

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**CARACTÉRISATION DE DIOXYGÉNASES DU BIPHÉNYLE PRODUITES
PAR INGÉNIERIE GÉNÉTIQUE**

Par
Catherine Simard

Mémoire
pour l'obtention
du grade de Maître en science (M.Sc.)
en Microbiologie et Biotechnologie Appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur interne

Richard Villemur
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

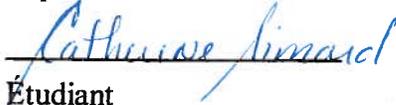
Ryszard Brzezinski,
Département de Biologie
Université de Sherbrooke

Directeur de recherche

Michel Sylvestre
INRS-Institut Armand-Frappier

Résumé

Les biphényles polychlorés (BPC) sont des composés xénobiotiques introduits récemment dans l'environnement. La détection de ces produits toxiques dans la biosphère et leur accumulation dans les tissus d'organismes vivants a dévoilé la limite de notre écosystème à minéraliser ces composés. Autre que par l'intervention de techniques physico-chimique pour l'élimination de ces contaminants et qui demeurent insatisfaisants jusqu'à présent, l'utilisation de procédés de dégradation par les microorganismes est une avenue intéressante. Plusieurs microorganismes disposent d'un système enzymatique pouvant transformer certains congénères BPC, par la voie de dégradation du biphényle. Cependant, les bactéries aérobies identifiées ne transforment qu'un nombre restreint de congénères BPC essentiellement ceux à faible teneur en chlore, excluant les congénères à fort pourcentage de chlore ou de forme co-planaire. La dioxygénase du biphényle (BPDO), qui catalyse la première étape de la voie catabolique du biphényle, est déterminante dans le profil de sélection des souches capables de transformer les BPC. Par les connaissances acquises sur le mécanisme réactionnel de la BPDO, ainsi que sur ses éléments structuraux déterminants dans la spécificité de l'enzyme, il nous est possible d'établir des stratégies de sa modification génétique afin d'améliorer cette voie catabolique microbienne. L'étude présentée dans ce mémoire comporte deux volets, soit la caractérisation enzymatique d'hybrides de BPDO produits par ingénierie génétique, ainsi que la construction et de la caractérisation enzymatique de BPDO variants produits par recombinaison aléatoire (*DNA shuffling*) entre les BPDO des souches *Burkholderia cepacia* LB400 et *Comamonas testosteroni* B356. Nous avons donc comparé l'activité enzymatique des BPDO parentales avec celle de BPDO hybrides dans un système *in vitro*, utilisant des préparations d'enzymes purifiées et dans un système *in vivo* utilisant des cellules *E. coli* exprimant ces enzymes. Ces travaux ont permis de confirmer certaines études antérieures qui mentionnaient que la portion C-terminale de la sous-unité α ainsi que la sous-unité β de la BPDO influençaient grandement le profil de transformation des BPC. De plus, nous avons démontré que la BPDO de LB400 est plus flexible à recevoir des modifications structurelles majeures que celle de B356 par le maintien de l'activité enzymatique de ces hybrides. De même, nous avons identifié trois hybrides LB, LBC et LBCD comme étant capables de transformer le 3,3',4,4'-tetrachlorobiphényle encore récalcitrant. Cependant, l'ensemble de ces hybrides montre un spectre d'activité peu varié. De ce constat, nous avons donc utilisé l'évolution moléculaire *in vitro* par recombinaison aléatoire afin d'explorer un plus grand nombre de BPDO variantes qui pourraient présenter un potentiel catabolique plus large ou varié que ceux des BPDO identifiées jusqu'à ce jour. La stratégie a été d'appliquer la recombinaison *in vitro* aléatoire sur les portions du gène *bphA* en partie C-terminale. Cette approche a permis d'obtenir le mutant II-H intéressant par son habilité à catalyser une oxygénation en *ortho-meta* favorisant une transformation efficace du congénère 2,6-dichlorobiphényle toxique et persistant dans l'environnement.


Étudiant


Directeur de recherche

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma reconnaissance à mon directeur de recherche, Dr Michel Sylvestre, de m'avoir permis d'effectuer ce projet de recherche dans son laboratoire de l'INRS-IAF. Ses rigoureux conseils, son aide et ses encouragements durant ce cheminement académique, dans mes travaux et lors de ma rédaction, m'ont été des plus précieux.

Je remercie également Diane Barriault de sa disponibilité à répondre à mes multiples questions avec intérêt et en tout temps et pour nos discussions de toutes sortes tenues tout au long de ces deux années, ma coloc de laboratoire, Kathleen, pour nos échanges enrichissants entre deux manipulations, Rémy et Marie-Michèle qui ont fait en sorte que nos journées soient des plus agréables.

Aussi, je tiens à remercier profondément mes parents, Armandine et Denis, mes frères, Guillaume et Pierre, et ma petite soeur, Anne-Marie, qui n'ont cessé de s'intéresser, de m'encourager et de me transmettre à certains moments la motivation nécessaire à l'atteinte de mes objectifs. De même que je remercie Stéphane, Dominic, Chantal, Patrick, Sylvie, Marie-Josée, Nathalie, mes ami(e)s et ceux qui ont traversé ma vie et garde en mémoire leur amitié, leur soutien et leur compréhension qu'ils m'ont accordés durant cette période.

Table des matières

Résumé	ii
Remerciements	iii
Table des matières	iv
Liste des figures	vii
Liste des tableaux	ix
Liste d'abréviations	x
Introduction	2
Chapitre 1 : Revue de littérature.....	5
1.1 Origine des biphényles polychlorés.....	6
1.2 Aspects toxicologiques des BPC.....	9
1.2.1 Santé humaine.....	9
1.2.2 Identification des composants responsables des effets toxiques.....	10
1.3 Décontamination des BPC dans l'environnement.....	12
1.3.1 Méthodes conventionnelles.....	12
1.3.2 Méthodes microbiologiques.....	13
1.4 Voies cataboliques des BPC.....	14
1.4.1 Spécificité enzymatique des voies de transformation oxydatives.....	15
1.4.2 Étapes catalytiques du catabolisme oxydatif.....	17
1.4.3 Description de la dioxygénase du biphényle.....	19
1.4.4 Organisation génique des opérons biphényle des souches LB400, B356 et KF707.....	21
1.5 Ingénierie de la dioxygénase.....	22
1.5.1 Études de la structure et de l'activité de la NDO.....	23
1.5.1.1 Structure tridimensionnelle de la NDO.....	23
1.5.1.2 Activité de la NDO envers le biphényle.....	24
1.5.2 Régions influentes sur la spécificité de la BPDO.....	25
1.5.2.1 Études de Mondello <i>et al</i> : Régions I-II-III-IV.....	25
1.5.2.2 Recombinaison entre BphA de LB400 et BphA1 de KF707.....	28
1.5.2.3 Rôle de la sous-unité β	29
1.5.3 Recombinaison aléatoire <i>in vitro</i> (DNA shuffling).....	31
1.5.4 Recombinaison aléatoire <i>in vitro</i> entre <i>bphA</i> ₁ de KF707 et <i>bphA</i> de LB400.....	32

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes	35
2.1 Souches bactériennes et plasmides.....	36
2.1.1 Plasmides utilisés pour l'expression des composantes de BPDO des souches LB400, B356 et des BPDO hybrides.....	37
2.1.2 Plasmides utilisés pour le criblage de BPDO variants obtenus par recombinaison aléatoire <i>in vitro</i>	38
2.2 Expression et purification des BPDO de LB400 et de B356 et des BPDO hybrides.....	39
2.3 Détermination de la concentration protéique.....	40
2.4 Essais enzymatiques et cinétique de transformation.....	40
2.4.1 Essais enzymatiques <i>in vitro</i> envers divers congénères BPC.....	40
2.4.2 Cinétique de transformation par des suspensions cellulaires de <i>E.coli</i> recombinants.....	42
2.5 Protocoles d'analyses chromatographiques.....	44
2.5.1 Analyse par chromatographie HPLC.....	44
2.5.2 Analyse par chromatographie gazeuse (GC-ECD).....	46
2.6 Construction des BPDO hybrides par recombinaison <i>in vitro</i> aléatoire.....	48
2.6.1 Protocoles généraux de biologie moléculaire.....	48
2.6.1.1 Purification d'ADN plasmidique.....	48
2.6.1.2 Réactions d'endonucléases et ligation.....	48
2.6.1.3 Procédure de séparation et d'élution des fragments d'ADN sur le gel d'agarose.....	49
2.6.1.4 Purification des produits de PCR.....	49
2.6.1.5 Synthèse des oligonucléotides et séquençage de l'ADN....	50
2.6.1.6 Amplification <i>in vitro</i> des fragments d'ADN par PCR.....	50
2.6.1.7 Dosage de l'ADN amplifié au spectrophotomètre.....	51
2.6.1.8 Transformation bactérienne.....	51
2.6.2 Stratégie et protocoles utilisés pour la construction des hybrides par recombinaison aléatoire <i>in vitro</i>	52
2.6.2.1 Amplification et digestion des fragments à soumettre à la recombinaison aléatoire.....	54
2.6.2.2 PCR sans amorce.....	55
2.6.2.3 PCR avec amorces.....	55
2.6.2.4 Criblage des colonies démontrant une dioxygénase plus efficace.....	55
Chapitre 3 : Résultats.....	57
3.1 Partie I Analyse des hybrides produits par ingénierie génétique.....	58
3.1.1 Essais enzymatiques <i>in vivo</i> des hybrides entre les sous-unités α des BPDO de LB400 et de B356.....	58
3.1.1.1 Propriétés catalytiques des hybrides des BPDO de LB400 et de B356.....	59

3.1.1.2 Transformation des congénères BPC sélectionnés par des cellules de <i>E.coli</i> DH11S exprimant les BPDO hybrides...	65
3.2 Partie II Analyse des hybrides produits par recombinaison aléatoire (<i>DNA shuffling</i>).....	71
3.2.1 Criblage des BPDO variantes	71
3.2.2 Caractérisation des BPDO variantes	74
3.2.3 Analyse de la séquence du variant II-H	80
Chapitre 4 : Discussion.....	83
4.1 Déterminants structuraux de l'activité catalytique de la BPDO envers les congénères BPC.....	83
4.2 Influence de la concentration totale d'un mélange de BPC sur le spectre de transformation de la BPDO de LB400.....	90
4.3 L'intérêt d'une approche empirique afin de favoriser le développement de BPDO variants efficaces dans la transformation des congénères BPC.....	92
4.3.1 Variants de seconde génération.....	93
4.3.2 Gain d'une capacité à transformer l'indole en indigo.....	94
4.3.3 Variants de troisième génération.....	95
4.3.4 Variant II-H.....	96
Chapitre 5 : Conclusion.....	98
Chapitre 6 : Bibliographie.....	101

Liste de figures

Figure 1	Structure chimique des BPC	8
Figure 2	Représentation des structures chimiques du dibenzo- <i>p</i> -dioxine (a), du dibenzofuranne (b) et du 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxine	11
Figure 3	Schéma de la transformation d'un congénère BPC toxique au niveau du foie et de l'induction des cytochromes P-450	12
Figure 4	Congénères BPC préférentiellement transformés par les souches <i>B. cepacia</i> LB400, <i>P. pseudoalcaligenes</i> KF707 et <i>C. testosteroni</i> B-356	17
Figure 5	Voie catabolique du biphenyle	19
Figure 6	Système multi-enzyme de la dioxygénase du biphenyle (BPDO)	20
Figure 7	Organisation génique des opérons biphenyle des souches <i>B. cepacia</i> LB400, <i>P. pseudoalcaligenes</i> KF707 et <i>C. testosteroni</i> B-356	22
Figure 8	Structure du centre Rieske présent dans la sous-unité α de l'oxygénase de la BPDO	24
Figure 9	Représentation des régions I, II, III et IV identifiées au niveau de la partie C-terminale des sous-unités α des ISP des souches <i>B. cepacia</i> LB400 et <i>P. pseudoalcaligenes</i> KF707	27
Figure 10	Hybrides construits par l'échange complet des sous-unités α et β des ISP des souches <i>B. cepacia</i> LB400 et <i>C. testosteroni</i> B356	29
Figure 11	Schéma du procédé de Recombinaison aléatoire	32
Figure 12	Illustration des sites de restriction utilisés pour construire les hybrides entre les gènes <i>bphAE</i> des souches LB400 et B356	37
Figure 13	Hybrides construits par l'échange des fragments A, B, C ou D entre les gènes <i>bphAE</i> des souches LB400 et B356	38
Figure 14	Stratégie utilisée pour appliquer la procédure de recombinaison aléatoire <i>in vitro</i> entre <i>bphA</i> de LB400 et de B356	53
Figure 15	Représentation des hybrides construits entre les BPDO de la souche LB400 et de B356	62

Figure 16	Représentation de l'expression des sous-unités α et β sur le gel SDS-PAGE 12 % des BPDO parentales et des variants obtenus par l'échange de fragments entre la BPDO de LB400 et de B356.....	63
Figure 17	Transformation d'un mélange de 50 nmol/ml de chacun des congénères 2,2'CB, 2,6CB, 22'66'CB, 22'55'CB et 22'44'55'CB par la BPDO de LB400	66
Figure 18	Transformation d'un mélange de 125 nmol/ml de chacun des congénères 2,2'CB, 2,6CB, 22'66'CB, 22'55'CB et 22'44'55'CB par la BPDO de LB400	67
Figure 19	Illustration de la séquence d'acides nucléiques de <i>bphA</i> (comprise dans la séquence <i>MluI-AvrII</i> (490pb-1353pb) de LB400, B356 et du variant II-H où les modifications ont eu lieu.....	81
Figure 20	Illustration de la séquence d'acides aminés de BphA de LB400, B356 et du variant II-H	82

Liste des tableaux

Tableau 1	Pourcentages d'homologie des BphA et des BphE des souches <i>B. cepacia</i> LB400, <i>P. pseudoalcaligenes</i> KF707 et <i>C. testosteroni</i> B-35626
Tableau 2	Quantité de substrat transformé lors d'essais <i>in vitro</i> par les hybrides obtenus en interchangeant les sous-unités α et β de la BPDO des souches <i>B. cepacia</i> LB400 et <i>C. testosteroni</i> B356.....30
Tableau 3	Caractéristiques des plasmides utilisés dans cette étude36
Tableau 4	Congénères caractérisés lors d'essais <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> sur HPLC45
Tableau 5	Mélange de 18 congénères BPC utilisé lors d'essais <i>in vivo</i> et analysé par GC-ECD47
Tableau 6	Amorces utilisées pour les réactions de PCR ou de séquençage d'ADN ...50
Tableau 7	Activités catalytiques des BPDO de LB400 et de B356 purifiées par chromatographie d'affinité comparées à celles des BPDO hybrides.....60
Tableau 8	Potentiel catalytique <i>in vivo</i> de BPDO hybrides.....70
Tableau 9	Phénotypes des BPDO variants obtenus du deuxième cycle de recombinaison aléatoire en recombinant <i>bphA</i> de B356 et de LB400.....73
Tableau 10	Phénotypes des BPDO variants obtenus du troisième cycle de recombinaison aléatoire en recombinant <i>bphA</i> de B356 et de LB400.....74
Tableau 11	Transformation de l'Aroclor 1242 par les cellules de <i>E. coli</i> DH11S exprimant la BPDO de la souche LB400 et/ou des variants obtenus par <i>Recombinaison aléatoire</i>77
Tableau 12	Potentiel catalytique <i>in vivo</i> de la BPDO de LB400 et de variants issus d'une deuxième génération de recombinaison aléatoire78
Tableau 13	Potentiel catalytique <i>in vivo</i> de la BPDO de LB400 et de variants issus d'une troisième génération de recombinaison aléatoire.....79

Liste d'abréviations

BPDO	biphényle 2,3-dioxygénase
BPC	biphényle(s) polychloré(s)
PCDD	dibenzène-p-dioxines
PCDF	dibenzo furannes
o	<i>ortho</i>
m	<i>meta</i>
p	<i>para</i>
CB	chlorobiphényle
BphB	2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle déshydrogénase
BphC	2,3-dihydroxybiphényle-1,2-dioxygénase
BphD	HPDA hydrolase
HPDA	2-hydroxy-6-oxo-phényl-hexa-2,4-dièneoate
bphG	ferrédoxine-réductase
bphF	ferrédoxine
ISP	oxygénase terminale
bphA	sous-unité α du composant ISP
bphE	sous-unité β du composant ISP
NDO	dioxygénase du naphthalène
TOD	dioxygénase du toluène
LB	milieu de culture Luria-Bertani
HEPES	4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid
Pipes	1,4-Piperazinediethanesulfonic acid
IPTG	isopropylthiol-bêta-D-galactoside
DTT	dithiothreitol
CAPS	3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate
MES	2-Morpholinoethanesulfonic acide
GC-ECD	Chromatographe en phase gazeuse couplé à un détecteur à capture d'électrons
HPLC	Chromatographie liquide haute pression
ppm	partie par million
kb	kilopaires de bases
pb	paires de bases
kDa	kilodalton
V	volt
UV	rayon ultra-violet
SDS	sodium dodécyl sulfate
EDTA	disodium éthylène diamine tétra-acétate
DMSO	diméthylsulfoxyde

Introduction

Introduction

Les biphényles polychlorés (BPC) sont des composés d'origine industrielle produits entre les années 30 et 70 qui représentent un groupe de polluants organiques majeurs et récalcitrants dans l'environnement (Furukawa, 1982). Détectés pour la première fois en 1966 (Jensen, 1966) dans les organismes vivants, on reconnaît maintenant leur présence à l'échelle planétaire. Bien que leur utilisation se soit concentrée dans les pays en essor industriel, ils se retrouvent même dans les lieux aussi isolés que l'Arctique et l'Antarctique dû à leur transport par les vents atmosphériques (Tanabe, 1988; Macdonal *et al*, 2000). Malheureusement, ces xénobiotiques, produits d'une synthèse chimique, sont extrêmement stables et leur caractère lipophile entraîne leur accumulation dans les tissus adipeux des animaux ainsi que leur bioconcentration dans la chaîne trophique (Hutzinger *et al*, 1974; Furukawa. 1982). Considérés comme des agents neurotoxiques (Chou *et al*, 1979; Safe, 1990), hépatotoxiques (Yoshimura *et al*, 1979), génotoxiques (Safe *et al*, 1982; Brown *et al*, 1991) et cancérigènes (Kimbough *et al*, 1975; Shaw, 1993), leur présence persistante dans l'environnement peut représenter un risque élevé pour préserver le meilleur équilibre possible chez les organismes vivants du globe. D'où l'intérêt de développer des techniques de décontamination efficaces de sites contaminés aux BPC.

La présence diffuse des BPC dans la biosphère et leur accumulation dans les tissus organiques suggèrent que ces produits ne sont pas transformés efficacement dans l'environnement. Ceci indique une absence d'efficacité des voies cataboliques des micro-organismes à minéraliser ces produits. L'introduction récente des BPC dans l'environnement peut expliquer le fait que les micro-organismes ne se sont pas encore adaptés adéquatement à leur transformation. Afin de contrer ce problème, des traitements ont été développés, dont les plus couramment utilisés actuellement pour décontaminer les sols et les déchets font appel à la destruction thermique. Cependant, ces méthodes contribuent à l'émission de gaz composés de dibenzo-p-dioxines (PCDD) et de dibenzofurannes (PCDF) qui s'avèrent être hautement plus toxiques que les BPC en soi (Safe *et al*, 1985; Safe, 1990; Jones *et al*, 1993). L'incapacité à utiliser ces méthodes pour

décontaminer les sols difficilement accessibles à la machinerie lourde, les eaux et les sédiments démontre la limite de leur application exigeant le développement de méthodes alternatives.

L'utilisation de micro-organismes s'avère être une alternative judicieuse. Depuis quelques temps, un nombre de bactéries ont été identifiées comme étant capables de transformer les BPC à faible teneur en chlore en empruntant la voie de transformation du biphenyle (Furukawa, 1982; Sylvestre, 1995). Aussi, cette voie qui sert à priori à transformer le biphenyle, dispose d'enzymes spécifiques dont la séquence génétique varie d'un micro-organisme à l'autre définissant leur propre spectre d'activité (Taira *et al*, 1992; Guilbeault *et al*, 1994; Haddock *et al*, 1995). Donc, ces souches bactériennes ont un profil d'activités enzymatiques différent et elles démontrent un spectre de transformation plus ou moins large en terme de nombre de congénères transformés. Cependant, aucune d'elles ne peut transformer tous les congénères retrouvés dans les mélanges commerciaux. Ainsi, l'application de procédés microbiologiques efficaces exige des modifications majeures du spectre de sélectivité de ces bactéries afin d'étendre leur capacité à transformer la grande majorité des BPC retrouvés dans l'environnement. Nos études portent sur la modification du spectre de transformation des souches *Burkholderia cepacia* LB400 et *Comamonas testosteroni* B356 qui comptent parmi les souches capables de transformer les BPC les mieux connus à ce jour.

Les gènes codant pour les enzymes de la voie catabolique du biphenyle ont tous été localisés et séquencés, et les enzymes ont été purifiés. La dioxygénase du biphenyle (BPDO) qui initie la voie de transformation constitue un déterminant majeur dans la spécificité catabolique d'un micro-organisme à transformer les BPC. Ainsi, l'augmentation de l'efficacité de cette voie implique des modifications des gènes codant pour cette enzyme. La BPDO est un système multi-enzyme constitué de trois composantes; une oxygénase (ISP), une ferrédoxine-réductase et une ferrédoxine (Haddock et Gibson, 1995; Hurtubise *et al*, 1995). La ferrédoxine-réductase et la ferrédoxine forment une chaîne de transport d'électrons pour le transfert de deux électrons vers l'ISP terminale qui catalyse une oxygénation sur le noyau biphenyle (Hurtubise *et al*, 1995). Ainsi, l'ISP est la composante de la BPDO qui se lie directement

au substrat et qui est donc à la base de la spécificité enzymatique de la voie de transformation, d'où l'intérêt de nos travaux à modifier l'ISP afin d'obtenir des profils de sélection différents de ceux connus jusqu'ici.

C'est dans ce contexte que s'inscrit le présent mémoire. Selon des études antérieures, il a été démontré que l'ISP est constituée de deux sous-unités, α et β , qui s'assemblent afin de former une enzyme hexamérique active, $\alpha_3\beta_3$ (Haddock *et al*, 1995; Hurtubise *et al*, 1996). La portion en C-terminale de la sous-unité α , dont quatre régions spécifiques ont été identifiées, montre une forte influence sur le spectre de transformation de la BPDO. Dans la première partie de nos travaux, deux objectifs ont été: (1) de caractériser l'activité enzymatique des hybrides obtenus par l'échange de fragments dans la partie C-terminale des BPDO des souches *B. cepacia* LB400 et *C. testosteroni* B356 par ingénierie génétique; (2) d'identifier certaines portions de l'enzyme qui pourraient influencer le spectre de transformation des BPC.

De plus, des études précédentes ont démontré que l'utilisation d'une méthode d'évolution génétique par recombinaison aléatoire, nommée *DNA shuffling*, peut permettre d'augmenter l'efficacité des BPDO à transformer les BPC (Kumamaru *et al*, 1998; Bruhlmann *et al*, 1999). La rapidité de la méthode ainsi que les multiples possibilités de recombinaisons aléatoires sont des atouts intéressants afin d'obtenir des variants ayant un spectre de transformation des BPC plus large ou différent. La seconde partie de nos travaux, deux objectifs à atteindre furent: (1) d'utiliser une approche empirique par *DNA shuffling* pour l'obtention de BPDO variants; (2) de caractériser l'activité enzymatique des variants sur un mélange de BPC commercial, Aroclor 1242, et sur un mélange synthétique dans le but de cibler les variants intéressants par leur capacité de transformation hors du commun.

Chapitre 1
Revue de littérature

1.1 Origine des biphényles polychlorés

Les biphényles polychlorés (BPC) sont des composés xénobiotiques introduits récemment dans l'environnement. Actuellement, ils comptent parmi les polluants environnementaux les plus persistants et répandus dans l'écosystème. C'est en Allemagne, en 1881 que la première synthèse de ces composés organiques a été réalisée (Carrier, 1991). Cependant, ce n'est qu'en 1929 que débute l'utilisation intensive des BPC à des fins industrielles (Furukawa, 1982). Une première réglementation concernant la production et l'utilisation des BPC a été élaborée en 1976 par le Congrès américain suite à des études démontrant aussi leur présence dans les organismes vivants (Jensen, 1966; Wassermann *et al*, 1979). De par leur caractère lipophile, les BPC ont tendance à s'accumuler dans les tissus adipeux du vivant et ce, à tous les niveaux des différentes chaînes trophiques. Ce n'est qu'à la fin des années 70 que le principal fabricant mondial, la compagnie Monsanto (93% de la production mondiale, 1×10^9 kg) a cessé la production et commercialisation des BPC.

On estime qu'entre les années 1929 et 1989, la production mondiale totale des BPC (excluant l'ex-Union Soviétique) a été de 1,5 million de tonnes avec une moyenne de 26 000 tonnes/année. La première législation émise par les États-Unis en 1976 interdisait la production, la vente et distribution des BPC (hormis dans un système entièrement scellé). La production mondiale de BPC s'est poursuivie à un rythme de 16 000 tonnes/année de 1980 à 1984 et de 10 000 tonnes/année de 1984 à 1989 (PNUE, 1998). En 1988, on évaluait que 31% de la production totale de BPC avait déjà pénétré dans l'environnement, que 4% avait été détruit et que 65% a été encore en usage ou entreposé (Tanabe, 1988). Jusqu'à présent, l'expansion de la contamination par les BPC dans l'environnement et la création de sites hautement contaminés sont principalement dues à l'étendue de leur utilisation lors du développement industriel, ainsi qu'à une mauvaise gestion des déchets contaminés (Fuoco *et al*, 1996; Chevreuil et Granier, 1992).

Les BPC sont une famille de composés produits commercialement par la réaction du biphenyle avec du chlore anhydre en présence de chlorure ferrique (ou de limaille de fer) utilisé comme catalyseur métallique (Hutzinger *et al*, 1974). En contrôlant la quantité du chlore dans le mélange réactionnel, le taux de chloration peut être ajusté afin de produire une série de produits possédant des caractéristiques différentes. Ainsi, ils sont produits et commercialisés sous forme de mélanges complexes constitués de congénères qui diffèrent par leur niveau de chloration. On les retrouve sous différentes appellations à travers le monde : " Aroclor " (Monsanto, États-Unis) ; " Phenoclor " et " Pyralene " (Prodelec S.A., France); " Clophen " (Farbenfabriken Baye AG, Allemagne); " Kanechlor " (Kanegafuchi Chemical Industrial Co. Ltd, Japon) (Hutzinger *et al*, 1972). Les compagnies ont un système d'identification spécifique à chacun des mélanges par l'assignation d'un chiffre reflétant le pourcentage d'atomes de chlore dans le mélange ou la teneur moyenne en chlore. Par exemple, pour l'Aroclor 1260, le premier chiffre indique la molécule de départ ; le biphenyle. Les deux derniers désignent la teneur en chlore du mélange, soit 60% de chlore ce qui représente un rapport de 6.3 atomes de chlore par molécule de biphenyle. À l'intérieur d'une même préparation, par exemple Aroclor 1242, il y a jusqu'à 72 congénères différents (Albro et Parker, 1979).

Les BPC comprennent un ensemble de molécules possédant une structure de base identique formée du noyau biphenyle, où se greffent des atomes de chlore en quantité et de positions différentes. En principe, 209 congénères différents de BPC peuvent être synthétisés. En pratique, seulement 130 sont produits dû aux problèmes d'encombrement stérique et à la stabilité de la molécule (figure 1) (Hutzinger *et al*, 1974).

Les biphenyles polychlorés possèdent des propriétés physico-chimiques étant à la base de leur application commerciale. De façon générale, ces molécules aromatiques possèdent une grande stabilité chimique et thermique (Hutzinger *et al*, 1974; Furukawa, 1982). Les caractéristiques physiques importantes des BPC sont la basse pression d'évaporation, la faible solubilité et le coefficient diélectrique élevé. Les

caractéristiques chimiques comprennent entre autres, la résistance à l'oxydation et l'hydrolyse acide-base (Carrier, 1991). Leur caractère lipophile augmente selon la teneur en chlore alors que leur solubilité et leur volatilité varient en sens inverse (Hutzinger *et al*, 1974).

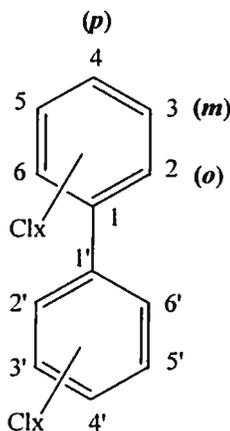


Figure 1. Structure chimique des BPC. La numérotation des positions des atomes de chlore et les positions *ortho* (*o*), *meta* (*m*) et *para* (*p*) sont indiquées. Le nombre total d'atomes de chlore (*x*) est compris entre 0 et 10.

Leur spectre d'utilisation industriel va de leur présence dans la fabrication de plastifiants, d'insecticides, de lubrifiants, de fluides hydroélectriques, de fluides pour échangeurs de chaleur et de retardateurs de flammes et notamment comme fluides refroidissants à l'intérieur de transformateurs et condensateurs électriques. On les a utilisés aussi dans la confection de peintures, de papiers à polycopier, dans les adhésifs, les savons et dans les encres d'imprimeries (Hutzinger *et al*, 1972; Safe, 1990; PNUE, 1998).

