

Université du Québec  
INRS - Institut Armand-Frappier

**ÉTUDE ET ÉVOLUTION**  
**DE LA DIOXYGÉNASE DU BIPHÉNYLE**  
**PAR RECOMBINAISON ALÉATOIRE *IN VITRO***

Par  
Julie Vézina

Thèse présentée  
pour l'obtention  
du grade Philosophiae doctor (Ph.D.)  
en biologie

Jury d'évaluation

Président du jury  
et examinateur interne

**Réjean Beaudet**  
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

**Marc Sirois**  
Groupe de recherche en oncologie et  
endocrinologie moléculaire(GROEM)  
Université du Québec à Trois-Rivières

Examineur externe

**Diane Fournier**  
Héma-Québec  
Professeur Associé, Département de  
Microbiologie et Immunologie,  
Université de Montréal

Directeur de recherche

**Michel Sylvestre**  
INRS-Institut Armand-Frappier

## Résumé


Les biphényles polychlorés (BPC) sont des composés aromatiques classés comme polluants organiques persistants. La dégradation des BPC en chlorobenzoates, premier segment de la minéralisation, suit une voie oxydative de 4 étapes dont la première est catalysée par la dioxygénase du biphényle (BPDO). Cette enzyme catalyse l'hydroxylation de deux atomes de carbone adjacents situés sur l'un des cycles du biphényle. Cependant, les différentes BPDO retrouvées dans la nature ne peuvent dégrader qu'une fraction des 209 congénères BPC existants. Des études ont démontré que la spécificité de la BPDO est déterminée en partie par des segments de la portion C-terminale de la sous-unité  $\alpha$  (BphA) de la composante catalytique de l'enzyme (BphAE).

Le projet consistait dans un premier temps à examiner la diversité des séquences d'acides aminés contenues dans les sols et codant pour la partie C-terminale de BphA. Des séquences hautement conservées de ce fragment ont servi d'amorces pour amplifier cette partie du gène par PCR. Cet ADN permettait d'examiner des gènes de bactéries non cultivables en laboratoire et d'isolats bactériens dont les gènes *bphA* n'avaient pas été caractérisés. La seconde partie du projet visait à modifier génétiquement BphA afin d'obtenir des enzymes recombinantes présentant un potentiel catalytique accru ou une régiospécificité nouvelle. Un protocole d'évolution moléculaire par recombinaison aléatoire *in vitro* (*family DNA shuffling*) utilisant des fragments du gène *bphA* amplifiés par PCR sur l'ADN isolé directement à partir d'échantillons de sols contaminés par les BPC a été mis au point afin d'exploiter le bagage génétique des bactéries non cultivables du sol.

L'analyse des séquences en acides aminés des fragments d'ADN obtenus révèle que certaines BphA contenues dans les sols divergent des familles phylogéniques présentes chez les isolats bactériens. Ces BphA forment une nouvelle branche phylogénique entre la famille I des protéobactéries (famille des souches *Bulkholderia xenovorans* LB400 et *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707) et la famille II des

protéobactéries (famille de la souche *Pandoraea pnomenusa* B356). Cependant, les séquences des régions particulièrement importantes au niveau de la spécificité de l'enzyme sont similaires à celles de la souche *P. pseudoalcaligenes* KF707 et présentent peu de variations.

Aucune des BphA recombinantes obtenues par *family shuffling* ne démontre un potentiel catalytique envers les BPC qui soit supérieur aux BphA déjà décrites dans la littérature. Cependant certaines révèlent un angle d'attaque en position 5,6 du noyau biphényle différent de ceux connus chez les souches isolées en laboratoire. De plus, contrairement aux autres variants sélectionnés, le variant S100 n'a conservé que ce seul angle et acquis une activité spécifique accrue envers le biphényle. La mutagenèse dirigée effectuée sur les variants cible certains résidus dont M<sup>237</sup>S<sup>238</sup> et S<sup>283</sup> pouvant être impliqués au niveau de la capacité du variant S100 à métaboliser les congénères *ortho*-substitués. Cependant, ces résidus ne semblent pas influencer la régiospécificité envers le 2,2'-CB. Le variant S100 attaque aussi les composés monoaromatiques comme le toluène et le benzène, une capacité quasi nulle chez la BPDO de la souche parentale LB400.



**Julie Vézina**



**Michel Sylvestre**

## Remerciements

Ce travail qui s'est échelonné sur plusieurs années n'aurait pu être réalisé sans le soutien constant et essentiel de Michel Sylvestre et de Diane Barriault. Je tiens à les remercier de leur présence et de leur confiance tout au long de mon cheminement. Je veux tout particulièrement souligner l'écoute et la patience de M. Sylvestre qui m'ont permis de terminer ce que j'avais entrepris.

Je veux aussi souligner l'amitié et les conseils de Mahmood Mahommadi. Il n'a pas son pareil pour remonter le moral et pour remettre les choses en perspective lorsque l'on a l'impression que le ciel nous tombe sur la tête.

Je dédie cette thèse à mes parents, Catherine et Jean-Guy, sans qui je ne me serais jamais rendue aussi loin. Ils ont été un appui inestimable durant ces dernières années.

À vous tous, merci.

## Tables des matières

Résumé.....	ii
Remerciements.....	iv
Liste des figures et des tableaux .....	ix
Introduction.....	1
État des connaissances.....	4
1.1 Les biphényles polychlorés (BPC).....	4
1.1.1 Historique .....	4
1.1.2 Caractérisation chimique et physique des BPC .....	5
1.1.3 Effets physiologiques.....	6
1.1.4 Élimination environnementale.....	7
1.2 Dégradation des BPC par les bactéries du sol.....	9
1.2.1 Voie catabolique des BPC chez les bactéries aérobies.....	9
1.2.2 Isolats bactériens dégradant les BPC .....	11
1.2.3 Structure génomique du locus <i>bph</i> chez divers isolats bactériens.....	14
1.3 La dioxygénase du biphényle.....	17
1.3.1 Généralités .....	17
1.3.2 Évolution de la BPDO .....	18
1.3.3 Mécanisme d'action et spécificité de la BPDO.....	20
1.3.3.1 Mécanisme d'action.....	21
1.3.3.2 Angle d'attaque et spécificité.....	23
1.4 Structure de la BphAE .....	25
1.4.1 Régions de BphAE responsables des variations de spécificité envers le substrat.....	27
1.4.4.1 Rôle de <i>BphA</i> .....	27
1.4.4.2 Rôle de <i>BphE</i> .....	31
1.5 Évolution moléculaire.....	32
1.5.1 L'évolution moléculaire par recombinaison aléatoire <i>in vitro</i> de familles de gènes.....	34
1.5.2 Ingénierie de la dioxygénase du biphényle .....	36

