONTE, B.A. NEVILLE, R. PICKFORD, S. POLLEY, K. SCHNEIDER et J.M. SKEHEL. 1999b. An integrated proteomic approach to studying glomerular nephrotoxicity. Electrophoresis. **20**(18) : 3647-3658.

DAMBOSKY, J. 1999. Tetrachloroethene-dehalogenating bacteria. Folia. Microbiol. **44**(3) : 247-262.

DENNIE, D., I. GLADU, F. LÉPINE, R. VILLEMUR, J.-G. BISAILLON et R. BEAUDET. 1998. Spectrum of the reductive dehalogenation activity of *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. Appl. Environ. Microbiol. **64**(11) : 4603-4606.

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

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

FRAAIJE, M.W. et A. MATTEVI. 2000. Flavoenzyme: diverse catalysts with recurrent features. Trends Biochem. Sci. **25**(3) : 126-132.

FRANCIS, R.T. Jr et R.R. BECKER. 1984. Specific indication of hemoproteins in polyacrylamide gels using a double-staining process. Anal. Biochem. **136**(2) : 509-14.

FRANZEN, B., G. AUER, A.A. ALAIYA , E. ERIKSSON, K. URYU, T. HIRANO, K. OKUZAWA, H. KATO et S. LINDER. 1996. Assessment of homogeneity in polypeptide expression in breast carcinomas shows widely variable expression in highly malignant tumors. Int. J. Cancer. **69**(5) : 408-414.

GARRELS, J.I. 1996. YPD-A database for the proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res. **24**(1) : 46-49.

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

GERRITSE, J., O. DRZYZGA, G. KLOETSRA, M. KEIJMEL, L. WIERSUM, R. HUTSON, M.D. COLLINS et J.C. GOTTSCHAL. 1999. Influence of different electron donors and acceptors on dehalorespiration of tetrachloroethene by *Desulfitobacterium frappieri* TCE1. Appl. Environ. Microbiol. **65** (12) : 5212-5221.

GORMON, T. et L. PHAN-THANH. 1995. Identification and classification of *Listeria* by two-dimensional protein mapping. Res. Microbiol. **146**(2) : 143-154.

GUERREIRO, N., J.W. REDMOND, B.G. ROLFE et M.A. DJORDJEVIC. 1997. New *Rhizobium leguminosarum* flavonoid-induced proteins revealed by proteome analysis of differentially displayed proteins. Mol. Plant Microbe Interact. **10**(4) : 506-516.

GYGI, S.P., R. BEATE, A.S. GERBER, F. TURECEK, M.H. GELB et R. AEBERSOLD. 1999. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. Nat. Biotechnol. **17** : 994-999.

GYGI, S.P., G.L. CORTHALS, Y. ZHAN, Y. ROCHON et R. AEBERSOLD. 2000. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. PNAS. **97**(17) : 9390-9395.

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

HARTINGER, J., K. STENIUS, D. HOGEMANN et R. JAHN. 1996. 16-BAC/SDS-PAGE: A two-dimensional gel electrophoresis system suitable for the separation of integral membrane proteins. Anal. Biochem. **240** : 126-133.

HAYNES, P., I. MILLER, R. AEBERSOLD, M. GEMEINER, I. EBERINI, M.R. LOVATI MR, C. MANZONI, M. VIGNATI et E. GIANAZZA. 1998a. Proteins of rat serum: I. Establishing a reference two-dimensional electrophoresis map by immunodetection and microbore high performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. Electrophoresis. **19**(8-9) : 1484-1492.

HAYNES, P.A., S.P. GYGI, D. FIGEYS et R. AEBERSOLD. 1998b. Proteome analysis: biological assay or data archive?. Electrophoresis. **19** : 1862-1871.

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

HENZEL, W.J., T.M. BILLECI, J.T. STULTS, S.C. WONG, C. GRIMLEY et C. WATANABE. 1993. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence. PNAS **90**(11) : 5011-5015.

HERBERT, B.R., M.P. MOLLOY, A.A. GOOLEY, B.J. WALSH, W.G. BRYSON et K.L. WILLIAMS. 1998. Improved protein solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent. Electrophoresis. **19**(5) : 845-851.

HODGES, P.E., W.E. PAYNE et J.I. GARRELS. 1998. The Yeast Protein Database (YPD): a curated proteome database for *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res. **26** : 68-72.

JAMES, P., M. QUADRONI, E. CARAFOLI et G. GONNET. 1993. Protein identification by mass profile fingerprinting. Biochem. Biophys. Res. Commun. **195**(1) : 58-64.

JENSEN, O.N., M. WILM, A. SHEVCHENKO et M. MANN. 1999. Peptide sequencing of 2-DE gel-isolated proteins by nanoelectrospray tandem mass spectrometry. Methods Mol. Biol. **112** : 571-588.

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

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

KASIMOGLU. E., S.J. PARK, J. MALEK, C.P. TSENG et R.P. GUNSALUS. 1996. Transcriptional regulation of the proton-translocating ATPase (*atpIBEFHAGDC*) operon of *Escherichia coli*: control by cell growth rate. J. Bacteriol. **178**(19) : 5563-5567.

KLOSE, J. 1975. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. Humangenetik. **26**(3) : 231-43.

KLOSE, J. et U. KOBALZ. 1995. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. Electrophoresis. **16**(6) : 1034-1059.

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

LANTHIER, M. 1999. «Étude de la biodégradation anaérobie du pentachlorophénol dans le sol par *Desulfitobacterium frappieri* souche PCP-1». Mémoire de maîtrise, Ville de Laval, Université du Québec, 140 p.

LANTHIER, M., R. VILLEMUR, F. LÉPINE, J.-G. BISAILLON AND R. BEAUDET. 2000. Monitoring of *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1 in pentachlorophenol-degrading anaerobic soil slurry reactors. Environ. Microbiol. **2**(6) : 703-708.

LÉVESQUE, M.J., S. LA BOISSIÈRE, J.C. THOMAS, R. BEAUDET et R. VILLEMUR. 1997. Rapid method for detecting *Desulfitobacterium frappieri* strain PCP-1 in soil by polymerase chain reaction. Appl. Microbiol. Biotechnol. **47** : 719-725.

LÉVESQUE M.J., R. BEAUDET, J.G. BISAILLON et R. VILLEMUR. 1998. Quantification of *Desulfitobacterium* strain PCP-1 and *Clostridium*-like strain 6 in mixed bacterial populations by competitive polymerase chain reaction. J. Microbiol. Methods. **32** : 263-271.

LIE, T.J., W. GODCHAUX et E.R. LEADBETTER. 1999. Sulfonates as terminal electron acceptors for growth of sulfite-reducing bacteria (*Desulfitobacterium* ssp.) and sulfate-reducing bacteria: effects of inhibitors of sulfidogenesis. Appl. Environ. Microbiol. **65**(10) : 4611-4617.

LINK, A.J., L.G. HAYS, E.B. CARMACK et YATES III. 1997. Identifying the major proteome components of *Haemophilus influenzae* type-strain NCTC 8143. Electrophoresis. **18**(8) : 1314-1334.

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

LÖFFLER, F.E., R.A. SANFORD et J.M. TIEDJE. 1996. Initial characterization of a reductive dehalogenase from *Desulfitobacterium chlororespirans* Co23. Appl. Environ. Microbiol. **62**(10) : 3809-3813.

LOPEZ, M.F. 2000. A comparison of silver stain and SYPRO ruby protein gel stain with respect to protein detection in two-dimensional gels and identification by peptide mass profiling. Electrophoresis. **21**(17) : 3673-3683.

LOUIE, T.M., S. NI, L. XUN 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. **168** : 520-527.

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

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

MAGNUSON, J.K., R.V. STERN, J.M. GOSSETT et S.H. ZINDER. 1998. Reductive dechlorination of tetrachloroethene to ethene by a two-component enzyme pathway. Appl. Environ. Microbiol. **58**(4) : 2874-2878.

MAGNUSON, J.K., M.F. ROMINE, D.R. BURRIS et M.T. KINGSLEY. 2000. Trichloroethene dehalogenase from *Dehalococcoides ethenogenes*: sequence of tceA and substrate range characterization. Appl. Environ. Microbiol. **66**(12) : 5141-5147.

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

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

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

MOHN, W.W. et J.M. TIEDJE. 1992. Microbial reductive dehalogenation. Microbiol. Rev. **56**(3) : 482-507.

MOLLOY, M.P., B.R. HERBERT, B.J. WALSH, M.I. TYLER, M. TRAINI, J.C. SANCHEZ, D.F. HOCHSTRASSER, K.L.WILLIAMS et A.A. GOOLEY. 1998. Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. Electrophoresis. **19** : 837-844.

MORRIS, H.R., T. PAXTON, A. DELL, J. LANGHORNE, M. BERG, R.S. BORDOLI, J. HOYES et R.H. BATEMAN. 1996. High sensitivity collisionally-activated decomposition tandem mass spectrometry on a novel quadrupole/orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometer. Rapid. Commun. Mass Spectrom. **10**(8) : 889-896.

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

NEUMANN, A., G. WOHLFARTH et G. DIEKERT. 1996. Purification and characterization of tetrachloroethene reductive dehalogenase from *Dehalospirillum multivorans*. J. Biol. Chem. **271**(28) : 16515-16519.

NEUMANN, A., G. WOHLFARTH et G. DIEKERT. 1998. Tetrachloroethene deshalogenase from *Dehalospirillum multivorans*: cloning, sequencing of the encoding genes, and expression of the *pceA* gene in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **180**(16) : 4140-4145.

NI, S., J.K. FREDRICKSON et LUYING XUN. 1995. Purification and characterization of a novel 3-chlorobenzoate-reductive dehalogenase from cytoplasmic membrane of *Desulfomonile tiedjei* DCB-1. J. Bacteriol. **177**(17) : 5135-5139.

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

O'CONNOR, C.D ., P. ADAMS, P. ALEFOUNDER, M. FARRIS, N. KINSELLA, Y. LI, S. PAYOT et P. SKIPP. 2000. The analysis of microbial proteomes: Strategies and data exploitation. Electrophoresis. **21** : 1178-1186.

O'FARRELL, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. **250**(10) : 4007-4021.

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

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

PATESTOS N.P., M. FAUTH et B.J RADOLA BJ. 1988. Fast and sensitive protein staining with colloidal acid violet 17 following isoelectric focusing in carrier ampholyte generated and immobilized pH gradients. Electrophoresis. **9** : 488-496.

PATTON, W.F. 1999. Proteome analysis. II. Protein subcellular redistribution: linking physiology to genomics via the proteome and separation technologies involved. J. of Chromatograph Biomed. Sci. App. **722** : 203-233.

PELLICER M.T., J. BADÌA, J. AGUILAR et L. BALDOMÀ. 1996. *glc* locus of *Escherichia coli*: characterization of Genes Encoding the Subunits of Glycolate Oxidase and the *glc* Regulator Protein. J. Bacteriol. **178**(7) : 2051-2059.

PELLICER M.T., C. FERNANDEZ, J. BADÌA, J. AGUILAR, E.C.C. LIN et L. BALDOMÀ. 1999. Cross-induction of *glc* and *ace* operons of *Escherichia coli*: attributable to pathway intersection. J. Biol. Chem. **274**(3) : 1745-1752.

PELMONT, J. 1993. Bactéries et environnement : adaptations physiologiques. Grenoble : Collection Grenoble Sciences. Presses Universitaires de Grenoble. 899 p.

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

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

RABILLOUD, T. 2000. Detecting proteins separeted by 2-D gel electrophoresis. Anal.Chem. **72**(1) : 48A-55A.

ROEPSTORFF, P. 1997. Mass spectrometry in protein studies from genome to function. Curr. Opin. Biotechnol. **8**(1) : 6-13.