1.2 Aspects toxicologiques des BPC

Les biphényles polychlorés sont des composés persistants dans l'environnement et ubiquitaires (Risebrough *et al*, 1968). Leur détection requiert des techniques d'analyses complexes afin de les distinguer des autres composés organochlorés présents dans l'environnement. Des traces de BPC ont été dépistées pour la première fois lors d'un échantillonnage sur des organismes vivants en 1966 (Jensen, 1966). Par leurs propriétés chimiques favorisant leur transport sur de longues distances, les BPC ont été détectés dans les régions polaires (Tanabe, 1988; Macdonal *et al*, 2000), dans l'eau océanique à des concentrations se situant entre 0,04 à 8,0 ng/L (Tanabe et Tatsukawa, 1986), ainsi que dans l'atmosphère (Chevreuil et Granier, 1992). Malgré les mesures strictes de protection de l'environnement face aux BPC, ces derniers continuent de pénétrer dans la nature à partir de sources diverses tels l'élimination inadéquate de ces substances, les déversements accidentels, les épandages de boues en provenance de stations d'épuration (Chevreuil et Granier, 1992).

1.2.1 Santé humaine

À cause de leur caractère lipophile jumelé à leur faible solubilité dans l'eau, les BPC s'accumulent principalement au niveau des tissus lipidiques des organismes vivants. On les retrouve à tous les échelons de la chaîne alimentaire.

Chez l'humain des pays industrialisés, la concentration moyenne dans les tissus adipeux varie entre 0,6 à 10,0 ppm. Chez les travailleurs constamment exposés à ces produits, on peut détecter plus d'une centaine de ppm de BPC dans leur tissus adipeux (Brown *et al*, 1991). Une étude réalisée sur un groupe de travailleurs ayant été exposés quotidiennement aux Aroclor 1242, 1254 et 1016 à différentes périodes a permis d'identifier certaines des manifestations toxiques des BPC. L'exposition aux BPC est associée entre autres à une augmentation des risques de développer un cancer du foie corroborant les résultats d'études menées sur des animaux (Kimbrough *et al*,

1975; Shaw, 1993). D'autres études indiquent qu'ils pourraient être des agents neurotoxiques (Chou *et al*, 1979; Safe, 1990), hépatotoxiques (Yoshimura *et al*, 1979), génotoxiques (Safe *et al*, 1982; Brown *et al*, 1991) et responsables du développement de troubles dermatologiques (Garner et Matthews, 1998).

Les cas d'intoxication alimentaire aux BPC, qui ont eu lieu à Yosho au Japon en 1968 et à Yu-Cheng en Taiwan en 1978 (Rogan *et al*, 1988), ont témoigné des effets toxicologiques de ces xénobiotiques. Suite à une consommation d'huile de riz contaminée accidentellement, les symptômes observés ont été multiples: lésions dermiques (chloracné), une pigmentation des ongles et de la peau, des troubles de la vision, des problèmes neurologiques et la présence de lésions hépatiques (Safe, 1990).

1.2.2 Identification des composants responsables des effets toxiques

Les BPC sont des mélanges complexes où il est difficile d'identifier précisément les composants responsables des effets toxiques. Plusieurs études concernant les effets biologiques et toxiques ont démontré une corrélation avec le degré de chloration du mélange. Ainsi, l'Aroclor 1254 et l'Aroclor 1260 s'avèrent beaucoup plus toxiques que les mélanges commerciaux à faible teneur en chlore (Safe, 1990). De plus, la toxicité de chacun des congénères varie considérablement. Selon Safe *et al* (1985), les congénères les plus toxiques contiennent, au moins, deux atomes de chlore en position *para* et deux ou plus en position *meta*. La présence d'atomes de chlore dans les positions *ortho* réduit significativement les effets observés. Enfin, il a été démontré que les mélanges commerciaux de BPC contiennent des traces de composés secondaires, tel la 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxine, 10 000 fois plus toxique que les BPC (Safe *et al* 1985; Safe, 1990), la dibenzo-p-dioxine (PCDD) et le dibenzofuranne (PCDF) de conformation coplanaire formés lors de leur production (figure 2) (Safe, 1990).

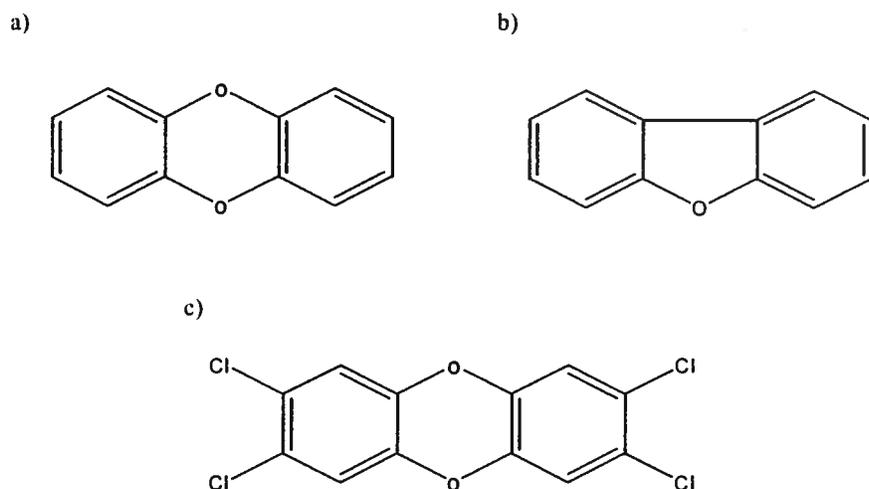


Figure 2. Représentation des structures chimiques du dibenzo-*p*-dioxine (a), du dibenzofuranne (b) et du 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxine (c).

La toxicité des congénères BPC coplanaires et des impuretés secondaires seraient associées à une grande affinité de liaison avec les récepteurs cellulaires hépatiques (Ah) (Safe, 1990; Safe *et al*, 1985). Ces récepteurs sont impliqués directement dans les mécanismes de détoxification en régulant l'induction des monooxygénases du type cytochrome P-450 en présence de ces xénobiotiques. Cependant, les cytochromes P-450 catalysent la transformation des composés aromatiques en dérivés époxydes réactifs et mutagènes pouvant former des liens covalents avec l'ADN, l'ARN et les protéines (figure 3) (Safe, 1990; Safe *et al*, 1985)

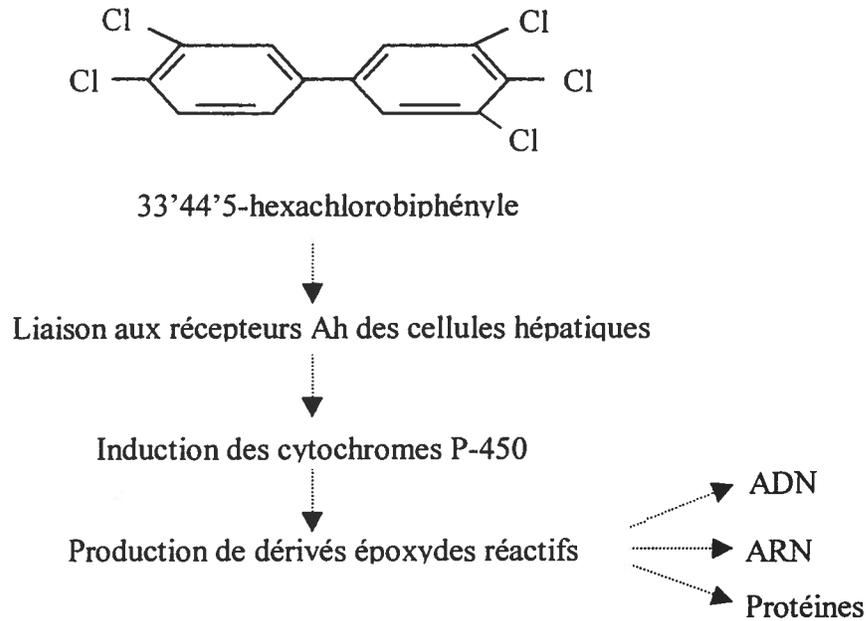


Figure 3. Schéma de la transformation d'un congénère BPC toxique au niveau du foie et induction des cytochromes P-450.

1.3 Décontamination des BPC dans l'environnement

1.3.1 Méthodes conventionnelles

La destruction des molécules de BPC nécessite la scission de liens moléculaires par l'application d'énergie thermique ou chimique. Actuellement, les traitements les plus couramment utilisés pour les sols et déchets contaminés sont davantage axés sur des méthodes de destruction thermique. Les systèmes les plus utilisés sont les fours rotatifs, les fours à ciment et les incinérateurs à lit fluidisé (Ackerman *et al*, 1983; PNUE, 1998). Malgré l'efficacité de ces techniques pour le traitement d'un éventail de congénères BPC, elles contribuent néanmoins à l'émission des gaz PCDD et PCDF qui représentent 1% de la totalité des gaz émis dans l'atmosphère hautement plus toxiques que les BPC en soi (Jones *et al*, 1993). Leurs coûts d'installation et d'exploitation ainsi que ceux requis pour l'excavation des sols

contaminés sont très onéreux (Chiarenzenlli *et al*, 1995). De plus, seuls les sols accessibles à la machinerie lourde peuvent être traités, ce qui présente un problème sérieux de contamination des eaux, des sédiments et des sols difficilement accessibles.

Certains procédés de déchlorination par voies chimiques ont été proposés. Ces méthodes se basent sur des réactions d'hydrolyse impliquant un métal alcalin lié à un groupement organique (naphtalène ou polyéthylène glycol de sodium) ou un oxyde ou hydroxyde métallique alcalin. Cependant, ces procédés peuvent détruire les inhibiteurs d'oxydation, limitant le recyclage des huiles dans lesquelles les BPC sont solubilisés (PNUE, 1998). De plus, la déchlorination catalysée par des bases est inefficace pour le traitement des déchets contenant plus de 10% de BPC et ne peut pas réduire la teneur en composés chlorés à moins de 2 ppm.

1.3.2 Méthodes microbiologiques

Une alternative aux méthodes conventionnelles est le développement de méthodes de bioréhabilitation. La bioréhabilitation fait appel à des processus naturels. L'utilisation contrôlée des micro-organismes sélectionnés selon leur capacité à transformer des composés toxiques ciblés assure la décontamination des sols, de l'eau et des sédiments. Ainsi, contrairement aux méthodes conventionnelles plutôt dispendieuse et qui vont jusqu'à stériliser le sol, les méthodes microbiologiques, exigeant un temps de réalisation plus long appliquées dans le respect de l'environnement, sont donc moins dispendieuses et néfastes pour les sites traités.

La présence de différents composés organiques dans l'écosystème a permis aux micro-organismes de développer des systèmes enzymatiques capables d'utiliser un grand nombre de substrats. Cependant, pour certains produits xénobiotiques introduits récemment dans l'environnement, il n'existe pas de voie catabolique efficace, ceux-ci étant réfractaires à la biotransformation. Jusqu'à présent, diverses souches bactériennes et fongiques ont été répertoriées à même les sites contaminés en fonction

de leur capacité à transformer des congénères BPC (Bedard *et al*, 1986). On constate que les activités envers les BPC diffèrent selon la souche, comprenant un spectre plus ou moins large de congénères BPC transformés. La transformation des BPC se fait par co-métabolisme et le biphényle est nécessaire afin d'optimiser leur transformation (Ahmed et Focht, 1972; Barriault et Sylvestre, 1993).

De façon générale, les méthodes microbiologiques utilisent deux approches. La première approche privilégie l'usage d'un consortium bactérien sélectionné à partir de la flore indigène activée et la seconde, emploi de souches pures ou développées en laboratoire afin d'accroître leur capacité de transformation. Ces souches sont employées dans les techniques de bioréhabilitation, tel lors de traitements en biopile ou en bioréacteur. Ces procédés de décontamination sont effectués de manière à optimiser l'activité de transformation en contrôlant certains paramètres dont l'apport nutritif, la température et le taux d'oxygénation du milieu réactionnel.

1.4 Voies cataboliques des BPC

La transformation des biphényles polychlorés peut s'effectuer par deux voies distinctes: transformation oxydative dans une niche écologique exposée à l'oxygène ou transformation réductive en milieu anoxique (Lunt et Evans, 1970; Brown *et al*, 1987).

Généralement, les sols saturés en eau et les sédiments aquatiques sont anaérobies. La présence de métaux tels le Fe, le Mn et l'Al en concentration élevée peut aussi favoriser le développement de conditions anoxiques dans les sols. Les congénères BPC à plus forte teneur en chlore, peuvent être déshalogénés par des micro-organismes anaérobies. Le phénomène de déshalogénéation réductrice a été observé dans les sédiments contaminés où l'on a noté que la proportion des congénères fortement chlorés diminuait de façon significative en fonction du temps

(Brown *et al*, 1987). Ce processus pourrait faciliter la transformation subséquente des chlorobiphényles par voie aérobie en réduisant le nombre d'atomes de chlore sur la molécule. Vu le manque de connaissances des mécanismes de déshalogénéation réductrice, des enzymes impliquées, et des métabolites produits, plusieurs études seront encore nécessaires avant d'appliquer ce procédé à la bioréhabilitation des sites contaminés aux BPC.

D'autre part, la voie catabolique oxydative du biphényle favorise la transformation des congénères BPC faiblement chlorés en chlorobenzoates (Furukawa, 1982). Ceux-ci seront éventuellement minéralisés par la voie catabolique du benzoate (Sondossi *et al*, 1992). Les souches les plus performantes connues jusqu'à présent et qui représentent le deux tiers des souches capables de transformer les BPC appartiennent au groupe des bactéries aérobie strictes Gram négatif (Abramowicz, 1990). Les souches les plus étudiées en raison de leur performance de transformation des BPC sont *B. cepacia* LB400 (Fain et Haddock 2001), *C. testosteroni* B-356 (Ahmad *et al*, 1990) et *P. pseudoalcaligenes* KF707 (Taira *et al*, 1992).

1.4.1 Spécificité enzymatique des voies de transformation oxydative

Les divergences du profil de transformation préférentielle des bactéries capables de transformer les BPC s'expliquent par les variations entre les enzymes impliquées dans la voie de transformation du biphényle d'un organisme à l'autre. *B. cepacia* LB400 (Bopp, 1986; Fain et Haddock, 2001), *C. testosteroni* B-356 (Ahmad *et al*, 1990) et *P. pseudoalcaligenes* KF707 (Taira *et al*, 1992) peuvent catalyser l'oxygénation de l'un des noyaux aromatiques du biphényle en position 2 et 3. Cependant, leur profil de transformation des BPC diffère (Haddock *et al*, 1995; Guilbeault *et al*, 1994; Taira *et al*, 1992). *C. testosteroni* B-356 transforme pauvrement les congénères BPC substitués en position *ortho*, tel le 2,2'-dichlorobiphényle (2,2'-DCB) (Guilbeault *et al*, 1994). Selon le profil de sélection de cette souche, B-356 transforme préférentiellement le congénère substitué en position

meta, tel le 3,3'-dichlorobiphényle (33'CB) et possède une faible efficacité de transformation du 4,4'-dichlorobiphényle (44'CB) (Hurtubise *et al*, 1998). D'autre part, *P. pseudoalcaligenes* KF707, isolé des sites contaminés à Kitakyushu (Japon), possède un spectre de transformation étroit dont son substrat préférentiel est le 44'CB. Tout comme B-356, KF707 est incapable d'oxygéner le noyau biphényle en position 3,4. Finalement, *B. cepacia* LB400 transforme préférentiellement les congénères BPC doublement substitués en position *ortho*-, tel le 2,2'-dichlorobiphényle (22'CB) que peu de bactéries connues peuvent transformer (Bedard *et al*, 1986; Hurtubise *et al*, 1998). La souche LB400 transforme faiblement les congénères substitués en *meta* et *para*, tel le 33'CB et 44'CB respectivement. Un autre trait caractéristique de cette souche est son habileté à oxygéner le noyau biphényle en position 3 et 4 du biphényle (Haddock *et al*, 1995). LB400 dispose d'un plus large spectre de transformation lui conférant la compétence de catalyser des congénères ayant jusqu'à 6 atomes de chlore par cette capacité d'hydroxylation en position 2,3 et 3,4. Ce qui explique sa capacité de transformer le congénère 22'55' CB, où les sites *ortho* et *meta* ne sont pas disponibles (Haddock *et al*, 1995). Ceci fait d'elle l'une des souches les plus performantes connues à ce jour (figure 4).

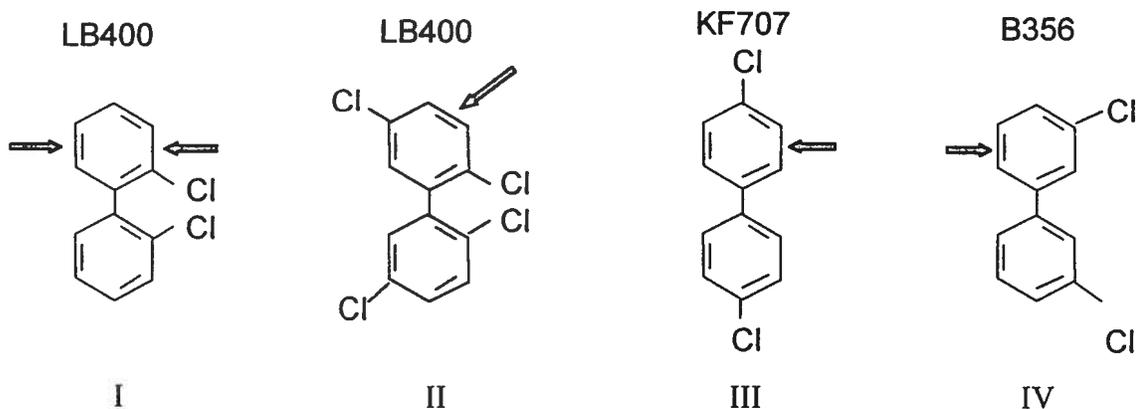


Figure 4. Congénères BPC préférentiellement transformés par les souches *B. cepacia* LB400, *P. pseudoalcaligenes* KF707 et *C. testosteroni* B-356. Congénères I : 2,2'-dichlorobiphényle, II : 2,2',5,5'-tetrachlorobiphényle, III : 4,4'-dichlorobiphényle, IV : 3,3'-dichlorobiphényle. Flèche : position d'attaque de la dioxygénase du biphényle sur le substrat.

1.4.2 Étapes catalytiques du catabolisme oxydatif

La biodégradation des BPC s'effectue par la voie catabolique du biphényle. Cette voie, qui sert a priori à transformer le biphényle, dispose d'enzymes spécifiques dont la séquence d'acides aminés varie d'un microorganisme à l'autre, définissant leur propre spectre d'activité. La minéralisation du biphényle par voie oxydative s'effectue par l'intermédiaire de deux voies. Une voie supérieure catalyse la conversion du biphényle en acide benzoïque par une hydroxylation suivi du clivage de l'un des cycles du noyau aromatique. L'acide benzoïque est ensuite métabolisé par la voie de dégradation du benzoate (voie inférieure). Successivement, les métabolites formés pourront être intégrés au cycle de Krebs (Sondossi *et al*, 1992).

La transformation du biphényle en benzoate s'effectue en quatre étapes enzymatiques (figure 5). Tout d'abord, l'enzyme multi-composante appelée biphényle 2,3-dioxygénase (BPDO) catalyse l'incorporation d'oxygène moléculaire sur l'un des deux cycles du biphényle pour former le 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle (II) (Haddock *et al*, 1993; Bergeron *et al*, 1994). Cette étape s'effectue en présence du co-facteur NADH. Le métabolite II est ensuite oxydé en présence de NAD^+ par une déshydrogénase (BphB) pour former le 2,3-dihydroxybiphényle (III). Celui-ci est alors clivé en position *meta* par la 2,3-dihydroxybiphényle-1,2-dioxygénase (BphC). Le produit de *meta*-clivage, le 2-hydroxy-6-oxo-phényl-hexa-2,4-dièneoate (HPDA), est ensuite hydrolysé par la HPDA hydrolase (BphD) pour former le benzoate et le 2-hydroxy-penta-2,4-dièneoate par l'introduction d'une molécule d'oxygène (Ahmad *et al*, 1990; Furukawa, 1982; Massé *et al*, 1984).

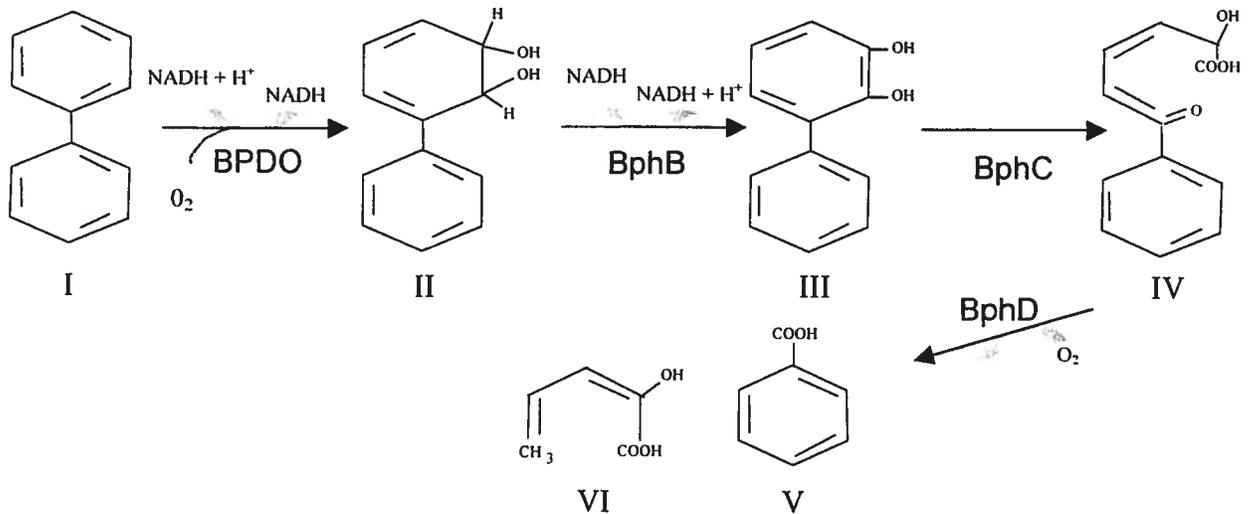


Figure 5. Voie catabolique du biphenyle. Métabolites I: biphenyle, II: 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphenyle, III : 2,3-dihydroxybiphenyle, IV : 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-diénoate (HPDA), V : acide benzoïque, VI : 2-hydroxy-penta-2,4-diénoate. Enzymes : BPDO : biphenyle 2,3-dioxygénase, BphB : 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphenyle déshydrogénase, BphC : 2,3-dihydroxybiphenyle 1,2-dioxygénase, BphD : HPDA hydrolase.

1.4.3 Description de la dioxygénase du biphenyle

La BPDO est un système multi-enzyme qui initie la voie de transformation par l'incorporation de deux atomes d'oxygène juxtaposés sur l'un des cycles aromatiques du biphenyle afin de produire un 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphenyle, illustré à la figure 6. La BPDO se compose d'une ferrédoxine-réductase (43 kDa) codée par le gène *bphG*, d'une ferrédoxine (12 kDa) codée par *bphF* et d'une oxygénase terminale (ISP) qui est une protéine fer-souffre composée d'une sous-unité α (51 kDa) et d'une sous-unité β (22 kDa) codées respectivement par *bphA* et *bphE* (Erickson et

Mondello, 1992; Hurtubise *et al*, 1995). La ferrédoxine-réductase et la ferrédoxine servent à transférer deux électrons en provenance du NADH réduit vers le centre Rieske [2Fe-2S] de l'oxygénase terminale (Hurtubise *et al*, 1995). Par la suite, ces électrons pourront être transférés au fer mononucléaire du site actif situé dans la sous-unité α afin d'activer la molécule d'oxygène pour une réaction de *cis*-hydroxylation sur le noyau biphényle. Sous forme active, les sous-unités α et β de l'oxygénase terminale de la BPDO s'associent en hexamère, $\alpha_3\beta_3$ (Haddock *et al*, 1995; Hurtubise *et al*, 1996).

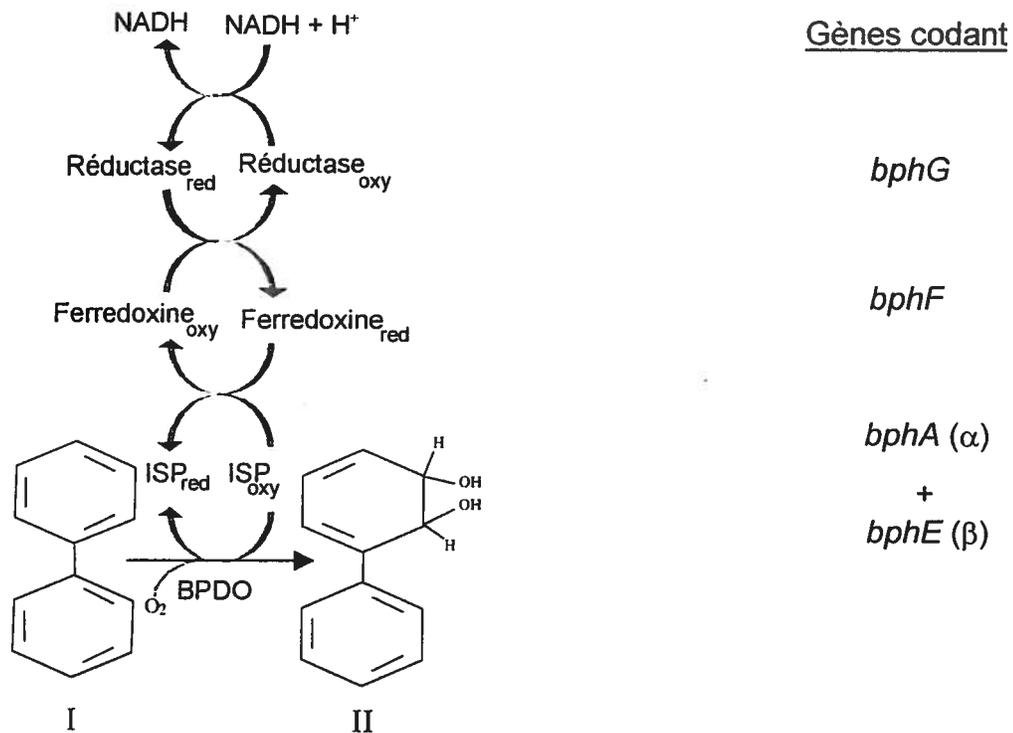


Figure 6. Système multi-enzyme de la dioxygénase du biphényle (BPDO) de la souche B356. Ferrédoxine-réductase (*bphG*); Ferrédoxine (*bphF*); Oxygénase terminale (ISP) formée d'une sous-unité α (*bphA*) et d'une sous-unité β (*bphE*). Red : Réduite, Oxy : Oxydée, I : biphényle, II : 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle.

1.4.4 Organisation génique des opérons biphényle des souches LB400, B-356 et KF707

Les gènes codant pour le catabolisme du biphényle sont organisés sous forme d'opérons (Ahmad *et al*, 1990; Mondello, 1989) localisé soit sur le chromosome (Ahmad *et al*, 1990) ou sur le plasmide (Merlin *et al*, 1997). Leur disposition peut varier selon la souche étudiée (figure 7). L'opéron biphényle des souches LB400 et KF707 est ordonné de façon similaire sur le chromosome (Erickson et Mondello, 1992; Taira *et al*, 1992). Cette grande ressemblance au niveau de l'organisation est le reflet du pourcentage d'homologie élevée entre les gènes *bphAEFG* de LB400 et *bphA1A2A3A4* de KF707, soit de 95% (Gibson *et al*, 1993). Cependant, l'organisation des gènes de B-356 diffère. Le gène codant pour la ferrédoxine-réductase de B-356 (*bphG*) est situé à 18kb en amont de *bphA* et les gènes codant pour les enzymes de la voie inférieure (*bphK*, *bphH*, *bphJ* et *bphI*) ne sont pas situés entre *bphC* et *bphD* comme chez LB400. Le pourcentage d'homologie entre les gènes *bph* de B-356 et ceux des souches LB400 et KF707 est de 75%, à l'exception de *bphG* qui n'a que 30% d'homologie (Sylvestre *et al*, 1996).

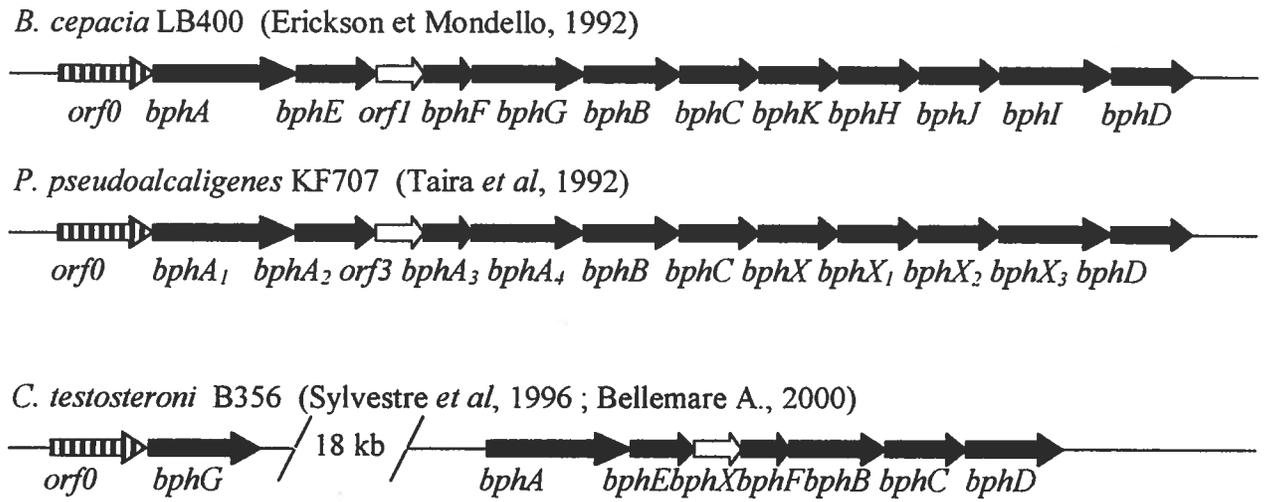


Figure 7. Organisation génique des opérons biphenyle des souches *B. cepacia* LB400, *P. pseudoalcaligenes* KF707 et *C. testosteroni* B-356. Les flèches noires indiquent les gènes codant pour des enzymes de transformation, les flèches blanches indiquent les gènes de fonction inconnue et les flèches rayées indiquent les gènes impliqués ou potentiellement impliqués dans la régulation de l'opéron biphenyle.