Chapitre I.....	38
2.1 Rappel de la problématique et des objectifs de recherche .....	38
2.2 Matériel et méthodes.....	39
2.2.1 Mise au point des conditions PCR pour amplifier le fragment C-terminal de <i>bphA</i> à partir de l'ADN génomique extrait d'isolats bactériens .....	39
2.2.1.1 <i>Souches bactériennes et conditions de culture</i> .....	39
2.2.1.2 <i>Plasmides et protocoles généraux de biologie moléculaire</i> .....	40
2.2.1.2.1 Plasmides	40
2.2.1.2.2 Isolement de l'ADN génomique et plasmidique	40
2.2.1.2.3 Clonage des fragments PCR obtenus des isolats	40
2.2.1.2.4 Séquençage des clones obtenus	42
2.2.1.3 <i>Amplification PCR de la partie C-terminale de bphA</i> .....	42
2.2.1.4 <i>Analyse de la variabilité des séquences obtenues</i> .....	43
2.2.2 Amplification du fragment C-terminal de gènes <i>bphA</i> homologues présents dans l'ADN extrait des sols, et évaluation de la variabilité du gène <i>bphA</i> dans la nature .....	44
2.2.2.1 <i>Souches bactériennes, sols et conditions de culture</i> .....	44
2.2.2.1.1 Échantillons de sols	44
2.2.2.1.2 Souches bactériennes	45
2.2.2.2 <i>Plasmides et protocoles généraux de biologie moléculaire</i> .....	45
2.2.2.2.1 Isolement de l'ADN génomique et plasmidique	45
2.2.2.2.2 Clonage des fragments PCR obtenus des sols	45
2.2.2.2.3 Séquençage des clones obtenus	46
2.2.2.3 <i>Amplification PCR de la partie C-terminale de bphA</i> .....	46
2.2.2.4 <i>Analyse de la variabilité des séquences obtenues</i> .....	46
2.3 Résultats.....	48
2.3.1 Identification des amorces dégénérées potentielles .....	48
2.3.2 Isolats bactériens.....	51
2.3.2.1 <i>Amplification PCR de bphA à partir d'ADN génomique extrait d'isolats bactériens</i> .....	51
2.3.2.2 <i>Analyse des séquences des fragments C-terminaux de bphA provenant d'isolats bactériens</i> .....	52
2.3.3 Sols contaminés aux BPC .....	57
2.3.3.1 <i>Amplification PCR de bphA à partir d'ADN génomique extrait directement des sols contaminés aux BPC</i> .....	57
2.3.3.2 <i>Analyse des séquences des fragments C-terminaux de bphA provenant des sols contaminés aux BPC</i> .....	58
2.4 Discussion.....	62

Chapitre II .....	71
3.1 Rappel de la problématique et des objectifs de recherche .....	71
3.2 Matériel et méthodes.....	72
3.2.1 Évolution moléculaire <i>in vitro</i> de famille de gènes ( <i>family shuffling</i> ).....	72
3.2.1.1 Souches bactériennes et conditions de culture, sols et produits chimiques .....	72
3.2.1.2 Plasmides et protocoles de biologie moléculaire .....	73
3.2.1.2.1 Plasmides .....	74
3.2.1.2.2 Isolement de l'ADN génomique et plasmidique .....	74
3.2.1.2.3 Endonucléases de restriction .....	74
3.2.1.2.4 Ligation et transformation .....	74
3.2.1.2.5 Séquençage des clones obtenus .....	75
3.2.1.3 Stratégie de recombinaison aléatoire <i>in vitro</i> de famille de gène ( <i>family shuffling</i> ) .....	75
3.2.1.3.1 Préparation des fragments .....	75
3.2.1.3.2 PCR sans amorce et amplification des fragments pleine longueur .....	75
3.2.1.3.3 Criblage des variants obtenus .....	78
3.2.1.4 Évaluation du potentiel catabolique des variants envers les chlorobiphényles.....	80
3.2.2 Caractérisation biochimique des variants S100, S149 et S151 .....	81
3.2.2.1 Essais utilisant des cellules entières .....	81
3.2.2.1.1 Clonage des variants S100, S149, S151 dans l'environnement <i>bphFG</i> .....	81
3.2.2.1.2 Séparation des métabolites par chromatographie en phase gazeuse et analyse par spectrométrie de masse .....	82
3.2.2.2 Essais utilisant les enzymes purifiées et quantification de l'activité catalytique des <i>BphAE</i> issues des variants.....	83
3.2.2.2.1 Purification des enzymes recombinantes .....	83
3.2.2.2.2 Analyse des métabolites des réactions enzymatiques par GC-MS .....	84
3.2.2.2.3 Quantification de l'activité enzymatique basée sur la consommation en oxygène .....	85
3.2.3 Caractérisation du <i>cis</i> -5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-CB.....	86
3.2.3.1 Purification du métabolite par chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC).....	86
3.2.3.1.1 Purification du métabolite par HPLC .....	86
3.2.3.1.2 Analyse des métabolites purifiés par HPLC et GC-MS .....	86
3.2.3.1.3 Analyse du métabolite par résonance magnétique nucléaire.....	87
3.2.3.2 Analyse de l'attaque du <i>cis</i> -5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-CB par <i>BphB</i> et <i>BphC</i> .....	87
3.2.4 Mutagenèse dirigée sur S100 .....	88
3.2.4.1 Mutagenèse dirigée.....	88
3.2.4.2 Analyse de l'activité des mutants obtenus envers différents congénères BPC.....	89
3.3 Résultats .....	91
3.3.1 Recombinaison aléatoire <i>in vitro</i> de famille de gènes ( <i>family shuffling</i> ) utilisant des isolats de laboratoire .....	91
3.3.1.1 Sélection des variants issus du <i>family shuffling</i> impliquant les gènes <i>bphA</i> d'isolats. ....	91
3.3.1.2 Caractérisation préliminaire des variants issus du <i>family shuffling</i> impliquant les gènes <i>bphA</i> d'isolats. ....	92
3.3.2 Recombinaison aléatoire <i>in vitro</i> de famille de gènes ( <i>family shuffling</i> ) utilisant l'ADN extrait de sols contaminés aux BPC. ....	95
3.3.1.1 Sélection des variants issus du <i>family shuffling</i> impliquant les gènes <i>bphA</i> amplifiés à partir de l'ADN extrait de sols contaminés et non contaminés. ....	91

3.3.2.2	<i>Caractérisation préliminaire des variants issus du family shuffling impliquant les gènes bphA amplifiés du sol</i> .....	96
3.3.2.3	<i>Séquences en acides aminés de variants issus du family shuffling sur l'ADN de sol</i> .....	99
3.3.3	Propriétés catalytiques des variants S100, S149 et S151 envers les congénères BPC.....	103
3.3.3.1	<i>Activité catalytique envers le 2,2'-CB</i> .....	103
3.3.3.1.1	Identification du nouveau métabolite du 2,2'-CB produit par BphAE <sub>S100</sub>	106
3.3.3.2	<i>Activité catalytique du variants S100 envers le biphenyle</i> .....	108
3.3.3.3	<i>Activité catalytique envers différents chlorobiphényles ortho- substitués</i> .....	109
3.3.3.4	<i>Activité catalytique envers différents chlorobiphényles meta et para-substitués</i>	114
3.3.3.5	<i>Activité catalytique envers divers composés aromatiques</i> .....	116
3.3.4	Métabolisme du 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-CB par les enzymes de la voie catabolique du biphenyle.....	118
3.3.5	Identification de quelques caractéristiques structurales de BphAE <sub>S100</sub> associées à sa régiospécificité envers les congénères ortho-chlorés.....	121
3.3.5.1	<i>Comparaison de la régiospécificité envers le 2,2'-CB de BphAE<sub>S100</sub> avec celle de BphAE<sub>B356</sub></i> .....	121
3.3.5.2	<i>Mutagenèse dirigée sur des résidus choisis de BphA<sub>S100</sub></i> .....	122
3.4	<b>Discussion</b> .....	126
	<b>Conclusion</b> .....	139
	<b>Appendice A</b> .....	142
	<b>Appendice B</b> .....	156
	<b>Bibliographie</b> .....	167