SANFORD, A., J.R. COLE, F.E. LÖFFLER, et J.M. TIEDJE. 1996. Characterization of *Desulfitobacterium chlororespirans sp. nov.*, which grows by coupling the oxidation of lactate to the reductive dechlorination of 3-chloro-4-hydroxybenzoate. Appl. Environ. Microbiol. **62**(10) : 3800-3808.

SANTONI, V., M. MOLLOY et T. RABILLOUD. 2000. Membrane proteins and proteomics: Un amour impossible ? Electrophoresis. **21** : 1054-1070.

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

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

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. **178**(8) : 2328-2333.

SKIDMORE. A.F. et T.J. BEEBEE. 1990. Rat lactate dehydrogenase A and B subunit concentrations are not regulated by mRNA abundance in liver and heart. FEBS Letters. **270**(1-2) : 67-70.

SMIDT, H., M. VAN LEEST, J. VAN DER OOST et W.M. DE VOS. 2000. Transcriptional regulation of the *cpr* gene cluster in *ortho*-chlorophenol-respiring *Desulfitobacterium dehalogenans*. J. of Bacteriol. **182**(20) : 5683-5691.

SMITH, M.H. et S.L. WOODS. 1994. Regiospecificity of chlorophenol reductive dechlorination by vitamin B_{12}. Appl. Environ. Microbiol. **60** : 4111-4115.

TAKAMI, H., K. NAKASONE, Y. TAKAKI, G. MAENO, R. SASAKI, N. MASUI, F. FUJI, C. HIRAMA, Y. NAKAMURA, N. OGASAWARA, S. KUHARA et K. HORIKOSHI. 2000. Complete genome sequence of the alkaliphilic bacterium *Bacillus halodurans* and genomic sequence comparison with *Bacillus subtilis*. Nucleic Acids Res. **28**(21) : 4317-4331.

TARTAKOVSKY, B., M. LÉVESQUE, R. DUMORTIER, R. BEAUDET et S.R. GUIOT. 1999. Biodegradation of pentachlorophenol in a continuous anaerobic reactor augmented with *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. Appl. Environ. Microbiol. **65**(10) : 4357-4362.

TSUJI, T., S. SHIMOHAMA, S. KAMIYA, T. SAZUKA et O. OHARA. 1999. Analysis of brain proteins in Alzheimer's disease using high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. J. Neurol. Sci. **166**(2) : 100-106.

URQUHART, B.L., T.E. ATSALOS, D. ROACH, D.J. BASSEAL, B. BJELLQVIST, W.L. BRITTON et I. HUMPHERY-SMITH. 1997. 'Proteomic contigs' of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* (BCG) using novel immobilised pH gradients. Electrophoresis. **18**(8) : 1384-1392.

VANBOGELEN, R.A., K.Z. ABSHIRE, B. MOLDOVER, E.R. OLSON et F.C. NEIDHARDT. 1997. *Escherichia coli* proteome analysis using the gene-protein database. Electrophoresis. **18**(8) : 1243-1251.

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

VAN DE PAS, B.A., H. SMIDT, W.R. HAGEN, G. SCHRAA, A. STAMS et W. DE VOS. 1999a. Regulation and properties of *ortho*-chlorophenol reductive dehalogenase of *Desulfitobacterium dehalogenans*. Affiche présentée au congrès de l'American Society of Microbiology.

VAN DE PAS, B.A., H. SMIDT, W.R. HAGEN, J. VAN DER OOST, G. SCHRAA, A. STAMS et W. DE VOS. 1999b. Purification and molecular characterization of *ortho*-chlorophenol reductive dehalogenase, a key enzyme of halorespiration in *Desulfitobacterium dehalogenans*. J. Biol. Chem. **274**(29) : 20287-20292.

VAN DE PAS, B.A., H.J. HARMSEN, G.C. RAANGS, W.M. DE VOS, G. SCHRAA et A.J. STAMS. 2001a. A *Desulfitobacterium* strain isolated from human feces that does not dechlorinate chloroethenes or chlorophenols. Arch. Microbiol. **175**(6) : 389-394.

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

VOET, D. et J.G. VOET. 1995. Biochemestry. 2ième édition. États-Unis: Jonh Wileys & Sons, Inc. 1361p.

WASINGER, V.C., S.J. CORDWELL, A. CERPA-POLJAK, J.X. YAN, A.A. GOOLEY, M.R. WILKINS, M.W. DUNCAN, R. HARRIS, K.L. WILLIAMS et I. HUMPHERY-SMITH. 1995. Progress with gene-product mapping of the mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. Electrophoresis. **16**(7) : 1090-1094.

WILKINS, J.C., K.A. HOMER et D. BEIGHTON. 2001. Altered protein expression of *Streptoccocus oralis* cultured at low pH revealed by two-dimentional gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. **67**(8) : 3396-3405.

YATES III, J.R., S. SPEICHER, P.R. GRIFFIN et T. HUNKAPILLER. 1993. Peptide mass maps: a highly informative approach to protein identification. Anal. Biochem. **214**(2) : 397-408.

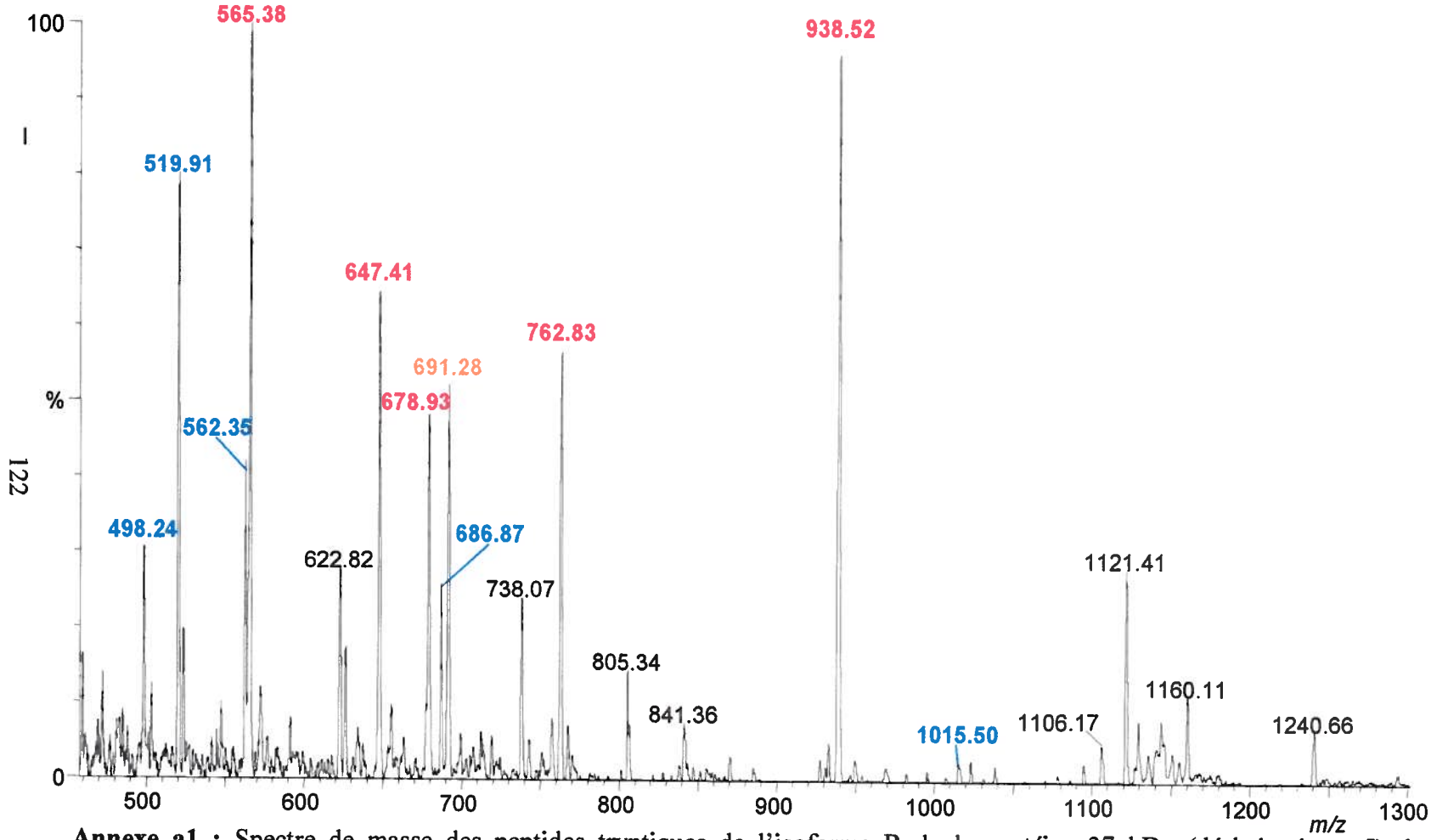
YATES III, J.R. 1998. Mass spectrometry and the age of the proteome. J. Mass Spectrom. **33** : 1-19.

YATES III, J.R. 2000. Mass spectrometry. From genomics to proteomics. Trends Genet. **16**(1) : 5-8.

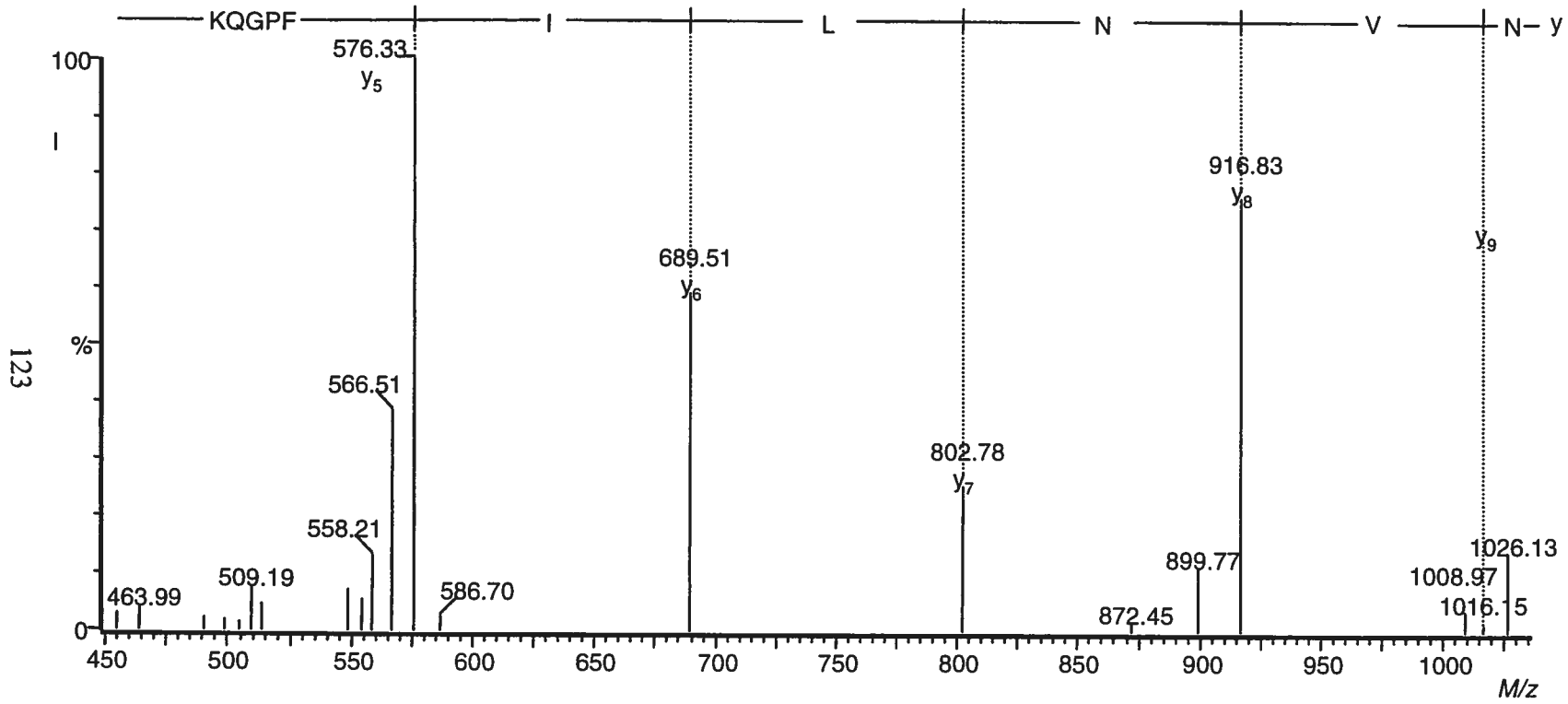
ZUO, X. et D.W. SPEICHER. 2000. A method for global analysis of complex proteomes using sample prefractionation by solution isoelectrofocusing prior to two-dimensional electrophoresis. Analytical Biochemestry. **284** : 266-278.