1.5 Ingénierie de la dioxygénase

Les premières étapes enzymatiques de la transformation aérobie de divers composés aromatiques sont similaires. Des enzymes homologues à la BPDO, Bph B et Bph C ont été identifiées dans les voies cataboliques responsables de la transformation du naphthalène, du toluène et du benzène (Barriault *et al*, 1998). L'arrangement des composantes de la dioxygénase est analogue. Cependant, leur divergence structurelle est la source de leur activité catalytique distincte et spécifique. Ainsi, leur adaptation évolutive a généré des spécificités enzymatiques qui leur sont propres tout en maintenant une capacité à catalyser un large spectre de composés aromatiques où leurs activités peuvent se chevaucher (Sylvestre *et al*, 1996). Par

exemple, la BPDO a l'habilité de réagir avec les chlorobiphényles (Haddock *et al*, 1995), le toluène (Furukawa *et al*, 1993), les hydroxybiphényles (Sondossi *et al*, 1991) et les dichlorophényl-trichloro-éthanes (Massé *et al*, 1989). La dioxygénase du naphthalène (NDO) peut oxygéner plusieurs hydrocarbures polycycliques aromatiques (Kiyohara *et al*, 1994), et possède la compétence de dihydroxyler le biphényle et certains chlorobiphényles portant les atomes de chlore en position *ortho-meta* et *meta-para* (Barriault et Sylvestre, 1999a). D'autre part, la dioxygénase du toluène (TOD) peut métaboliser une variété de composés aromatiques et le biphényle (Furukawa *et al*, 1993).

1.5.1 Études de la structure et de l'activité de la NDO

1.5.1.1 Structure tridimensionnelle de la NDO

De façon générale, les dioxygénases de composés aromatiques catalysent une réaction de dihydroxylation sur deux atomes de carbone adjacents du cycle aromatique. Quelques unes de ces enzymes peuvent oxygéner un large spectre de substrats analogues (Mason et Cammack, 1992). La connaissance de la structure tridimensionnelle de la dioxygénase, qui est responsable de la spécificité de l'enzyme, de la liaison et de l'orientation du site actif avec le substrat, permet d'identifier lesquels des résidus aminés détiennent un rôle important. Jusqu'à présent, la structure de la BPDO n'est pas encore connue. Toutefois, la structure de la NDO est un modèle pour tous les membres de la famille des dioxygénases catalysant une hydroxylation sur les cycles aromatiques. Cette enzyme existe sous forme d'hexamère, $\alpha_3\beta_3$, qui visuellement prend l'aspect d'un champignon. Les trois sous-unités α composent la tête du champignon, alors que la base est constituée de l'assemblage des trois sous-unités β . La sous-unité α contient le centre Rieske [2Fe-2S] qui transfère les électrons vers le Fe^{2+} mononucléaire du site actif de l'enzyme qui est situé sur la partie C-terminale de la sous-unité α (figure 8). La structure tridimensionnelle suggère une coopération entre les sous-unités α adjacentes où les électrons en provenance du centre Rieske d'une sous-unité α sont transférés au Fe^{2+} du site catalytique de la sous-

unité α adjacente. Ainsi, la partie C-terminale de la sous-unité α est directement impliquée dans la réaction avec le substrat. Parales *et al* (1999) ont démontré que l'Asp-205, présent au site actif de la sous-unité α de la NDO, est essentiel lors du transfert des électrons du centre Rieske vers le Fe^{2+} de la sous-unité α adjacente. Il en va de même de l'Asp-362 qui est impliqué dans la liaison avec le Fer mononucléaire. De plus, il est possible que l'association et l'espace entre les sous-unités α et β influencent la dimension et la conformation de la poche catalytique modulant ainsi la spécificité enzymatique (Kauppi *et al*, 1998). Ce modèle conceptuel pourrait expliquer pourquoi les acides aminés du site actif de la sous-unité α identifiés comme étant critiques lors de la reconnaissance enzyme/substrat dans une dioxygénase donnée, ont peu ou aucun effet sur l'activité catalytique d'hybrides ayant des différences au niveau structurel.

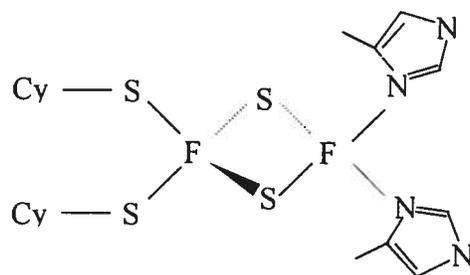


Figure 8. Structure du centre Rieske [2Fe-2S] présent dans la sous-unité α de l'oxygénase de la BPDO.

1.5.1.2 Activité de la NDO envers le biphényle

La caractérisation enzymatique de la NDO purifiée de *Pseudomonas putida* G7 a permis de démontrer sa capacité à catalyser l'oxygénation du biphényle. Deux métabolites sont produits, soit le 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle et le 3,4-dihydro-3,4-dihydroxybiphényle dans un rapport d'environ 90:10 (Barriault et Sylvestre, 1999a). D'autre part, la 1,2-dihydro-1,2-dihydroxynaphtalène

dihydrogénase purifiée de *Pseudomonas* sp. C18, peut catalyser la déshydrogénation du 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphényle, du 3,4-dihydro-3,4-dihydroxybiphényle et du 3,4-dihydro-3,4-dihydroxy-2,2',5,5'-tetrachloro-biphényle (Barriault *et al*, 1998). Ces résultats démontrent l'utilité des enzymes de la voie de transformation du naphthalène, homologues à celle du biphényle afin de construire, par ingénierie génétique, une voie catabolique nouvelle capable de transformer les BPC plus efficacement (Barriault *et al*, 1998).

De plus, il est intéressant de constater que des modifications structurales mineures de la NDO permettent de modifier considérablement la spécificité de l'enzyme envers le biphényle ainsi que sa position d'attaque (Parales *et al*, 1999, 2000). Alors que la NDO parentale catalyse l'oxygénation du noyau bipényle sur les atomes de carbone 2 et 3 principalement, la NDO mutante, résultant de la substitution du résidu Phe³⁵² par une valine, transforme 96% du biphényle en *cis*-biphényle-3,4-dihydrodiol (Parales *et al*, 2000). De façon générale, il est possible d'apporter de grandes modifications au site actif de la NDO sans en affecter son activité sauf pour l'Asp-205 et l'Asp-362 (Parales *et al*, 2000). Par cette tolérance et cette flexibilité de l'enzyme à subir de telles modifications structurelles en son site catalytique, il est envisageable d'y introduire des mutations significatives afin de générer de nouvelles activités spécifiques envers la transformation de congénères BPC récalcitrants.

1.5.2 Régions influentes sur la spécificité de la BPDO

1.5.2.1 Études de Mondello *et al* : Régions I-II-III-IV

Mondello *et al* (1997) ont catégorisé 15 souches en deux groupes de base selon leur habilité à transformer les BPC. Le groupe du type LB400 a la capacité de transformer les BPC plus fortement chlorés et ceux substitués en position 2 et 5 par une hydroxylation en position 3,4. Cependant, il possède une faible activité envers les congénères substitués en *para*. Au contraire, le type KF707 performe mieux sur les

congénères doublement substitués en *para*. Ce groupe présente une faible activité envers les congénères substitués en position 2 et 5 sur le cycle aromatique. De plus, leur activité se dirige vers les congénères plus faiblement chlorés (Mondello *et al*, 1997). Néanmoins, la comparaison des séquences entre les composantes ISP de BPDO des souches LB400 et KF707 démontre qu'il y a seulement une différence de 20 acides aminés entre les sous-unités α , incluant 19 substitutions et la délétion d'une glycine dans celle de KF707, alors que les sous-unités β ne diffèrent que d'un acide aminé (Erickson et Mondello, 1993). Malgré leur forte homologie, de 95,6% pour la sous-unité α et de 99,3 % pour la sous-unité β , ces deux ISP possèdent des spécificités catalytiques distinctes (tableau 1) (Kimura *et al*, 1997). Ces divergences ont été exploitées afin de mettre en évidence les facteurs déterminants dans la structure de la BPDO pouvant influencer sa spécificité envers divers congénères BPC.

Tableau 1 Pourcentage d'homologie des BphA et des BphE des souches *B. cepacia* LB400, *P. pseudoalcaligenes* KF707 et *C. testosteroni* B-356.

	Bph A (α)	Bph E (β)
LB400 – KF707	95,6 %	99,5 %
LB400 – B356	76,2 %	70,1 %

Afin de mieux cibler les portions influentes de la structure lors de la reconnaissance enzyme/substrat, la comparaison des séquences dans un premier temps et ensuite la mutagenèse dirigée ont permis d'identifier 4 régions importantes ; I, II, III et IV (figure 9) (Erickson et Mondello, 1993; Mondello *et al*, 1997).

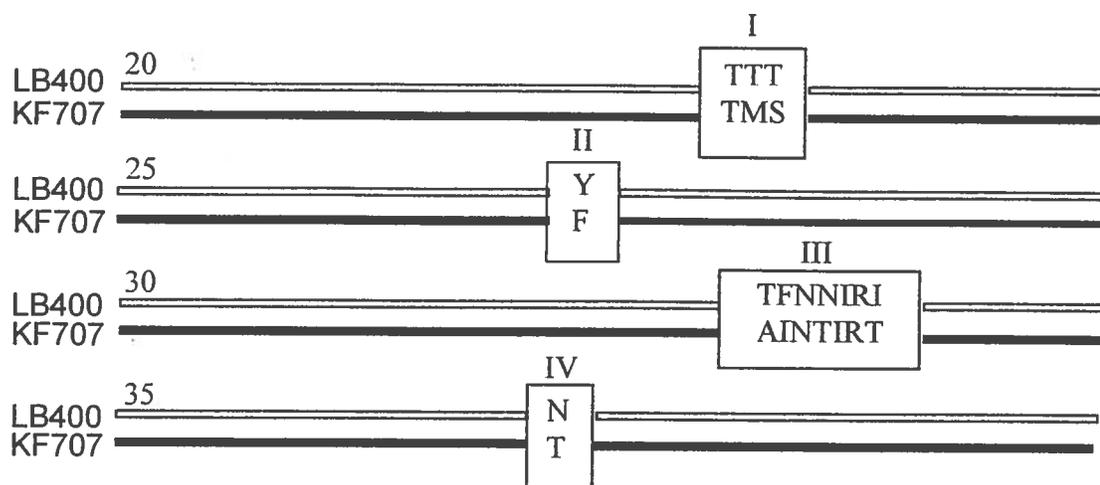


Figure 9. Représentation des régions I, II, III et IV identifiées au niveau de la partie C-terminale de la sous-unité α des ISP des souches *B. cepacia* LB400 et *P. pseudoalcaligenes* KF707.

Les divergences marquées au niveau de la spécificité de la BPDO de LB400 et KF707 résultent de mutations à l'intérieur des régions III et IV de leur sous-unité α respective. La modification des acides aminés 335 à 341 de la région III dans la sous-unité α de LB400 (TF-N--I) par celle de KF707 (AI-T--T) conduit à l'acquisition d'une activité catalytique envers les congénères doublement substitués en *para* tout en maintenant un spectre de transformation similaire à LB400 (Erickson et Mondello, 1993). Cependant, conjointement à ces modifications, le changement de l'asparagine³⁷⁷ de la région IV de la sous-unité α de LB400 par un thréonine, tel que présent dans la région IV de KF707, entraîne un profil de sélection similaire à KF707 réduisant drastiquement ces capacités à catalyser l'oxygénation en position *meta-para* (Mondello *et al*, 1997). Ces résultats démontrent un effet combinatoire entre les régions III et IV de la sous-unité α . Par contre, la présence d'une phénylalanine³³⁶, dans la région III de la sous-unité α de LB400, modifie l'effet des mutations dans la région IV. Ainsi, la région IV qui comporte une asparagine³⁷⁷ comme dans la BphA de LB400 ou une thréonine³⁷⁷ comme dans la BphA1 de KF707 n'a pas d'effets

substantiels lorsque la valine³³⁶ de la région III est remplacée par une phénylalanine (Mondello *et al*, 1997).

Les hybrides obtenus par Mondello *et al* (1997), qui témoignent d'une meilleure activité, ont subi des modifications dans la région III du domaine C-terminale de la sous-unité α de LB400. Dans la majorité des cas, les acides aminés remplacés sont petits et hydrophobes. Ceci suggère que l'augmentation d'activité résulterait de la formation d'un environnement favorisant les interactions hydrophobiques envers les BPC limitant les contraintes stériques permettant la transformation de congénères doublement substitués en *para*.

1.5.2.2 Recombinaison entre BphA de LB400 et BphA1 de KF707

Kimura *et al* (1997) ont construit des hybrides entre BphA1 de KF707 et BphA de LB400 à l'aide de sites de restriction où quatre fragments ont été générés. Il a été observé que les hybrides ayant acquis les régions III et IV de LB400 se comportaient exactement comme celle de LB400. D'autre part, le remplacement de la thréonine³⁷⁶ (région IV) de BphA1 de KF707 par une asparagine³⁷⁶ comme dans LB400 résulte en un élargissement remarquable des capacités de transformation du nouvel enzyme envers le 22'55'CB en position 3, 4. Ainsi, un seul acide aminé peut changer grandement le spectre de transformation des BPC (Kimura *et al*, 1997; Suenaga *et al*, 1999). Cependant, l'hybride $\alpha_{B356}\beta_{LB400}$ a la capacité de catalyser une hydroxylation en position 3,4 sur le cycle aromatique malgré que la région IV de cet hybride soit constituée d'une thréonine³⁷⁵. De plus, le mutant résultant du changement de la Thr³⁷⁵ de B356 par l'Asn³⁷⁵ de LB400 n'a pas acquis la capacité de catalyser l'oxygénation sur les atomes de carbone en position *meta* et *para* (Hurtubise *et al*, 1998). Ainsi, malgré les fortes similarités entre les régions clefs des sous-unités α de KF707 et de B356, les traits caractéristiques structurels de leur domaine C-terminal, qui influencent fortement la spécificité KF707 et LB400, n'influencent pas de la même façon l'activité de la BPDO de B356. En somme, il y a d'autres types de

structures qui peuvent influencer la spécificité de l'enzyme envers les congénères BPC, telle l'association de la sous-unité α et β pouvant moduler la structure globale de l'enzyme, modulant ainsi son spectre d'activité (Chebrou *et al*, 1999; Hurtubise *et al*, 1998).

1.5.2.3 Rôle de la sous-unité β

Les différences de séquences et de spécificités enzymatiques retrouvées entre la BPDO de la souche *B. cepacia* LB400 et *C. testosteroni* B356 ont été exploitées afin de mettre en évidence l'implication de la sous-unité β du composant ISP dans le profil d'activité de la BPDO envers les congénères BPC. Des hybrides ont été construits en remplaçant les sous-unités α ou β du composant ISP de LB400 par celles de l'oxygénase de B356 afin d'obtenir les hybrides $\alpha_{B356}\beta_{LB400}$ et $\alpha_{LB400}\beta_{B356}$ (figure 10) (Hurtubise *et al*, 1998).

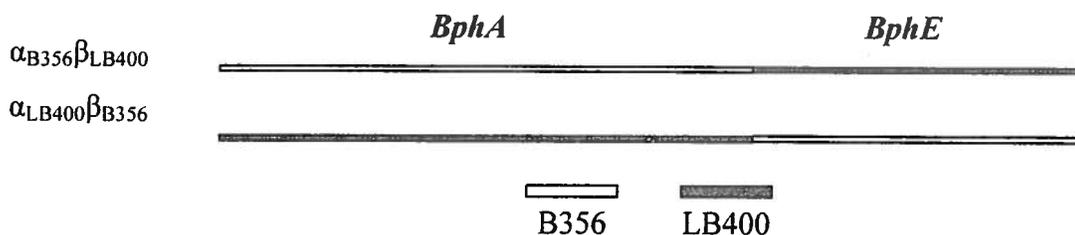


Figure 10. Hybrides construits par l'échange des sous-unités α et β des ISP des souches *B. cepacia* LB400 et *C. testosteroni* B356.

La comparaison des substrats préférentiels révèle que l'hybride $\alpha_{B356}\beta_{LB400}$ se comporte comme la BPDO de LB400. Elle a acquis la capacité de transformer aussi efficacement que $\alpha_{LB400}\beta_{LB400}$ le 22'CB et le 22'55'CB tout en maintenant une activité équivalente envers le 33'CB et 44'CB (tableau 2). Ainsi, la sous-unité β influencerait

le comportement de l'enzyme (Hurtubise *et al*, 1998). D'autre part, les caractéristiques catalytiques de l'hybride $\alpha_{LB400}\beta_{B356}$ sont moyennes entre celles de la BPDO de B356 et de la BPDO de LB400. Ainsi, elle transforme le 22'CB, la 22'55'CB et le 33'CB, mais a une efficacité moindre que LB400 et B-356 respectivement, tout en ne présentant qu'une faible activité envers le 44'CB (Hurtubise *et al*, 1998).

Tableau 2 Quantité de substrat transformé lors d'essais *in vitro* par les hybrides obtenus en interchangeant les sous-unités α et β des BPDO des souches *B. cepacia* LB400 et *C. testosteroni* B356.

Substrat	nanomoles de substrat transformé/0,6 nanomole d'enzyme			
	$\alpha_{B356}\beta_{B356}$	$\alpha_{LB400}\beta_{LB400}$	$\alpha_{B356}\beta_{LB400}$	$\alpha_{LB400}\beta_{B356}$
22'CB	<10	50	50	30
33'CB	50	<10	<10	30
44'CB	Trace	Trace	Trace	Trace
22'55'CB	-	35	40	20

(Hurtubise *et al*, 1998)

Le remplacement de la sous-unité α et β a créé des hybrides révélant de nouvelles propriétés catalytiques qui ne peuvent être déterminées par l'une ou l'autre des sous-unités. L'implication de la sous-unité β dans la spécificité a aussi été confirmée par diverses études dont l'une a été effectuée sur des hybrides entre les sous-unités α et β des BPDO des souches LB400 et B356 avec celles de *Rhodococcus globerulus* P6 (Chebrou *et al*, 1999). Une autre étude a été réalisée impliquant la BPDO de KF707 (Bph A₁A₂A₃A₄) et la TOD de *Pseudomonas putida* F1 (TodC₁C₂BC) qui sont homologues à 60%. Les résultats de cette dernière étude, basés sur l'analyse du comportement des hybrides entre les composants de la BPDO et de la TOD, a permis de montrer l'implication des sous-unités α et β dans la capacité de ces enzymes à métaboliser le biphenyle, le toluène, le benzène et d'autres dérivés. Le remplacement

de BphA1 de la BPDO de KF707 par TodC1 de la TOD de F1 a généré un hybride capable de convertir le toluène en un produit de *meta*-clivage (Furukawa *et al*, 1993).

1.5.3 Recombinaison aléatoire *in vitro* (*DNA shuffling*)

Stemmer (1994) a été le premier à avancer la stratégie d'évolution moléculaire *in vitro* par recombinaison aléatoire d'ADN. Cette méthode, nommée DNA shuffling ou "direct-*in vitro* evolution", repose sur la recombinaison aléatoire des séquences. Elle consiste à mimer le processus d'évolution des êtres sexués à une échelle moléculaire en prenant avantage de la technique de PCR. Au niveau évolutif, une petite proportion des mutations ponctuelles qui s'introduisent sur l'ADN sont bénéfiques à l'organisme en favorisant une meilleure adaptation à son environnement. Dans une optique analogue, l'échange de gènes entre individus d'une même espèce permettra le développement de nouveaux caractères. C'est d'ailleurs le principe extrait de la loi du vivant qui dirige la nouvelle technique de recombinaison *in vitro* aléatoire. Récemment, Cramer *et al* (1998) ont appliqué le principe de la recombinaison *in vitro* à des gènes homologues. Le procédé est nommé "family shuffling". Les séquences des gènes choisis sont similaires et les protéines exprimées possèdent des structures et fonctions semblables. L'avantage d'utiliser cette approche est l'augmentation des possibilités d'acquérir de nouvelles propriétés sans toutefois désorganiser la structure tridimensionnelle de l'enzyme. Cette approche d'évolution moléculaire *in vitro* aléatoire entre une famille de gènes homologues favorise l'obtention d'une progéniture à caractère phénotypique désiré en un moins grand nombre de générations que si les gènes ont été fortement homologues (Cramer *et al*, 1998).

La technique de *DNA shuffling* consiste à scinder les gènes homologues par l'action d'une endonucléase non-spécifique (Dnase I) afin de générer un mélange d'ADN fragmenté aléatoirement entre 50 et 100 pb (figure 11). Par l'application de la technique de PCR, ces fragments sont assemblés pour reconstituer un gène complet. Les événements de recombinaisons génétiques entre les fragments s'effectuent selon

l'homologie existant entre les gènes parentaux. Cette population de nouveaux gènes (la progéniture) est clonée dans un vecteur d'expression. Les plasmides générés sont utilisés lors de la transformation bactérienne. Une pression sélective est appliquée et dirigée selon le caractère phénotypique recherché. Sur les milliers de gènes mutants obtenus, seuls une dizaine, répondront aux critères de sélection désirés. Tout comme le phénomène de sélection naturelle, la plupart des mutations de l'ADN d'un organisme mènent à un cul-de-sac et seules quelques-unes en ressortiront bonifiées.

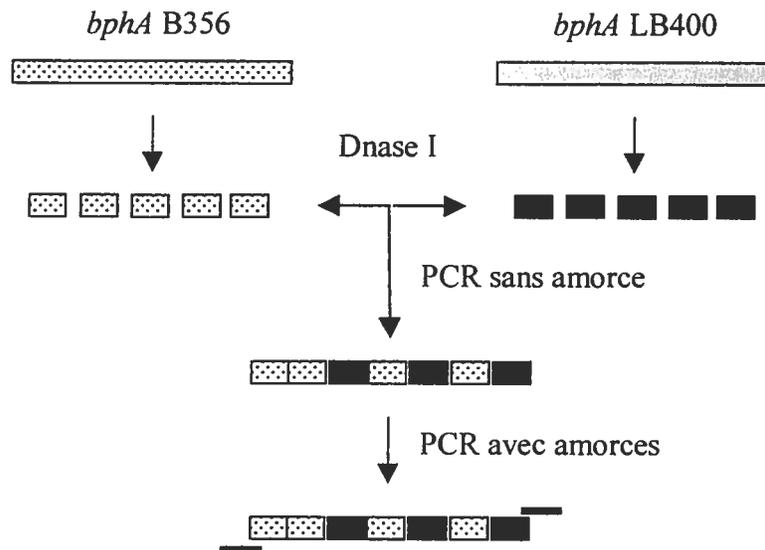


Figure 11. Schéma du procédé de recombinaison aléatoire.

1.5.4 Recombinaison aléatoire *in vitro* entre *bphA1* de KF707 et *bphA* de LB400

Kumamaru *et al* (1998) ont utilisé le procédé de *DNA shuffling* pour générer une population d'hybrides entre les gènes homologues *bphA₁* de KF707 et de la *bphA* de LB400. Suite à leur expression dans *E. coli*, quelques-uns des hybrides montraient une capacité à transformer non seulement les BPC et certains analogues du biphényle, mais aussi le toluène et le benzène, lesquels sont faiblement transformé par les BPDO

parentales. De plus, certains hybrides avaient acquis une nouvelle activité catalytique permettant de convertir l'indole en indigo. Trois des variants de cette étude avaient acquis la région IV de LB400, constituée d'une asparagine-376, tout en conservant la région III de KF707. Ces variants qui avaient subi d'autres modifications structurales démontraient une faible activité catalytique en position 3,4 du noyau biphényle. En se basant sur les analyses d'hybrides obtenus par Kimura *et al* (1997) et Suenaga *et al* (1999), ces trois nouveaux hybrides auraient dû être très performants envers le 22'55'CB (Kimamura *et al*, 1998). Ainsi, entre les régions III et IV, la présence d'autres types de modifications à l'intérieur de portions différentes de la sous-unité α influencent aussi la spécificité enzymatique. À l'inverse, un hybride ayant acquis les acides aminés Gln²⁵⁵, Ile²⁵⁸ et Glu³⁰³ de BphA de LB400 au lieu des acides aminés His, Val et Asp respectivement et dont le reste de la molécule a été identique à BphA1 de KF707 possédait une action catalytique accrue d'oxygénation en position 3 et 4 (Kimamaru *et al*, 1998).

Cette méthode d'évolution aléatoire directe a été appliquée aussi par Brühlman et Chen (1999) entre BphA1 de KF707 et BphA de LB400. Quelques-uns des variants de la progéniture montraient une activité accrue envers les congénères tetra- et pentachlorés comparativement aux enzymes parentales. L'analyse des séquences a montré que toutes les variations structurelles des BphA hybrides les plus performantes portaient sur la région III de la sous-unité α , confirmant ainsi l'importance de cette région. De plus, le remplacement de Thr³³⁵ et Phe³³⁶ par des acides aminés de plus petite taille et hydrophobes, comme l'alanine et l'isoleucine, semblaient favoriser la performance des hybrides envers les BPC (Brühlman et Chen, 1999).

Ces études ont permis de confirmer l'importance de la partie C-terminale de BphA dans la détermination de la spécificité enzymatique. Cependant, aucun transformant, jusqu'à présent, démontre des capacités à transformer les congénères substitués en position *ortho*, tels que le 26CB et le 22'66'-CB qui résistent aux transformations en aérobies et en anaérobies. De ceci l'importance de développer des

hybrides capables de transformer ce type de congénères indésirables dans l'environnement.

Chapitre 2
Matériel et Méthodes

2. Matériel et Méthodes

2.1 Souches bactériennes et plasmides

Les souches *E. coli* DH11S et *E. coli* SG13009 ont servi d'hôtes pour le maintien et la réplication des plasmides utilisés. Les plasmides d'expression pDB31, pQE31 et pQE51 ont été utilisés pour diverses manipulations. Leurs caractéristiques sont énumérées au tableau 3.

Tableau 3 : Caractéristiques des plasmides utilisés dans cette étude.

Plasmides	Caractéristiques	Références
PQE31	Vecteur d'expression (3.4 kb), Amp ^R , promoteur T5, opérateur <i>lac</i> , étiquette histidine (6xHis), cassette de clonage, origine de réplication ORI.	QIAGEN Inc.
PDB31	Vecteur d'expression (5.6 kb), Kan ^R , promoteur T5, opérateur <i>lac</i> , étiquette histidine (6XHis), cassette de clonage, origine de réplication p15A.	Barriault et Sylvestre, 1999b
PQE51	Vecteur d'expression (5.4 kb), Amp ^R , origine de réplication ORI.	QIAGEN Inc Inc.

Amp^R : gène de résistance à l'ampicilline; Kan^R : gène de résistance à la kanamycine.

2.1.1 Plasmides utilisés pour l'expression des composantes des BPDO des souches LB400 et B356 et des BPDO hybrides.

Une partie du travail visait à caractériser le spectre d'activité de BPDO hybrides obtenue en échangeant des portions des gènes *bphAE* de LB400 et B356. Pour reconstituer l'enzyme active, nous avons purifié chacune des composantes individuellement à partir de clones de *E. coli* exprimant la protéine sous forme de protéine de fusion portant l'étiquette 6XHis. Nous avons utilisé les plasmides pQE31 [*bphF*_{B356}] et pQE31 [*bphG*_{B356}] pour exprimer les composantes ferrédoxine et réductase de la BPDO de la souche B356. Nous avons utilisé les plasmides pQE31 [*bphAE*_{LB400}] et pQE31 [*bphAE*_{B356}] pour exprimer la composante ISP de LB400 et B356. Plusieurs hybrides de la composante ISP ont aussi été exprimés. Trois sites de restriction situés sur la partie C-terminale de *bphA* de LB400 et de B356 ont servi à construire ces hybrides (figure 12). La figure 13 illustre les hybrides construits en échangeant les fragments qui ont fait l'objet de ce travail. Les gènes *bphAE* hybrides ont été clonés dans les plasmides pDB31 ou pQE31 pour être exprimés dans *E. coli* DH11S.

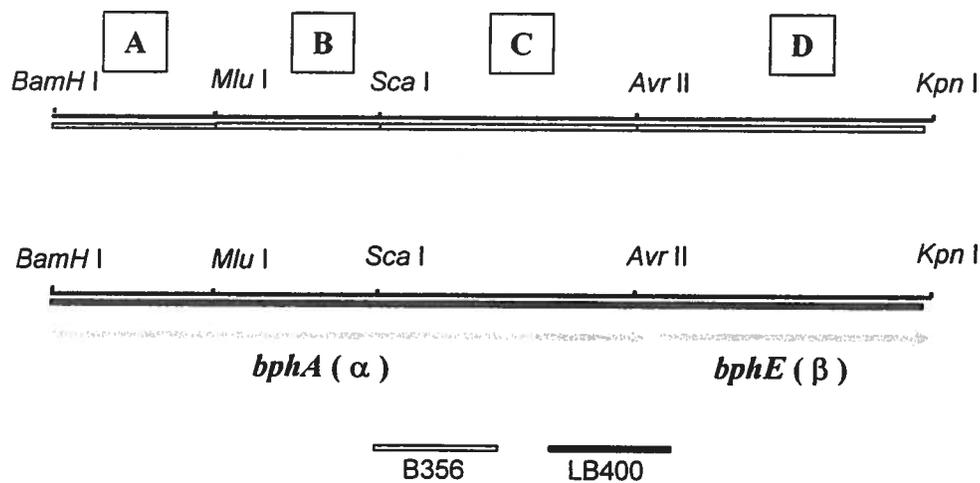


Figure 12. Illustration des sites de restriction utilisés pour construire les hybrides entre les gènes *bphAE* des souches LB400 et B356.