## Liste des figures et des tableaux

<b>Figure 1.</b>	Schéma de la structure chimique générale des BPC .....	5
<b>Figure 2.</b>	Tronçon supérieur de la voie catabolique du biphényle chez la souche <i>B. xenovorans</i> LB400 .....	10
<b>Figure 3.</b>	Organisation génomique de l'opéron <i>bph</i> chez diverses souches de bactéries .....	16
<b>Figure 4.</b>	Réaction catalytique de la dioxygénase .....	17
<b>Figure 5.</b>	Structure du centre Rieske .....	19
<b>Figure 6.</b>	Arborescence phylogénique des sous-unités $\alpha$ de dioxygénases d'hydroxylation de composés de type aryl, comportant un centre Rieske .....	20
<b>Figure 7.</b>	Mécanisme de transfert des électrons lors de la réaction de dioxygénation du biphényle par la BPDO .....	22
<b>Figure 8.</b>	Activation de l'O <sub>2</sub> par le Fe <sup>2+</sup> et son insertion au niveau du substrat .....	22
<b>Figure 9</b>	Structure tridimensionnelle de BphAE provenant de la BPDO de la souche <i>R. jostii</i> RHA1 .....	26
<b>Figure 10.</b>	Structure détaillée du site actif contenant un centre Rieske (2Fe-2S) et un Fe <sup>2+</sup> en présence du biphényle .....	27
<b>Figure 11.</b>	Alignement des séquences en acides aminés de fragments C-terminaux de BphA <sub>LB400</sub> et BphA <sub>KF707</sub> .....	28
<b>Figure 12.</b>	Identification des régions I à IV telles que décrites par Mondello et al. (1997) .....	31
<b>Figure 13.</b>	Schéma du processus de <i>family shuffling</i> .....	35
<b>Figure 14.</b>	Stratégies de criblage .....	37
<b>Figure 15.</b>	Alignement des séquences <i>bphA</i> situées en aval du centre Rieske. ....	49

<b>Figure 16.</b>	Alignement des séquences situées en C-terminal du gène <i>bphA</i> des souches <i>P. pnomenusa</i> B356, <i>B. xenovorans</i> LB400, <i>P. pseudoalcaligenes</i> KF707, <i>Burkholderia sp.</i> JB1 et <i>R. globerulus</i> P6 .....	<b>50</b>
<b>Figure 17.</b>	Alignement des séquences en acides aminés de la partie C-terminale de BphA de six isolats bactériens et de la souche LB400 .....	<b>54</b>
<b>Figure 18.</b>	Arbre phylogénique tracé par le programme MEGA, par alignement des séquences déduites en acides aminés des portions C-terminales des gènes <i>bphA</i> de différents isolats de séquences connues avec les séquences des souches B206, B257, B357, B358 et YT-01 .....	<b>56</b>
<b>Figure 19.</b>	Arbre phylogénique tracé par le programme MEGA, par alignement des séquences déduites en acides aminés des portions C-terminales des gènes <i>bphA</i> de différents isolats de séquences connues avec les séquences déduites en amplifiant l'ADN du sol .....	<b>61</b>
<b>Figure 20.</b>	Superposition de modèles tridimensionnels des résidus de la région III de BphA <sub>LB400</sub> (rouge) et BphA <sub>RHAI</sub> (vert) .....	<b>64</b>
<b>Figure 21.</b>	Superposition de modèles tridimensionnels de certains résidus de la paroi catalytique de BphA <sub>RHAI</sub> lorsque le résidu alanine présent à la position 311 de l'enzyme de type sauvage est remplacé par une phénylalanine (bleu).....	<b>66</b>
<b>Figure 22.</b>	Stratégie de <i>family shuffling</i> .....	<b>76</b>
<b>Figure 23.</b>	Séquences en acides aminés d'un échantillon de variants provenant du <i>family shuffling</i> effectué avec des fragments issus d'ADN de sols .....	<b>100</b>
<b>Figure 24.</b>	Arbre phylogénique tracé à l'aide du programme MEGA par alignement des séquences déduites en acides aminés des portions C-terminales des gènes <i>bphA</i> de différents isolats et des fragments amplifiées de l'ADN du sol avec les séquences des variants S100, S149 et S151. ....	<b>102</b>
<b>Figure 25.</b>	Analyse par GC-MS des métabolites, couplés au butylboronate, issus de l'attaque du 2,2'-CB par <i>E. coli</i> DH11S exprimant soit BphAE <sub>p<sub>+</sub></sub> FG <sub>LB400</sub> (rouge) ou BphAE <sub>S100</sub> FG <sub>LB400</sub> (noir) .....	<b>104</b>
<b>Figure 26.</b>	Analyse par GC-MS des métabolites couplés au butylboronate issus de l'attaque du 2,2'-CB par <i>E. coli</i> DH11S exprimant l'un ou l'autre des variants S100 (vert), S149 (noir) et S151 (rouge) .....	<b>105</b>