Annexes

Annexe a : Empreinte peptidique et séquences de la protéine 37 kDa (déshalogénase I) de *D. frappieri*

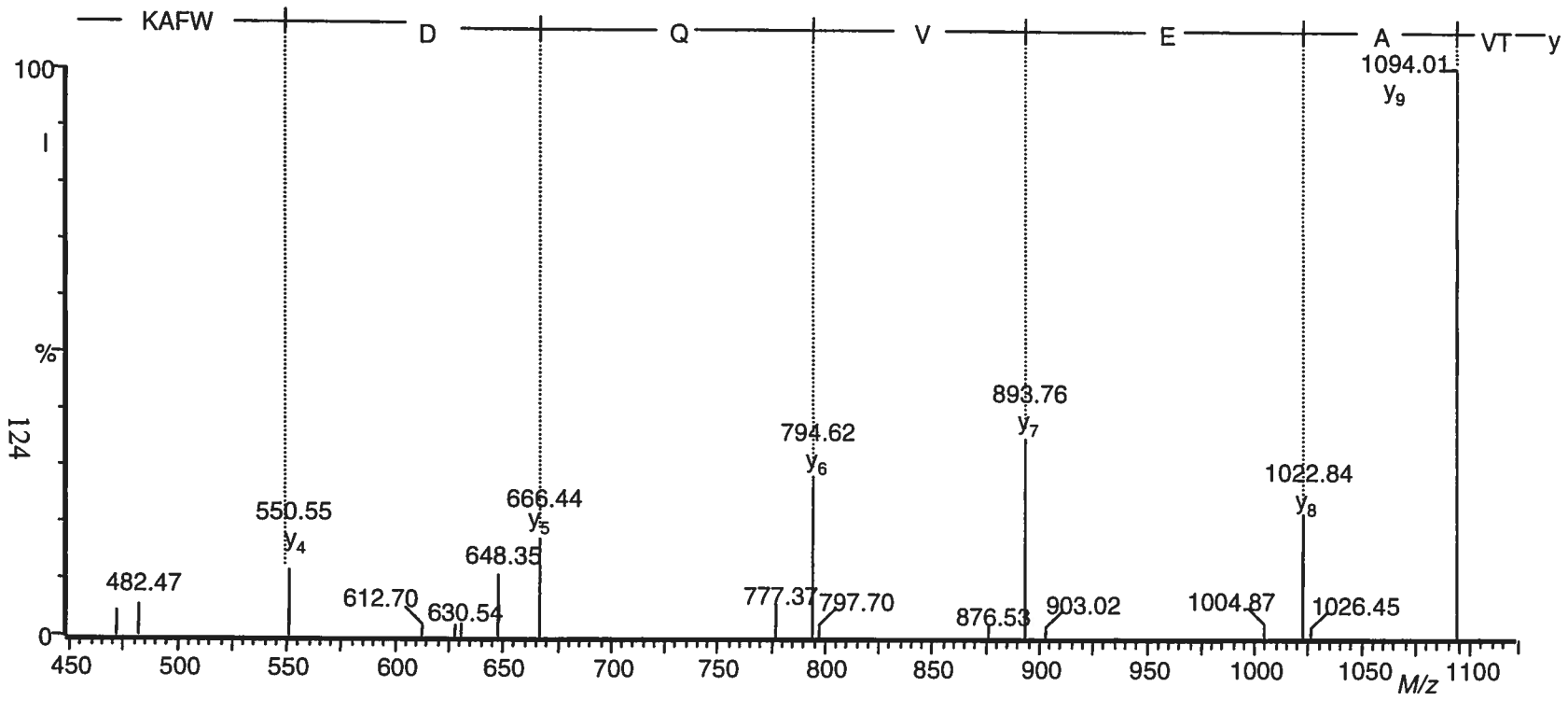


Annexe a1 : Spectre de masse des peptides tryptiques de l'isoforme B de la protéine 37 kDa (déshalogénase I) de *D. frappieri*. Analyse effectuée par nanoélectrovaporisation couplée à un quadripôle. Les peptides proviennent de quatre digestions tryptiques effectuées à même les morceaux de gels SDS-PAGE 12 % colorés au nitrate d'argent. Peptide dont la masse correspond à une masse de la digestion théorique de la déshalogénase I de *D. frappieri* (●) peptide dont la séquence se retrouve dans celle de la déshalogénase I de *D. frappieri* (●) peptide possédant les deux caractéristiques précédentes (●).

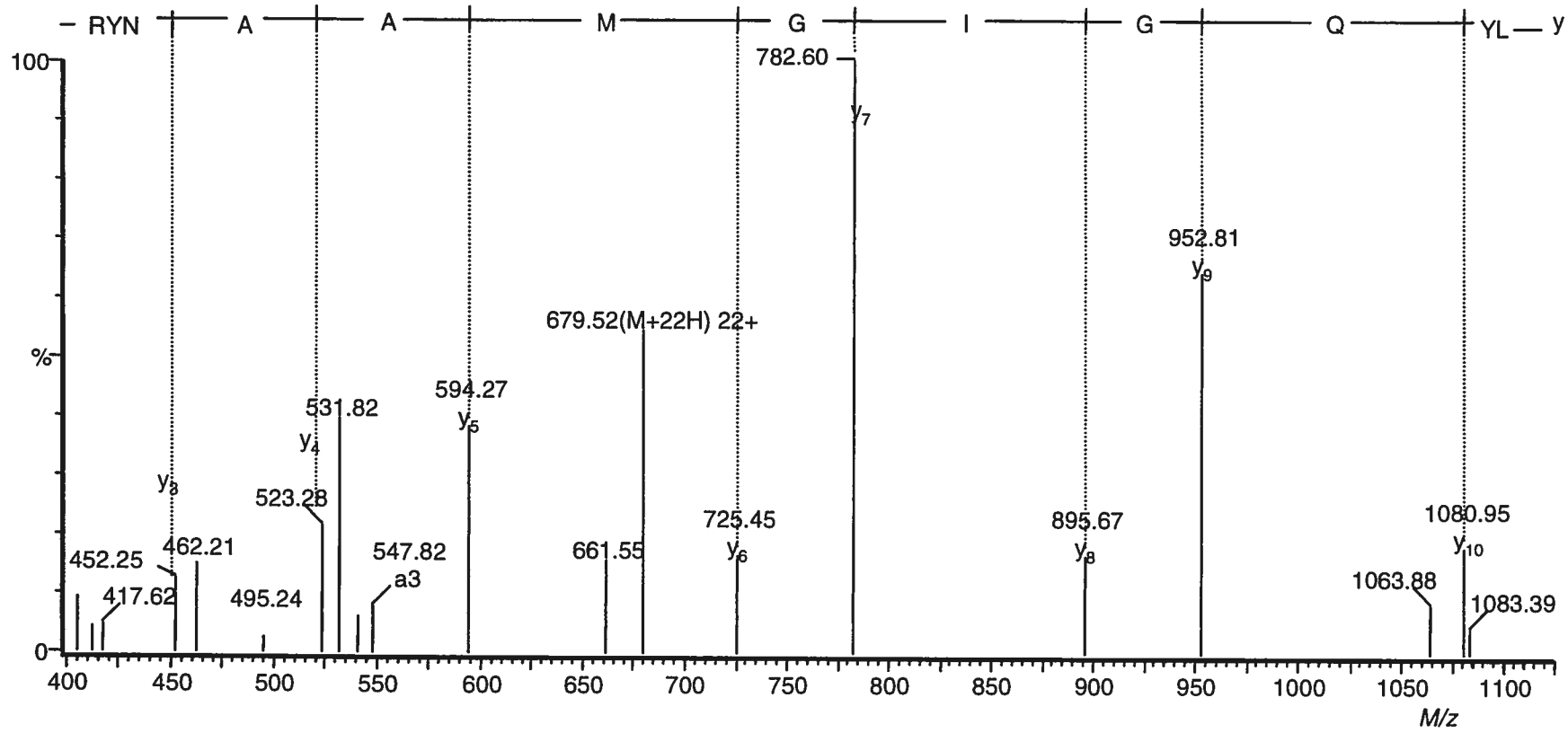


123

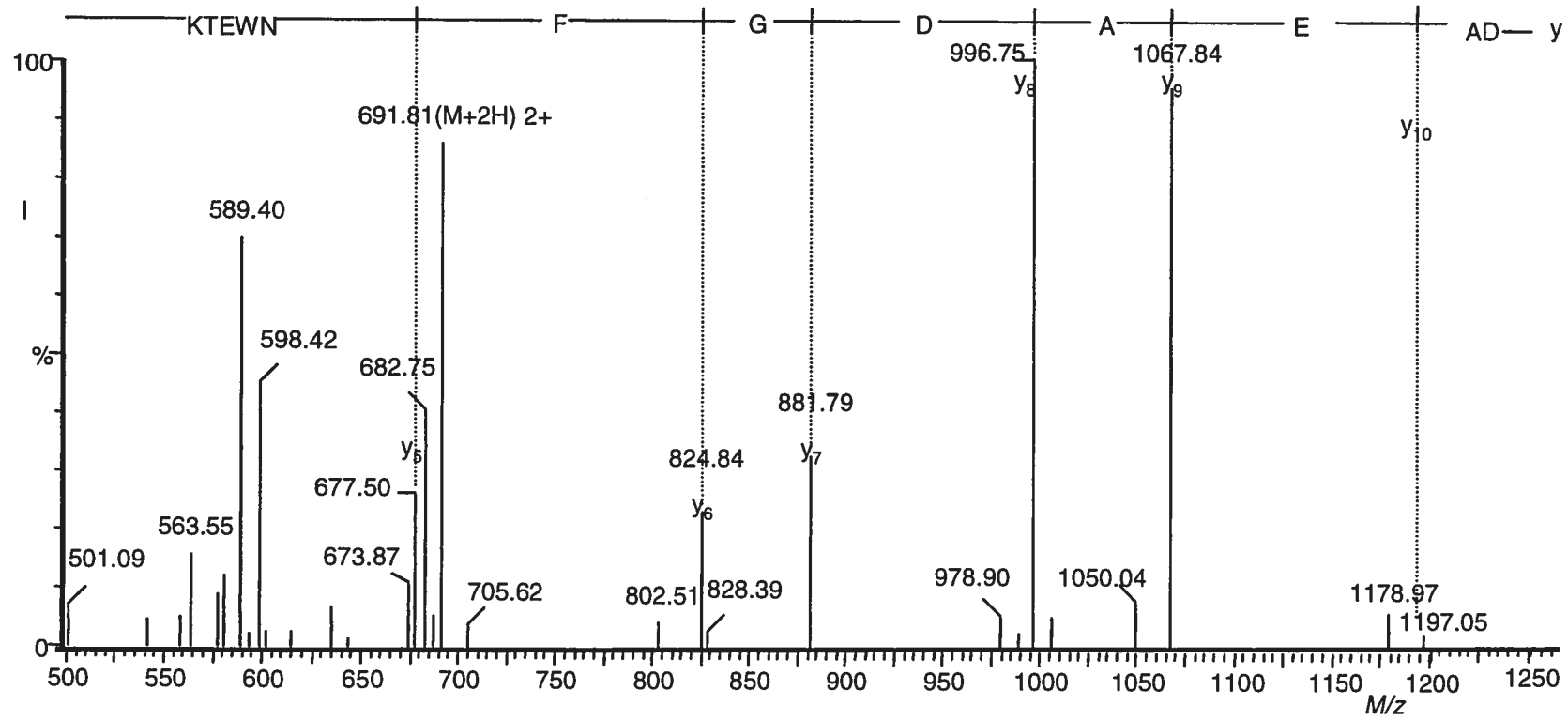
Annexe a2 : Détermination de la séquence d'un peptide (ion pseudo-moléculaire 565,56 *m/z* doublement chargé) de l'isoforme a de la protéine 37 kDa de *D. frappieri.* Analyse effectuée par nanoélectrovaporisation couplée à un triple quadripôle avec une énergie de collision de 24 eV. Le peptide provient de quatre digestions tryptiques de l'isoforme a de la protéine 37 kDa séparée sur gel SDS-PAGE 12 % coloré au nitrate d'argent.