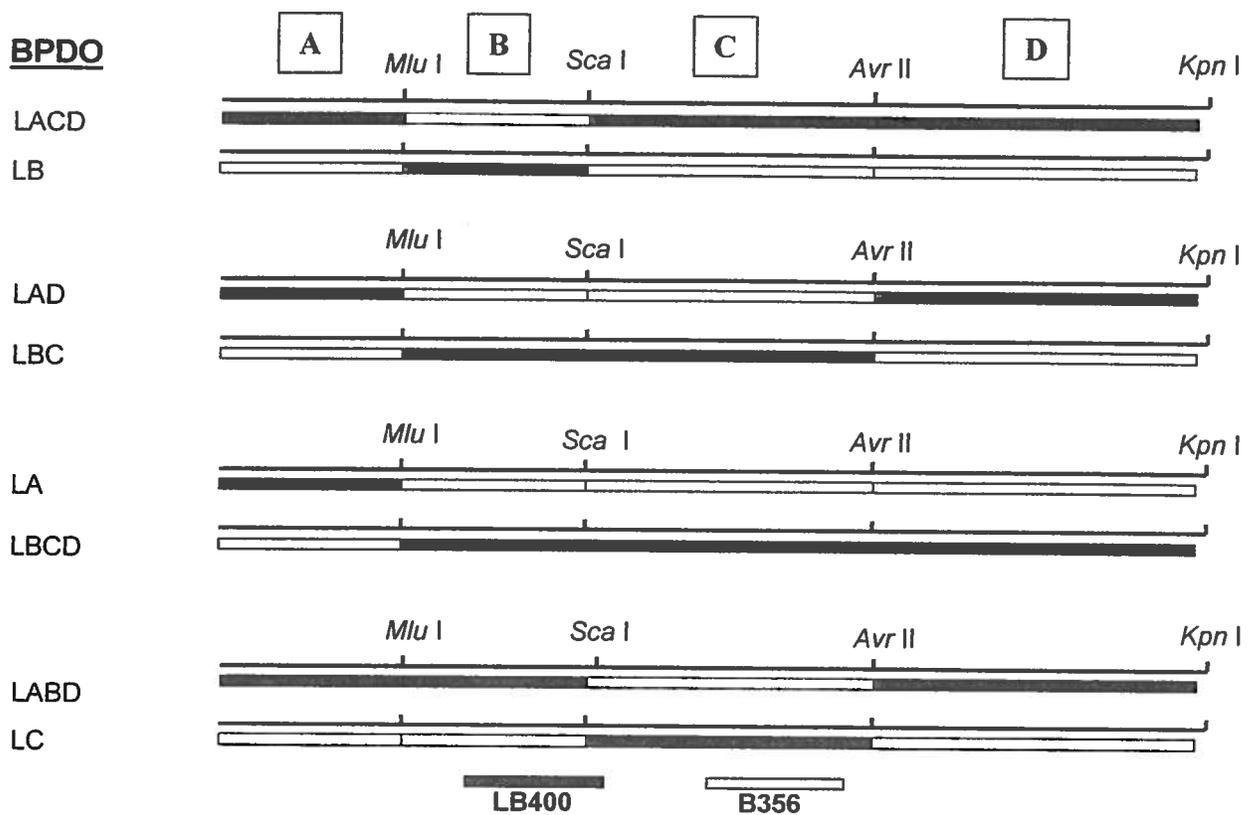


Figure 13. Hybrides construits par l'échange des fragments A, B, C ou D entre les gènes *bphAE* des souches LB400 et B356.

2.1.2 Plasmides utilisés pour le criblage des BPDO variants obtenus par recombinaison aléatoire *in vitro*.

La seconde partie du travail a consisté à créer des BPDO hybrides par recombinaison aléatoire *in vitro* "DNA shuffling" entre les gènes *bphA* des souches LB400 et B356. Nous avons alors utilisé les plasmides pQE51 [*bphFG*_{LB400}] et pQE51 [*bphFGB*_{LB400}] décrits précédemment (Chebrou *et al*, 1999), ainsi que le plasmide pDB31 portant les gènes de *bphAE* de LB400 et B356 (Barriault *et al*, 2001).

2.2 Expression et purification de la BPDO de LB400 et de B356 et BPDO hybrides.

Le milieu Luria-Bertani (LB) en bouillon de culture (10 g NaCl, 10 g tryptone peptone et 5 g d'extrait de levure dans 1L) contenant les antibiotiques appropriés, a servi à faire croître les clones pour la production des protéines. La pré-culture, incubée à 37°C pendant 18 heures, a servi à inoculer 800 ml de milieu LB contenant 200 mg/ml d'ampicilline et 25 mg/ml de kanamycine dans un flacon Erlenmeyer 2L. Cette culture a été incubée à 37°C jusqu'à l'obtention d'une densité optique de 0,9 à 600 nm. Ensuite, les cultures ont été induites en ajustant la concentration du milieu à 0,5 M d'isopropylthiol-bêta-D-galactoside (IPTG) puis incubées à 37°C pour l'expression de BphF et à température de la pièce pour l'expression de BphAE, BphG, pendant 3 heures et 30 minutes avec agitation.

La culture a été ensuite centrifugée à 10 000 g (Sorvall, rotor GSA) à 4°C. Le culot a été lavé dans un tampon HEPES (50 mM HEPES, pH 7,0) puis suspendu dans un volume équivalant à 4X le poids du culot dans le mélange composé 50 mM PIPES, 10% (v/v) glycérol et 300 mM NaCl, pH 7,2 (tampon de sonication). Cette suspension bactérienne a été soniquée (# 4710 série, Cole-Parmer Instrument Co.) puis centrifugée à 22 000 g (Sorvall, rotor SS-34) à 4°C, pendant 1 heure. Le surnageant (lysats) a été agité en présence de résine d'acide nitrilo-triacétique (QIAexpress Ni-NTA protein purification system, QIAGEN), pendant 1 heure à 4°C. La suspension a été ensuite transversée à l'aide d'une pipette pasteur sur une colonne. Cette dernière a été dans une succession d'étapes, lavée au tampon de lavage (Pipes 50 mM, Glycérol 10 % et NaCl 300 mM à pH 6,4) contenant des concentrations croissantes d'imidazole de 20 et 40 mM d'imidazole. La protéine a été éluée avec une solution de lavage ayant une concentration finale de 200 mM d'imidazole.

La protéine BphAE a parfois été purifiée en condition anaérobie. Dans ce cas, le culot a été suspendu dans le tampon de sonification décrit plus haut auquel a été ajouté 2 mM de dithiothréitol (DTT). Les étapes subséquentes, soit l'absorption sur

colonne et l'éluion de la protéine BphAE, se sont déroulé dans une chambre anaérobie obtenue en faisant circuler un mélange gazeux de 9,9 % de CO₂; 10,1 % de H₂ ; 80 % N₂. Les étapes de purification ont été effectuées en présence de sacs de glace afin de maintenir les solutions à basse température.

2.3 Détermination de la concentration protéique

La concentration en protéine des préparations purifiées a été déterminée par la méthode de Lowry *et al* (1951). La courbe standard a été établie à partir des concentrations d'albumine sérum bovin (BSA) entre 25 et 400 µg/ml. La concentration protéique a été déterminée en fonction de la courbe standard à une longueur d'onde de 500 nm.

Dans certains cas, la concentration protéique a été évaluée par spectrophotométrie en utilisant les valeurs de coefficient d'extinction molaire établies précédemment, soit de 8 300 M⁻¹ cm⁻¹ à 450 nm pour le composant ISP, de 7 400 M⁻¹ cm⁻¹ à 450 nm pour le composant réductase et de 11 250 M⁻¹ cm⁻¹ à 450 nm pour la ferrédoxine (Hurtubise *et al*, 1995). Les protéines purifiées ont aussi été analysé sur un gel d'acrylamide SDS 12,5% (SDS-PAGE).

2.4 Essais enzymatiques et cinétique de transformation

2.4.1 Essais enzymatiques *in vitro* envers divers congénères BPC

La cinétique de transformation de divers congénères BPC par les BPDO parentales et hybrides a été déterminée en mesurant la disparition du substrat ou la production de métabolites par chromatographie HPLC (Perkin-Elmer LCI-100 et Agilent 1100 #G1322A). Le protocole de séparation est décrit à la section 2.5.1. Les

congénères utilisés dans ces essais ont été le 22'CB, le 33'CB, le 44'CB, le 22'55'CB et le 22'44'55'CB.

La réaction enzymatique a été effectuée dans 200 μ l de tampon MES 50 mM à pH 5,5. Le milieu réactionnel comprenait 1,2 nmoles/ml de FeSO_4 , 50 nmoles/ml de NADH, 50 nmoles/ml du substrat BPC solubilisé dans 5 μ l d'acétone, 1 nmole/ml de la ferrédoxine réductase et 1 nmole/ml de la ferrédoxine. La réaction a été initiée en ajoutant 200 μ g du composant BphAE purifié. Lorsque le 22'55'CB a servi de substrat, la concentration dans le milieu réactionnel était ajusté à 100 nmoles/ml plutôt qu'à 50 nmoles/ml. Le mélange réactionnel a été incubé pendant 5 minutes à 37°C avec une agitation constante. La réaction a été arrêtée par l'addition de 400 μ l de méthanol et le milieu a été centrifugé par une centrifugeuse de table (Brinkmann #5414) pendant 1 minute à 16 000 g. Immédiatement, 50 μ l du surnageant a été injecté à l'injecteur du HPLC.

Lorsque le substrat était le biphényle, la cinétique de la réaction a été évaluée en mesurant la production du HPDA au cours d'une réaction couplée en présence des enzymes BphB et BphC. Dans ce cas, la réaction a été effectuée dans 200 μ l de tampon MES 50 mM à pH 5,5. Le milieu comprenait 1,2 nmoles/ml FeSO_4 , 50 nmoles/ml NADH, 50 nmoles/ml NAD, 100 nmoles/ml de biphényle, 1 nmole/ml de chacune des préparations enzymatiques purifiées suivantes: BphB, BphC, BphF et BphG. Cette réaction a été initiée par l'ajout de 200 μ g du composant BphAE purifié. Le milieu réactionnel a été incubé pendant 2 minutes à 37°C avec une agitation constante. La réaction a été arrêtée par l'ajout de 800 μ l de la solution CAPS (100 mM, pH 9,0) et centrifugée pendant 1 minute sur une centrifugeuse de table (Brinkmann #5414). Le HPDA produit a été quantifié dans le surnageant par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 434 nm, utilisant la valeur du coefficient d'extinction molaire de 22 000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ établi précédemment (Hurtubise *et al*, 1996).

2.4.2 Cinétique de transformation par des suspensions cellulaires de *E. coli* recombinants

La capacité de certains hybrides BphAE à transformer les BPC a été évaluée dans des essais *in vivo*, utilisant des cellules de *E. coli* DH11S recombinants, exprimant l'enzyme hybride. Dans ce cas, la souche de *E. coli* exprimant les gènes *bphAE* à partir du plasmide pDB31 et les gènes *bphF* et *bphG* de LB400 à partir du plasmide compatible pQE31 a été utilisée. Ces constructions permettaient l'induction des gènes à l'aide de l'IPTG.

Une pré-culture de la souche testée a été d'abord établie dans 2 ml du milieu de culture LB contenant 200 µg/ml d'ampicilline et 25 µg/ml de kanamycine. La culture a été incubée 18 heures à 37°C sous agitation. Des portions de 300 µl de cette culture servaient à inoculer 12 ml de milieu LB identique. Les cultures ont été incubées à 37°C, avec une agitation de 300 rpm jusqu'à l'obtention d'une densité optique de 0,7-0,8 à une longueur d'onde de 600 nm. À ce moment, l'IPTG (0,5 mM de concentration finale) a été ajouté et la culture incubée à 37°C pendant 3 heures, avec agitation. Cette dernière a été ensuite centrifugée à 6 000 g pendant 10 minutes. Le culot a été lavé avec du milieu M9 (Sambrook *et al*, 1989) composé de 10% (v/v) d'une solution mère 10X (60 g Na₂HPO₄; 30 g KH₂PO₄; 5 g NaCl et 10 g NH₄Cl dans un volume final de 1L), de 0,1% (v/v) MgSO₄ 1M et de 0,2% (p/v) d'acétate de sodium. Les cellules ont été suspendues dans suffisamment de milieu M9 (contenant 0,0002% (p/v) de thiamine; 100 µg/ml d'ampicilline et 25 µg/ml de kanamycine) pour ajuster la densité optique à 2,0 à une longueur d'onde de 600 nm. Cette suspension a été distribuée par volume de 197 µl dans des tubes en verre de 2 ml avec bouchon vissé. Le milieu réactionnel a reçu 1 µl d'acétone contenant une concentration 10 M de substrat et 2 µl deau contenant une concentration de 100 M d'IPTG. La réaction s'est poursuivie pendant 2 heures avec agitation à 37°C. Les congénères BPC suivants : 22'CB, 26CB, 22'66'CB, 22'55'CB et 22'44'55'CB ont été ajoutés individuellement ou sous forme de mélange aux concentrations finale de 50 nmoles/ml et 125 nmoles/ml du mélange réactionnel. La réaction enzymatique a été arrêtée par l'ajout de 400 µl d'une solution 50 :50 acétonitrile et méthanol. La suspension a été

transférée dans un tube de 1,5 ml par l'intermédiaire d'une seringue et centrifugée 3 minutes. Les échantillons ont été transférés dans un contenant en verre de 1 ml (Fisher Scientific) fermé hermétiquement. Les échantillons ont été maintenus à -20°C jusqu'au moment de l'analyse.

Dans certains cas, nous avons évalué la capacité des bactéries recombinantes à transformer l'Aroclor 1242 ou un mélange synthétique de congénères BPC dont la composition apparaît au tableau 5. La disparition du substrat a été alors évaluée par chromatographie en phase gazeuse utilisant un détecteur à capteur d'électrons (GC-ECD).

Pour ces analyses, la préparation des suspensions cellulaires induites se faisait de façon similaire à celle décrite ci-haut. La souche bactérienne à tester a été d'abord induite à l'IPTG dans le milieu LB, puis les cellules ont été lavées et suspendues dans suffisamment de milieu M9 afin d'obtenir une densité optique de 2,0 à 600 nm. Cependant, dans ce cas, cette suspension cellulaire a été distribuée par un volume de 2 ml dans des éprouvettes en verre de 20 ml fermées avec des bouchons vissés recouverts à l'intérieur d'une membrane de Teflon®. Ces cultures ont reçu 5 μl d'une solution de 100 nmoles d'IPTG dissous dans l' H_2O et 10 μl d'Aroclor 1242 équivalent à 5 ppm (concentration finale) d'une solution stock à 1 000 ppm d'Aroclor 1242 dans de l'acétone. Dans certains cas, la solution d'Aroclor 1242 a été remplacée par une solution d'un mélange de congénères BPC. Dans ce cas, les cultures recevaient 10 μl d'une solution mère de 18 congénères BPC dissous dans l'acétone. La concentration finale obtenue des congénères BPC dans le milieu réactionnel était de 1 μM sauf pour les congénères 26CB, 33'CB et le 44'CB qui a été de 5 μM (tableau 5). Les milieux réactionnels ont été incubés à 37°C pendant 18 heures sous agitation de 300 g.

L'extraction des BPC des milieux réactionnels a été réalisée avec 3 portions successives de 5 ml d'hexane. Les phases organiques ont été combinées, puis déshydratées avec des cristaux de sulfate d'ammonium. L'extrait a été ensuite évaporé

sous jet d'azote pour réduire le volume à 3 ml. Ces échantillons ont été conservés à -20°C dans des tubes de verre fermés hermétiquement jusqu'au moment de l'analyse.

2.5 Protocoles d'analyses chromatographiques

2.5.1 Analyse par chromatographie HPLC

La transformation des congénères BPC par les enzymes purifiées ou par les suspensions cellulaires a été évaluée en quantifiant la disparition du substrat ou la production de métabolites par chromatographie HPLC en phase inverse. L'appareil utilisé a été le HPLC Agilent 1100 #G1322A muni d'un détecteur UV visible à longueur d'onde variable.

La cinétique d'oxygénation des congénères 22'CB, 33'CB, 44'CB, 26CB, 22'66'CB et 22'44'55'CB des préparations enzymatiques purifiées a été établie en évaluant la concentration du substrat résiduel présent dans le milieu réactionnel 5 minutes après le début de la réaction. Les essais enzymatiques ont été effectués selon le protocole mentionné à la section 2.4.1. Après ajout de 400 µl de méthanol, 50 µl du milieu réactionnel furent injectés sur une colonne d'octyldecyl silane Hypersil II de 4 mm par 25 cm. La colonne a été pré-équilibrée avec le mélange H₂O : acétonitrile (60 : 40). Après l'injection de l'échantillon, la colonne a été lavée pendant 5 minutes avec le mélange H₂O : acétonitrile (60 : 40) puis un gradient linéaire a été établi sur une période de 10 minutes pour atteindre les proportions H₂O : acétonitrile (10 : 90) qui furent maintenues pendant 5 minutes. Les congénères BPC ont été détectés à une longueur d'onde de 203 nm. La concentration des congénères BPC a été déterminée à partir des courbes standards établies dans les mêmes conditions.

La cinétique d'oxygénation du 22'5,5'CB par les préparations enzymatiques purifiées a été quantifiée en évaluant la quantité de 3,4-dihydro-3,4-dihydroxy-2,2'5,5'-tetrachlorobiphényle produit dans le milieu réactionnel. Dans ce cas, 50 µl d'échantillon ont été injectés sur la colonne Hypersil II décrite plus haut qui avait été

pré-équilibrée avec le mélange H₂O : acétonitrile : méthanol (50 : 30 : 20). Après l'injection de l'échantillon, la colonne a été lavée pendant 5 minutes avec le mélange H₂O : acétonitrile : méthanol (50 : 30 : 20) avant d'établir un gradient linéaire étendu sur une période de 15 minutes pour atteindre la proportion d'acétonitrile : méthanol (60 : 40) qui a été maintenue pendant 5 minutes. Le 3,4-dihydro-3,4-dihydroxy-2,2',5,5'-tetrachlorobiphényle a été détecté à 283 nm. Le métabolite a été quantifié à partir d'une courbe standard établie avec du 3,4-dihydro-3,4-dihydroxy-2,2',5,5'-tetrachlorobiphényle (Barriault *et al*, 1998)

Dans certains cas, nous avons évalué la capacité de suspensions cellulaires à transformer le mélange de 7 congénères décrits au tableau 4 en quantifiant leur disparition par HPLC. Les conditions chromatographiques et de détection des congénères BPC ont été identiques à celles décrites pour l'analyse des congénères individuels. La concentration des congénères individuels du mélange a été établie à partir d'une courbe standard. Le tableau 4 donne les temps de rétention de chacun des congénères du mélange.

Tableau 4 Congénères caractérisés lors d'essais *in vitro* et *in vivo* sur HPLC

Congénères	Temps de rétention (moyenne)
22'CB	11,0
26CB	11,4
33'CB	13,2
44'CB	13,1
22'66'CB	12,1
22'44'55'CB	17,9
22'55'CB (diol)	13,7

2.5.2 Analyse par chromatographie gazeuse (GC-ECD)

La transformation du mélange Aroclor 1242 et d'un mélange synthétique de 18 congénères, décrite au tableau 5, par des suspensions de cellules recombinantes exprimant les BPDO hybrides a été évaluée par chromatographie en phase gazeuse en quantifiant la disparition des congénères présents dans ces mélanges. L'appareil utilisé a été un chromatographe HP5890 de Hewlett Packard muni d'un détecteur à capture d'électrons. La colonne utilisée a été une colonne capillaire de 25 m HP5 de Hewlett- Packard. Les analytes ont été véhiculés dans la colonne par un courant d'hélium. La température de l'injecteur a été maintenue à 275°C et celle du détecteur à 350°C. Le four a été maintenu à 60°C après l'injection, puis la séparation a été effectuée par une élévation de température de 5°C/minute jusqu'à 300°C. L'évaluation de la transformation des différents congénères constituant le mélange d'Aroclor 1242 a été effectué par rapport au pic de pentachlorobiphényle présent dans le mélange et difficilement transformable qui servait de standard interne. La surface sous la courbe pour chacun des pics a été donc divisée par la surface de ce pic de référence. Il est à noter que le profil général d'élution se fait dans l'ordre croissant de leur degré de substitution.

Tableau 5 Mélange de 18 congénères BPC utilisé lors d'essais *in vivo* et analysé par GC-ECD

Congénères	Temps de rétention (moyenne)
26'CB	17,42
33CB	22,25
44'CB	23,06
22'66'CB	25,21
23'4CB	25,69
244'CB	26,20
234'CB	27,43
22'55'CB	28,70
22'44'CB	29,22
22'33'CB	31,70
23'44'CB	33,35
33'45'CB	35,57
22'345'CB	37,07
33'44'CB	37,78
23'44'5CB	39,71
22'44'55'CB	41,38
22'3455'CB	42,30
22'33'455'66'CB	52,55

La concentration des congénères dans la solution mère du mélange de 18 BPC a été de 1 μM pour tous les congénères sauf les dichlorés dont la concentration a été de 5 μM . La solution mère du mélange a été ajoutée au milieu réactionnel en quantité suffisante pour porter les concentrations finales à 250 $\mu\text{mol/ml}$ et 125 $\mu\text{moles/ml}$ respectivement.

2.6 Construction des BPDO hybrides par la recombinaison *in vitro* aléatoire

Une partie de ce travail a été consacrée à la construction de BPDO hybrides obtenus par recombinaison aléatoire *in vitro* entre les gènes *bphA* des souches LB400 et B356. Nous décrirons donc dans cette section les protocoles généraux de biologie moléculaire qui ont servi pendant le travail, ainsi que l'approche stratégique utilisée lors de la construction des hybrides.

2.6.1 Protocoles généraux de biologie moléculaire

2.6.1.1 Purification d'ADN plasmidique

La purification des plasmides des souches de *E. coli* a été effectuée avec la trousse Flexi-prep kit TM d'Amersham Pharmacia Biotech en suivant les recommandations de la compagnie. 50 ml de culture bactérienne a été centrifugée à 7700 g pendant 10 minutes. Le culot a été suspendu dans 5 ml de la solution I (50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl et 10 mM EDTA, pH 8,0). De la solution II (0,2 mM NaOH et 1% SDS) 5 ml a été ajouté afin de lyser les cellules et une incubation de 5 minutes à température ambiante a été effectuée. Ensuite, 5 ml de la solution III neutralisante (3 M KOAc, 5 M HOAc) a été ajouté, suivi d'une incubation sur glace de 10 minutes. Le culot d'ADN est dissout dans 5 ml de la solution de Sephaglas FP préparé dans un tampon guanidine-HCl (7 M Guanidine-HCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 Mm edta) et ensuite élué dans 500 µl du tampon TE. L'ADN purifié a été concentré par précipitation à l'éthanol suivant le protocole décrit par Sambrook *et al* (1989).

2.6.1.2 Réactions d'endonucléases et ligation

Les réactions d'endonucléases de restriction ont été réalisées en suivant les recommandations des fournisseurs; New England BioLab Inc, Boehringer Mannheim,

Pharmacia. Les ligations vecteur-insert (proportion 1:3) ont été effectuées avec la T4 DNA ligase (1U) de GIBCO BRL® selon le protocole recommandé par la compagnie.

2.6.1.3 Procédure de séparation et d'élution des fragments d'ADN sur gel d'agarose

Les fragments d'ADN ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose de 0,7% (pour les fragments de 1 000 à 6 000 pb) et de 1% (pour les fragments de 500 à 1 000 pb). La séparation des fragments a été réalisée à un voltage de 100 V sur une période de 1 heure en présence d'un marqueur de poids moléculaire. Les gels ont été coloré au bromure d'éthidium et les bandes d'ADN ont été révélées sous une lampe UV. La bande correspondant au fragment recherché a été découpée du gel. L'ADN a été extrait à l'aide de la trousse QIAEX®II Gel Extraction System (QIAGEN Inc., Chatsworth, Calif.).

2.6.1.4 Purification des produits de PCR

La trousse "High Pure™ PCR Product" de Boehringer Mannheim a servi à purifier l'ADN obtenu par amplification par une réaction de PCR. Le principe repose sur la capacité d'une fibre de verre spéciale contenue dans un tube de 2 ml en polypropylène à se lier seulement aux fragments d'ADN. 500 µl du tampon de liaison (3 M guanine-thiocyanate, 10 mM Tris-HCl, 5% éthanol (v/v), pH 6,6) a été ajouté à 100 µl du produit de PCR et le mélange a été centrifugé 60 secondes à 13 000 g avec une centrifugeuse de table (Brinkmann #5414). Le culot a été lavé deux fois avec 500 µl et 200 µl du tampon de lavage (concentration finale de 20 mM NaCl et 2 mM Tris-HCl, pH 7,5 dans de l'éthanol) et centrifugé à 13 000 g pendant 1 minute. L'étape de l'élution a été effectuée avec 50 µl de tampon d'élution (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) et le produit de PCR purifié a été obtenu après une centrifugation à 13 000 g pendant 1 minute.

2.6.1.5 Synthèse des oligonucléotides et séquençage de l'ADN

Les oligonucléotides utilisés lors de cette étude ont été synthétisés par le service de synthèse d'oligonucléotides de l'INRS-Institut Armand-Frappier (Laval, Qc.). Ceux-ci sont décrits au tableau 6 et positionnés sur les gènes à la figure 14.

Le séquençage de l'ADN de la région *Bam*HI-*Kpn*I de *bphA* a été effectué au service de séquençage de l'INRS-Institut Armand-Frappier (Laval, Qc.). L'ADN à séquencer a été amplifié par PCR avec les amorces 5 et 6. Les amorces 1 et 4 inverses ont servi au séquençage.

Tableau 6 Amorces utilisées pour les réactions de PCR ou de séquençage d'ADN

Amorces	Séquence des amorces
1	5' ACGGCTGGGCCTACGACATC 3'
2	5' CGTTGTTGCCATTGCTGCAGG 3'
3	5' GACATGTACCACGCCGGCAC 3'
4	5' CTGGGGGCGGTTGCAGGCA 3'
5	5' TTGAGCGTGGCCACCTA 3'
6	5' AGGGATCCGACCGCACTCACCGAAAG 3'
7	5' GACGGTACCTTACGCGTGCCGCAG 3'

2.6.1.6 Amplification *in vitro* des fragments d'ADN par PCR

La technique PCR a été utilisée dans le but d'amplifier des fragments d'ADN afin qu'ils soient clonés dans un vecteur ou pour un séquençage éventuel. Un seul programme d'amplification a servi à amplifier les fragments désirés. La trousse « Hot Start Taq DNA polymerase" (QIAGEN) contient une polymérase thermostable, la Hot Start polymerase. Le mélange réactionnel a été composé de 10 µl du tampon Hot Start

(10X), de 20 μl de la solution Q (5X), de 4 μl de la solution 5 mM dNTP, de 5 μl de chacune des deux amorces (10 pmoles/ μl), de 1 μl de la Hot Start polymérase (5U/ μl) et d'une quantité variable d'ADN équivalent à une concentration finale de 10 ng/ μl et complété avec du H_2O pour un volume final de 100 μl . L'échantillon a été recouvert de 0,75 μl d'huile de parafine afin d'éviter l'évaporation à haute température. Le programme d'amplification au cours duquel les étapes de dénaturation, hybridation et d'élongation ont été répété sur 30 cycles a été le suivant : dénaturation totale de 15 minutes à 95°C; dénaturation de 1 minute à 94°C; hybridation de 1 minute à 52°C; élongation de 1 minute et 45 secondes à 72°C; élongation finale de 10 minutes à 72°C.

2.6.1.7 Dosage de l'ADN amplifié au spectrophotomètre

La concentration en ADN des échantillons a été déterminée par spectrophotomètre dans un tampon Tris-HCl 10 mM à pH 7,5 en considérant que dans ces conditions, une densité optique de 1,0 à 260 nm équivaut à 50 ng/ μl (Sambrook *et al*, 1989).

2.6.1.8 Transformation bactérienne

Dans 50 μl de souches *E. coli* DH5 α compétentes a été ajouté un volume équivalent à 5 ng d'ADN dans un tube de 1,5 ml. Suite à une incubation de 30 minutes sur glace, un choc thermique a été effectué à 42 °C pendant 1 minute suivi d'une incubation de 2 minutes sur glace. Un volume de 450 μl de milieu LB a été ajouté et la culture bactérienne a été incubée pendant 1 heure à 37°C avec agitation. De cette culture de bactéries transformées, 150 μl a été étalé sur une gélose (milieu LB agar avec 200 $\mu\text{g/ml}$ d'ampicilline) suivi d'une incubation à 37 °C pendant 18 heures.

2.6.2 Stratégie et protocoles utilisés pour la construction des hybrides par recombinaison aléatoire *in vitro*.

Dans cette étude, nous avons appliqué la procédure de recombinaison aléatoire *in vitro* sur la partie distale des gènes *bphA* de LB400 et de B356. La stratégie a été basée sur l'observation voulant qu'un fragment *MluI-AvrII* de 865 pb de *bphA* de LB400 pouvait être remplacé par le fragment correspondant de *bphA* de B356 sans perte d'activité (Barriault *et al*, 2001). La procédure de recombinaison aléatoire a été appliquée sur une portion de fragment *MluI-AvrII* des gènes *bphA* de B356 et LB400. La stratégie utilisée pour la recombinaison *in vitro* est illustrée à la figure 14. Les fragments *MluI-AvrII* de 865 pb du gène *bphA* de B356 et un fragment plus court de 193 pb, couvrant la partie distale du fragment *MluI-AvrII* de *bphA* de LB400 ont été digérés par la DNase I (Pharmacia), puis les fragments ont été réassemblés par une amplification par PCR sans amorce suivi d'une amplification avec les amorces 4 et 5 pour générer des fragments *MluI-AvrII* hybrides. Les fragments *MluI-AvrII* hybrides obtenus ont servi à créer une génothèque de variants en les substituant au fragment *MluI-AvrII* de *bphA* de LB400 dans le plasmide pDB31 (LB400-*bphAE*).