- Figure 27.** Gel de retardement en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) d'extraits cellulaires provenant des souches *E. coli* DH11S [pDB31*bphFG*<sub>LB400</sub>] exprimant BphAE de LB400 (3) ou des variants S100 (4), S149 (5), S151 (6) ..... 105
- Figure 28.** Analyse RMN du métabolite du 2,2'-CB produit par le variant S100 ..... 107
- Figure 29.** Analyse par GC-MS des métabolites couplés au butylboronate issus de l'attaque du biphenyle par LB400 (rouge) et par le variant S100 (noir) ..... 108
- Figure 30.** Analyse par spectroscopie de masse des métabolites couplés au butylboronate issus de l'attaque du 2,6-CB par *E. coli* DH11S exprimant BphFG<sub>LB400</sub> et l'une des BphAE des variants S100 (rouge), S149 (vert), S151 (noir) ou *p4* (bleu) ..... 110
- Figure 31.** Absorbance des métabolites produits par des préparations purifiées de BphAE de LB400, S100, S149 et S151 en présence de BphFGBC<sub>LB400</sub> et de biphenyle, de toluène, de benzène ou d'éthylbenzène ..... 116
- Figure 32.** Analyse par GC-MS du métabolite couplé au TMS produit lorsque BphB<sub>LB400</sub> purifiée catalyse l'oxydation du *cis*-5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-CB ..... 119
- Figure 33.** Analyse par GC-MS du métabolite (2-hydroxy-6-oxo-6-(2,2'-dichlorophényle)-hexa-2,4-diénoate) couplé au TMS produit lorsque BphB<sub>LB400</sub> et BphC<sub>LB400</sub> catalysent l'oxydation du *cis*-5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-CB dans une réaction couplée ..... 120
- Figure 34.** Analyse par GC-MS des métabolites couplés au butylboronate issus de l'attaque 2,2'-CB par des préparations purifiées de BphAE de S100 et de B356 en présence de BphFG<sub>LB400</sub> ..... 122
- Figure 35.** Superposition des centres catalytiques de BphA de LB400 (vert) et de S100 (rouge) montrant certains résidus ciblés basés sur la comparaison des séquences primaires ..... 123
- Figure 36.** Analyse par GC-MS des métabolites couplés au butylboronate issus de l'attaque 2,2'-CB par des cellules de *E. coli* DH11S produisant BphFG<sub>LB400</sub> et BphAE de S100, S100m237/238, S100m283, S100m369 ou S100m376 ..... 124
- Figure 37.** Gel de retardement en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) d'extraits cellulaires provenant des souches *E. coli* DH11S [pDB31 : *bphFG*<sub>LB400</sub>] exprimant BphAE de LB400, de S100 ou des mutants S100m237/238, S100m370, S100m283 et S100m377 ..... 125

<b>Figure 38.</b>	Séquence primaire en acides aminés de la partie C-terminale de BphA des souches LB400, B356, et des variants S100, S149, S151 et II-9 .....	134
<b>Tableau 1.</b>	Spécificité de certains isolats de laboratoire capables de transformer les BPC .....	24
<b>Tableau 2.</b>	Description de diverses méthodes d'évolution moléculaire .....	33
<b>Tableau 3.</b>	Isolats naturels utilisés .....	39
<b>Tableau 4.</b>	Séquences des différentes amorces utilisées pour amplifier par PCR la portion C-terminale de <i>bphA</i> à partir d'ADN extrait de sols contaminés .....	46
<b>Tableau 5.</b>	Séquences <i>bphA</i> utilisées pour déterminer les amorces dégénérées .....	48
<b>Tableau 6.</b>	Amplification par PCR à l'aide d'amorces dégénérées de la partie C-terminale de <i>bphA</i> d'isolats bactériens .....	52
<b>Tableau 7.</b>	Amplification par PCR à l'aide d'amorces dégénérées de la partie C-terminale de <i>bphA</i> de gènes directement isolés de sols contaminés aux BPC .....	57
<b>Tableau 8.</b>	Alignement des résidus codant pour la partie C-terminale du gène <i>bphA</i> .....	60
<b>Tableau 9.</b>	Séquences des différentes amorces utilisées pour amplifier par PCR les fragments nécessaires à la stratégie de <i>family shuffling</i> .....	78
<b>Tableau 10.</b>	Congénères BPC présents dans le mélange synthétique de 18 congénères BPC .....	81
<b>Tableau 11.</b>	Séquences des différentes amorces utilisées pour amplifier par PCR les fragments nécessaires à la mutagenèse dirigée .....	90
<b>Tableau 12.</b>	Tableau synthèse des rondes de <i>family shuffling</i> effectuées avec l'ADN extrait d'isolats de laboratoire: origine des fragments, mode de sélection, nombres de variants totaux et positifs obtenus et noms des variants associés .....	92

<b>Tableau 13.</b>	Dégradation d'un mélange synthétique de 18 congénères BPC par des variants obtenus par <i>family shuffling</i> de la partie C-terminale du gène <i>bphA</i> provenant d'isolats de laboratoire .....	<b>94</b>
<b>Tableau 14.</b>	Tableau synthèse des rondes de <i>family shuffling</i> effectuées avec l'ADN extrait des sols: origine des fragments, mode de sélection, nombres de variants totaux et positifs obtenus et noms des recombinants associés .....	<b>95</b>
<b>Tableau 15.</b>	Dégradation d'un mélange synthétique de 18 congénères BPC par des variants obtenus par <i>family shuffling</i> de la partie C-terminale du gène <i>bphA</i> issus d'ADN de sols contaminés aux BPC .....	<b>98</b>
<b>Tableau 16.</b>	Taux de consommation d'O <sub>2</sub> des enzymes purifiées BphFG <sub>LB400</sub> et BphAE <sub>LB400</sub> , BphAE <sub>S100</sub> , BphAE <sub>S149</sub> et BphAE <sub>S151</sub> en présence de biphenyle et de 2,2'-CB .....	<b>106</b>
<b>Tableau 17.</b>	Métabolites produits à partir de congénères BPC <i>ortho</i> -chlorés par les variants S100, S149 et S151 .....	<b>112</b>
<b>Tableau 18.</b>	Métabolites produits à partir de congénères BPC <i>meta</i> et <i>para</i> -substitués par les variants S100, S149 et S151 .....	<b>115</b>
<b>Tableau 19.</b>	Activités relatives des BphAE des variants S100, S149 ou S151 envers le toluène, le benzène et l'éthylbenzène comparées à l'activité envers biphenyle de BphAE <sub>LB400</sub> .....	<b>117</b>

## Introduction

Les polluants organiques persistants (POP) sont des substances généralement non présentes à l'état naturel dans l'environnement. Leur stabilité chimique et physique freine grandement leur dégradation. Ils proviennent généralement de l'activité humaine et leur apparition récente dans les écosystèmes explique en partie l'absence de voies naturelles de dégradation pour ces composés (Wania, 2000 : 54). Les biphényles polychlorés (BPC) sont des composés xénobiotiques apparus dans l'industrie vers les années 1930 et utilisés à grande échelle jusqu'à la fin des années 1970. Ils persistent cependant dans l'environnement et présentent un potentiel toxique non négligeable tant au niveau de leur accumulation dans les tissus organiques qu'au niveau des accidents pouvant survenir avec les BPC usagés entreposés (Unterman, 1996 : 209).

Le développement de biotechnologies permet de traiter les sols et les sédiments contaminés avec un minimum d'effets sur les écosystèmes présents. De plus, elles offrent des solutions peu coûteuses aux industries qui désirent se débarrasser des déchets entreposés (Dua et al., 2002 : 143; Straathof, Panke et Schmid, 2002 : 548). Il existe dans la nature des organismes (bactéries, champignons) capables de dégrader certains des 209 congénères BPC via des voies dites de co-metabolisme pour la plupart. Cependant, les composés contenant plus de 7 atomes de chlore sont difficilement dégradés (Pieper, 2005 : 170). Il est peu probable d'arriver à développer une enzyme recombinante capable de dégrader tous les congénères BPC. Une stratégie plus réaliste est d'élaborer des systèmes multi-enzymatiques pouvant dégrader des congénères BPC ciblés plus néfastes pour l'environnement.