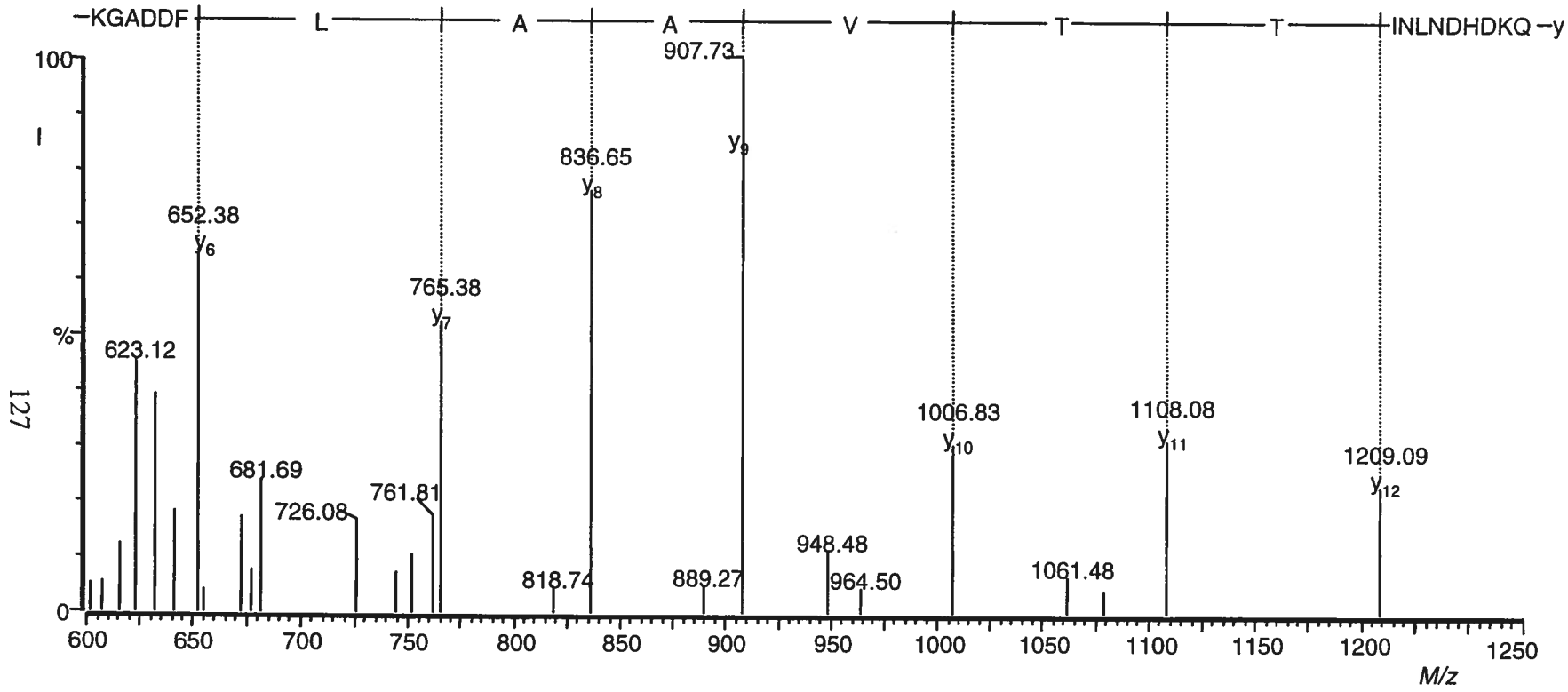
Annexe a3 : Détermination de la séquence d'un peptide (ion pseudo-moléculaire 647,61 *m/z* doublement chargé) de l'isoforme a de la protéine 37 kDa de *D. frappieri.* Analyse effectuée par nanoélectrovaporisation couplée à un triple quadripôle avec une énergie de collision de 24 eV. Le peptide provient de quatre digestions tryptiques de l'isoforme a de la protéine 37 kDa séparée sur gel SDS-PAGE 12 % coloré au nitrate d'argent.



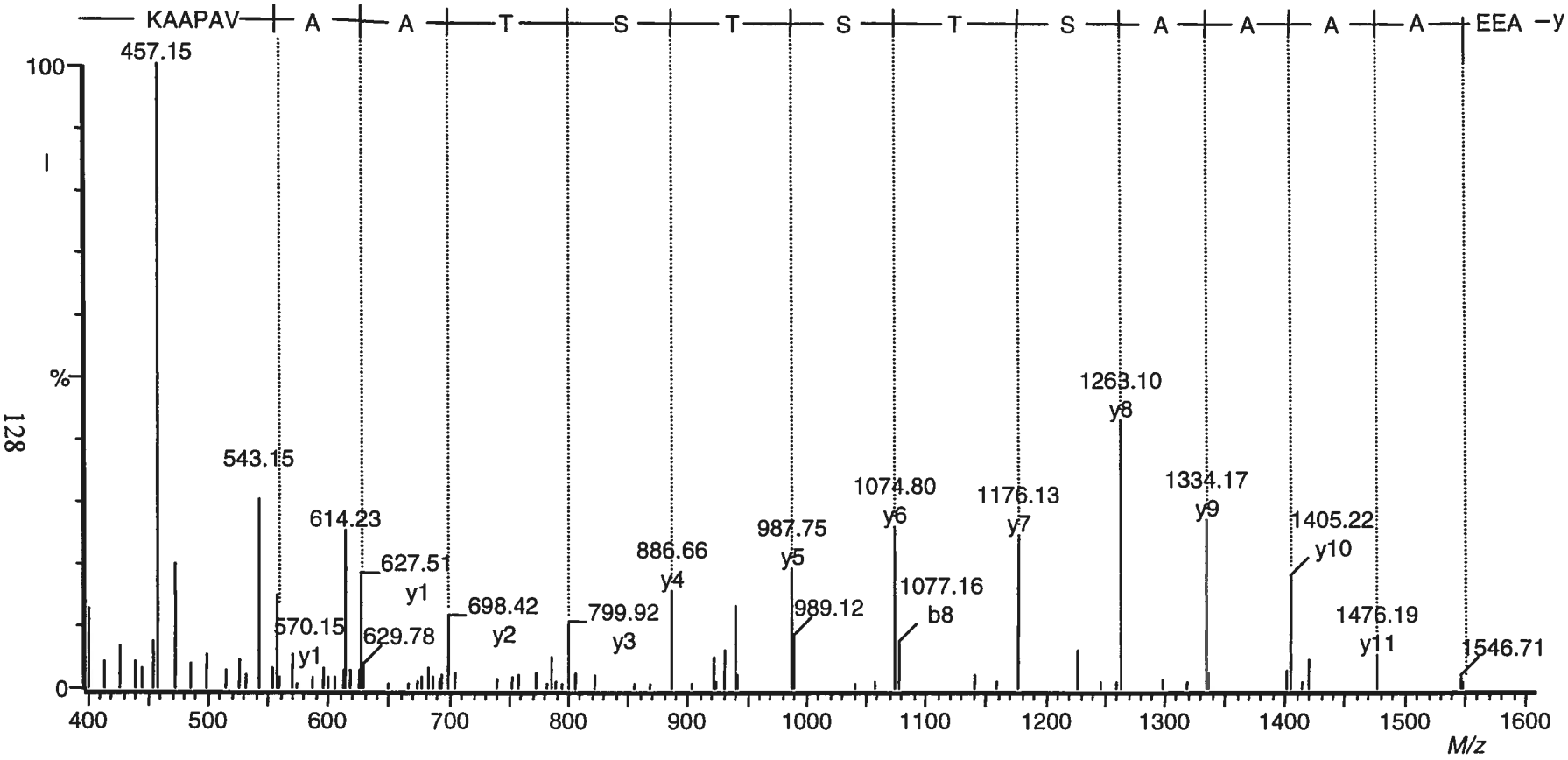
Annexe a4 : Détermination de la séquence d'un peptide (ion pseudo-moléculaire 679,09 *m/z* doublement chargé) de l'isoforme a de la protéine 37 kDa de *D. frappieri.* Analyse effectuée par nanoélectrovaporisation couplée à un triple quadripôle avec une énergie de collision de 28 eV. Le peptide provient de quatre digestions tryptiques de l'isoforme a de la protéine 37 kDa séparée sur gel SDS-PAGE 12 % coloré au nitrate d'argent.



Annexe a5 : Détermination de la séquence d'un peptide (ion pseudo-moléculaire 691,54 *m/z* doublement chargé) de l'isoforme a de la protéine 37 kDa de *D. frappieri.* Analyse effectuée par nanoélectrovaporisation couplée à un triple quadripôle avec une énergie de collision de 22 eV. Le peptide provient de quatre digestions tryptiques de l'isoforme a de la protéine 37 kDa séparée sur gel SDS-PAGE 12 % coloré au nitrate d'argent.