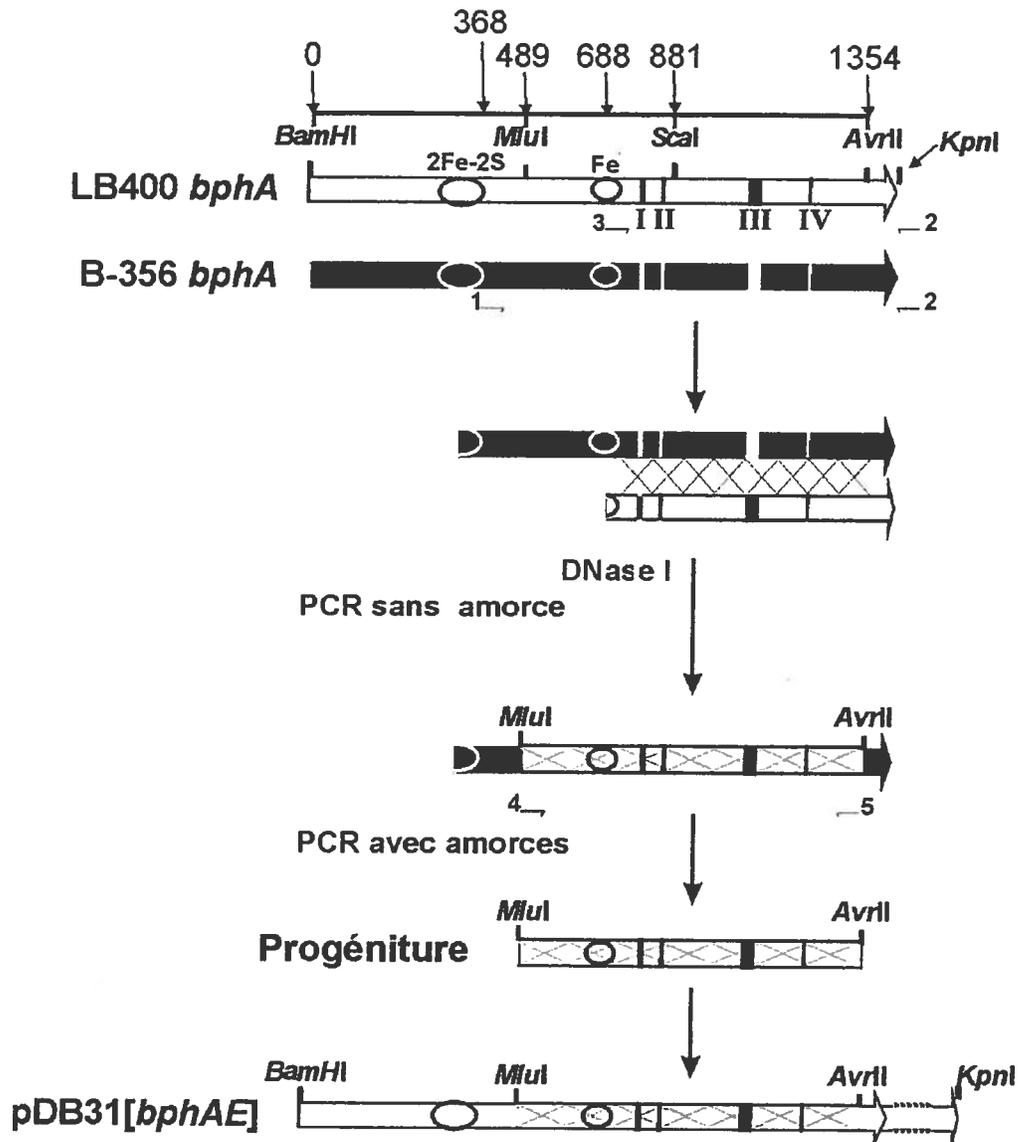


Figure 14. Stratégie utilisée pour appliquer la procédure de recombinaison aléatoire *in vitro* entre *bphA* de LB400 et de B356. Les flèches représentent les amorces utiliser pour amplifier les fragments par PCR (les séquences des amorces utilisées sont décrits au tableau 6). Les régions I, II, III et IV identifiées par Mondello *et al* 1997 sont aussi représentées.

2.6.2.1 Amplification et digestion des fragments à soumettre à la recombinaison aléatoire

Le plasmide pDB31 [*bphA*-B356] a servi à amplifier par PCR un fragment de 1022 pb en utilisant les amorces 1 et 2 (tableau 6). Ces amorces délimitaient un fragment commençant à 101 pb en amont du site *Mlu*I de *bphA* (figure 14) et se terminaient à 30 pb en aval de la fin de *bphA* dans le vecteur pDB31. De même, le plasmide pDB31 [*bphA*-LB400] a servi à amplifier un fragment de 718 pb avec les amorces 2 et 3 (tableau 6) qui délimitaient un fragment qui commence à 193 pb en amont du site *Sca*I de *bphA* (figure 14) et qui se terminait dans le vecteur à 30 pb en aval de la fin du gène. Ces deux fragments ont été purifiés et digérés à la DNase I. Le mélange réactionnel a été d'abord refroidi sans la DNase à 14°C pendant 5 minutes. La solution de DNase a été ajoutée puis le milieu réactionnel a été incubé pendant 7 minutes à 14°C. Le mélange a été ensuite centrifugé dans des tubes EZ (filtre millipore de centrifugation, Micon (Bioseparation)) à 16 000 g, 30 secondes, afin d'en retirer la DNase I. Puis 20 µl du tampon Tris-HCl 5 mM (sans MnCl₂) furent ajoutés, suivis d'une centrifugation à 16 000 g, 30 secondes. Le mélange réactionnel était composé de 5 µg de l'ADN cible (doser selon le protocole 2.4.1.7), de 10 µl du tampon Tris-HCl 50 mM à pH 7,6 (avec MnCl₂), de 10 µl de DNase I de 2 mU/µl (préparé dans le tampon Tris-HCl 5 mM (avec MnCl₂)) et complété à un volume final de 100 µl avec de l'H₂O déionisée.

Le désalage et la concentration des fragments d'ADN furent effectués selon le protocole de "Desalting and Concentrating DNA solution" (trousse de QIAGEN Inc, Chatsworth, Calif). La vérification du produit de digestion a été effectuée par une migration par électrophorèse sur un gel d'agarose 2% avec le tampon TBE (Tris 45 mM, acide borique 45 mM et EDTA 2 mM) à 100 V.

2.6.2.2 PCR sans amorce

Le produit digéré à la DNase I (Pharmacia) a été assemblé par PCR sans amorce dans le but de reconstituer le fragment de gène complet. Les conditions de PCR suivies sont telles que décrites ci-après. Le mélange réactionnel a été composé de 5 µl du tampon Taq 10X (QIAGEN), de 2 µl de dNTP 5 mM, 0,04 µg/µl de l'ADN cible (dosé selon le protocole 2.4 .1.7) et complété à un volume final de 50 µl avec de l'H₂O déionisée. La réaction a été initiée par l'ajout de 0,5 µl de la Taq polymérase (5 U/µl). Le milieu réactionnel a été recouvert de 50 µl d'huile de parafine. Le programme d'amplification au cours duquel les étapes de dénaturation, d'hybridation et d'élongation ont été répétées sur 60 cycles a été le suivant : dénaturation totale de 3 minutes à 95°C, dénaturation de 1 minute à 94°C, hybridation de 1 minute à 42°C, élongation de 1 minute et 45 secondes à 72°C et élongation finale de 10 minutes à 72°C.

2.6.2.3 PCR avec amorce

Le produit du PCR sans amorce a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose 2% afin de s'assurer que la bande amplifiée avait la dimension attendue. Cet ADN a été ensuite amplifié par PCR avec les amorces 4 et 5 qui amplifient le fragment *MluI-AvrII* de 865 pb. Le protocole de PCR utilisé a été celui décrit à la section 2.4.1.6. Le produit de PCR digéré par *MluI* et *AvrII* a ensuite été ligué au plasmide pDB31 [*bphAE* -LB400] préalablement digéré avec les deux mêmes enzymes. Le produit de ligation a servi à transformer des cellules de *E. coli* DH11S portant le plasmide compatible pQE51 [*bphFGB*-LB400].

2.6.2.4 Criblage des colonies démontrant une dioxygénase plus efficace

Les cellules de *E. coli* contenant les plasmides pDB31 [*bphAE*] et pQE51 [*bphFGB*] furent étalées sur la surface d'une membrane de nylon déposée sur un milieu gélosé LB (Sambrook *et al*, 1989) contenant de l'ampicilline 100 µg/ml et de la

kanamycine 25 µg/ml. Les géloses ont été incubées à 37°C pendant 18 heures. La membrane a été transférée sur un nouveau milieu gélosé LB avec antibiotique contenant une concentration finale de 0,5 mM d'IPTG. Les colonies furent induites à 37°C pendant 3 heures. Ensuite, une cupule contenant des cristaux de 22'CB ou de 22'44'55'CB a été placée dans le couvercle du Pétri. Les colonies ont été incubées 24 heures puis par observation visuelle les colonies de couleur brunâtre-rosâtre signifiant leur capacité à transformer les vapeurs du substrat ont été repérées. Ces dernières ont été isolées sur du milieu frais et purifiées afin de déterminer leur habilité à transformer les congénères BPC par les protocoles décrits à la section 2.4.

Le criblage a été basé sur l'instabilité des catéchols en présence d'oxygène. À l'air ambiant, ces métabolites se polymérisent pour former un produit oxydé de couleur brunâtre. La souche témoin qui contenait les vecteurs d'expression pDB31 et pQE51[*bphFGB-LB400*] ne pouvait pas convertir le substrat en catéchols.

Chapitre 3
Résultats

3. Résultats

3.1 Partie I : Analyse des hybrides produits par ingénierie génétique

3.1.1 Essais enzymatiques *in vivo* des hybrides entre les sous-unités α des BPDO de LB400 et de B356

Les résultats d'études menées par Mondello *et al* (1997) témoignent d'une activité supérieure pour les mutants de la BPDO de LB400 lorsque la sous-unité α du composant ISP subissait des modifications dans sa portion C-terminale. À partir de ce constat, par ingénierie génétique, des hybrides ont été construits par l'échange de quatre fragments (A, B, C, D) des gènes *bphAE* de LB400 et de B356 (Barriault *et al* 2001) (voir figure 12). Le premier fragment, désigné A, est délimité par le site de restriction *Bam*HI qui a servi lors de la ligation de l'insert dans le vecteur et par le site *Mlu*I situé en position 489 pb. Ce fragment couvre la partie N-terminale de BphA. Le fragment B débute par le résidu Arg¹⁶⁴ et se termine par Gln²⁹⁴ de la sous-unité α de la BPDO de LB400 et de B356. Il est délimité dans *bphA* par le site *Mlu*I en position 489 pb et le site *Sca*I en position 881 pb. Le fragment C est délimité par le site *Sca*I et le site *Avr*II en position 1354 pb et 1348 pb pour les gènes *bphA* de LB400 et de B356 respectivement. Le site *Avr*II a été introduit par mutagenèse dirigée pour pallier à l'absence de site de restriction identique à la fin du gène *bphA* de LB400 et B356. La mutation a conduit au changement de la Ser⁴⁵³ de BphA de LB400 et de la Ser⁴⁵¹ de BphA de B356 par un résidu Arg. Ainsi, le fragment C est localisé entre Tyr²⁹⁵ et Glu⁴⁵¹ de la sous-unité α de LB400 et entre Tyr²⁹⁵ et Glu⁴⁴⁹ pour celle de B356. Le fragment D inclu le gène *bphE* au complet.

Les fragments d'ADN *Bam*HI/*Kpn*I hybrides, obtenus par l'échange de ces quatre fragments, ont été clonés dans le vecteur pDB31. Les BPDO hybrides ont ensuite été exprimés dans *E. coli* DH11S et purifiés sous forme de protéine de fusion portant une étiquette histidine (6XHis) en position N-terminale (Barriault *et al* 2001).

3.1.1.1 Propriétés catalytiques des hybrides des BPDO de LB400 et de B356

La figure 15 montre les huit hybrides obtenus par l'échange des fragments A, B, C et D correspondants entre les gènes *bphA* de LB400 et de B356 qui ont fait l'objet de cette étude. Lors de la construction des gènes hybrides, nous avons choisi de les cloner dans le vecteur pDB31 plutôt que le vecteur pQE31 à cause de la présence de deux sites *ScaI* dans pQE31. Par la suite, les inserts ont été transférés dans le vecteur pQE31 afin de favoriser une meilleure expression des gènes en vue de leur purification. Une partie de notre travail a consisté à déterminer de façon plus précise le spectre d'activité de ces enzymes hybrides.

Le spectre d'activité des BPDO hybrides purifiés envers les congénères BPC sélectionnés a été déterminé selon le protocole décrit à la section 2.4.1. Les résultats de l'analyse présentés au tableau 7 montrent leur potentiel catabolique comparé à celui de chacune des BPDO parentales LB400 et B356 envers le biphenyle, le 22'CB, le 33'CB, le 44'CB et la 22'55'CB. L'activité envers le biphenyle des BPDO hybrides a été évaluée par spectrométrie en quantifiant le 2-hydroxy-6-oxo-phényle-2,4-diénoate (HPDA) produit suite à une réaction enzymatique couplée qui incluait BphB et BphC. L'activité de chacune des enzymes hybrides envers le 22'55'CB a été évaluée par la quantification du 3,4-dihydro-3,4-dihydroxy-2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyle produit et les activités envers le 22'CB, le 33'CB et le 44'CB ont été mesurées en évaluant la disparition du substrat dans le milieu de réaction par chromatographie HPLC. Il est intéressant de constater que les hybrides de la BPDO de LB400 ayant subi des modifications dans la portion C-terminale de BphA par l'introduction de fragments correspondants de BphA de B356 ont maintenu une activité enzymatique. Ainsi, les hybrides LACD, LAD, LA, LBCD et LABD s'avèrent actifs envers les congénères sélectionnés et analysés individuellement. À l'inverse, on note que les hybrides LB, LBC et LC obtenus en remplaçant une partie de BphA de B-356 par le fragment correspondant de BphA de LB400 sont faiblement actifs ou tout simplement inactifs envers les congénères BPC utilisés (figure 15).

Tableau 7 Activités catalytiques* des BPDO de LB400 et de B356 purifiées par chromatographie d'affinité comparées à celles de BPDO hybrides.

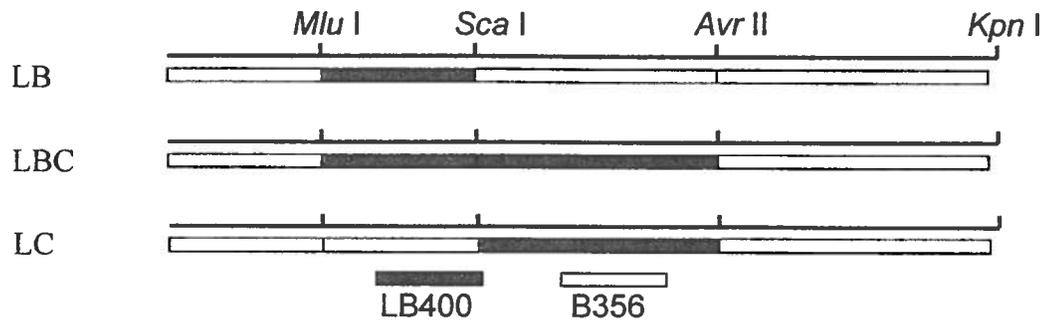
BPDO	Biphényle	22'CB	33'CB	44'CB	22'55'TCB
	μmol de substrat transformé ou du métabolite produit/min/μg d'enzyme				
LB400	63 ± 10	34 ± 8	0	5 ± 1	33 ± 8
B356	121 ± 16	5 ± 6	18 ± 7	0	0
LACD	16 ± 5	19 ± 4	0	10 ± 3	12 ± 6
LB	0	ND	ND	ND	0
LABD	11 ± 3	10 ± 3	17 ± 1	0	T
LC	0	ND	ND	0	0
LAD	95 ± 19	12 ± 5	14 ± 2	0	T
LBC	3 ± 6	0	0	13 ± 3	0
LA	101 ± 5	0	15 ± 2	0	0
LBCD	3 ± 7	7 ± 3	0	9 ± 3	3 ± 2

* La réaction enzymatique a été effectuée dans 200 μl de tampon MES 50 mM à pH 5,5. Le milieu réactionnel comprenait 1,2 nmol/ml de FeSO₄, 50 nmol/ml de NADH, 50 nmol/ml de NAD (dans le cas du substrat biphényle), 50 nmol/ml de substrat BPC solubilisés dans 5 μl d'acétone, 1 nmol/ml de la ferrédoxine réductase et 1 nmol/ml de la ferrédoxine. La réaction a été initiée en ajoutant 200 μg du composant ISP purifié. Par la suite, 50 μl du surnageant du milieu réactionnel ont été injectés sur un chromatographe HPLC. Les valeurs représentent la moyenne d'au moins trois expériences ± l'écart type.

Cette faible activité ou l'inactivité enzymatique de ces derniers peuvent être d'origines diverses.

Afin d'identifier les causes de cette inactivité, plusieurs analyses de caractérisation ont été effectuées sur les protéines purifiées. Les résultats d'analyse par filtration moléculaire ont démontré que les sous-unités α et β de l'hybride LC ne peuvent s'associer entre elles afin de former une enzyme active, $\alpha_3\beta_3$, expliquant son incapacité à oxygéner les congénères BPC (Barriault *et al*, 2001). D'autre part, l'activité enzymatique déficiente des hybrides LB et LBC est expliquée en partie par la faible expression des sous-unités α et β démontrée par le résultat d'analyse sur gel SDS-PAGE (figure 16). Le gel de protéines révèle que pour ces protéines, il est difficile d'obtenir une bonne préparation de l'enzyme purifiée par chromatographie d'affinité (figure 16). Ceci s'explique par un excès de protéines contaminantes riches en résidus histidine qui se sont liées aux sites de liaisons Ni^+ de la colonne d'acide nitrilo-triacétique. L'excès de protéines contaminantes peut être causé par la trop faible expression de la protéine BphA hybride ou par sa précipitation dans des corps d'inclusions. Notamment, la présence de ces protéines contaminantes peuvent être ainsi la source d'une sous-estimation de l'activité de ces hybrides par le fait que la mesure d'activité enzymatique est exprimée en μg d'enzymes. Enfin, il est aussi possible que la faible activité de ces BPDO hybrides soit due à une reconstitution inadéquate du centre Rieske dans la cellule de *E. coli* DH11S. Globalement, il est intéressant de constater la flexibilité qui distingue la BPDO de la souche LB400 comparativement à la BPDO de B356 à recevoir des modifications majeures au niveau de sa structure tridimensionnelle sans toutefois en affecter son activité enzymatique. Outre le premier constat, les résultats présentés au tableau 7 démontrent que des changements dans la portion C-terminale de la sous-unité α de la BPDO peuvent modifier les capacités catalytiques des enzymes.

Hybrides faiblement actifs (ou inactif):



Hybrides actifs :

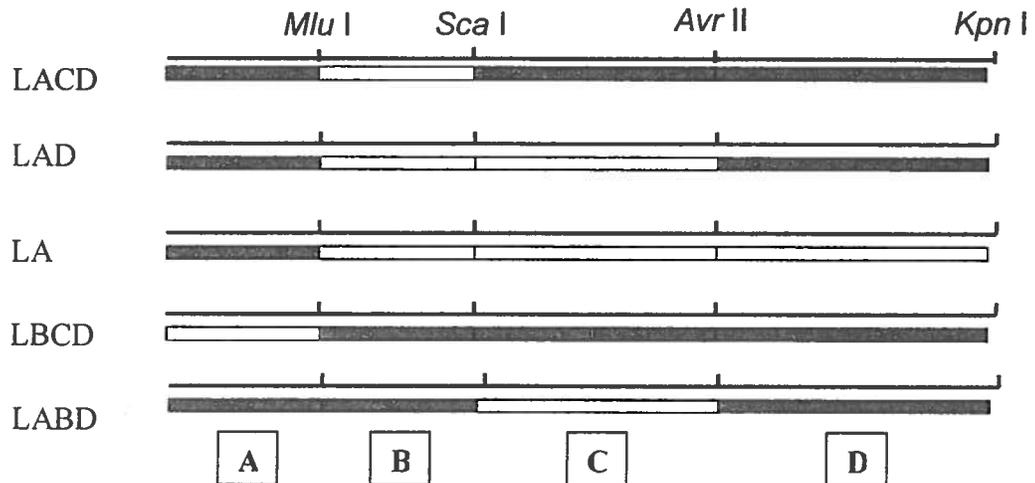


Figure 15. Représentation des hybrides construits entre les BPDO des souches LB400 et de B356.

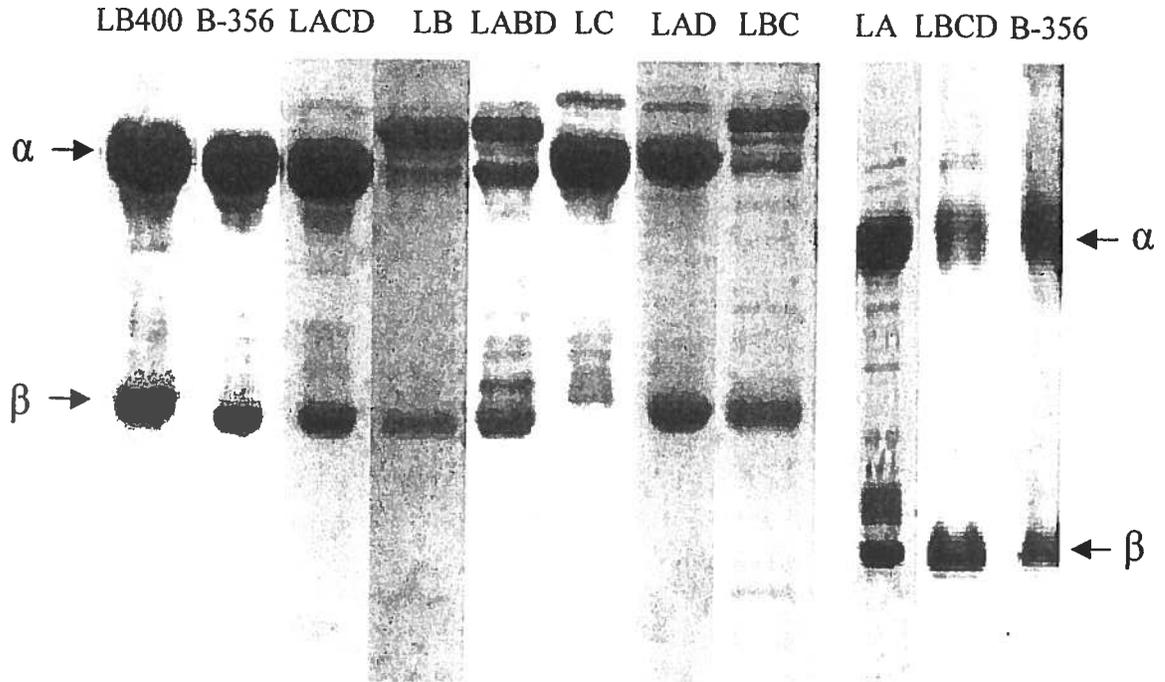


Figure 16. Représentation de l'expression des sous-unités α et β sur gel SDS-PAGE 12 % des BPDO parentales et des variants obtenus par l'échange de fragments entre la BPDO de LB400 et de B356.

Ainsi, en référence à la figure 15 et au tableau 7, les hybrides LA et LAD possédant les régions (B + C) de B356 dans BphA de LB400 ont une activité spécifique similaire à l'enzyme parentale B356 envers le biphenyle, soit de 101 μmoles de substrat transformés/min/ μg et de 95 μmoles /min/ μg respectivement. Les hybrides LACD possédant la région B de B356 et LABD possédant la région C de B356 ont aussi conservé une activité envers le biphenyle. Cependant, dans ce cas, les valeurs sont nettement plus faibles de 16 μmoles /min/ μg et de 11 μmoles /min/ μg respectivement comparativement aux enzymes parentales LB400 (63 μmoles /min/ μg) et B356 (121 μmoles /min/ μg). De ces résultats, il est intéressant de constater que l'introduction simultanée de la région B et C de B356 dans la BPDO de LB400 produit des hybrides qui se caractérisaient par une activité spécifique envers le biphenyle qui est plus élevée que la BPDO de LB400.

En ce qui à trait aux activités envers les BPC, les hybrides LABD et LAD obtenus par le remplacement des régions C et (B + C) respectivement montrent des traits caractéristiques plus similaires à l'enzyme de B356 qu'à celle de LB400. Toutes deux possèdent une activité spécifique envers le 22'55'CB ainsi qu'envers le 22'CB qui est plus faible que celle de la BPDO de LB400. De plus ces deux hybrides catalysent l'oxygénation du 33'CB de façon équivalente à la BPDO de B356. D'autre part, l'hybride LACD, obtenu par le remplacement de la région B de la sous-unité α de LB400 par celle de B356, montre une activité plus élevée que la BPDO de B356 envers le 22'55'CB et le 22'CB, mais est incapable d'oxygéner le 33'CB. De plus, son activité envers le 44'CB est plus élevée que celle de la BPDO de LB400.

L'hybride LA qui possède la région A de la BPDO de LB400 et les régions BCD de la BPDO de B356 a maintenu son activité et détient des traits caractéristiques fortement similaires à la BPDO de B356. Par contre, les hybrides LACD et LABD sont faiblement actifs envers le biphenyle comme s'est le cas pour l'hybride LBCD qui possède la région A de BphA de B356. Toutefois, les hybrides LACD, LABD et LBCD peuvent catalyser l'oxygénation du 22'CB, du 44'CB et du 22'55'CB.

3.1.1.2 Transformation des congénères BPC sélectionnés par des cellules de *E. coli* DH11S exprimant les BPDO hybrides

Le détermination des activités spécifiques des différentes BPDO purifiées envers les congénères BPC est un processus long et ardu. De façon à pouvoir caractériser les enzymes hybrides envers un plus large spectre de substrats, un protocole a été d'abord mis au point afin de mesurer la transformation de plusieurs congénères à la fois par des suspensions cellulaires de *E. coli* qui exprimaient les BPDO hybrides. Des essais *in vivo* visant à vérifier le potentiel de la BPDO de LB400 à hydroxyler le 22'CB qui est son substrat préférentiel ont démontré qu'après 18 heures d'incubation le substrat a été complètement transformé pour des quantités de 50 nmoles/ml et 125 nmoles/ml.

Dans un second temps, des essais enzymatiques *in vivo* ont été effectués en présence d'un mélange de 50 nmoles/ml de chacun des deux congénères 22'CB et 44'CB. Ceci a permis d'évaluer l'influence que peut avoir la présence d'un second substrat sur la capacité de l'enzyme à maintenir une activité catalytique envers un substrat préférentiel, comme le 22'CB. En présence du 44'CB, les cellules de *E. coli* exprimant la BPDO de LB400 ont transformé 100% du 22'CB présent dans le milieu réactionnel après 18 heures d'incubation. Ainsi, l'activité de la BPDO de LB400 envers le 22'CB ne semble pas affecter par la présence du 44'CB. Ces résultats confirment ceux de Bédard *et al* (1986) et Hurtubise *et al* (1998). Toutefois, aucune diminution de la quantité ajoutée de 44'CB n'a été observée après 18 heures d'incubation alors que la BPDO purifiée de LB400 a une activité spécifique évaluée à 5 μ moles du 44'CB consommé/min/ μ g d'enzyme.

D'autre part, lorsque le nombre de congénères BPC est augmenté dans le milieu réactionnel, la transformation des substrats préférentiels est affectée. La capacité d'une suspension cellulaire de *E. coli* exprimant la BPDO de LB400 à dégrader un mélange constitué de 50 nmoles/ml ou de 125 nmoles/ml de chacun des congénères 22'CB, 26CB, 22'66'CB, 22'55'CB et 22'44'55'CB a été évalué. En présence de ce mélange de cinq congénères, nous avons constaté que la BPDO de LB400 transforme le 22'CB ainsi que le 22'55'CB moins efficacement (figure 17 et

figure 18). Lorsque le mélange comprenait 50 nmoles/ml de chacun des congénères, 56,7±8,1% du 22'CB ont été transformés. Et lorsque le mélange a été composé de 125 nmoles/ml de chacun des congénères, seulement 25,6±3,2% du 22'CB ont été transformés. Ainsi, nous avons noté une nette diminution de 43,3% de la capacité de la BPDO de LB400 à oxygéner son substrat préférentiel en présence d'un mélange de 50 nmoles/ml de chacun des cinq congénères. Cette diminution atteignait 74,4% lorsque les essais de transformation ont été effectués en présence du mélange composé de 125 nmoles/ml de chacun des cinq congénères.

Figure 17. Transformation d'un mélange de 50 nmoles/ml de chacun des congénères 22'CB, 26CB, 22'66'CB, 22'55'CB et 22'44'55'CB par la BPDO de LB400. La BPDO de LB400 a été exprimée par une suspension de *E. coli* DH11S. La lecture a été produite après 18 heures d'incubation dans des conditions décrites à la section 2.4.2 de Matériel et Méthodes.