La dioxygénase du biphényle (BPDO) est une enzyme particulièrement intéressante pour la biotransformation d'autres polluants comme le benzène ou le dibenzofurane, ou encore dans le développement de biocatalyseurs pour l'industrie chimique. Le site catalytique de l'enzyme a la possibilité d'accepter divers types de substrats et ce, sans pour autant s'inactiver (Kimura et al., 1996 : 220). Dans cette optique, il est particulièrement important de comprendre la façon dont les résidus présents

au site catalytique interagissent avec le substrat ou ses analogues. La manière dont l'enzyme lie le substrat et l'oriente au niveau du site catalytique est critique pour le potentiel catalytique de l'enzyme et pour sa régiospécificité (Imbeault et al., 2000 : 12430). Une meilleure compréhension de la façon dont la BPDO évolue est essentielle au développement des biotechnologies, que ce soit celles ciblant la destruction de divers types de polluants ou que ce soit dans l'approche industrielle. La première partie de ce travail s'intéresse à la diversité des structures en acides aminés de la région C-terminale de BphA, une sous-unité catalytique de l'enzyme importante pour la spécificité. L'analyse des séquences des produits PCR amplifiés à partir de diverses souches de bactéries non caractérisées ou de la microflore de sols contaminés permet de dessiner un portrait plus précis des régions les plus conservées et les plus variables de la partie C-terminale de BphA.

La seconde partie de ce travail vise à élargir le spectre d'action de la BPDO en lui permettant d'acquérir et d'intégrer des caractéristiques catalytiques de plusieurs types de BphA issues de l'environnement. Il a été déterminé que moins de 1% des microorganismes du sol peuvent être cultivés en laboratoire (Stim, 1995 : 1; Zlatkin et al., 1996 : 219). La diversité des séquences des BphA provenant d'isolats de laboratoire est donc sensiblement restreinte. Tenant compte que la portion C-terminale de BphA est critique au niveau de la spécificité de l'enzyme et pour réduire le nombre d'hybrides qu'il est nécessaire de cribler pour identifier les variants d'intérêt, le présent travail développe une stratégie de *family shuffling* s'effectuant sur la partie C-terminale des gènes *bphA* provenant d'ADN extrait de sols contaminés par les BPC. Il permet aussi d'identifier des résidus d'acides aminés et des domaines de l'enzyme responsables de l'apparition d'un phénotype en comparant les séquences et les capacités de dégradation des variants obtenus à celles de leurs parents

La souche *Bulkholderia xenovorans* LB400 est l'une des souches naturelles les plus performantes connues jusqu'à ce jour grâce à une BPDO ayant un spectre de substrat élargi (Bopp, 1986 : 23; Mondello et Bopp, 1987 : 171). Il s'agit d'une des seules BPDO connues pouvant transformer efficacement le 2,2'-chlorobiphényle (2,2'-CB), un

congénère *ortho*-chloré connu comme ayant des effets nuisibles sur la santé des animaux (Barriault et al., 2004 : 47489). BphA<sub>LB400</sub> permet une attaque du 2,2'-CB sur les carbones 3 et 4 du cycle ou sur les carbones 2 et 3. Ce dernier angle d'attaque provoque une *ortho*-déchlorination et plusieurs travaux de mutagénèse au niveau de la partie C-terminale de cette enzyme ont été effectués afin d'élargir le potentiel catalytique de l'enzyme. Dans notre étude, les fragments issus du *shuffling* ont servi à remplacer la partie C-terminale de *bphA*<sub>LB400</sub> et les variants obtenus ont été criblés selon leurs capacités catalytiques envers le 2,2'-CB. Ce criblage a permis d'identifier les BphA de S100, S149 et S151 dont la régiospécificité envers le 2,2'-CB diffère de celle observée pour BphA<sub>LB400</sub>. Nous avons caractérisé ces variants afin de déterminer leur position d'attaque sur le 2,2'-CB, de préciser leurs capacités cataboliques envers d'autres analogues du biphenyle et d'identifier certains éléments structuraux de BphA responsables des nouvelles propriétés catalytiques de ces variants.



# État des connaissances

## 1.1 Les biphényles polychlorés (BPC)

### 1.1.1 Historique

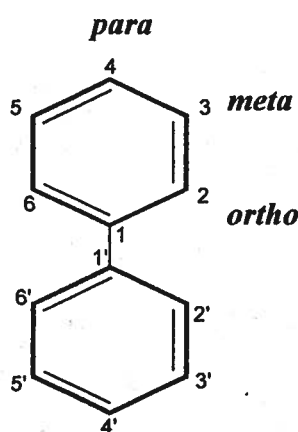
Les BPC sont des huiles synthétiques industrielles mises au point dans les années 1930 et dont la production a atteint un maximum au début des années 70. Leurs stabilités thermique et physique ont permis de multiples utilisations : plastifiants, ignifuges, lubrifiants, fluides échangeurs de chaleur, fluides de compression. Produits par chloration directe du biphényle, les BPC ont été commercialisés sous forme de mélanges contenant une fraction (60 à 80) des 209 congénères possibles, en particulier les congénères contenant de trois à six atomes de chlore.

En raison de la présence de risques sérieux pour la santé et l'écologie, leur production a été interdite dès 1977 dans les pays industrialisés et ils ont été classés comme polluant organique persistant (POP) à la Convention de Stockholm (Suède), organisée par le Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE) en mai 2001. Les POP regroupent une douzaine de composés : pesticides, composés chimiques industriels, produits secondaires. Leur stabilité et leur apparition récente dans le milieu naturel les rendent peu aptes à être dégradés par les microorganismes environnementaux.

Les BPC sont encore présents dans certains vieux appareils électriques et sous forme de déchets entreposés (Pieper, 2005 : 170). La contamination environnementale est surtout causée par des événements accidentels ponctuels lors de l'utilisation, de l'entreposage ou du transport. De ces points de fuite, les BPC sont ensuite dispersés dans toutes les sphères trophiques, entraînés par les vents, l'eau et disséminés par les organismes vivants. Les BPC sont présents dans à peu près toutes les niches écologiques. Ils persistent dans les écosystèmes et s'accumulent au niveau de la chaîne alimentaire (Fries, 1995 : 71).

### 1.1.2 Caractérisation chimique et physique des BPC

Les 209 congénères BPC possèdent des propriétés physico-chimiques différentes selon le nombre et la position des atomes de chlore présents (Figure 1). Le degré de planarité de la molécule est largement déterminé par le degré de substitution en position *ortho*. Les non-*ortho* et les mono-*ortho* sont classés comme étant des composés planaires ou co-planaires, les autres congénères étant non-planaires.