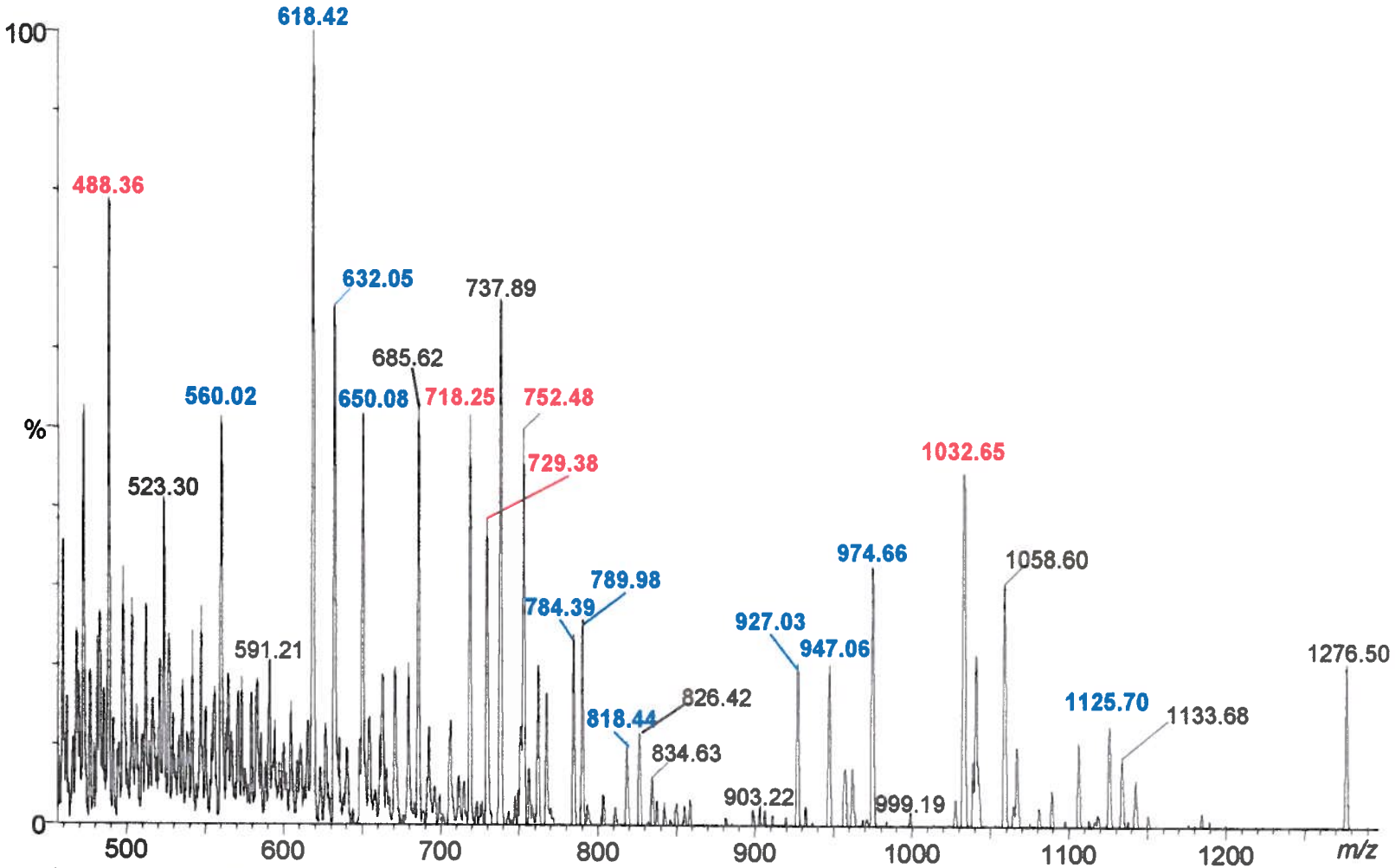


Annexe a6 : Détermination de la séquence d'un peptide (ion pseudo-moléculaire 762,99 *m/z* triplement chargé) de l'isoforme a de la protéine 37 kDa de *D. frappieri.* Analyse effectuée par nanoélectrovaporisation couplée à un triple quadripôle avec une énergie de collision de 30 eV. Le peptide provient de quatre digestions tryptiques de l'isoforme a de la protéine 37 kDa séparée sur gel SDS-PAGE 12 % coloré au nitrate d'argent.

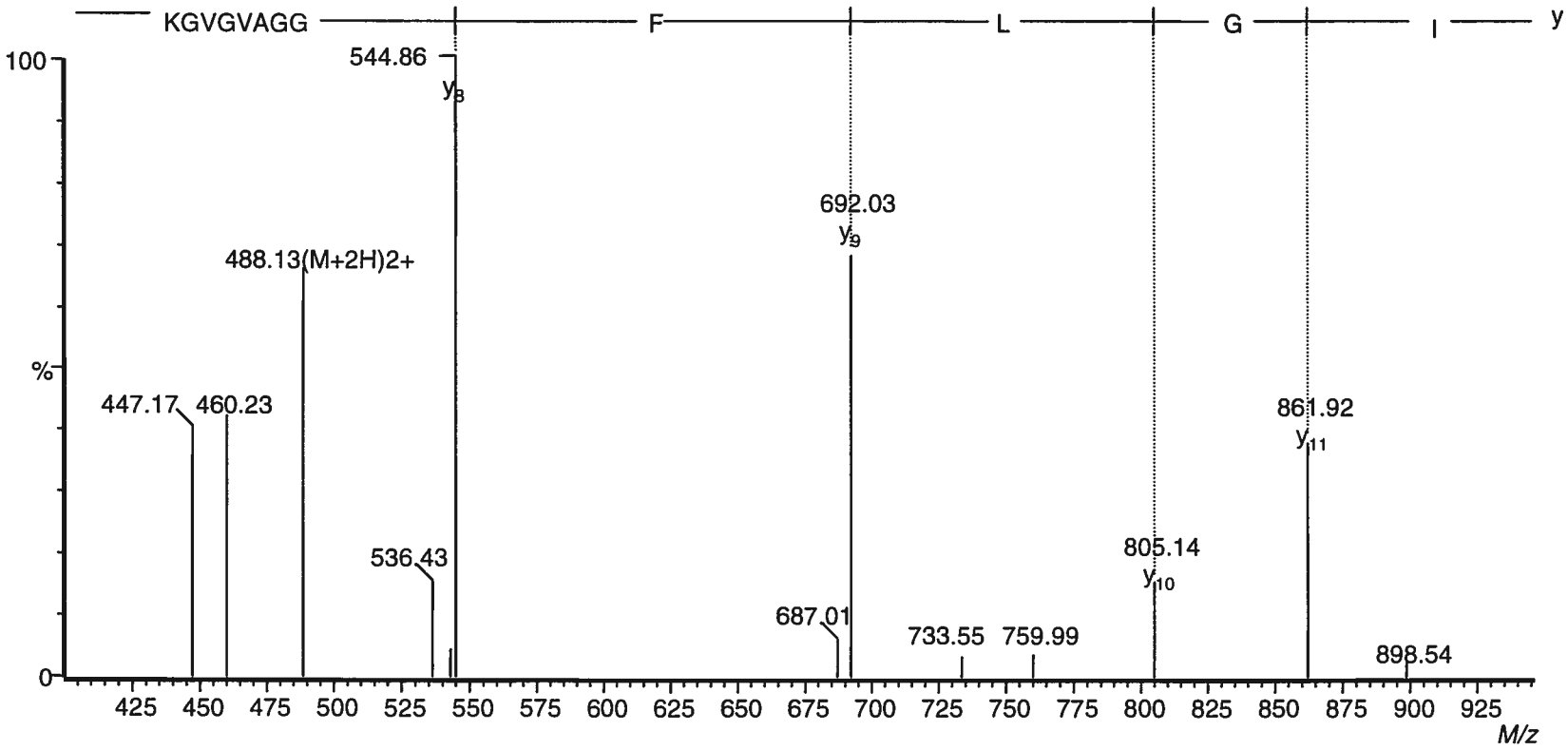


Annexe a7 : Détermination de la séquence d'un peptide (ion pseudo-moléculaire 938.40 *m/z* doublement chargé) de l'isoforme a de la protéine 37 kDa de *D. frappieri.* Analyse effectuée par nanoélectrovaporisation couplée à un triple quadripôle avec une énergie de collision de 33 eV. Le peptide provient de quatre digestions tryptiques de l'isoforme a de la protéine 37 kDa séparée sur gel SDS-PAGE 12 % coloré au nitrate d'argent.

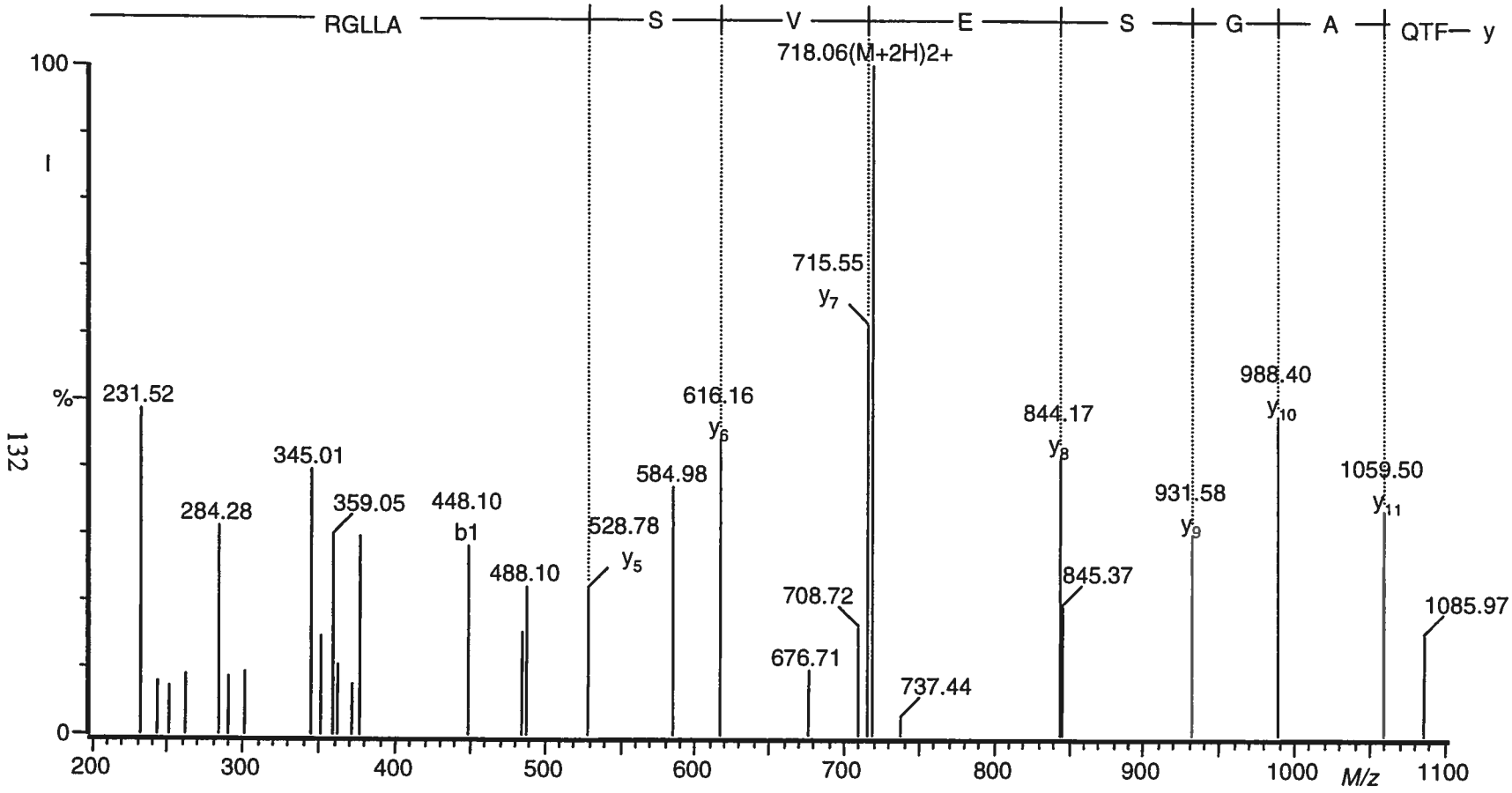
Annexe b : Empreinte peptidique et séquences de la protéine 45 kDa de *D. frappieri*