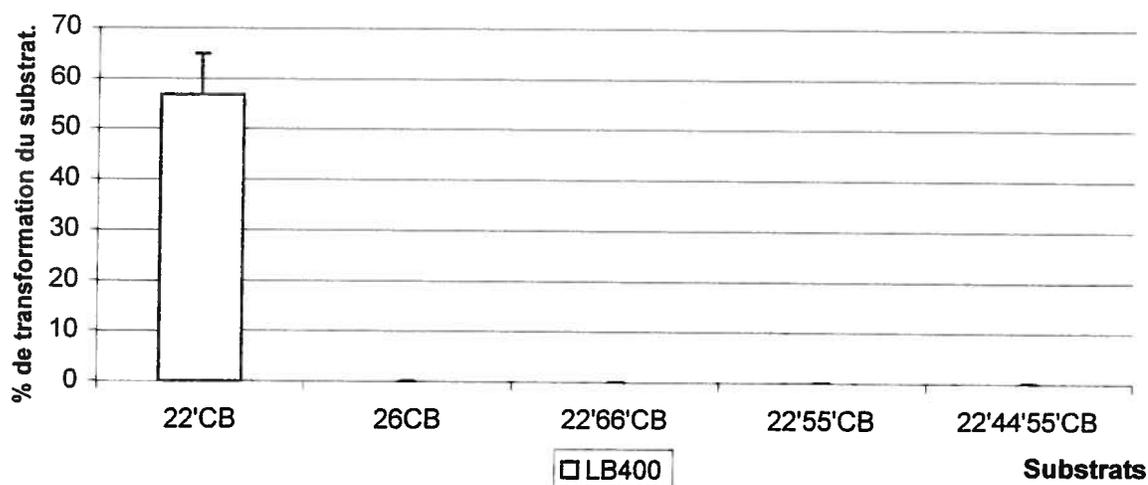
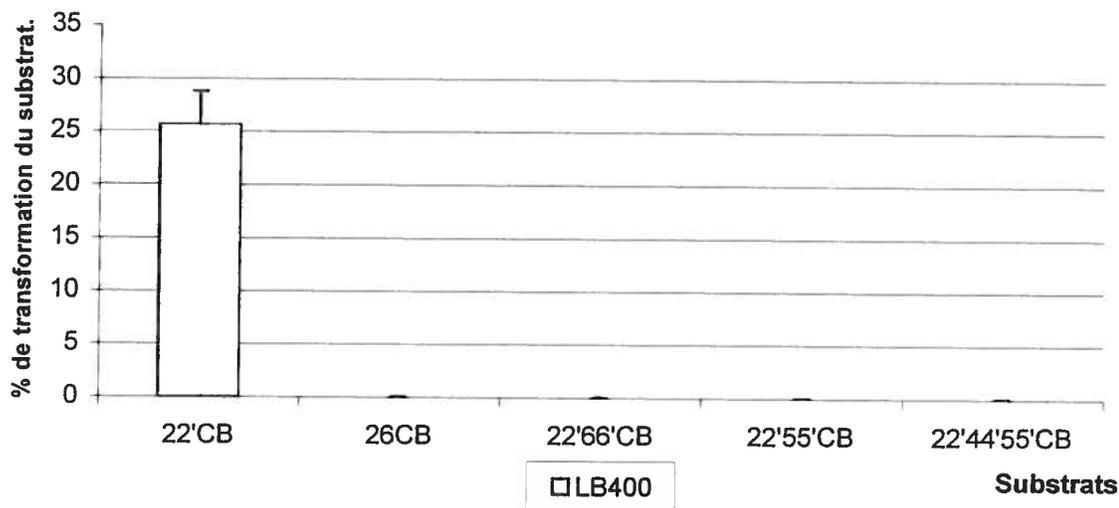


Figure 18. Transformation d'un mélange de 125 nmoles/ml de chacun des congénères 22'CB, 26CB, 22'66'CB, 22'55'CB et 22'44'55'CB par la BPDO de LB400. La BPDO de LB400 a été exprimée par une suspension de *E. coli* DH11S. La lecture a été produite après 18 heures d'incubation dans des conditions décrites à la section 2.4.2 de Matériel et Méthodes.



Ces résultats suggèrent que même si certains congénères comme le 26CB et le 22'66'CB ne sont pas transformés par la BPDO de LB400, ceux-ci compétitionnent avec les congénères préférentiels comme le 22'CB pour réduire l'efficacité de transformation. Il faut donc en conclure que les essais de transformation des congénères BPC risquent de ne pas être fiables lorsque les concentrations de congénères ajoutés sont élevés. Or, pour que les analyses de transformation par l'évaluation de la disparition du substrat par chromatographie HPLC soient statistiquement valables, nous devons avoir des concentrations de chacun des congénères dans le milieu au-dessus de 50 nmoles/ml. De ces observations, l'analyse du spectre de transformation des hybrides des BPDO de LB400 et de B356 sur GC-ECD s'est avérée être une alternative intéressante car cette technique permet d'utiliser des concentrations finales 400 plus petite de l'ordre de 125 $\mu\text{mol/ml}$ et 250 $\mu\text{mol/ml}$ au lieu de concentration finales détectables sur HPLC de l'ordre de 50 nmoles/ml et plus.

Afin d'obtenir une évaluation plus exhaustive du spectre de transformation des hybrides de la BPDO de LB400 et de B356, des essais *in vivo* ont été effectués sur un mélange de 18 congénères BPC. Le mélange a été constitué du 26CB, 33'CB, 44'CB, 22'66'CB, 23'4CB 244'CB, 234'CB, 22'55'CB, 22'44'CB, 22'33'CB, 23'44'CB, 33'45'CB, 22'345'CB, 33'44'CB, 23'44'5CB, 22'44'55'CB et 22'3455'CB incluant un témoin négatif qui a été le 22'33'455'66'CB (voir section 2.5.2). La concentration résiduelle de chacun des congénères dans le milieu réactionnel a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse (GC-ECD) selon le protocole décrit à la section 2.5.1. Le mélange ne contenait pas le 22'CB car il a été impossible de discriminer le congénère 26CB de celui-ci par GC-ECD. Les résultats illustrés au tableau 8, présentent les valeurs de l'activité catalytique des hybrides sous forme de pourcentage (%) de transformation des congénères BPC évaluées en mesurant la disparition des congénères BPC après 18 heures d'incubation selon le protocole décrit à la section 2.4.2.

Les résultats confirment ceux obtenus avec la BPDO purifiée de LB400 qui démontrait que l'enzyme a un fort potentiel catalytique envers le 22'55'CB et un faible potentiel de transformation envers le 44'CB (Haddock *et al*, 1995; Hurtubise *et al*, 1998). De plus, l'enzyme a démontré une activité envers les congénères 23'4CB, 234'CB et 22'33'CB. Le pourcentage de transformation du 22'55'CB qui est de 87% a été très élevé par rapport à l'incapacité de la BPDO de LB400 à transformer ce congénère lors des essais *in vivo* réalisé avec un mélange composé de 50 nmoles/ml de cinq congénères. Ces résultats montrent la validité de notre approche. De plus, ces résultats démontrent que le 23'4CB et le 22'33'CB sont transformés par la BPDO de LB400. D'autre part, le 33'CB est transformé à 245% et le 234'CB à 27%. Étonnamment, la BPDO de LB400 purifiée ne démontrait aucune activité envers 50 nmoles/ml du congénère 33'CB lors d'essais *in vitro*, alors que les essais *in vivo* semblent favoriser la transformation du 33'CB présent à la concentration de 125 μ mol/ml.

Les hybrides LB, LBC et LC obtenus par le remplacement des fragments B et C de BphA de B356 par ceux de LB400 ont montré une activité catalytique envers les congénères BPC qui différait de celle présentée au tableau 7. L'hybride LC est demeuré inactif. Ce résultat a été attendu du fait que les deux sous-unités ne se réassemblaient pas pour constituer une oxygénase terminale active (voir la section précédente) (Barriault *et al*, 2001). Cependant, considérant le faible spectre d'activité de l'hybride LB purifié, les résultats obtenus des essais *in vivo* sont étonnants. En effet, les cellules de *E. coli* exprimant l'hybride LB ont transformé 25% de 44'CB, 17% de 33'44'CB, 12% de 23'44'CB et entre 7 et 9% des congénères 234'CB, 23'44'5CB et 22'44'55'CB présents. De façon similaire, l'hybride LBC, qui a été très faiblement actif lors des essais d'enzymes purifiées, semble capable de transformer faiblement les congénères plus fortement chlorés comme le 33'44'CB et le 22'44'55'CB (tableau 8).

Les hybrides LA, LAD et LABD obtenus par le remplacement des régions B, C ou (B + C) de la sous-unité α du BphA de LB400 par celles de B356 sont demeurés actifs, ainsi que l'hybride LBCD. Comme pour les analyses faites avec les enzymes purifiées, les hybrides LA et LAD ont maintenu une activité enzymatique envers le 33'CB et le 44'CB. De plus, ces hybrides ont transformé le 23'4CB et le 234'CB efficacement.

Ainsi, comme nous l'avons constaté précédemment, les hybrides formés par le remplacement des fragments B, C ou D de B356 par ceux de LB400 sont faiblement actifs (Barriault *et al*, 2001). Il est cependant intéressant de constater que les hybrides LBC et LABC ont démontré une capacité de transformer les congénères à forte teneur en chlore que la BPDO de LB400 est incapable de transformer.

Tableau 8 Potentiel catalytique *in vivo* de BPDO hybrides .

Congénère	LB400	LA	LB	LC	LBC	LBCD	LAD	LABC
% de transformation* de chacun des congénères								
26CB	-	-	-	-	-	-	-	-
33'CB	25 ± 2	18 ± 7	-	-	-	-	49 ± 33	-
44'CB	-	33 ± 11	26 ± 5	-	-	24 ± 3	39 ± 16	22 ± 4
22'66'CB	-	-	-	-	-	-	-	-
23'4CB	69 ± 3	87 ± 7	-	-	-	-	91 ± 6	-
244'CB	-	-	-	-	-	-	-	-
234'CB	27 ± 4	61 ± 24	9 ± 1	-	-	-	80 ± 17	-
22'55'CB	87 ± 13	-	-	-	-	-	-	-
22'44'CB	-	-	-	-	-	-	-	-
22'33'CB	70 ± 19	-	-	-	-	-	-	-
23'44'CB	-	-	12 ± 2	-	-	-	-	-
33'45'CB	-	-	-	-	-	-	-	-
22'345'CB	-	-	-	-	-	-	-	-
33'44'CB	-	-	-	-	-	-	-	-
23'44'5CB	-	-	17 ± 1	-	9 ± 2	12 ± 4	-	-
22'44'55'CB	T	-	9 ± 4	-	-	-	-	-
22'3455'CB	-	-	8 ± 4	-	2 ± 1	T	-	4 ± 0.2
22'33'455'66'CB	-	-	-	-	-	-	-	-

* Les cellules ont été suspendues dans suffisamment de milieu M9 (contenant 0,0002% (p/v) de thiamine; 100 µg/ml d'ampicilline ; 25 µg/ml de kanamycine et 100 nmol d'IPTG) pour ajuster la densité optique à 2,0 à une longueur d'onde de 600 nm. Cette suspension a été distribuée par volume de 197 µl dans des tubes en verre de 2 ml avec bouchon vissé. Le milieu réactionnel a reçu 10 µl du mélange de BPC synthétique dissout dans l'acétone et composé de 1 µM de tous les congénères sauf de 5 µM pour le 26CB, 33'CB et le 44'CB. La disparition du substrat a été alors évaluée par chromatographie en phase gazeuse utilisant un détecteur à capteur d'électrons (GC-ECD). Les valeurs représentent la moyenne d'au moins trois expériences ± l'écart type.

3.2 Partie II : Analyse des hybrides produits par recombinaison aléatoire (*DNA shuffling*)

Dans la première partie de cette étude, la caractérisation de l'activité enzymatique des hybrides de la BPDO de LB400 et B356 a permis de démontrer tout d'abord la flexibilité qui distingue la BPDO de la souche LB400 comparativement à la BPDO de B356. Ainsi, de façon générale, les hybrides qui ont présenté une plus grande efficacité de transformation envers certains congénères BPC sont ceux construits en remplaçant des fragments de la partie C-terminale de la BPDO de LB400 par ceux de la BPDO de B356. À quelques exceptions près, leur spectre d'activité enzymatique demeurerait dans les limites des capacités catalytiques des enzymes parentales. De ces observations, il a été envisagé d'expérimenter diverses variations structurelles de la partie C-terminale de BphA de LB400 par une approche empirique, soit par recombinaison aléatoire *in vitro*, afin de favoriser le développement de BPDO hybrides plus efficaces ou possédant un spectre de transformation plus large ou varié que ceux connus jusqu'ici. De plus, basé sur le travail de Ness *et al* (1999), plutôt que de cibler une progéniture de première génération de recombinaisons aléatoires, nous avons choisi de retenir de façon aléatoire le plus grand nombre de variants de la progéniture de première génération. Cette approche, selon Ness *et al* (1999), nous a permis d'explorer un plus grand ensemble de spectre des structures possibles de la protéine.

3.2.1. Criblage des BPDO variants

Nous avons appliqué le procédé de « *DNA shuffling of gene family* » (recombinaison aléatoire *in vitro* entre gènes d'une même famille mais qui ne sont pas très rapprochés phylogénétiquement) (Cramer *et al*, 1998). La recombinaison aléatoire *in vitro* a été réalisée sur une portion seulement du gène *bphA* de LB400. Cette stratégie avait pour but d'augmenter la fréquence d'obtention d'une progéniture active (Barriault *et al*, 2002). La stratégie utilisée a consisté à recombiner le fragment de *bphA* de LB400 qui code pour la partie C-terminale de la sous-unité α de BphA

avec la portion correspondante du gène homologue à 76,2% de B356. Dans une première étape, des variants ont été créés lors d'une première recombinaison *in vitro* entre le fragment *MluI-AvrII* du gène *bphA* de B356 et d'un fragment plus court (de 193 pb) couvrant la partie distale du fragment *MluI-AvrII* correspondant de *bphA* de LB400 (figure 14). Les fragments *MluI-AvrII* hybrides obtenus ont servi à créer une génothèque d'hybrides en les substituant au fragment *MluI-AvrII* de *bphA* de LB400 dans le plasmide pDB31 [*bphAE*-LB400].

Cette génothèque de plasmides a servi à transformer *E. coli* DH11S. Les transformants ont été disposés sur un milieu gélosé LB et sans criblage. Toutes les colonies transformées ont été recueillies sans discrimination afin de récupérer le plus grand nombre de combinaisons possibles obtenues durant le processus de recombinaisons entre les fragments d'ADN. L'ADN du mélange des clones recombinants a été extrait et a servi à une deuxième recombinaison aléatoire créant une progéniture de deuxième génération de recombinaison aléatoire. Dans ce cas, le fragment *MluI-AvrII* de la population de clones a été isolé puis digéré et soumis au protocole de *DNA shuffling*. Les fragments hybrides *MluI-AvrII* reconstitués ont été clonés dans le vecteur pDB31 [*bphAE*-LB400]. Cette génothèque a servi à transformer les cellules *E. coli* DH11S. La sélection s'est effectuée selon le protocole de criblage présenté à la section 2.6.2.4 en présence de vapeur du congénère 22'44'55'CB ou du congénère 22'CB. Les hybrides ayant la capacité de transformer l'un ou l'autre des congénères furent identifiés selon la coloration des colonies.

Parmi 3 000 colonies criblées pour leur capacité à transformer le 22'44'55'CB, 15 colonies ont produit une coloration foncée. Par contre, 40 colonies sur 2 000 analysées ont produit une coloration foncée lorsqu'elles ont été exposées aux vapeurs du 22'CB. Le tableau 9 présente les caractéristiques de quelques-uns des variants obtenus sur les milieux de criblage. Une plus faible proportion de colonies positives sur le 22'44'55'CB n'est pas étonnante en considérant que ce congénère est difficilement transformable par les BPDO parentales. Nous avons choisi ce congénère dans le but de sélectionner des variants que nous présumons être plus efficaces pour

transformer les congénères BPC fortement chlorés. D'autre part, parmi les variants obtenus, nous avons constaté qu'environ 1,3 % des colonies présentaient une couleur bleu foncé avant même d'être exposé aux vapeurs de BPC. Aussi, tous ces variants ont été actifs envers le biphényle. Une observation similaire a été rapportée par Kumamaru *et al* (1998) où il a été constaté que plusieurs clones exprimant des BPDO variants obtenus en recombinant BphA de LB400 avec BphA1 de KF707 présentaient une coloration bleue. Cette coloration a été attribuée au fait que ces BPDO avaient acquis la capacité de transformer l'indole en indigo. Les BPDO qui présentaient cette caractéristique semblaient catalyser l'oxygénation en position *ortho* plus efficacement.

Tableau 9 Phénotype des BPDO variants obtenue du deuxième cycle de recombinaison aléatoire en recombinant *bphA* de B356 et de LB400.

Hybrides de 2 ^{ème} génération	Substrat de criblage (congénère BPC)	Couleur de la colonie sur milieu LB gélosé
II-3	aucune	Bleu foncé
II-6	22'44'55'CB	Beige-verdâtre
II-11	22'44'55'CB	Verdâtre
II-14	22'44'55'CB	Beige foncé
II-A	22'CB	Beige-verdâtre
II-G	22'CB	Brunâtre
II-H	22'CB	Beige foncé
II-I	22'CB	Brunâtre
II-J	22'CB	Brunâtre

Dans une seconde étape, une démarche similaire à celle de recombinaison aléatoire de deuxième génération a été suivie pour créer des variants de troisième génération. Donc, un troisième cycle de recombinaison aléatoire a été effectué à partir d'une génothèque de variants choisis au hasard parmi les variants de deuxième

génération. Les BPDO variants de troisième génération ont été criblés sur le 22'CB ou le 22'44'55'CB. Parmi les 1 800 colonies analysées, 34 hybrides ont été capables d'oxygéner le 22'CB. Aucune colonie bleue n'a été observée. Et sur le nombre de colonies hybrides, cinq ont été retenues parce qu'elles présentaient une coloration plus foncée que le témoin exprimant la BPDO de LB400. Il s'agit des variants II-1, II-2, II-3, II-5 et II-6 (tableau 10).

Tableau 10 Phénotype des BPDO variants obtenus du troisième cycle de recombinaison aléatoire en recombinant *bphA* de B356 et de LB400.

Hybrides de 3 ^{ème} génération	Criblage (congénère BPC)	Couleur de la colonie sur milieu LB gélosé
III-1	22'CB	Beige
III-2	22'CB	Beige-rosé
III-3	22'CB	Beige-rosé
III-5	22'CB	Beige
III-6	22'CB	Beige foncé

3.2.2. Caractérisation des BPDO variants

Nous avons évalué le potentiel à transformer l'Aroclor 1242 par les cellules *E. coli* DH11S exprimant la BPDO de la souche LB400 ou les BPDO hybrides variants II-3, II-6, II-11 et II-14. La disparition de chacun des congénères du mélange Aroclor 1242 a été évaluée par GC-ECD selon le protocole décrit à la section 2.5.2 (tableau 11). Étrangement, aucune activité catalytique envers le 22'44'55'CB n'a été détectée qui pourtant a été le substrat de criblage pour les variants II-6, II-11 et II-14. Cependant, ces variants ont été capables de transformer le 22'344'5CB, qui est un congénère fortement chloré, alors que la BPDO de LB400 est incapable de transformer ce congénère. D'autre part, ces variants ont transformé 100% des congénères monochlorés présents dans le mélange, entre 80-100% le 24'CB sauf pour

II-11 (21%) et entre 35-45% les penta-chlorés. Les variants II-6 et II-14 ont démontré une plus grande activité oxydative envers les congénères 23'CB, 23CB, 24'CB, 236CB, 23'6CB, 234'CB, 22'46'CB et 22'33'CB que les variants II-3 et II-11.

La complexité des mélanges commerciaux d'Aroclor rend difficile l'interprétation des résultats de l'analyse de transformation des congénères qui les composent. Pour cette raison nous avons choisi d'évaluer le potentiel de quelques variants obtenus des recombinaisons aléatoires de deuxième et de troisième génération à transformer un mélange constitué de 18 congénères BPC (tableau 12). De façon générale, les hybrides de deuxième génération transforment les congénères 23'4CB et 234'CB plus efficacement que la BPDO de LB400. Cependant, sauf le variant II-H, tous les variants montrent un spectre d'activité envers les congénères BPC du mélange qui est beaucoup plus étroit que celui de la BPDO de LB400. Deux observations intéressantes : bien que faible, II-6 peut transformer le 22'44'55'CB et d'autre part, II-H transforme de façon significative le 26'CB qui est un congénère très récalcitrant.

Les hybrides II-6, II-14, II-A, II-G, II-H, II-I et II-J ont pu transformer de 85-99% du 23'4CB (sauf II-G, 46%) et de 70-96% du 234'CB (sauf II-A, 32% et II-I, 18%). Un profil de transformation identique a été observé pour II-A et II-I qui transforment seulement le 234'CB et 23'4CB à des pourcentages analogues. De même, II-G et II-J possèdent une activité oxydative similaire par leur capacité à transformer respectivement 24% et 18% du 33'CB, en plus de transformer le 23'4CB et 234'CB. D'autre part, l'hybride II-6 a témoigné d'une capacité à transformer 33% du 44'CB présent et 7% du 22'44'55'CB présent dans le milieu. Enfin, II-14 a pu transformer 88% du 22'33'CB. Ces habiletés catalytiques ont fait d'eux les hybrides de deuxième génération de recombinaison aléatoire qui peuvent transformer les congénères les plus fortement chlorés. Néanmoins, l'hybride II-H est le plus intéressant de tous par ses capacités de transformer un large spectre de congénères incluant le 26CB, le 33'CB, le 44'CB, le 244'CB et le 22'33'CB. Ainsi, ce dernier a démontré un profil de

transformation différent et une activité catalytique plus efficace que la BPDO de LB400 envers les congénères BPC.

D'autre part, les hybrides III-1, III-2, III-3, III-5 et III-6, obtenus d'une troisième génération de *shuffling*, se sont révélés en tout point moins performants que la BPDO de LB400 (tableau 13). Les hybrides III-5 et III-6 ont transformé 65% et 54% du 22'55'CB et 20% et 8% du 22'33'CB respectivement, comparativement à une transformation de 87% du 22'55'CB et 70% du 22'33'CB par la BPDO de LB400. Par ailleurs, III-3 a manifesté une activité oxydative unique envers le 23'4CB, et les hybrides III-1 et III-2 détiennent un profil de transformation analogue. Toutefois III-1 s'avère être moins performant que III-2 mais possède une activité de transformation additionnelle de 16% du 23'44'CB. D'un point de vue général, les hybrides obtenus de troisième génération semblent être avantagés pour une capacité à oxyder en position *meta-para* des cycles aromatiques qui favoriserait majoritairement la transformation du 22'55'CB. Cependant, une perte certaine de leur capacité à oxygéner en position *ortho* le noyau biphenyle a été observée.

Tableau 11 Transformation de l'Aroclor 1242 par les cellules de *E.coli* DH11S exprimant la BPDO de la souche LB400 et/ou des variants obtenus par recombinaison aléatoire.

Pics	% de transformation* des congénères de l'Aroclor 1242					
	LB400	II-3	II-6	II-11	II-14	
1	100	100	100	100	100	100
3	100	11	11	-	-	13
4	100	87	100	21	-	89
5	100	16	94	-	-	87
6	99	25	91	-	-	84
8	100	100	100	-	-	100
11	48	-	23	-	-	26
12	70	-	12	-	-	5
13	73	72	79	22	-	42
14	75	-	-	-	-	17
15	48	45	78	-	-	60
17	13	-	9	-	-	25
18	79	-	21	4	-	23
20	23	5	85	-	-	74
31	52	-	6	-	-	8
43	19	7	10	5	-	88
49	45	36	45	42	-	45
50	6	16	11	11	-	25
57	-	73	67	72	-	39

*Les cellules ont été suspendues dans suffisamment de milieu M9 (contenant 0,0002% (p/v) de thiamine; 100 µg/ml d'ampicilline ; 25 µg/ml de kanamycine et 100 nmol d'IPTG) pour ajuster la densité optique à 2,0 à une longueur d'onde de 600 nm. Cette suspension a été distribuée par volume de 197 µl dans des tubes en verre de 2 ml avec bouchon vissé. Le milieu réactionnel a reçu 10 µl d'Aroclor 1242 équivalent à 5 ppm final. La disparition du substrat a été alors évaluée par chromatographie en phase gazeuse utilisant un détecteur à capteur d'électrons (GC-ECD).

**Seuls les congénères pour lesquels une transformation a été mesurée sont rapportés dans le tableau. Les valeurs représentent la moyenne d'au moins trois expériences ± l'écart type.

Tableau 12 Potentiel catalytique *in vivo* de la BPDO de LB400 et de variants issus d'une deuxième génération de recombinaison aléatoire.

Variants	LB400	II-6	II-14	II-A	II-G	II-H	II-I	II-J
% de transformation* de chacun des congénères								
26CB	-	-	-	-	-	91 ± 9	-	-
33'CB	25 ± 2	-	-	-	25 ± 2	100 ± 0	-	18 ± 11
44'CB	-	33 ± 11	-	-	-	79 ± 8	-	-
22'66'CB	-	-	-	-	-	-	-	-
23'4CB	69 ± 3	91 ± 3	94 ± 7	86 ± 2	47 ± 20	99 ± 2	79 ± 3	95 ± 7
244'CB	-	-	-	-	-	69 ± 13	-	-
234'CB	27 ± 4	70 ± 7	82 ± 23	32 ± 6	81 ± 18	96 ± 3	18 ± 5	71 ± 6
22'55'CB	87 ± 13	-	-	-	-	-	-	-
22'44'CB	-	-	-	-	-	-	-	-
22'33'CB	70 ± 19	-	88 ± 10	-	-	17 ± 7	-	-
23'44'CB	-	-	-	-	-	-	-	-
33'45'CB	-	-	-	-	-	-	-	-
22'345'CB	-	-	-	-	-	-	-	-
33'44'CB	-	-	-	-	-	-	-	-
23'44'5CB	-	-	-	-	-	-	-	-
22'44'55'CB	T	7 ± 1	-	-	-	-	-	-
22'3455'CB	-	-	-	-	-	-	-	-
22'33'455'66'CB	-	-	-	-	-	-	-	-

* Les cellules ont été suspendues dans suffisamment de milieu M9 (contenant 0,0002% (p/v) de thiamine; 100 µg/ml d'ampicilline ; 25 µg/ml de kanamycine et 100 nmol d'IPTG) pour ajuster la densité optique à 2,0 à une longueur d'onde de 600 nm. Cette suspension a été distribuée par volume de 197 µl dans des tubes en verre de 2 ml avec bouchon vissé. Le milieu réactionnel a reçu 10 µl du mélange de BPC synthétique dissout dans l'acétone et composé de 1 µM de tous les congénères sauf de 5 µM pour le 26CB, 33'CB et le 44'CB. La disparition du substrat a été alors évaluée par chromatographie en phase gazeuse utilisant un détecteur à capteur d'électrons (GC-ECD). Les valeurs représentent la moyenne d'au moins trois expériences ± l'écart type.

Tableau 13

Potentiel catalytique *in vivo* de la BPDO de LB400 et de variants issus d'une troisième génération de recombinaison aléatoire.

Congénères	LB400	III-1	III-2	III-3	III-5	III-6
% de transformation de chacun des congénères						
26CB	-	-	-	-	-	-
33'CB	25 ± 2	-	-	-	-	-
44'CB	-	-	-	-	-	-
22'66'CB	-	-	-	-	-	-
23'4CB	69 ± 3	16	32	55	-	-
244'CB	-	-	-	-	-	-
234'CB	27 ± 4	-	-	-	-	-
22'55'CB	87 ± 13	51	75	-	65	54
22'44'CB	-	-	-	-	-	-
22'33'CB	70 ± 19	22	61	-	20	8
23'44'CB	-	16	-	-	-	-
33'45'CB	-	-	-	-	-	-
22'345'CB	-	-	-	-	-	-
33'44'CB	-	-	-	-	-	-
23'44'5CB	-	-	-	-	-	-
22'44'55'CB	-	-	-	-	-	-
22'3455'CB	T	-	-	-	-	-
22'33'455'66'CB	-	-	-	-	-	-

* Les cellules ont été suspendues dans suffisamment de milieu M9 (contenant 0,0002% (p/v) de thiamine; 100 µg/ml d'ampicilline; 25 µg/ml de kanamycine et 100 nmol d'IPTG) pour ajuster la densité optique à 2,0 à une longueur d'onde de 600 nm. Cette suspension a été distribuée par volume de 197 µl dans des tubes en verre de 2 ml avec bouchon vissé. Le milieu réactionnel a reçu 10 µl du mélange de BPC synthétique dissout dans l'acétone et composé de 1 µM de tous les congénères sauf de 5 µM pour le 26CB, 33'CB et le 44'CB. La disparition du substrat a été alors évaluée par chromatographie en phase gazeuse utilisant un détecteur à capteur d'électrons (GC-ECD). Les valeurs représentent la moyenne d'au moins trois expériences ± l'écart type.

3.2.3 Analyse de la séquence du variant II-H

Le variant II-H origine d'une deuxième génération de recombinaison aléatoire *in vitro* effectué sur la génothèque d'hybrides non sélectionnés d'une première recombinaison *in vitro* entre le fragment *MluI-AvrII* de 865 pb du gène *bphA* de B356 et un fragment plus court couvrant la partie distale du fragment *MluI-AvrII* de 193 pb correspondant de *bphA* de LB400 (figure 14).

Le variant II-H a démontré des capacités catalytiques intéressantes et différentes des profils de transformation connus jusqu'ici. Ainsi, II-H transforme le 33'CB, le 44'CB, le 23'4CB, le 244'CB, le 234'CB et le 22'33'CB plus efficacement que la BPDO de LB400 (tableau 12). De plus, son habilité à transformer le 26CB s'avère être une caractéristique unique qui n'est pas partagée par aucune autre bactérie connue dans l'environnement (Maltseva *et al*, 1999)

Le séquençage du fragment *MluI-AvrII* de II-H a permis de mettre en évidence les différences structurales qui distinguent ce variant des parents. Le variant II-H a hérité du fragment *MluI-AvrII* de B356. Il est donc très similaire à l'hybride LAD décrit à la première section des résultats. Cependant, le fragment a subi trois mutations pendant le processus de recombinaison aléatoire illustré à la figure 19. Deux de ces mutations ont été silencieuses soit par le remplacement de la cytosine⁵⁴⁷ par une thymine et de la cytosine⁹⁸¹ par une thymine. Une seule mutation causée par le remplacement de la guanine⁹²⁵ par une adénine a conduit à un changement d'acide aminé dans BphA. Cette mutation a causé le remplacement de la valine³⁰⁹ (V), codée par le codon GTC dans la séquence d'acides aminés de BphA de B356, pour une isoleucine (I), codée par le codon ATC dans celle de l'hybride II-H (figure 20). En comparant l'activité des cellules de *E. coli* exprimant la BPDO hybride LAD avec des cellules de *E. coli* exprimant la BPDO II-H, il semble donc que la position V³⁰⁹ a une grande influence sur l'activité de l'enzyme envers les BPC.