**Figure 1.** Schéma de la structure chimique générale des BPC.

Les BPC se présentent généralement sous forme huileuse. Les noms commerciaux, Aroclor, Nanechlor, Phenochlor, Fenchlor, Clophen, Sovol, varient selon le pays d'origine. Extrêmement stable, leur densité varie de 1,0 à 1,8 g/cm<sup>3</sup> (à 25°C) et leur température d'ébullition, selon la composition du mélange, varie entre 275°C et 450°C. Leur incinération nécessite des niveaux de température et de pression très élevés et ils résistent aux attaques tant acides qu'alcalines. Ils sont relativement insolubles dans l'eau mais se dissolvent bien dans les solvants organiques non-polaires tout comme dans les lipides biologiques. Retrouvés en faible quantité dans l'eau et dans l'air, ils se concentrent dans les sédiments et dans les graisses chez les animaux supérieurs et chez les poissons (Fishbein, 1972 : 345; Fries, 1995 : 71; McFarland et Clarke, 1989 : 225).

### 1.1.3 Effets physiologiques

Les premiers effets néfastes des BPC sur le vivant ont été répertoriés dans les années 1930 (Drinker CK, 1937 : 283). Tout comme les animaux supérieurs, l'être humain est exposé aux BPC principalement via l'ingestion de nourriture contaminée et parfois par simple contact avec les sols. Les BPC se retrouvent au niveau du sang, des tissus adipeux ainsi que dans le lait maternel (Kimbrough, 1995 : 133). La toxicité directe des BPC sur l'homme est difficile à établir, car les individus sont exposés simultanément à plusieurs polluants (métaux lourds, dioxines, DDT, etc.). Les préparations commerciales de BPC contiennent souvent elles-mêmes des contaminants tels que les dibenzo-*p*-dioxines polychlorées (PCDD) et les dibenzofuranes polychlorées (PCDF), de puissants agents cancérigènes et tératogènes (Fishbein, 1972 : 345; McFarland et Clarke, 1989 : 225). Bien qu'il soit impossible d'isoler l'effet spécifique aux BPC, des observations faites chez les populations vivant près de lieux contaminés ainsi que chez des travailleurs exposés aux BPC d'une façon prononcée démontrent un taux élevé de cancer du foie et des reins, ainsi que des perturbations du développement neurologique et physiologique de l'enfant (Kimbrough, 1995 : 133; RibasFito et al., 2001 : 537; Safe, 1994 : 87; Tilson et Kodavanti, 1997 : 727).

Des expériences ont été effectuées chez les animaux en utilisant des congénères ou des mélanges de congénères purs. Le potentiel toxique des BPC varie en fonction de leur contenu en chlore, les plus chlorés présentant les effets cancérigènes et tératogènes les plus marqués (McFarland et Clarke, 1989 : 225). L'exposition de l'animal à de fortes concentrations de BPC peut provoquer des dommages au foie, aux reins, au système digestif et à la glande thyroïde. Des effets ont aussi été notés au niveau de la peau (chloracné), au niveau des organes reproducteurs et certains des animaux souffrent d'anémie et possèdent un système immunitaire déficient (Aoki, 2001 : 2; Agency for toxic substances and diseases registry (ATDSR), 1996; ATSDR, 2000). Selon leur coplanarité et la latéralité de leurs substituants, les BPC ont une capacité plus ou moins grande de mimer les hormones stéroïdiennes et de modifier ainsi le profil hormonal des

organismes exposés (McKinney et Waller, 1994 : 290). Finalement, il a été observé que chez les animaux, les BPC affectent des mécanismes reliés à la dopamine (Aoki, 2001 : 2).

#### **1.1.4 Élimination environnementale**

Les méthodes conventionnelles pour éliminer les BPC peuvent être physiques, chimiques et biologiques. Au Canada, la méthode la plus utilisée est le confinement physique des BPC sur des sites protégés. Cette méthode ne permet pas l'élimination des BPC mais seulement leur entreposage ou leur enfouissement après les avoir scellés dans des contenants hermétiques ou par vitrification. En décembre 2005, le Conseil Canadien de l'Environnement avait relevé 1 615 sites d'entreposage des BPC au Canada (Pollution Prevention Environmental Stewardship Branch of Environment Canada, 2006).

L'incinération à haute température et à des pressions élevées permet d'éliminer les BPC. Ceux-ci sont placés dans des fours où la température varie de 870°C à 1200°C en présence de 2 à 3% d'oxygène. L'enfouissement est préféré à cette technique, car la combustion incomplète des BPC produit des chlorures d'hydrogène, des dioxines et des furanes dont la présence, même infime, produit une charge toxique néfaste envers la faune et la flore de l'écosystème situé autour des incinérateurs. La nécessité d'obtenir des températures très élevées et de munir les incinérateurs de filtres permettant de contrôler rigoureusement l'émission de produits secondaires rend cette méthode très coûteuse (Pollution Prevention Environmental Stewardship Branch of Environment Canada, 2006). Plusieurs méthodes chimiques ont été développées comme l'oxydation de type électrochimique. Il existe aussi un processus de déchloration des BPC par une hydrolyse en présence de métaux alcalins liés à des groupements organiques ou de type oxydes ou hydroxydes. Ces méthodes demeurent extrêmement coûteuses et s'adaptent mal à l'extérieur des laboratoires, car elles nécessitent des conditions de traitement pour chaque composant individuel. Elles sont utilisées surtout pour éliminer de faibles concentrations de BPC de produits destinés à être réutilisés (Programme des Nations Unies sur l'Environnement, 1999).

Les méthodes biologiques forment un ensemble de techniques en émergence. Elles s'appuient sur l'observation des processus naturels qui transforment graduellement les BPC présents dans un environnement. Les stratégies utilisées jusqu'à présent à l'échelle industrielle se concentrent sur l'apport en eau, air et nutriments aux microorganismes endogènes et misent sur l'atténuation naturelle du polluant dans les sols. Les biotechnologies utilisant des consortiums de microorganismes ou des organismes génétiquement modifiés (OGM) demeurent à l'état expérimental pour la plupart. Plusieurs chercheurs étudient le développement de bioréacteurs pouvant servir à la transformation des déchets BPC entreposés (Fava et al., 1994 : 117; Fava, DiGioia et Marchetti, 2000 : 243; Fedi et al., 2005 : 201; Nollet et al., 2005 : 299; Tartakovsky et al., 2001 : 4323).

L'intérêt pour les méthodes dites de bioremédiation est croissant, car elles peuvent s'avérer moins coûteuses que les méthodes d'élimination chimiques et physiques et sont moins dommageables pour l'environnement. Elles demeurent toutefois difficiles à contrôler et leurs résultats sont souvent variables. Une meilleure connaissance de la biochimie des enzymes associées à ces processus est essentielle afin de pouvoir développer des stratégies visant à modifier génétiquement ces enzymes pour augmenter leur spectre d'action.