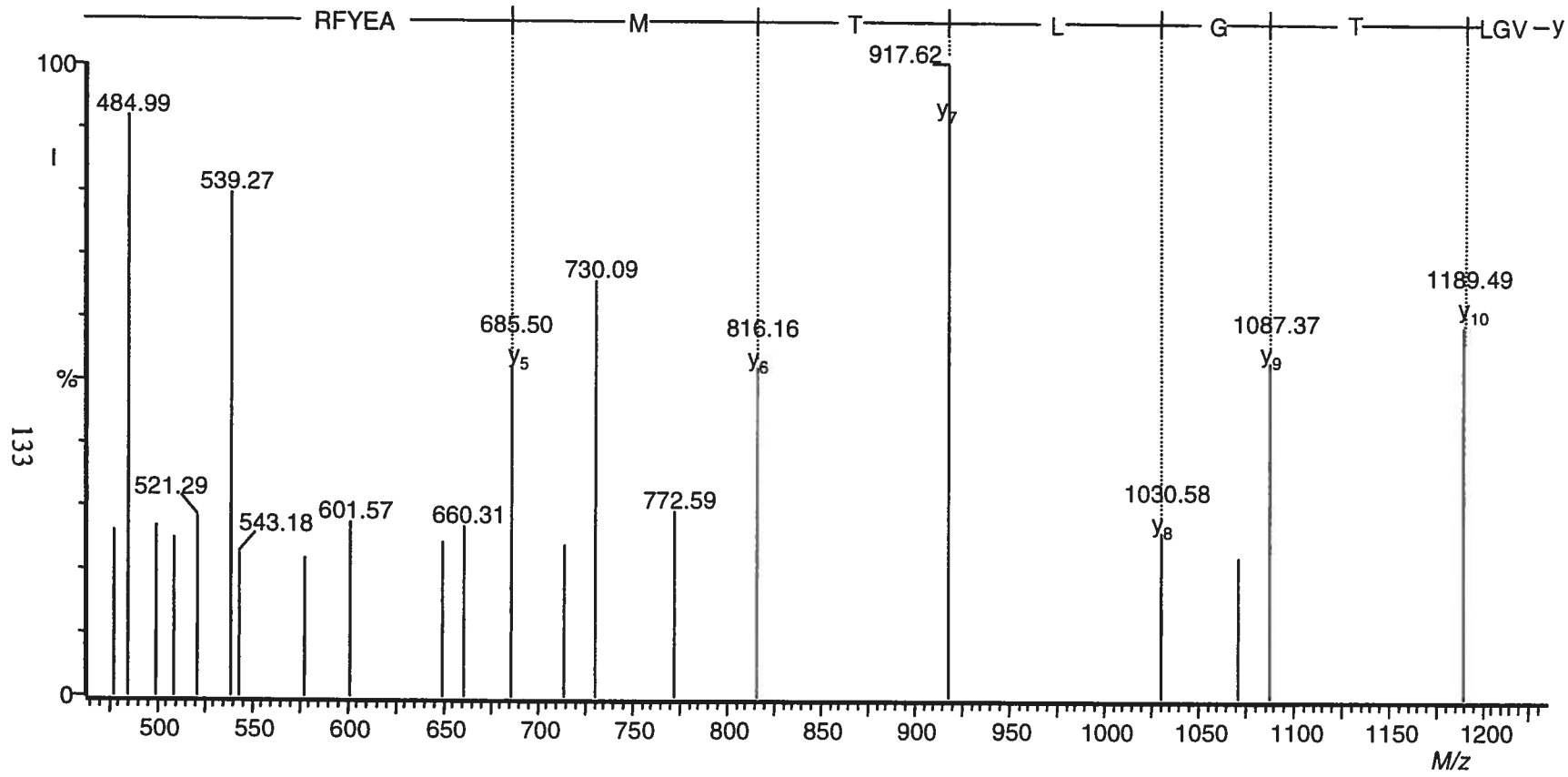
Annexe b1 : Spectre de masse des peptides tryptiques de l'isoforme b de la protéine 45 kDa de *D. frappieri*. Analyse effectuée par nanoélectrovaporisation couplée à un quadripôle. Les peptides proviennent de quatre digestions tryptiques à même les morceaux de gels SDS-PAGE 12 % colorés au nitrate d'argent. Peptide dont la masse correspond à une masse de la digestion théorique de la protéine 51 kDa de *D. hafniense* (●) et peptide ayant la caractéristique précédente et dont la séquence se retrouve dans celle de la protéine 51 kDa de *D. hafniense* (●).



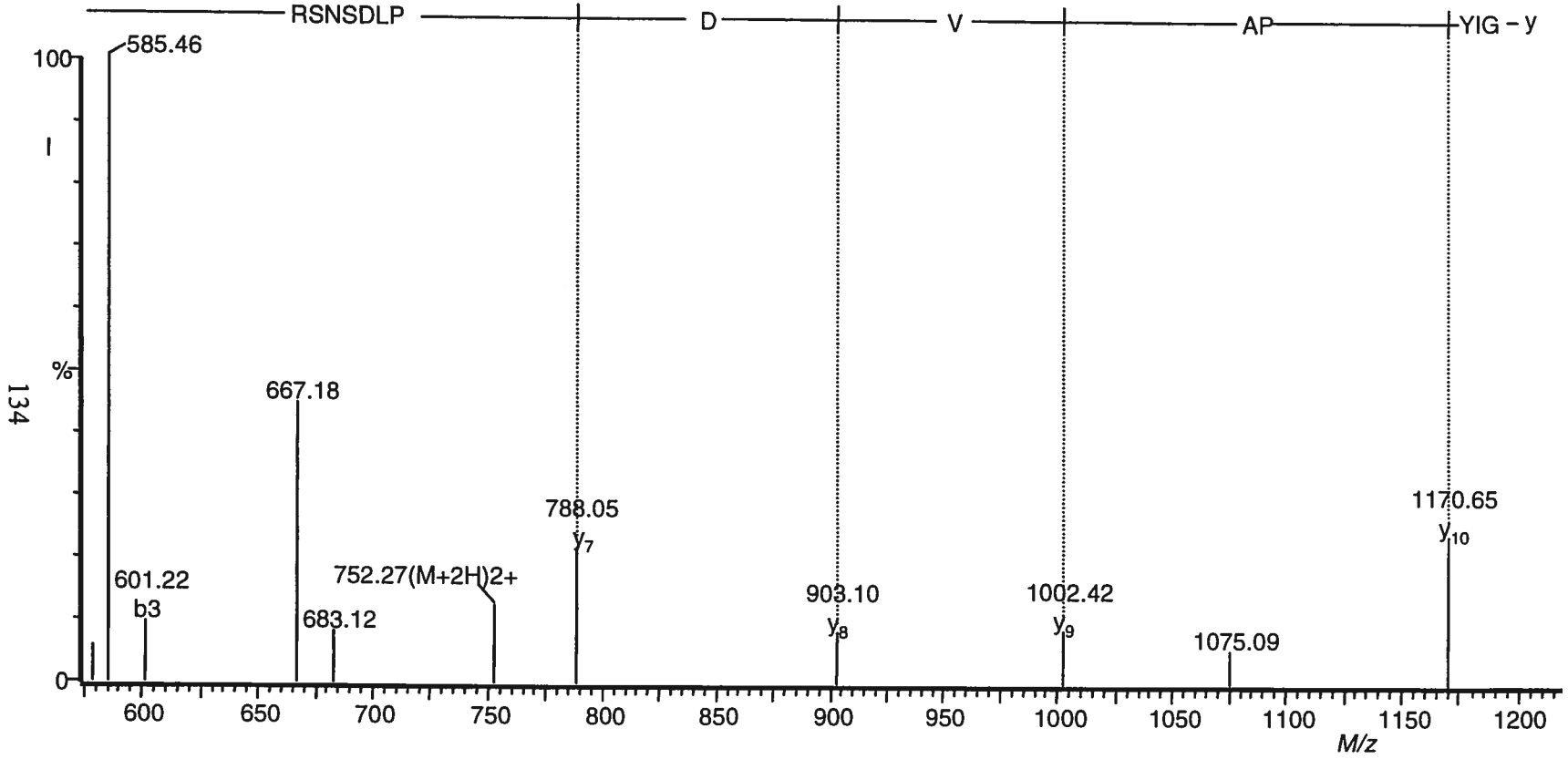
Annexe b2 : Détermination de la séquence d'un peptide (ion pseudo-moléculaire 488,29 *m/z* doublement chargé) de l'isoforme b de la protéine 45 kDa de *D. frappieri.* Analyse effectuée par nanoélectrovaporisation couplée à un triple quadripôle avec une énergie de collision de 17 eV. Le peptide provient de quatre digestions tryptiques de l'isoforme b de la protéine 45 kDa séparée sur gel SDS-PAGE 12 % coloré au nitrate d'argent.



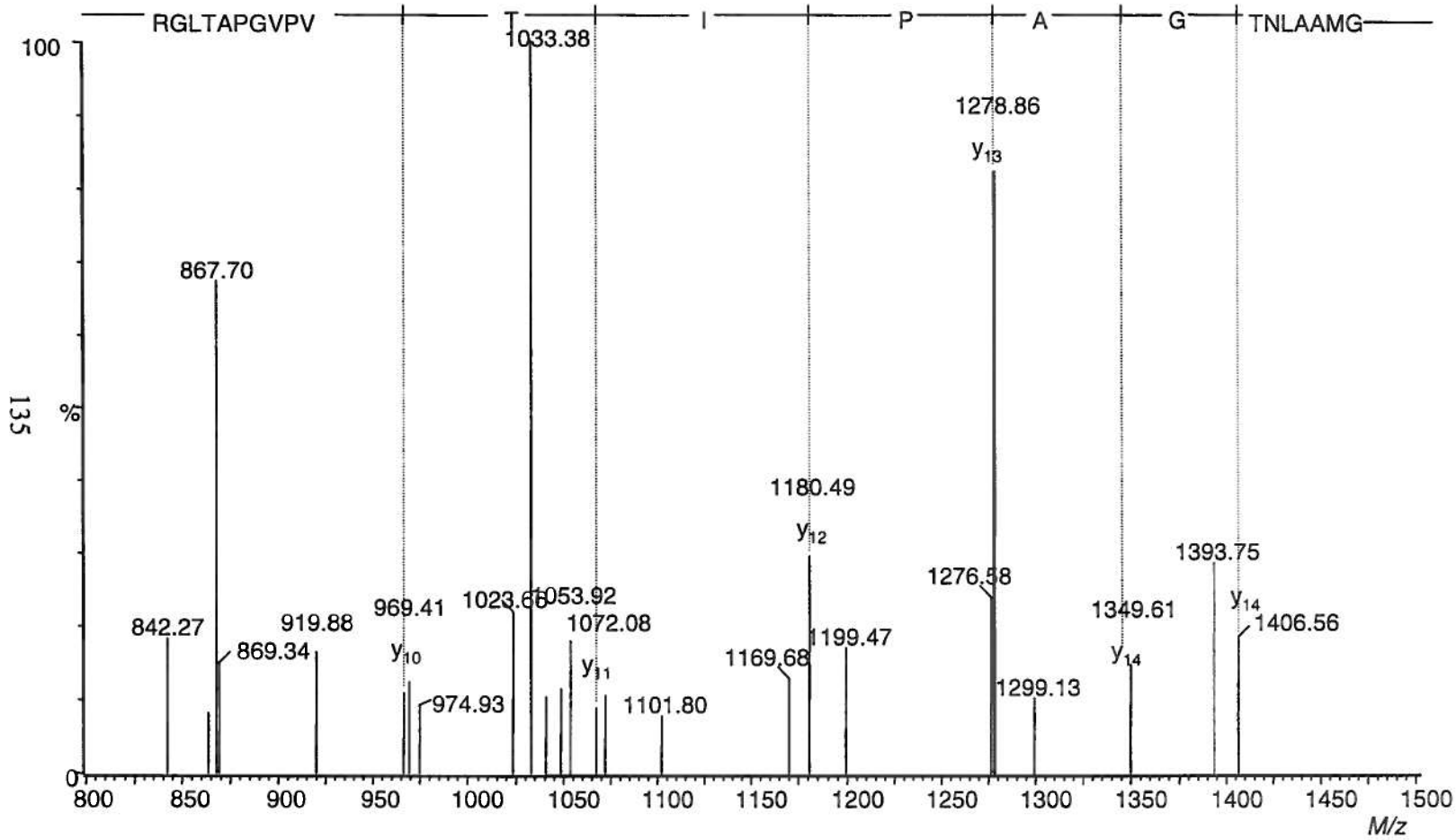
Annexe b3 : Détermination de la séquence d'un peptide (ion pseudo-moléculaire 718,32 *m/z* doublement chargé) de l'isoforme b de la protéine 45 kDa de *D. frappieri.* Analyse effectuée par nanoélectrovaporisation couplée à un triple quadripôle avec une énergie de collision de 20 eV. Le peptide provient de quatre digestions tryptiques de l'isoforme b de la protéine 45 kDa séparée sur gel SDS-PAGE 12 % coloré au nitrate d'argent.