LB400	531)	TGTGCAGGCG	CCAGACCTGG	AGACCTACCT	CGGTGACGCC	CGCCCTATA
B356		CCCCGA....	..C...C..AA.C.....G	ATG.....C.
II-H		CCCCGA....	..C...T..AA.C.....G	ATG.....C.
LB400	581)	TGGACGTCAT	GCTGGATCGC	ACGCCGGCCG	GGACTGTGGC	CATCGGCGGC
B356	G..	...C.....	..CGA...G.	.A..C.AA..A
II-H	G..	...C.....	..CGA...G.	.A..C.AA..A
LB400	631)	ATGCAGAAGT	GGGTGATTCC	GTGCAACTGG	AAGTTTGCCG	CCGAGCAGTT
B356		..C.....	...C..C..C.....
II-H		..C.....	...C..C..C.....
LB400	681)	CTGCAGTGAC	ATGTACCACG	CCGGCACCAC	GACGCACCTG	TCCGGCATCC
B356	C...G.T	.T.T.....	..A...G.G.
II-H	C...G.T	.T.T.....	..A...G.G.
LB400	731)	TGGCGGGCAT	TCCGCCGGAA	ATGGACCTCT	CCCAGGCGCA	GATACCCACC
B356	C..TC.	C.....T..GAAATC..	AC.GT.G.AG
II-H	C..TC.	C.....T..GAAATC..	AC.GT.G.AG
LB400	781)	AAGGGCAATC	AGTTCGGGGC	CGCTTGGGGC	GGGCACGGCT	CGGGCTGGTA
B356		..C.....	...T..CT.	...C.....GG	..C..G...T
II-H		..C.....	...T..CT.	...C.....GG	..C..G...T
LB400	831)	TGTCGACGAG	CCGGGCTCAC	TCCTGGCGGT	GATGGGCCCC	AAGGTCACCC
B356		CA.TA....C	T..TCGATT.	.G...T.T..	.G...G..G	..A...A.
II-H		CA.TA....C	T..TCGATT.	.G...T.T..	.G...G..G	..A...A.
LB400	881)	AGTACTGGAC	CGAGGGTCCG	GCTGCCGAGC	TTGCGGAACA	GCGCCTGGGG
B356		GC.A..C..A	..C.....	----A..GG	C...A..C.
II-H		GC.A..C..A	..C.....	----A..GG	C...A..C.
LB400	931)	CACACCGGCA	--TGCCGGTT	CGACGCATGG	TCGGCCAGCA	CATGACGATC
B356	924)	..GT..C...	GT....A.C	.TGGA....TA.....AG.G
II-H	924)	..AT..C...	GT....A.C	.TGGA....TA.....AG.G
LB400	981)	TTCCCGACCT	GTTCAATCCT	GCCCACCTTC	AACAACATCC	GGATCTGGCA
B356	973)C..	.C..G...T.	...TGG.A..C...T.	.C.C.....
II-H	973)T..	.C..G...T.	...TGG.A..C...T.	.C.C.....
LB400	1031)	CCGCGTGGT	CCCAATGAAA	TCGAGGTGTG	GGCCTTCACC	CTGGTCGATG
B356	1023)	T.....C...C..GG	.G.....C..GTG	T...G..C.
II-H	1023)	T.....C...C..GG	.G.....C..GTG	T...G..C.
LB400	1081)	CCGACGCCCC	GGCGGAG-TC	AAGGAAGAAT	ATCGCCGGCA	CAACATCCGC
B356	1073)T..G..	..A...TA..G....	TC...TT...	G.....
II-H	1073)T..G..	..A...TA..G....	TC...TT...	G.....
LB400	1131)	AACTTCTCCG	CAGGCGGCGT	GTTTGAGCAG	GACGATGGCG	AGAACTGGGT
B356	1123)	.C...TAA..	.C.....	...C.....C..A.	.A.....
II-H	1123)	.C...TAA..	.C.....	...C.....C..A.	.A.....
LB400	1181)	GGAGATCCAG	AAGGGGCTAC	GTGGGTACAA	G	
B356	1173)	...A..T...	CG..TAA.G.	.C..CC....		
II-H	1173)	...A..T...	CG..TAA.G.	.C..CC....		

Figure 19. Illustration de la séquence d'acides nucléiques de *bphA* (comprise dans la séquence *MluI-AvrII* (490pb-1353pb)) de LB400, B356 et du variant II-H. Les modifications* des acides nucléiques ont été indiquées en caractère gras. *Remplacement de la cytosine⁵⁴⁷ et de la cytosine⁹⁸¹ de B356 par une thymine et de la guanine⁹²⁵ par une adénine dans le variant II-H.

LB400	171)	LV FANWDPVQAP ETYL-GDAR-	PYMDVMLDRT	PAGTVAIGGM	QKWPVPCNWK
B356	EAPD L KTYLSDAM	E...E...I
II-H	EAPD L KTYLSDAM	E...E...I
LB400	223)	FAAEQFCSDM YHAGTTTHLS	GILAGIPPEM	DLSQAQIPTK	GNQFRAAWGG
B356	MS...	.V...L....	..T.I.LSKNS....
II-H	MS...	.V...L....	..T.I.LSKNS....
LB400	273)	HGSGWYVDEP GSLLAVMGPK	VTQYWTEGPA	AELAEQRLGH	TGMPVRRMVG
B356		..A..FINDS SI..S.V...	I.....Q...	..K.AR.VPQ	LPILD--.F.
II-H		..A..FINDS SI..S.V...	I.....Q...	..K.AR.IPQ	LPILD--.F.
LB400	323)	QHMTIFPTCS FLPTFNNIRI	WHPRGPNE		
B356	V.. TQI.T...	
II-H	V.. TQI.T...	

Figure 20. Illustration de la séquence d'acides aminés de BphA de LB400, B356 et du variant II-H. Les résidus aminés en caractère gras ont subi des modifications dans le codon de lecture dont deux sont silencieuses.

Chapitre 4
Discussion

4. Discussion

La première partie de ce travail confirme les résultats obtenus précédemment suggérant que la partie C-terminale de la sous-unité α ainsi que la sous-unité β de la BPDO influencent fortement le profil de transformation envers les congénères BPC (Kimura *et al*, 1997; Kumamaru *et al*, 1998; Mondello *et al*, 1997; Chebrou *et al*, 1999). La seconde partie montre l'intérêt d'utiliser une approche empirique, telle la recombinaison aléatoire *in vitro* appliquée sur la partie C-terminale de BphA afin d'obtenir des BPDO hybrides qui présentent des caractéristiques enzymatiques différentes à celles connues jusqu'ici. Cette approche a permis d'obtenir l'hybride II-H intéressant par son habilité à transformer efficacement le congénère 2,6-chlorobiphényle récalcitrant dans l'environnement. Finalement, dans cette étude nous avons démontré l'influence des concentrations de BPC individuels ou utilisés sous forme de mélanges sur l'activité catalytique de la BPDO de LB400 envers les congénères BPC. Cette dernière information sera très utile dans les essais de caractérisation de nouveaux variants de BPDO.

4.1 Déterminants structuraux de l'activité catalytique de la BPDO envers les congénères BPC

Notre étude a démontré que pour certaines BPDO, il est possible d'introduire des modifications structurelles majeures dans la partie C-terminale de BphA sans perdre de l'activité de l'enzyme. Cependant, certaines autres BPDO perdent leur activité catalytique lorsqu'elles subissent des modifications structurelles dans la partie C-terminale de la sous-unité α . Les hybrides construits en remplaçant certaines portions de BphA de LB400 par les portions correspondantes de BphA de B356 sont demeurés actifs contrairement à ceux construits en remplaçant les portions de BphA de B356 par les portions de BphA de LB400. Cette capacité à rester actif malgré l'introduction de changements majeurs à l'intérieur de la structure de l'enzyme pourrait expliquer le fait que la BPDO de la souche LB400 soit plus performante envers les BPC que tous les autres BPDO connues à ce jour. À l'instar de ceux de Barriault *et al* (2002), nos

résultats montrent l'intérêt d'expérimenter diverses autres variations sur de courtes chaînes de BphA de LB400 comme approche visant à identifier plus précisément les déterminants de la reconnaissance enzyme-substrat et à augmenter le potentiel de transformation de la BPDO. Une meilleure connaissance de l'influence de la structure sur l'activité, favorisera le développement d'enzymes plus efficaces ou possédant un spectre de transformation envers les BPC plus large ou varié que celui des BPDO connus jusqu'ici.

Mondello *et al* (1997) ont construit les mutants BDE335-5 dans lequel la région III de BphA de LB400 (T³³⁵F³³⁶N³³⁷N³³⁸I³³⁹R³⁴⁰I³⁴¹) a été remplacée par la région III de BphA1 de KF707 (A³³⁴I³³⁵N³³⁶T³³⁷I³³⁸R³³⁹I³⁴⁰) et FMT335-5 dans lequel les régions III et IV de BphA de LB400 (T³³⁵F³³⁶N³³⁷N³³⁸I³³⁹R³⁴⁰I³⁴¹N³⁷⁷) ont été remplacées par les régions III et IV de BphA1 de KF707 (A³³⁴I³³⁵N³³⁶T³³⁷I³³⁸R³³⁹T³⁴⁰T³⁷⁶). Ces mutants ont acquis une activité catalytique accrue envers les congénères doublement substitués en *para* comme le 44'CB. Cependant, le mutant FMT335-5 a été faiblement actif envers le 22'CB et il a été inactif envers 22'55'CB. Notamment, cette étude a permis de constater que conjointement aux modifications de la région III, le changement de N³⁷⁷ de la région IV de BphA de LB400 par le résidu correspondant T³⁷⁶ de BphA1 de KF707 confère un profil d'activité envers les BPC similaire à la BPDO de KF707, réduisant drastiquement ses capacités à catalyser l'oxygénation en *meta* et *para*. Ceci démontre un effet combinatoire des régions III et IV sur le profil de sélection de l'enzyme. Cette observation a été confirmée par le fait que le remplacement de T³⁷⁶ de BphA1 de KF707 par N crée une nouvelle enzyme qui acquiert la capacité de catalyser une dioxygénation en position 3 et 4 du 22'55'CB (Kimumura, 1997; Suenaga *et al*, 1999). Il est à noter que les régions III et IV de BphA de B356 sont identiques à celles de BphA1 de KF707 à l'exception d'une alanine (A³³⁴) de KF707 qui est remplacée par une glycine dans BphA de B356 (Hurtubise *et al*, 1998).

La structure de la dioxygénase du biphenyle n'est pas encore connue. Cependant, la structure de la dioxygénase de la naphthalène (NDO) est un modèle

pour tous les membres de la famille des dioxygénases catalysant une hydroxylation sur les sites aromatiques (Kauppi *et al*, 1998; Parales *et al*, 2000). Cette enzyme retrouvée sous forme d'hexamère, $\alpha_3\beta_3$, porte dans la sous-unité α un centre Rieske [2Fe-2S] qui transfère les électrons vers le Fe^{2+} mononucléaire du site actif de l'enzyme situé dans le domaine C-terminale de la sous-unité α (Kauppi *et al*, 1998). Notons cependant, que chaque centre Rieske interagit avec le Fe^{2+} mononucléaire de la sous-unité α adjacente à celle à laquelle il appartient. Chaque cycle catalytique implique donc un transfert d'électrons entre deux sous-unités α distinctes. Ainsi, toutes modifications structurelles qui pourraient potentiellement changer les distances entre les deux sous-unités α adjacentes pourraient avoir des conséquences néfastes sur l'activité de l'enzyme par une interaction inadéquate entre le centre Rieske et le Fe^{2+} mononucléaire. De plus, d'autres études enzymatiques ont révélé l'influence de la sous-unité β de la BPDO sur la spécificité enzymatique (Chebrou *et al*, 1999; Hurtubide *et al*, 1998). Ainsi, ces études suggèrent que d'autres domaines extérieures aux régions III et IV de la partie C-terminales de la sous-unité α de BphA peuvent influencer le profil de réactivité de la BPDO. L'analyse des hybrides de la BPDO de LB400 et de B356, qui ont fait l'objet de cette étude, confirme ces observations.

Lors d'essais *in vitro* envers les congénères individuels, les hybrides LABD et LAD qui possèdent les régions III et IV ciblées par Mondello *et al* (1997) de la BPDO de B356 se sont avérés plus actifs envers le 22'CB que la BPDO de B356 et ont montré des traces d'activité envers le 22'55'CB. De plus, ils ont présenté une activité enzymatique semblable à la BPDO de B356 envers le 33'CB tandis qu'ils ont été inactifs envers le 44'CB. D'autre part, les hybrides LBC et LBCD qui possèdent les régions III et IV de la BPDO de LB400 ont montré une faible activité envers le biphenyle ainsi qu'une activité plus élevée que la BPDO de LB400 envers le 44'CB; cependant LBC est incapable d'oxygéner le 22'CB et 22'55'CB. Si les régions III et IV ont été les seuls déterminants de la spécificité, les hybrides LBC et LBCD auraient dû être capables de transformer ces deux congénères. D'autre part, les hybrides LABD et LAD auraient dû pouvoir transformer le 44'CB et être incapables d'oxygéner le 22'CB et le 22'55'CB (Mondello *et al*, 1997; Kimura *et al*, 1997;

Suenaga *et al*, 1999). Ceci démontre que les régions III et IV ne sont pas les seuls éléments structuraux qui influencent le profil de transformation envers les congénères substitués en *ortho*.

Conformément aux résultats d'études antérieures, l'activité spécifique des préparations purifiées que nous avons obtenues de la BPDO de la souche B356 a été plus élevée sur le biphenyle que celle de la BPDO de LB400 (Hurtubise *et al*, 1998). Les essais enzymatiques effectués en présence de biphenyle ont démontré que les hybrides LAD et LA ont une activité spécifique similaire à la BPDO de B356. Ceci suggère que le fragment B + C de BphA de B356 présent dans LAD et LA influencerait le maintien d'une activité plus forte envers le biphenyle. D'autre part, les hybrides LAD, LA et LABD qui possèdent le fragment B de BphA de B356, ont présenté une activité catalytique équivalente à la BPDO de B356 envers le congénère 33'CB, qui est son substrat préférentiel en plus d'être inactifs envers le 44'CB. Au contraire, la présence du fragment C de LB400 a semblé favoriser la transformation du 44'CB, tel qu'observé pour les hybrides LACD, LBC et LBCD. Tel qu'abordé précédemment, ces résultats vont à l'encontre des études menées par Erickson et Mondello (1997) qui suggéraient que la région III de KF707, présente dans le fragment C, portait le déterminant permettant à l'enzyme d'oxygéner le congénère 44'CB efficacement. En effet, rappelons que la région III de BphA1 de KF707 est identique à un acide aminé près à celle de BphA de B356 (Hurtubise *et al*, 1998). Le fait que les variants LACD, LBC et LBCD portent la région III provenant de LB400 montre que cette région n'est pas la seule à influencer la réactivité de l'enzyme envers le 44'CB. En somme, certains acides aminés peuvent influencer grandement le profil catalytique d'une BPDO donnée (Erickson et Mondello, 1993; Mondello *et al*, 1997; Kimura *et al*, 1997; Suenaga *et al*, 1999). Toutefois, ces mêmes résidus aminés témoignent d'une plus faible influence dans le contexte structural d'autres BPDO. Cette constatation est confirmée par le fait que le remplacement de la région III de BphA de LB400 par celle de BphA de B-356 confère aux nouveaux variants, un potentiel de transformation des BPC très élevé (Barriault *et al*, 2002). Toutefois, le potentiel de transformation des BPC et de ces variants diminue considérablement

lorsqu'ils subissent une mutation causant le changement de l'Ala²⁶⁷ de BphA de LB400 par une sérine, comme pour BphA de B-356 (Barriault *et al* 2002).

Notre étude montre aussi une influence de la sous-unité β de LB400 sur le maintien d'une activité catalytique envers les congénères 22'CB et 22'55'CB par les hybrides LACD, LAD, LBCD et LABD. Ces résultats corroborent ceux obtenus par Hurtubise *et al* (1998) suite à l'analyse de l'activité enzymatique d'hybrides construits par l'échange complet des sous-unités α et β des BPDO de B356 et LB400. L'hybride $\alpha_{B356}\beta_{LB400}$ a maintenu une activité équivalente à la BPDO de LB400 envers la transformation du 22'CB et du 22'55'CB, alors qu'une diminution de ces activités a été observée pour l'hybride $\alpha_{LB400}\beta_{B356}$.

Ainsi, pour un type d'association α/β , des changements mineurs au niveau de la structure de la sous-unité α peuvent affecter fortement la spécificité d'une BPDO. Par exemple, l'altération de la T³⁷⁶ de la région IV de BphA de KF707 par le résidu N³⁷⁷ de la région IV de BphA de LB400 conduit à l'élargissement remarquable du spectre de transformation comprenant un gain d'activité d'hydroxylation en position 3,4 du noyau biphenyle. Ainsi, un seul acide aminé peut changer grandement le profil de transformation des BPC d'une enzyme donnée (Kimura *et al*, 1997; Mondello *et al*, 1997). Un exemple similaire a été rapporté au niveau d'une substitution du résidu Phe³⁵² par une valine localisée au site actif de la NDO. La NDO parentale, qui catalyse l'oxygénation du biphenyle sur les atomes de carbone en position 2 et 3 principalement, a acquis par cette substitution une capacité à transformer le biphenyle à 96% en *cis*-biphenyle-3,4-dihydrodiol (Parales *et al*, 2000). Cependant, Hurtubise *et al* (1998) ont démontré que malgré de grandes similarités entre les régions clés identifiées par Mondello *et al* (1997) entre BphA1 de KF707 et BphA de B356, les traits caractéristiques structurels de la sous-unité α en partie C-terminale qui influencent fortement la spécificité de KF707 et LB400, n'influencent pas de la même façon l'activité de la BPDO de B356.

D'autre part, une analyse du potentiel des hybrides entre les BphA de LB400 et B356 à transformer un mélange de 18 congénères a fait ressortir différentes autres caractéristiques des enzymes. Les hybrides LB, LBC, LBCD et LABD ont témoigné d'une activité envers des congénères BPC tetra, penta et hexa-chlorés (tableau 12). La présence des fragments A de B356 et B de LB400 dans LB, LBC et LBCD suggère que ces portions de BphA favoriseraient chez ces hybrides la transformation des congénères doublement substitués en *ortho*, *meta* et *para* comme les congénères 33'44'CB et 23'44'5CB présents dans le mélange. Plus précisément, le fragment B de LB400 présent dans LB, LBC, LBCD et LABD semble avantager les BPDO hybrides à transformer le congénère 22'44'55'CB.

Selon le tableau 12, les hybrides LB, LBC et LBCD ont semblé se spécialiser dans la transformation des congénères co-planaires en perdant l'activité envers le 22'CB et gagnant une activité envers le 33'44'CB et aussi envers le 44'CB pour les hybrides LB et LBCD. L'acquisition d'une capacité à transformer le 33'44'CB, qui est un congénère co-planaire, persistant et toxique est très intéressante. Jusqu'à présent, aucune dioxygénase n'a été identifiée comme étant capable de transformer ce congénère substitué en *di-para* et des plus récalcitrant dans l'environnement. Par sa structure tridimensionnelle, ce dernier simule les dioxines et les furannes.

En somme, cette première partie de notre travail a permis de confirmer que des domaines structuraux autres que les régions III et IV peuvent influencer la spécificité de l'enzyme envers les congénères BPC complexes. Chebrou *et al* (1999) ont suggéré que la structure tridimensionnelle, $\alpha_3\beta_3$, modulait le site actif ou favorisait les interactions entre certains acides aminés et certains congénères BPC. L'approche rationnelle est basée sur la compréhension de la structure tridimensionnelle de la protéine et sur les interactions enzyme/substrat afin d'apporter des modifications spécifiques à l'amélioration du spectre d'activité de l'enzyme. En vain, les résultats d'essais effectués afin de changer les propriétés de l'enzyme par des modifications rationnelles sont souvent inattendus, car les effets de substitutions d'acides aminés sur la structure et sur la fonction de l'enzyme ne correspondent pas aux résultats

escomptés (Kikuchi *et al*, 1999). En conséquence, il est probablement plus laborieux de suivre une telle approche pour développer de nouvelles enzymes dû aux effets fortuits des substitutions.

4.2 Influence de la concentration totale d'un mélange de BPC sur le spectre de transformation de la BPDO de LB400

La première partie de l'étude de caractérisation enzymatique des hybrides a été effectuée par l'analyse chromatographique HPLC des congénères BPC ajoutés au mélange réactionnel. Les concentrations des congénères analysés individuellement dans le milieu réactionnel a été de l'ordre du nanomole. Par contre, l'analyse de l'activité des BPDO hybrides envers le mélange BPC a été effectuée par GC-ECD à des concentrations de l'ordre du picomole. Il a été observé que la concentration finale de la totalité des congénères lors d'un essai enzymatique peut influencer grandement le profil de sélection. Par exemple, lorsque le 22'CB a été le seul substrat, les suspensions de *E. coli* exprimant la BPDO de LB400 le dégradait complètement pour des concentrations de 50 nmoles/ml à 125 nmoles/ml (tableau 9). Par contre, la transformation du 22'CB a été de 56,6 % seulement à une concentration de 50 nmoles/ml lorsqu'il a été présent dans un mélange constitué de 5 congénères BPC (tableau 10) et de 25,6 % à une concentration de 125 nmoles/ml (tableau 11). Cette modification dans la capacité de transformer le 22'CB suggère que le spectre d'activité de la BPDO est aussi influencé par la concentration finale du mélange BPC. Cette influence peut être attribuée à l'inhibition causée par certain congénères reconnus pour être transformés efficacement. Mukerjee-Dhar *et al* (1998) ont fait ces mêmes constatations. La souche étudiée, *Burkholderia sp.* TSN101, a l'habilité de transformer le mélange kaneclor 300, qui est un mélange de BPC comparable à l'Aroclor 1242. À 25 µg/ml de kaneclor 300, TSN101 dégradait les congénères di- et trichlorés substitués en position *ortho*, *meta* et *para*. Cependant, à plus hautes concentrations (150 µg/ml de kaneclor 300) les di- et trichlorobiphényles substitués en position *ortho* cessaient d'être transformés mais les trichlorobiphényles substitués en position *para* et *meta* ont été transformés à des niveaux semblables à ceux obtenus

en présence de 5 µg/ml de kaneclor 300 (Mukerjee-Dhar *et al*, 1998). Ainsi, à forte concentration, l'activité enzymatique envers les congénères substitués en position *ortho* est affectée. À partir de cette constatation, l'analyse sur GC-ECD s'est avérée l'alternative qui permettait d'utiliser de très faibles concentrations d'un mélange BPC pour contrer le phénomène d'inhibition observée à de fortes concentrations.

Malgré cette précaution, des variations subsistent dans l'analyse des spectres de transformation déterminée par HPLC et GC-ECD, tel qu'observé pour la BPDO de LB400. Cependant, il faut considérer le fait que tous les essais par HPLC ont été effectués en utilisant des préparations de protéines purifiées, alors que les essais sur GC-ECD ont été effectués *in vivo*. Plusieurs facteurs peuvent influencer l'activité de l'enzyme. De ces facteurs, l'accessibilité de l'enzyme aux substrats peut jouer un rôle, la concentration d'enzyme utilisée qui diffère ou la qualité de l'enzyme en considérant qu'en essais *in vitro* l'enzyme subit des étapes de purification pouvant affecter partiellement sa structure protéique. De plus, la perméabilisation de la membrane bactérienne à certains congénères plus qu'à d'autres peut jouer un rôle dans l'accessibilité d'un substrat donné. Les résultats d'évaluation des capacités des oxygénases à transformer des BPC devraient toujours être comparables pour des conditions d'analyses identiques. Ces résultats suggèrent aussi que les spectres de transformation risquent d'être partiellement modifiés une fois introduits dans un autre type de système d'analyse enzymatique ou dans l'environnement, soit au contact de sols ou de déchets contaminés car les concentrations auxquelles les souches pourront être exposées seront probablement d'un autre ordre de grandeur.

4.3 L'intérêt d'une approche empirique afin de favoriser le développement de BPDO variants à haut potentiel catabolique envers les BPC

Une approche empirique, tel le processus de l'évolution directe *in vitro*, aussi nommée *DNA shuffling*, peut s'avérer un outil indispensable pour augmenter l'efficacité des BPDO à transformer les BPC. La rapidité de la méthode ainsi que les multiples possibilités de recombinaisons aléatoires sont des atouts intéressants afin d'obtenir des variants ayant un spectre de transformation plus large ou différent envers les congénères BPC. Cette approche a d'ailleurs fait ses preuves par le succès obtenu en recombinant le gène *bphA* de la souche LB400 avec *bphA1* de la souche KF707 (Brühlmann and Chen, 1999; Kumamaru *et al*, 1998) qui possèdent 95,5% d'homologie (Erickson and Mondello, 1992; Taira *et al*, 1992). Les hybrides obtenus ont démontré une activité de transformation accrue envers les congénères tetra et penta-chlorés comparativement aux enzymes parentales, ainsi qu'une capacité à transformer à la fois les congénères 44'CB, 22'CB et 22'55'CB. Toutefois, aucune dioxygénase jusqu'à présent a démontré la capacité de transformer des congénères substitués en *ortho*, tels le 2,6-dichlorobiphényle et le 2,2',6,6'-tetrachlorobiphényle qui résistent aux transformations aérobies et aux déshalogénations anaérobies (Maltseva *et al*, 1999)

Afin d'arriver à ces fins, des modifications structurelles majeures sont peut-être requises. L'application de la technique d'évolution moléculaire aléatoire *in vitro* à une famille de gènes ayant moins d'homologie entre eux, nommé *family shuffling*, suggérée par Crameri *et al* (1998), demeure une approche empirique intéressante. Cette approche permet l'introduction de modifications structurelles substantielles sur une protéine. On estime qu'entre les gènes ayant une grande homologie, une cinquantaine de cycles d'évolution aléatoire *in vitro* (générations) seront nécessaires pour obtenir les variants possédant les caractéristiques recherchées, alors que pour des gènes ayant entre 58% et 82% d'homologie, une seule génération est nécessaire pour l'obtention du trait recherché (Crameri *et al*, 1998). Une rigoureuse pression de sélection est toutefois nécessaire pour éliminer tous les recombinants non désirables et

retenir la progéniture ayant les caractéristiques phénotypiques recherchées. Afin de réduire le nombre de variants de BPDO à analyser, le procédé de *family shuffling* a été effectué sur une portion de *bphA*. L'approche encouragée a consisté à recombinaison la partie C-terminale de la sous-unité α de LB400 avec une portion correspondante du gène homologue à 76,2% de la BPDO de la souche B356 en suivant le protocole de recombinaison aléatoire (figure 15).

4.3.1 Variants de seconde génération

Dans notre étude, nous n'avons pas criblé les variants résultant du premier cycle de recombinaison *in vitro* aléatoire (première génération). En nous basant sur les résultats de Ness *et al* (1999), nous avons plutôt utilisé toute la population de variants obtenue du premier cycle, pour faire un deuxième et un troisième cycles de recombinaison. Le but de cette approche a été de favoriser au maximum le niveau de modifications de séquences des acides aminés dans la région ciblée. La tendance générale tend à démontrer que tous les hybrides de deuxième génération ont acquis une activité d'oxygénation plus performante en *ortho*, tel qu'observé par leur efficacité à transformer les congénères 23'4CB et 234'CB. Cependant, comme pour la BPDO de LB400, le site actif semblait demeurer peu réceptif envers les congénères portant un chlore en position *para* comme le 244'CB et le 44'CB. D'autre part, en plus d'avoir l'habileté à transformer les congénères 23'4CB et 234'CB, les hybrides II-G et II-I ont aussi préservé une activité envers le 33'CB équivalente à la BPDO de LB400. Hormis leur ressemblance avec l'activité de la BPDO de LB400 envers les congénères portant des atomes de chlore en *ortho-meta*, ces derniers ont perdu toute trace d'activité d'oxygénation en position *meta-para*. Contrairement à la majorité des hybrides de deuxième génération, les hybrides II-6, II-14 et tout particulièrement II-H témoignent d'une plus grande habileté à accepter des congénères co-planaires ainsi que ceux ayant une distorsion de l'axe dû aux encombrements stériques. Ainsi, l'hybride II-H est capable de transformer le 26CB, le 33'CB et le 22'33'CB, l'hybride II-14 transforme le 22'33'CB et l'hybride II-6 transforme le 33'CB et 22'44'55'CB en plus de transformer les congénères 23'4CB et 234'CB.

L'hybride II-H est celui qui présente le plus grand intérêt. Tout comme pour les congénères 33'44'-tetrachlorobiphényle et 22'66'-tetrachlorobiphényle, le 2,6-dichlorobiphényle est persistant et toxique (Maltseva *et al*, 1999). De plus, l'hybride II-H, comme la BPDO de KF707 est capable de transformer le 44'CB et le 244'CB (Mondello *et al*, 1997). Cependant, II-H démontre une plus grande efficacité à transformer le 44'CB et le 244'CB en plus de transformer les congénères 33'CB, 23'4CB, 234'CB et 22'33'CB exigeant une oxygénation *ortho-meta*. Ceci suggère que le site actif de II-H est très flexible et peut performer plus que tout autre à une oxygénation en position *ortho-meta*.