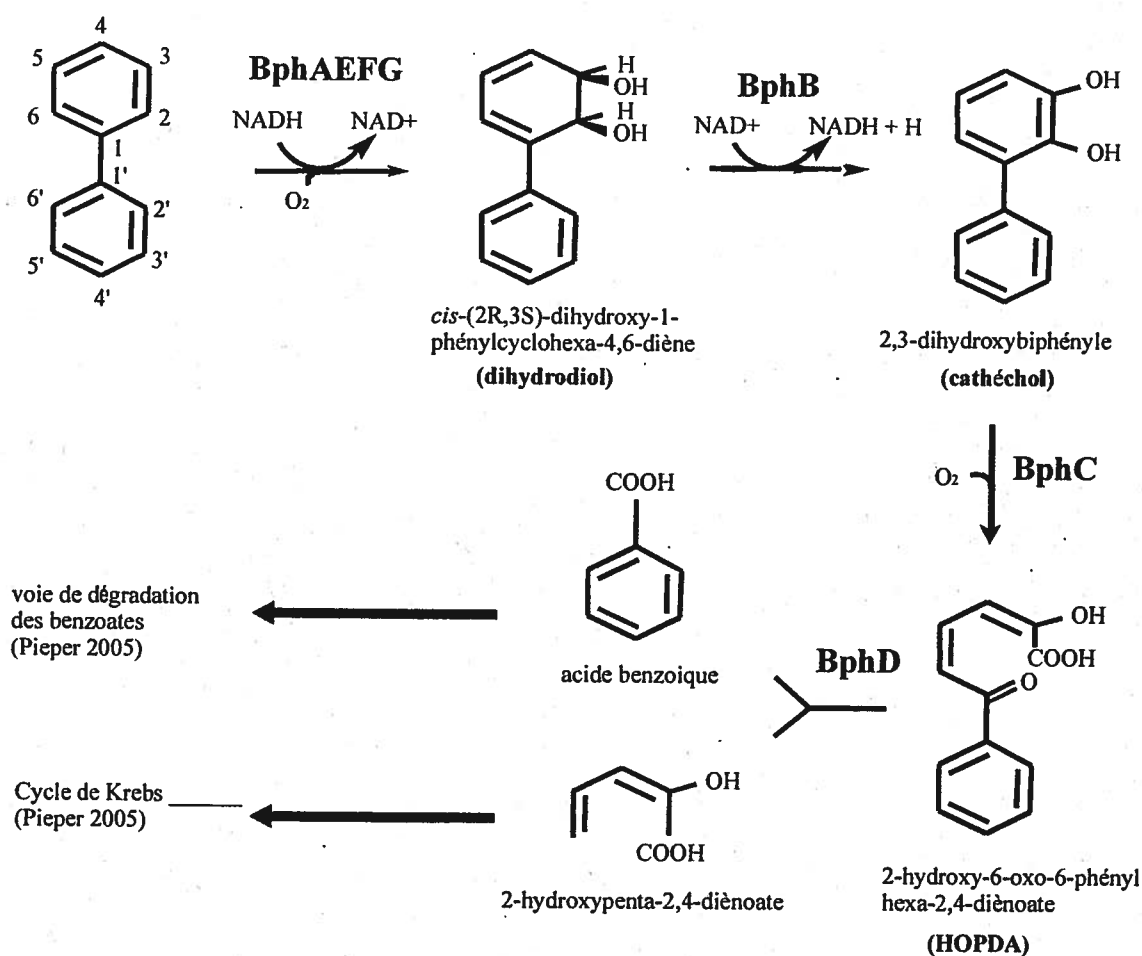
## 1.2 Dégradation des BPC par les bactéries du sol

### 1.2.1 Voie catabolique des BPC chez les bactéries aérobies

La voie catabolique du biphenyle chez les bactéries aérobies se divise en deux tronçons. Le tronçon supérieur transforme le biphenyle ou les chlorobiphenyles en benzoate/chlorobenzoates. La première réaction est catalysée par la dioxygénase du biphenyle (BPDO) qui introduit deux molécules d'oxygène sur l'un des cycles et produit le 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphenyle (dihydrodiol) (Figure 2). La BPDO est composée d'un centre catalytique (désigné BphAE chez LB400) comprenant trois sous-unités  $\alpha$  (BphA,  $M_r=51\ 000$ ) et trois sous-unités  $\beta$  (BphE,  $M_r=22\ 000$ ) assemblées sous forme d'hexamère (Hurtubise, Barriault et Sylvestre, 1996 : 8152.). La BPDO comprend également les composantes ferrédoxine (BphF,  $M_r=12\ 000$ ) et réductase de la ferrédoxine (BphG,  $M_r=43\ 000$ ) qui servent au transport des électrons du NADH vers le centre Rieske de BphAE. BphF et BphG ne sont pas liés en permanence à BphAE dans la cellule et il est possible d'utiliser un même système de transport d'électrons avec différentes BphAE (Barriault et Sylvestre, 1999 : 592; Hirose et al., 1994 : 27).

Le 2,3-dihydrodiol formé par l'oxydation du biphenyle par la BPDO est ensuite transformé en 2,3-dihydroxybiphenyle (catéchol) par une 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphenyle-2,3-déshydrogénase (BphB). Le catéchol subit un clivage en position 1,2 par la 2,3-dihydroxybiphenyle-1,2-dioxygénase (BphC) qui provoque l'ouverture du cycle aromatique et donne l'acide 2-hydroxy-6-oxo-6-phénylhexa-2,4-diénoïque (HOPDA). Cet acide est finalement hydrolysé par l'hydrolase de l'acide 2-hydroxy-6-oxo-6-phénylhexadiénoïque (BphD), libérant de l'acide benzoïque et de l'hydroxypentadiénoate (ou acide pentanoïque). La plupart des tronçons supérieurs des voies enzymatiques pouvant dégrader les BPC sont similaires à celui de LB400 (Barriault et al., 2001 : 1025; Edgington, 1994 : 1338; Hurtubise et al., 1995 : 6610; Seeger, Timmis et Hofer, 1995 : 2654).

Le tronçon inférieur comprend une série de voies qui mènent à la production d'intermédiaires du cycle de Krebs et varie en fonction des souches de bactéries (Brenner, Arensdorf et Focht, 1994 : 359; Deneff et al., 2006 : 585; Pieper, 2005 : 170). Chez LB400, les benzoates sont transformés en hydroxybenzoates via trois voies catalytiques utilisant le coenzyme A ou par des dioxygénases et le clivage subséquent du catéchol. Les produits obtenus sont ensuite transformés en acides tricarboxyliques (TCA) qui sont directement utilisables par le cycle de Krebs. L'hydroxypentadiénoate est converti en intermédiaires du cycle de Krebs grâce à trois enzymes codées par l'opéron *bph* : une hydratase, une déshydrogénase et une aldolase (Hofer, Backhaus et Timmis, 1994 : 9).



**Figure 2.** Tronçon supérieur de la voie catabolique du biphenyle chez la souche *B. xenovorans* LB400. BphA : sous-unité  $\alpha$  de la dioxygénase terminale, BphE : sous-unité  $\beta$  de la dioxygénase terminale, BphF : ferrédoxine, BphG : réductase de ferrédoxine, BphB : 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphenyle-2,3-déshydrogénase, BphC : 2,3-dihydroxybiphenyle-1,2-dioxygénase, BphD : hydrolase de l'acide 2-hydroxy-6-oxo-6-phénylhexadiénoïque.