Annexe b4 : Détermination de la séquence d'un peptide (ion pseudo-moléculaire 729.39 *m/z* doublement chargé) de l'isoforme b de la protéine 45 kDa de *D. frappieri.* Analyse effectuée par nanoélectrovaporisation couplée à un triple quadripôle avec une énergie de collision de 41 eV. Le peptide provient de quatre digestions tryptiques de l'isoforme b de la protéine 45 kDa séparée sur gel SDS-PAGE 12 % coloré au nitrate d'argent.

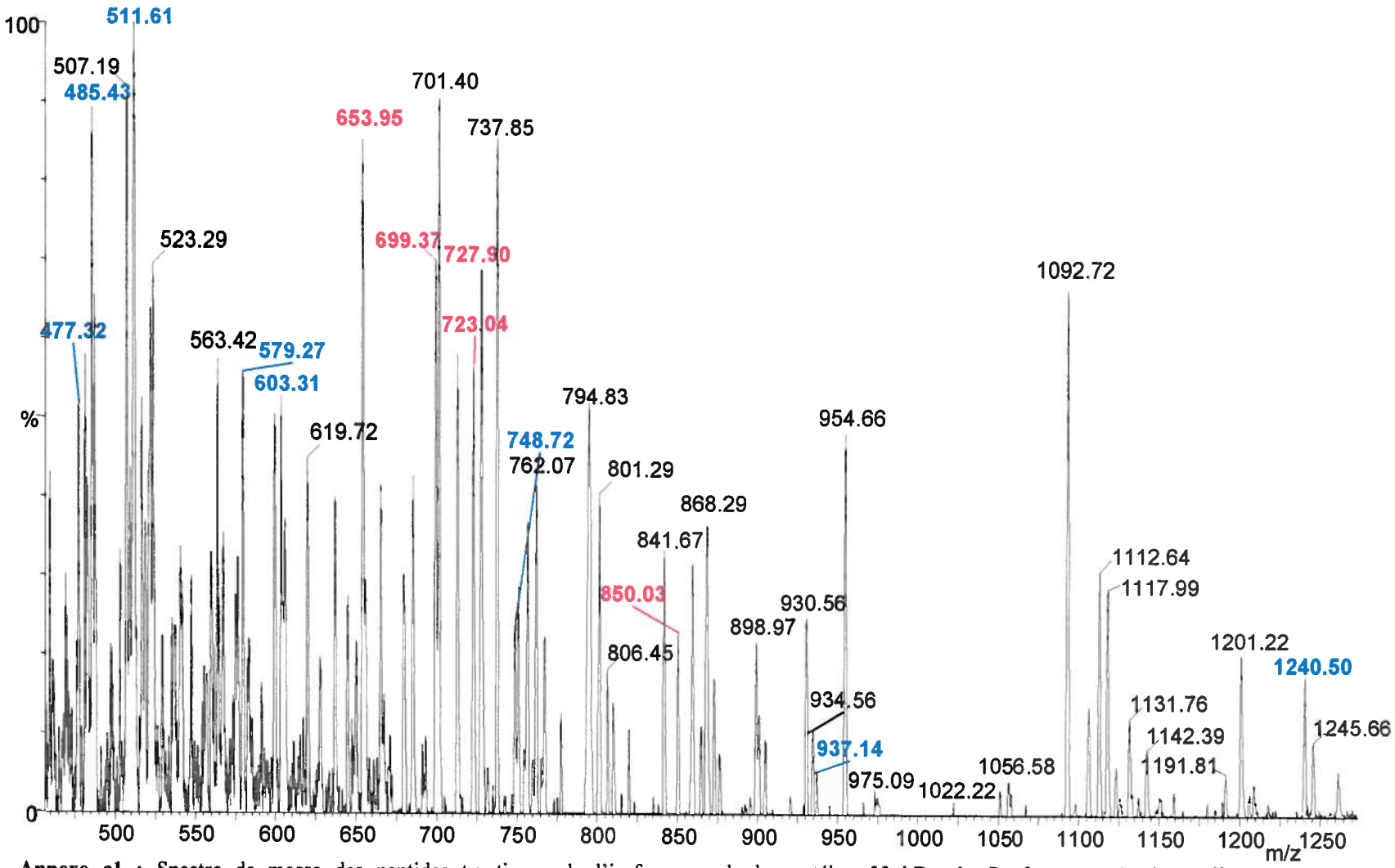


Annexe b5 : Détermination de la séquence d'un peptide (ion pseudo-moléculaire 752,26 *m/z* doublement chargé) de l'isoforme b de la protéine 45 kDa de *D. frappieri.* Analyse effectuée par nanoélectrovaporisation couplée à un triple quadripôle avec une énergie de collision de 19 eV. Le peptide provient de quatre digestions tryptiques de l'isoforme b de la protéine 45 kDa séparée sur gel SDS-PAGE 12 % coloré au nitrate d'argent.

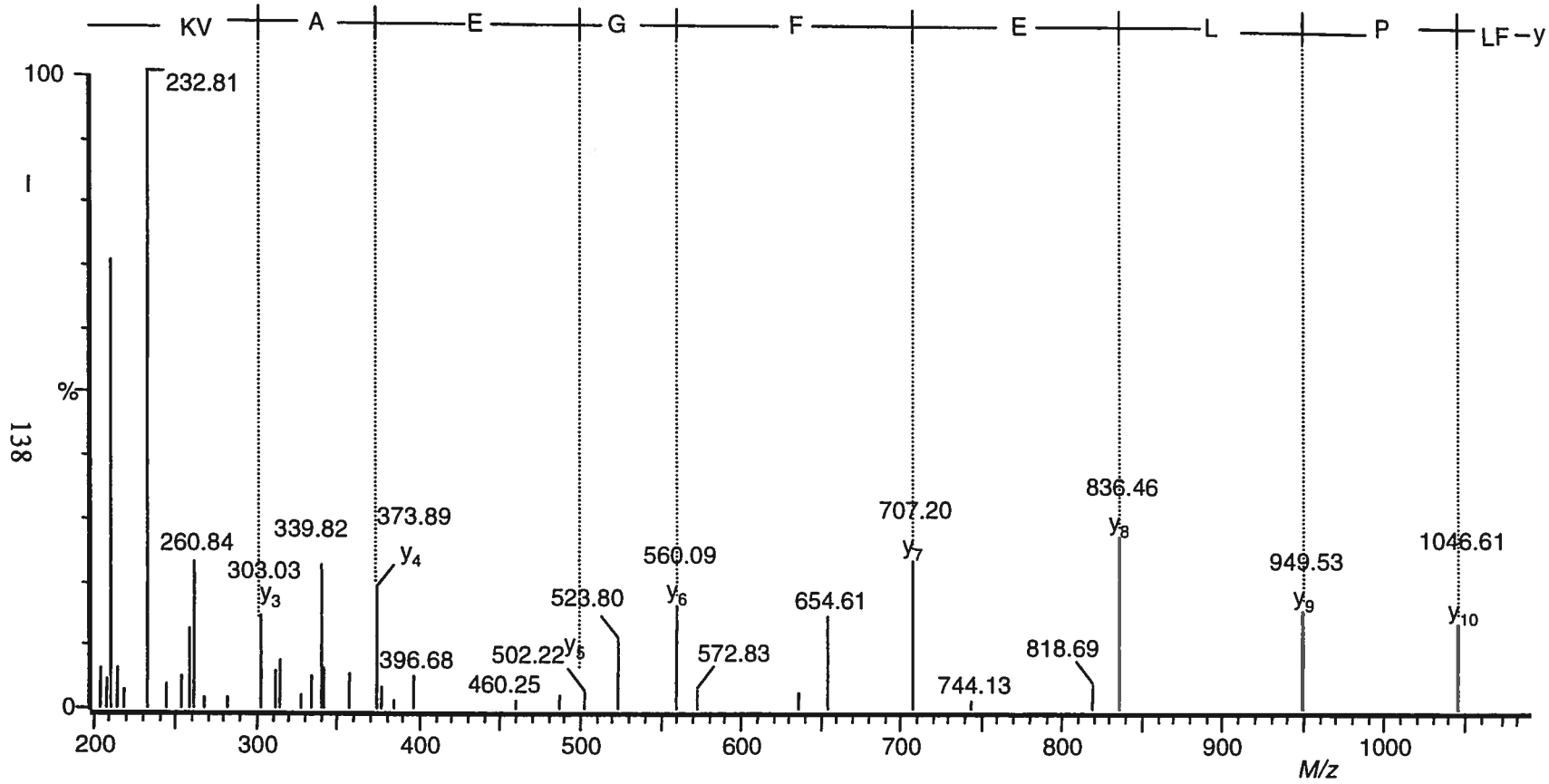


Annexe b6 : Détermination de la séquence d'un peptide (ion pseudo-moléculaire 1032,49 *m/z* doublement chargé) de l'isoforme b de la protéine 45 kDa de *D. frappieri.* Analyse effectuée par nanoélectrovaporisation couplée à un triple quadripôle avec une énergie de collision de 39 eV. Le peptide provient de quatre digestions tryptiques de l'isoforme b de la protéine 45 kDa séparée sur gel SDS-PAGE 12 % coloré au nitrate d'argent.