4.3.2 Gain d'une capacité à transformer l'indole en indigo

Les résultats visuels de l'activité de transformation sur milieu gélosé des hybrides obtenus au cours du deuxième cycle de recombinaison aléatoire ont démontré la formation de colonies de couleur bleue. Ce phénomène a aussi été observé sur des hybrides obtenus en recombinant *bphA* de la BPDO de LB400 et de *bphA1* KF707 (Kumamaru *et al*, 1998). En particulier, l'hybride pSHF1003 (Kumamaru *et al*, 1998) a témoigné d'une augmentation de ces capacités à oxygéner en position 2 et 3, de même qu'il a acquis une nouvelle activité enzymatique qui permet de transformer l'indole en indigo. Dans la littérature, cette capacité de produire de l'indigo par la catalyse de l'indole a été observée pour quelques dioxygénases et monooxygénases impliquées dans le métabolisme d'hydrocarbures aromatiques, tel le toluène, le phénol, le styrène et la naphtalène. Mais jusqu'à présent, aucune dioxygénase du biphényle n'avait été rapportée capable de transformer l'indole. En se basant sur des études réalisées avec d'autres congénères, la dioxygénase du biphényle cataboliserait l'indole en *cis*-indole-2,3-dihydrodiol suivi d'une élimination spontanée d'une molécule d'eau et d'une polymérisation du métabolite intermédiaire pour former de l'indigo (Ensley *et al*, 1983). Cette nouvelle habileté a été retrouvée pour les hybrides obtenus d'une deuxième génération. Ces hybrides ont été identifiés par le fait que certaines colonies de la progéniture ont été

bleuâtres. L'analyse préliminaire du spectre d'activité des hybrides de deuxième génération présentant cette caractéristique envers un mélange de 18 BPC et envers Aroclor 1242 a permis de constater une augmentation d'activité de ces variants envers les congénères portant des atomes de chlore en position 2 et 3 correspondant aux résultats de Kumamaru et *al* (1998) (résultats non présentés). Ceci suggère que l'acquisition d'une activité de transformation plus efficace en *ortho-meta* a permis aux hybrides de deuxième génération de bénéficier d'une nouvelle activité sur l'indole..

4.3.3 Variants de troisième génération

Selon les statistiques, plus le nombre de séquences et de mutations augmentent, plus les probabilités d'identifier des recombinants intéressants diminuent. La fréquence de variants capables de transformer le 22'CB, qui ont été obtenus au cours du troisième cycle de recombinaison aléatoire ont été similaires à celle du deuxième cycle de recombinaison aléatoire. Par contre, l'analyse des variants de troisième génération témoigne d'un potentiel catabolique plus spécifique ou plus restreint. Moins efficace que la BPDO de LB400, leur potentiel catabolique a été dirigé vers les tetrachlorobiphényles, tel le 22'55'CB et le 22'33'CB, suggérant une capacité de porter une attaque en position 3,4 et en position 2,3 respectivement, qui serait intéressant à confirmer par l'analyse des métabolites par GC-MS. Étonnamment, la majorité d'entre eux ont l'habilité à transformer le 23'4CB sans toutefois être capable de transformer le 234'CB comme les hybrides de la deuxième génération. Pour l'instant, nous n'avons pas d'explication permettant de rationaliser la différence entre les variants de deuxième et troisième génération. Une étude plus approfondie incluant l'analyse de leur séquence en acides aminés permettra d'avoir des hypothèses à ce sujet.

4.3.4 Variant II-H

Selon la séquence en acide aminé de l'hybride II-H, ce dernier correspond exactement au recombinant LAD de la première partie de cette étude à l'exception d'une mutation ponctuelle au niveau du résidu d'acide aminé en position 309. L'hybride II-H a changé la valine par une isoleucine comme dans BphA de B356 (figure 13). LAD a démontré une flexibilité de son site actif par sa capacité d'oxygéner les congénères de diverses configurations substitués en *ortho*, *meta* et *para*, tel que le 44'CB, le 33'CB, le 23'4CB et le 234'CB. En plus de transformer ces congénères plus efficacement que LAD ou que la BPDO de LB400, II-H a aussi acquis la capacité de transformer les congénères substitués sur les atomes de carbone 2 et 6 qui, par leur encombrement stérique, crée une distorsion de 90° de l'axe de la molécule. Ainsi, la comparaison entre l'hybride II-H et LAD suggère que l'isoleucine³⁰⁹ favorise une certaine élasticité du site actif permettant des liaisons enzyme/ligand plus diversifiées allant de molécules co-planaires (180°) à celles perpendiculaires à l'axe (90°).

Mondello *et al* (1997) ont construit des hybrides en modifiant la région III de BphA de la BPDO LB400 et KF707. De ces constructions, le mutant FMT20V a subi la substitution d'une isoleucine³³⁶ de la région III pour une valine³³⁶ où ces deux résidus aminés présentent des caractéristiques similaires par leur courte chaîne de carbone latérale et par leur hydrophobicité équivalente. Malgré cela, cette conversion mineure a modifié significativement le spectre de transformation du mutant FMT20V par une perte d'activité envers certains congénères BPC. Dans plusieurs cas, les acides aminés remplacés afin d'obtenir une activité enzymatique plus efficace envers les BPC sont petits et hydrophobes. Ceci suggère que l'augmentation d'activité résulterait de la création d'un environnement plus favorable aux interactions du site catalytique de l'enzyme avec les molécules BPC hydrophobiques tout en réduisant les contraintes stériques lesquelles rendent plus difficile la transformation des congénères substitués en *di-para* (Mondello *et al*, 1997). Cependant, il est étonnant de constater que les résidus aminés similaires, telles la valine et l'isoleucine, soient en mesure de modifier

grandement le spectre de transformation de l'enzyme. Il serait intéressant d'identifier où se porte l'attaque des congénères di-*para* par l'analyse des métabolites obtenus par GC-MS, mais il est fort probable que l'attaque s'effectue sur les atomes de carbone 2 et 3 du fait que II-H est incapable de transformer le 22'55'CB qui exige une attaque sur les atomes de carbone 3 et 4.

Chapitre 5
Conclusion

5. Conclusion

Conscient de la persistance dans l'environnement de composés xénobiotiques et qui s'avèrent être toxiques pour les organismes vivants, tel que les BPC, des solutions de décontamination saines et efficaces s'imposent. Les méthodes microbiologiques de décontamination sont des alternatives intéressantes en rapport aux méthodes conventionnelles appliquées actuellement. Cependant, les micro-organismes démontrent des limites dans leur capacité à transformer ces composés polychlorés par la voie de transformation du biphenyle, qui est initiée par l'enzyme de la dioxygénase du biphenyle (BPDO). De ce constat, l'ingénierie génétique est une approche prometteuse pour contrer ce problème. Cependant, l'ingénierie de nouveaux variants de BPDO plus performants envers les BPC nécessitera une meilleure connaissance des régions protéiques qui influencent l'activité catalytique de l'enzyme.

Un premier objectif de notre travail a été de caractériser le profil de transformation de BPDO hybrides construits par l'échange de portions de BphA des souches LB400 et B356. Le but a été d'évaluer l'influence de certaines portions de l'enzyme sur son activité catalytique. Un second objectif consistait à utiliser le procédé d'évolution moléculaire *in vitro* par recombinaison aléatoire (*DNA shuffling*) pour explorer un plus grand nombre de BPDO variants qui auraient pu présenter un potentiel catabolique plus large ou varié.

À la lumière des résultats de la première partie de notre étude, la caractérisation des hybrides de la BPDO obtenus par ingénierie génétique nous a permis de confirmer que la partie C-terminale de la sous-unité α de BphA ainsi que la sous-unité β de la BPDO influencent fortement le spectre de l'activité catalytique de l'enzyme envers les congénères BPC. De plus, nous avons pu constater que sur l'ensemble des BPDO hybrides, seules celles construits en remplaçant une partie de BphA LB400 par celle de BphA de B-356 ont maintenu une activité enzymatique significative envers les congénères BPC. Ceci suggère une certaine flexibilité de BphA de LB400 lui permettant d'expérimenter un plus grand nombre de variations structurelles sans perte d'activité. Ce

constat pourrait expliquer le fait que la souche LB400 soit la plus performante parmi les souches capables de transformer les BPC qui sont connues à ce jour. D'autre part, des portions de la BPDO de LB400 et de B356 ont été identifiées comme pouvant influencer la reconnaissance enzyme/substrat. Les résultats suggèrent que les portions B + C de B356 favorisent le maintien d'une activité envers le biphényle similaire à la BPDO de B356, que la portion B de B356 permet une activité envers le 33'CB, que la portion C de LB400 favorise une activité envers le 44'CB et finalement que la présence de la sous-unité β de LB400 permet de maintenir une activité équivalente à la BPDO de LB400 sur le 22'CB et le 22'55'CB.

Dans la seconde partie de notre étude, la recombinaison aléatoire *in vitro* s'est avérée être une stratégie intéressante pour générer des variants de BPDO d'intérêt. Cette approche empirique entre gènes homologues nous a permis d'obtenir une progéniture de BPDO actives et ayant des caractéristiques enzymatiques distinctes des BPDO parentales. Notamment, le variant II-H issu d'une seconde génération de recombinaison témoigne d'une plus grande flexibilité que les parents puisqu'il a été capable d'oxygéner des congénères substitués en *ortho*, *meta* et *para* présentant diverses configurations spatiales. Ces capacités enzymatiques uniques lui permettent de transformer à 91,4% le congénère 2,6-dichlorobiphényle toxique et toujours persistant dans l'environnement.

En somme, l'ensemble de ces résultats nous amène à suggérer que pour les travaux futurs, il serait pertinent d'utiliser la BPDO de LB400 afin d'y introduire des modifications par la méthode de recombinaison aléatoire *in vitro* dans la partie C-terminale de BphA en présence de gènes homologues de différentes souches. Cette stratégie aurait l'avantage d'augmenter les possibilités de trouver des variants d'intérêt parmi la progéniture sans toutefois avoir une connaissance approfondie de l'influence de la structure tridimensionnelle de la protéine, qui par cette étude, nous a démontré être distincte d'une structure donnée à une autre.

Chapitre 6
Bibliographie

Bibliographie

- ABRAMOWICZ, D.A. 1990. " Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs : a review ". Crit. Rev. Biotech., vol. 10, p. 241-249.
- ACKERMAN, D.G., L.L. Scinto, P.S. Bakshi, R.G. Delumyea, R.J. Johnson, G. Richard, A.M. Takata et E.M. Sworzyn. 1983. " Destruction and disposal of PCBs by thermal and non-thermal methods ". Noyes Data Corporation, New Jersey : USA, p. 315-385.
- AHMAD, D., R. Massé et M. Sylvestre. 1990. "Cloning and expression of genes involved in 4-chlorobiphenyl transformation by *Pseudomonas testosteroni* : homology to polychlorobiphenyl-degrading genes in other bacteria". Gene, vol. 86, p. 53-61.
- AHMED, M., D.D. et Focht. 1972. "Degradation of polychlorinated biphenyls by two species of *Achromobacter*". Can. J. Microbiol., vol. 19, no. 1, p. 47-52.
- ALBRO P.W. et C.E. Parker. 1979. "Comparison of the compositions of Aroclor 1242 and Aroclor 1016". J. Chromatogr., vol. 169, p. 161-166.
- BARRIAULT, D, C. Simard, H. Chatel et M. Sylvestre. 2001. " Characterization of hybrid biphenyl dioxygenases obtained by recombining *Burkholderia sp.* strain LB400 *bphA* with the homologous gene of *Comamonas testosteroni* B-356". Can. J. Microbiol., vol. 47, p. 1025-1032.
- BARRIAULT, D., J. Durand, H. Maaroufi, L.D. Eltis et M. Sylvestre. 1998. " Degradation of polychlorinated biphenyl metabolites by naphthalene- catabolizing enzymes ". Appl. Environ. Microbiol., vol. 94, p. 4637-4642.
- BARRIAULT D., M.M. Plante et M. Sylvestre. 2002. "Famely shuffling of a targeted *bphA* region to engineer biphenyl dioxygenase". J. Bacteriol., vol. 184, p. 3794-3800.
- BARRIAULT, D. et M. Sylvestre. 1999a. " Functionality of biphenyl 2,3-dioxygenase components in naphthalene 1,2- dioxygenase ". Appl Microbiol Biotechnol., vol.51, p. 592-597.
- BARRIAULT, D. et M. Sylvestre. 1999b. "A ColE1-compatible expression vector for the production of His-tagged fusion proteins". Ant.Van Leeuwenhoek, vol. 75, p. 293-297.
- BARRIAULT, D. et M. Sylvestre. 1993. "Factors affecting PCB degradation by an implanted bacterial strain in soil microcosms". Can. J. Microbio., vol. 39, p. 594-602.
- BEDARD, D. L., R. Unterman, L.H. Bopp, M.J. Brennan, M.L.Haberl et C. Johnson. 1986. " Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for the ability

- to degrade polychlorinated biphenyls ". Appl. Environ. Microbiol., vol. 51, p.761-768.
- BERGERON, J., D. Ahmad, D. Barriault, A. Larose, M. Sylvestre et J. Powlowski. 1994. "Identification and mapping of the gene translation products involved in the first steps of the *Comamonas testosteroni* B356 biphenyl/chlorobiphenyl biodegradation pathway". Can. J. Microbiol., vol. 40, p. 743-753.
- BOPP, .H. 1986. "Degradation of highly chlorinated PCBs by *Pseudomonas* strain LB400". J. Ind. Microbiol., vol. 1, p. 23-29.
- BROWN, J.F., JR., R.W. Lawton, M.R. Ross, et J. Feingold. 1991. " Assessing the human health effects of PCBs ". Chemosphere, vol. 23, p.1811-1815.
- BRUHLMANN, F. et W. Chen. 1999. " Transformation of polychlorinated biphenyls by a novel BphA variant through the *meta*-cleavage pathway ". FEMS Microbiology Letters, vol.179, p. 203-208.
- BROWN, J.P., R.E. Wagner, H. Feng, D.L. Bedard, M.J. Brennan, J.C. Carnahan et R.J. May. 1987. "Environmental dechlorination of PCBs". Environ. Toxicol. Chem., vol. 6, p. 579-593.
- BRUHLMANN, F. et W. Chen. 1999. " Tuning biphenyl dioxygenase for extended substrate specificity ". Biotech. Bioeng., vol. 63, p.544-551.
- CARRIER, G. 1991. "Réponse de l'organisme humain aux BPC, dioxines et furannes et analyses des risques toxiques". Québec : Édition Le Passeur, 484p.
- CHEBROU, H., Y. Hurtubise, D. Barriault et M. Sylvestre. 1999. " Heterologous expression and characterization of the purified oxygenase component of *Rhodococcus globerulus* P6 biphenyl dioxygenase and of chimeras derived from it ". J Bacteriol., vol.181, p.4805-4811.
- CHEVREUIL, M. et L. Granier. 1992. " Les PCB : des polluants difficiles à éliminer ". La Recherche, 242 vol. p. 484-486.
- CHIARENZELLI, J., R. Scudato, M. Wunderlich et D. Rafferty. 1995. " Photodecomposition of PCB absorbed on sediments and industrial wastes : implication for photocatalytic treatment of contaminated solids ". Chemosphere, vol. 31, p. 3259-3272.
- CHOU, S.M., T. Miike, W.M. Payne et G.J. Davis. 1979. " Neuropathology of " spinning syndrome " induced by prenatal intoxication with PCB in mice ". Ann. N.Y. Acad. Sci., vol. 320, p. 373-375

- CRAMERI A., S.-A Raillard, E. Bermudez et W.P.C. Stemmer. 1998. "DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution". Nature, vol. 391, p. 288-291.
- ENSLEY, B.D., B.J. Ratzkin, T.D. Ossulund, M.J. Simon, L.P. Wackett et D.T. Gibson. 1983. "Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo". Science, vol. 22, p. 167-169.
- ERICKSON, B.D. et F.J., Mondello. 1992. "Nucleotide sequencing and transcriptional mapping of the genes encoding biphenyl dioxygenase, a multicomponent polychlorinated-biphenyl-degrading enzyme in *Pseudomonas* strain LB400". J. Bacteriol., vol.174, p.2903-2912.
- ERICKSON, B.D. et F.J., Mondello. 1993. "Enhanced biodegradation of polychlorinated biphenyls after site-directed mutagenesis of a biphenyl dioxygenase gene". Appl. Environ. Microbiol., vol. 59, no.11, p.3858-3862.
- FAINS, M.G. et J.D. Haddock. 2001. "Phenotypic and phylogenetic characterization of *Burkholderia (Pseudomonas)* sp. strain LB400". Curr. Microbiol., vol. 24, p. 269-275.
- FUOCO, R., M.P. Colombini, A. Ceccarini et C. Abate. 1996. "Polychlorinated biphenyls in Antarctica". Microchem. J., vol. 54, p. 384-390.
- FURUKAWA, K. 1982. "Microbial degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs). In Biodegradation and detoxification of environmental pollutants". CRC Press, A.M. Chakrabarty ed., Boca Raton, Florida, p.33-57.
- FURUKAWA, K., J. Hirose, A. Suyama, T. Zaiki et S. Hayashida. 1993. "Gene components responsible for discrete substrate specificity in the metabolism of biphenyl (bph operon) and toluene (tod operon)". J. Bacteriol., vol.175, p. 5224-5232.
- GARNER, C.E. et H.B. Matthews. 1998. "The effect of chlorine substitution on the dermal absorption of polychlorinated biphenyls". Toxicol. Appl. Pharmacol., vol. 149, p. 150-158.
- GIBSON D.T., D.L. Cruden, J.D. Haddock, G.J. Zylstra et J.M. Brand. 1993. Oxidation of polychlorinated biphenyls by *Pseudomonas* sp. Strain LB400 and *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. J. Bacteriol., vol. 175, p. 4561-4564.
- GUILBEAULT, G., M. Sondossi, D. Ahmad et M. Sylvestre. 1994. "Factors affecting the enhancement of PCB degradation ability of soil microbial populations". Int. Biodet. Biodegr., vol. 33, p. 73-91.
- HADDOCK, J.D., L.M. Nadim et D.T Gibson. 1993. Oxidation of biphenyl by a multicomponent enzyme system from *Pseudomonas* sp. strain LB400. J. Bacteriol., vol 175, p. 395-400.

- HADDOCK, J.D., J.R. Horton et D.T Gibson. 1995. "Dihydroxylation and dechlorination of chlorinated biphenyls by purified biphenyl 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. Strain LB400". J. Bacteriol., vol 177, p. 20-26.
- HURTUBISE, Y., D. Barriault, J. Powlowski et M. Sylvestre. 1995. "Purification and characterization of the *Comamonas testosteroni* B-356 biphenyl dioxygenase components". J. Bacteriol., vol 177, p. 6610-6618.
- HURTUBISE, Y., D. Barriault et M. Sylvestre. 1996. "Characterization of active recombinant His-tagged oxygenase component of *Comamonas testosteroni* B-356 biphenyl dioxygenase". J. Biol. Chem., vol 271, p. 8152-8156.
- HURTUBISE, Y., D. Barriault et M. Sylvestre. 1998. "Involvement of the terminal oxygenase beta subunit in the biphenyl dioxygenase reactivity pattern toward chlorobiphenyls". J. Bacteriol., vol. 180, p.5828-5835.
- HUTZINGER, O., S. Safe, et V. Zitko. 1972. "Polychlorinated biphenyls". Analabs Res. Notes, vol. 12, no. 2, p.1-11.
- HUTZINGER, O., S. Safe, et V. Zitko. 1974. "The chemistry of PCBs". CRC Press, Cheveland, Ohio, 269p.
- JENSEN, S. 1966. "Report of a new chemical hazard". New Sci., vol. 32, p. 612.
- JENSEN, S., A.G. Johnels, M. Olsson et G. Olterlind. 1966. "DDT and PCB in marine animals from Swedish waters". Nature, vol. 224, p. 247-250.
- JONES, P.H., J. de Gerlache, E. Marti, G. Mischer, M.C. Scherrer, W.J. Bontinck et H.J. Niessen. 1993. "The global exposure of man to dioxins: A perspective on industrial waste incineration". Chemosphere, vol. 26, p.1491-1297.
- KAUPPI, B., K. Lee, E. Carredano, R.E. Parales, D.T. Gibson, H. Eklund et S. Ramaswamy. 1998. "Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2- dioxygenase". Structure, vol. 6, p. 571-586.
- KIKUCHI, M., K. Ohnishi et S. Harayama. 1999. "Novel family shuffling methods for the *in vitro* evolution of enzymes". Gene, vol. 236, no. 1, p. 159-167.
- KIMBROUGH, R.D., R.A. Squire, R.E. Linder, J.L. Strandberg, R.J. Montali et V.W. Burse. 1975. "Induction of liver tumors in Sherman strain female rats by PCB Aroclor 1260". J. Natl. Cancer Inst., vol. 55, p. 1453-1459.
- KIMURA, N., A. Nishi, M. Goto et K. Furukawa. 1997. "Functional analyses of a variety of chimeric dioxygenases constructed from two biphenyl dioxygenases that are similar structurally but different functionally". J. Bacteriol. vol. 179, p. 3936-3943.

- KIYOHARA, H., S. Torigoe, N. Kaida, T. Asaki, T. Iida, H. Hayashi et N. Takizawa. 1994. "Cloning and characterization of a chromosomal gene cluster, *pah*, that encodes the upper pathway for phenanthrene and naphthalene utilization by *Pseudomonas putida* OUS82". J. Bacteriol., vol 176, p. 2439-2443.
- KUMAMARU, T., H. Suenaga, M. Mitsuoka, T. Watanabe et K. Furukawa. 1998. "Enhanced degradation of polychlorinated biphenyls by directed evolution of biphenyl dioxygenase". Nat. Biotechnol., vol. 16, p.663-666.
- LOWRY, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr et R.J. Randall. 1951 "Protein measurement with the Folin phenol reagent". J. Biol. Chem., vol. 193, p. 265-275.
- LUNT, D. et W.C. Evans. 1970. "The microbial metabolism of biphenyl". Biochem. J., vol. 118, p. 54-55.
- MACDONALD, R.W., L.A. Barrie, T.F. Bidleman, M.L. Diamond, D.J. Gregor, R.G. Semkin, W.M. Strachan, Y.F. Li, F. Wania, M. Alaee, L.B. Alaxeeva, S.M. Backus, R. Bailey, J.M. Bewers, C. Gobeil, C.J. Halsall, T. Harner, J.T. Hoff, L.M. Jantunen, W.L. Lockhart, D. Mackay, D.C. Muir, J. Pudykiewicz, K.J. Reimer, J.N. Smith et G.A. Stern. 2000. "Contaminants in the Canadian Arctic: 5 years of progress in understanding sources, occurrence and pathways". Sci. Total. Environ., vol. 254, p. 93-234.
- MALTSEVA O.V., T.V. Tsoi, J.F. Quensen III, M. Fukuda et J.M. Tiedje. 1999. "Degradation of anaerobic reductive dechlorination products of Aroclor 1242 by four aerobic bacteria". Biodegradation, vol. 10, p. 363-371.
- MASSÉ, R., D. Lalanne, F. Messier et M. Sylvestre. 1989. "Characterization of new bacterial transformation products of 1,1,1,-trichloro-2,2-bis-(4-chlorobiphenyl) ethane (DDT) by gas chromatography/mass spectrometry". Biomed. Environ. Mass. Spectrom., vol 18, p. 741-752.
- MASSÉ, R., F. Messier, L. Péloquin, C. Ayotte, et M. Sylvestre. 1984. "Microbial biodegradation of 4-chlorobiphenyl, a model compound of chlorinated biphenyls". Appl. Environ. Microbiol., vol. 47, p. 947-951.
- MASSON, J.R. et R. Cammack. 1992. "The electron-transport protein of hydroxylation bacterial dioxygenase". Annu. Rev. Microbiol., vol. 46, p. 277-305.
- MERLIN, C., D. Springael, M. Mergeay et A. Toussaint. 1997. "Organisation of the *bph* gene cluster of transposon *Tn4371*, encoding enzymes for the degradation of biphenyl and 4-chlorobiphenyl compounds". Mol. Gen. Genet., vol. 253, p.499-506.
- MONDELLO, F.J. 1989. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Pseudomonas* strain LB400 genes encoding polychlorinated biphenyl degradation. J. Bacteriol., vol. 171, p. 1725-1732.

- MONDELLO, F. J., M.P. Turcich, J.H. Lobos et B.D. Erickson. 1997. " Identification and modification of biphenyl dioxygenase sequences that determine the specificity of polychlorinated biphenyl degradation ". Appl. Environ. Microbiol., vol. 63, p.3096-3103.
- MUKERJEE-DHAR G., T. Hatta, M. Shimura et K. Kimbara. 1998. " Analysis of changes in congener selectivity during PCB degradation by *Burkholderia sp.* strain TSN101 with increasing concentrations of PCB and characterization of the bphBCD genes and gene products". Arch. Microbiol., vol. 169, p. 60-70.
- NESS JE., M. Welch, L. Giver, M. Bueno, J.R. Cherry, T.V. Borchert, W.P. Stemmer et J. Minshull. 1999. "DNA shuffling of subgenomic sequences of subtilisin". Nat Biotechnol., vol. 17, septembre, p. 893-896.
- PARALES, R. E, J.V. Parales et D.T. Gibson. 1999. "Aspartate 205 in the catalytic domain of naphthalene dioxygenase is essential for activity". J. Bacteriol., vol 181, mars, p.1831-1837.
- PARALES, R. E., K. Lee, S.M. Resnick, H.Y. Jiang, D.J. Lessner et D.T. Gibson. 2000. " Substrate specificity of naphthalene dioxygenase: Effect of specific amino acids at the active site of the enzyme ". J. Bacteriol., vol. 182, p. 1641-1649.
- PNUE. 1998. " Behavior of polychlorinated biphenyls (PCBs); final rule ". Environmental Protection Agency, 40 CFR, Parts 750-761, 92p.
- RISEBROUGH, R.W., P. Rieche, S.G. Herman, D.B. Peakall et M.N. Kirven. 1968. " Polychlorinated biphenyl in the global ecosystem ". Nature, vol. 220, p. 1098-1100.
- ROGAN, W.J., B.C. Gladen, K.L. Hung, S.L. Koong, L.Y. Shih, J.S. Taylor, Y.C. Wu, D. Yang, N.B. Ragan et C.C. Hsu. 1988. " Congenital poisoning by polychlorinated biphenyl and their contaminants in Taiwan ". Science, vol. 241, p. 334-336.
- SAFE, S., L.W. Robertson, L. Safe, A. Parkinson, S. Bendiera, T. Sawyer et M.A. Campbell. 1982. " Halogenated biphenyls : molecular toxicology ". Can. J. Physiol. Pharmacol., vol. 60, p. 1057-1064.
- SAFE, S., S. Bendiera, T. Sawyer, B. Zmudzka, G. Mason, M. Romkes, M.A. Denomme, J. Sparling, A.B. Okey et T. Fujita. 1985. " Effects of structure on binding to the 2,3,7,8-TCDD receptor protein and AHH induction-halogenated biphenyls ". Environ. Health. Perspec., vol. 61, p. 21-33.
- SAFE, S. 1990. " Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds : environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs) ". Crit. Rev. Toxicol., vol. 21, p. 51-88.

- SAMBROOK, J., E.F. Fritsch et T. Maniatis. 1989. "Molecular cloning. A laboratory manual", 2e ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- SHAW, G. 1993. "Polychlorinated biphenyl (PCBs) effects on humans and the environment". Acad. Press, édition Morton Corn, p.611-625.
- SONDOSSI, M., M. Sylvestre, D. Ahmad. 1992. Effects of chlorobenzoate transformation on the *Pseudomonas testosteroni* biphenyl and chlorobiphenyl degradation pathway. Appl. Environ. Microbiol., vol. 58, p. 485-496.
- SONDOSSI, M., M. Sylvestre, D. Ahmad et R. Massé. 1991. "Metabolism of hydroxybiphenyl and chloro-hydroxybiphenyl by biphenyl chlorobiphenyl degrading *Comamonas testosteroni*, strain B-356". J. Ind. Microbiol., vol 7, p. 77-88.
- STEMMER, W.P. 1994. "DNA shuffling by random fragmentation and reassembly : *in vitro* recombination for molecular evolution". Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A, vol. 91, p. 10747-12751.
- SUENAGA , H., M. Goto et K. Furukawa. 2001. "Emergence of multifunctional oxygenase activities by random priming recombination". J. Biol. Chem., vol. 276, p. 2250-22506.
- SYLVESTRE, M., M. Sirois, Y. Hurtubise, J. Bergeron, D. Ahmad, F. Shareck, A. Larose, D. Barriault, I. Guillemette et J.M. Juteau. 1996. "Sequencing of *Comamonas testosteroni* strain B-356 biphenyl/chlorobiphenyl dioxygenase genes : evolutionary relationships among gram-negative biphenyl dioxygenase". Gene, vol 174, p. 195-202.
- TAIRA, K., J. Hirose, S. Hayashida et K. Furukawa. 1992. "Analysis of *bph* operon from the polychlorinated biphenyl-degrading strain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707". J. Biol. Chem., vol 267, p. 4844-4853.
- TANABE, S. 1988. "PCB problems in the future : foresight from current knowledge". Envir. Pollut., vol. 50, p.5-28
- TANABE, S. et R. Tastsukawa. 1986. " Distribution, behavior and loads of PCBs in the ocean ". *In PCBs and the environment* CRC Press, J.S. Waid ed., Boca Raton, vol. 1, p. 143-161.
- TANABE, N., S. Tanabe, R. Tastsukawa. 1988. " Potentially hazardous residues of non-ortho chlorine substituted coplanar PCBs in human adipose tissue ". Arch. Environ. Health, vol. 43, p. 11-14.
- WASSERMAN, M., D. Wasserman, S. Cucos et H.J. Miller. 1979. " World PCBs map : Storage and effects in man and his biologic environment in the 1970s ". Ann. N.Y. Acad. Sci., vol. 320, p. 69-124.

YOSHIMURA, H. S. Yoshihara, N. Ozawa et M. Miki. 1979. " Possible correlation between induction modes of hepatic enzymes by PCBs and their toxicity in rats ". Ann. N.Y. Acad. Sci., vol. 320, p. 179-192.