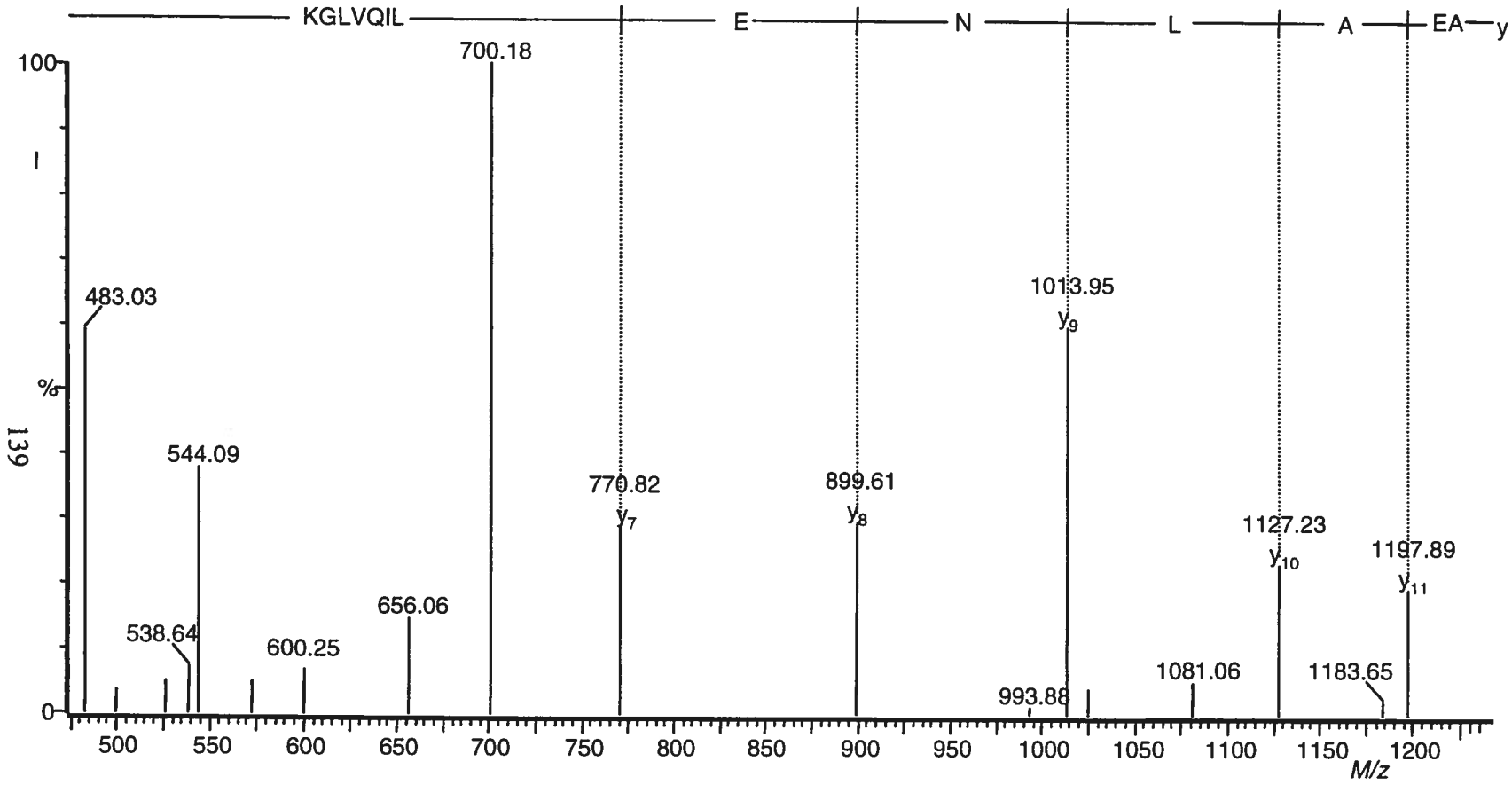
Annexe c : Empreinte peptidique et séquences de la protéine 55 kDa de *D. frappieri*



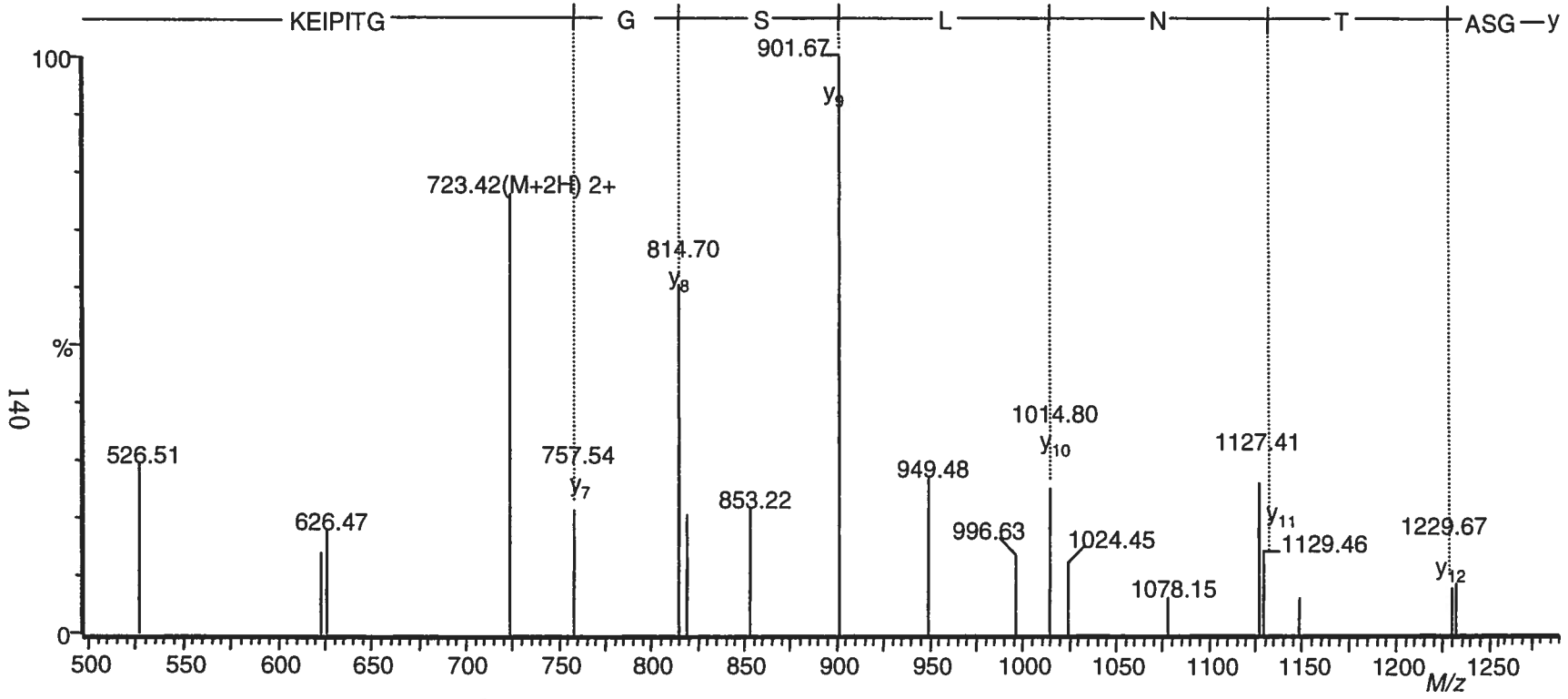
Annexe c1 : Spectre de masse des peptides tryptiques de l'isoforme c de la protéine 55 kDa de *D. frappieri*. Analyse effectuée par nanoélectrovaporisation couplée à un quadripôle. Les peptides proviennent de quatre digestions tryptiques à même les morceaux de gels SDS-PAGE 12 % colorés au nitrate d'argent. Peptide dont la masse correspond à une masse de la digestion théorique de la protéine 50 kDa de *D. hafniense* (●), peptide ayant la caractéristique précédente et dont la séquence se retrouve dans celle de la protéine 50 kDa de *D. hafniense* (●).



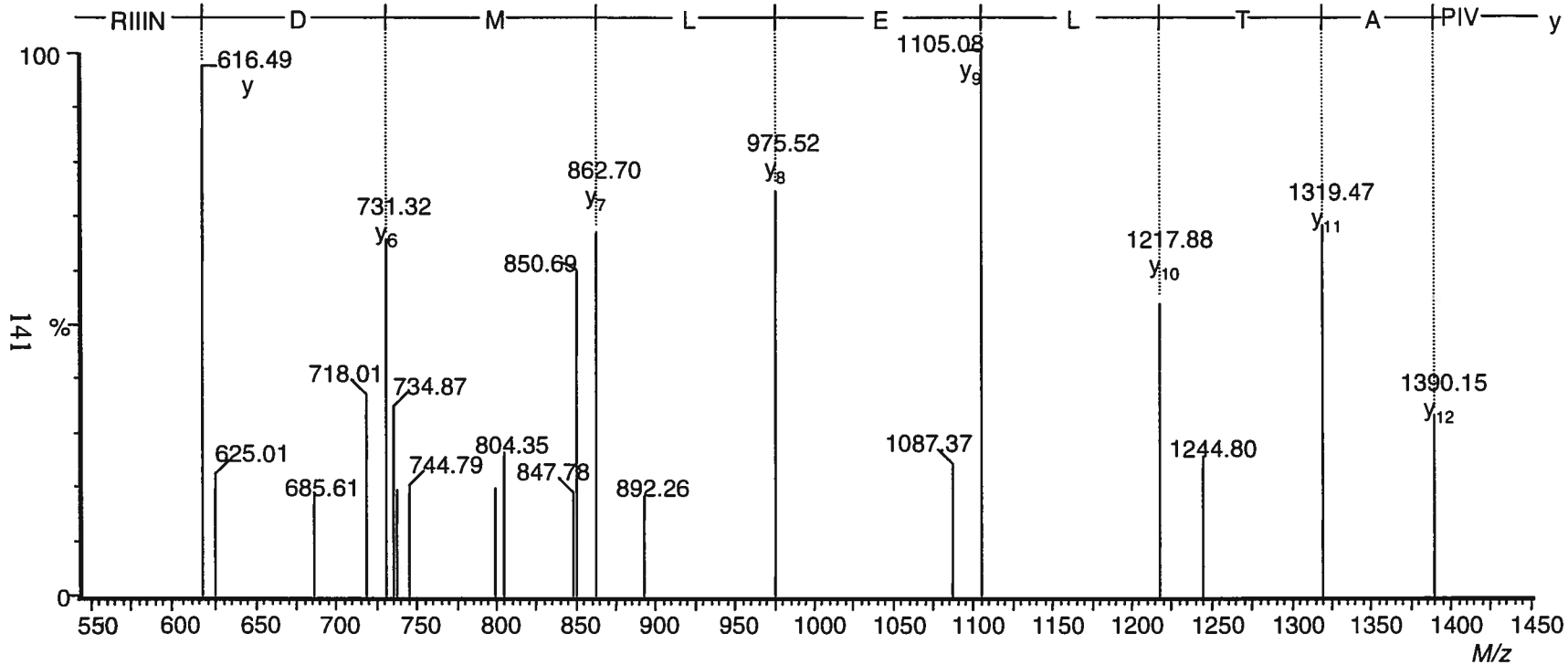
Annexe c2 : Détermination de la séquence d'un peptide (ion pseudo-moléculaire 653,71 *m/z* doublement chargé) de l'isoforme c de la protéine 55 kDa de *D. frappieri.* Analyse effectuée par nanoélectrovaporisation couplée à un triple quadripôle avec une énergie de collision de 30 eV. Le peptide provient de quatre digestions tryptiques de l'isoforme c de la protéine 55 kDa séparée sur gel SDS-PAGE 12 % coloré au nitrate d'argent.



Annexe c3 : Détermination de la séquence d'un peptide (ion pseudo-moléculaire 699,33 *m/z* doublement chargé) de l'isoforme b de la protéine 55 kDa de *D. frappieri.* Analyse effectuée par nanoélectrovaporisation couplée à un triple quadripôle avec une énergie de collision de 27 eV. Le peptide provient de quatre digestions tryptiques de l'isoforme b de la protéine 55 kDa séparée sur gel SDS-PAGE 12 % coloré au nitrate d'argent.



Annexe c4 : Détermination de la séquence d'un peptide (ion pseudo-moléculaire 723,04 *m/z* doublement chargé) de l'isoforme b de la protéine 55 kDa de *D. frappieri.* Analyse effectuée par nanoélectrovaporisation couplée à un triple quadripôle avec une énergie de collision de 30 eV. Le peptide provient de quatre digestions tryptiques de l'isoforme b de la protéine 55 kDa séparée sur gel SDS-PAGE 12 % coloré au nitrate d'argent.



141

Annexe c5 : Détermination de la séquence d'un peptide (ion pseudo-moléculaire 849,84 *m/z* doublement chargé) de l'isoforme b de la protéine 55 kDa de *D. frappieri.* Analyse effectuée par nanoélectrovaporisation couplée à un triple quadripôle avec une énergie de collision de 40 eV. Le peptide provient de quatre digestions tryptiques de l'isoforme b de la protéine 55 kDa séparée sur gel SDS-PAGE 12 % coloré au nitrate d'argent.