Bien que le présent travail s'intéresse plus particulièrement à la première réaction du tronçon supérieur de la voie catabolique, l'étude et l'ingénierie des autres enzymes du tronçon supérieur et du tronçon inférieur sont aussi importantes dans l'optique d'une minéralisation des BPC. En effet, la transformation des BPC mène souvent à des métabolites terminaux non transformés qui peuvent être très toxiques pour la cellule. C'est le cas notamment des dihydrodiols, des cathécols et des HOPDA qui sont chlorés (Brenner, Arensdorf et Focht, 1994 : 359).

### 1.2.2 Isolats bactériens dégradant les BPC

De nombreuses souches bactériennes capables de métaboliser certains congénères BPC peu chlorés ont été isolées de l'environnement (Ahmed et Focht, 1973 : 47; Baxter et al., 1975 : 53; Bedard et al., 1986 : 761; Clark, Chian et Griffin, 1979 : 680; Furukawa et Matsumura, 1976 : 251; Kiyohara, Nagao et Yana, 1982 : 454; Lunt et Evans, 1970 : 54). Il s'agit principalement de bactéries aérobies obligatoires qui ont été sélectionnées sur un milieu contenant du biphenyle comme source de carbone. Elles dégradent pour la plupart les composés contenant moins de 5 atomes de chlore. La position des atomes de chlore sur les cycles du biphenyle influence la spécificité d'une souche donnée envers les congénères BPC et chaque souche possède des angles d'attaque ainsi que des vitesses de réaction particulières (Furukawa, 1994 : 289; Higson, 1992 : 135; Pieper, 2005 : 170; Smith, 1990 : 191). Les paragraphes suivants résument brièvement les caractéristiques des souches les plus étudiées auxquelles nous référerons dans le présent travail.

La souche *B. xenovorans* LB400 a été isolée à partir d'un sol contaminé aux BPC dans l'état de New York (États-unis). Elle fait partie d'un ensemble de bactéries Gram (-) qui possèdent un large spectre de substrats et attaque des congénères pouvant contenir jusqu'à 6 atomes de chlore. Elle dégrade particulièrement bien les congénères substitués en position *ortho* (2,2'-CB, 2,3'-CB, 2,2',5-CB, 2,2',5, 5'-CB). Ces congénères résultent entre autres de la déchloration des mélanges industriels de BPC (Arochlor, Kanechlor, etc.) par les processus anaérobies présents dans les sédiments (Brown et al., 1984 : 167).



LB400 transforme ces congénères soit en attaquant en position 3,4 du cycle phényle, soit en provoquant une *ortho*-déchloration lors de l'attaque en position 2,3. Cependant, elle métabolise moins efficacement le 4,4'-CB et les congénères *meta*-substitués tel que le 3,3'-CB (Haddock, Horton et Gibson, 1995 : 20; Kimura et al., 1997 : 3936). La souche *Cupriavidus necator* (précédemment *Alcaligenes eutrophus*) H850 possède des caractéristiques semblables à la souche LB400. Isolée de boues provenant de la rivière Hudson dans l'état de New York (États-unis), elle transforme de façon préférentielle les congénères substitués en position *ortho* (Bedard et al., 1987 : 1094). La souche *Pseudomonas sp.* KKS102 a été isolée d'un terrain situé près d'une raffinerie dans la région de Tokyo (Japon) (Kikuchi et al., 1994 : 4269). C'est une dioxygénase apte à dégrader autant les congénères *ortho*- et *para*-substitués, dont la structure et le fonctionnement ont été très étudiés (Kimbara et al., 1988 : 2885; Ohtsubo et al., 2001 : 36146; Senda et al., 2000 : 397; Sugiyama et al., 1995 : 284).

Un second groupe de bactéries Gram (-) présente une spécificité plus restreinte. La souche *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 a été découverte sur un terrain entourant une usine de fabrication de BPC près de Kitakyushu au Japon (Furukawa et Miyazaki, 1986 : 392). Elle ne peut effectuer de déchloration en position *ortho*, ce qui la rend peu apte à transformer les congénères *ortho*-substitués. Par contre, elle transforme efficacement les congénères substitués en position *para* (4,4'-CB, 3,4-CB, 2,4'-CB, 2,4,4') (Gibson et al., 1993 : 4561; Kimura et al., 1997 : 3936). La souche *Pandoraea pnomenusa* B356 (précédemment *Comamonas testosteroni* B356 (Vézina, Barriault et Sylvestre, 2008 : 139)) est issue des boues résiduelles provenant d'un bassin de traitement des eaux usées domestiques (Québec, Canada) (Ahmad, Massé et Sylvestre, 1990 : 53). Contrairement à LB400, elle métabolise de façon préférentielle les composés *meta* et *para*- substitués (Gomez-Gil et al., 2007 : 5705; Guilbeault et al., 1994 : 73).

La souche *Rhodococcus globerulus* P6 est une souche Gram (+) isolée de sédiments du lac Mendota (Wisconsin, États-unis) (Furukawa, Matsumura et Tonomura, 1978 : 543). P6 métabolise plus efficacement les composés substitués en position *meta* comme le 3,3'-CB que les composés substitués en position *para* et a très peu d'affinité

pour les congénères doublement substitués en position *ortho* (Chebrou et al., 1999 : 4805; McKay et al., 1997 : 1924). La souche *Rhodococcus jostii* RHA1 dégrade efficacement les congénères *ortho*- et *para*-substitués. Elle provient d'un sol contaminé à l'hexachlorocyclohexane et tout comme KKS102, sa BPDO a été bien caractérisée (Seto et al., 1995 : 3353; Seto et al., 1995 : 4510).

Bien qu'aucune bactérie anaérobie capable de dégrader les BPC n'ait été décrite à ce jour, certaines bactéries anaérobies, en particulier celles du groupe des *Dehalococcoides*, peuvent les déshalogéner (Bedard, Ritalahti et Loeffler, 2007 : 2513). Ces bactéries utilisent les BPC comme accepteurs d'électron en remplaçant les atomes de chlore sur la molécule par des atomes d'hydrogène. Bien que ce processus appelé déshalorespiration soit relativement lent, le résultat final est une réduction de la charge chlorée des mélanges BPC facilitant leur dégradation par les bactéries aérobies. La mise en commun de ces diverses voies pourrait conduire à une stratégie efficace pour la dégradation complète des BPC (Unterman, 1996 : 209).

Il existe aussi certaines souches de champignons qui peuvent métaboliser les BPC. *Aspergillus niger* est un champignon filamenteux qui transforme les congénères peu chlorés. *Pleurotus ostreatus*, un champignon de la pourriture blanche du bois, dégrade lui aussi efficacement les congénères peu chlorés mais transforme certains composés hautement chlorés (Dietrich, Hickey et Lamar, 1995 : 3904; ; Kubatova et al., 2001 : 207). *Phanerochaete chrysosporium* permet, en plus de dégrader certains congénères, la déshalogénéation de certains BPC (De, Perkins et Dutta, 2006 : 350; Krcmar et Ulrich, 1998 : 79).

### 1.2.3 Structure génomique du locus *bph* chez divers isolats bactériens

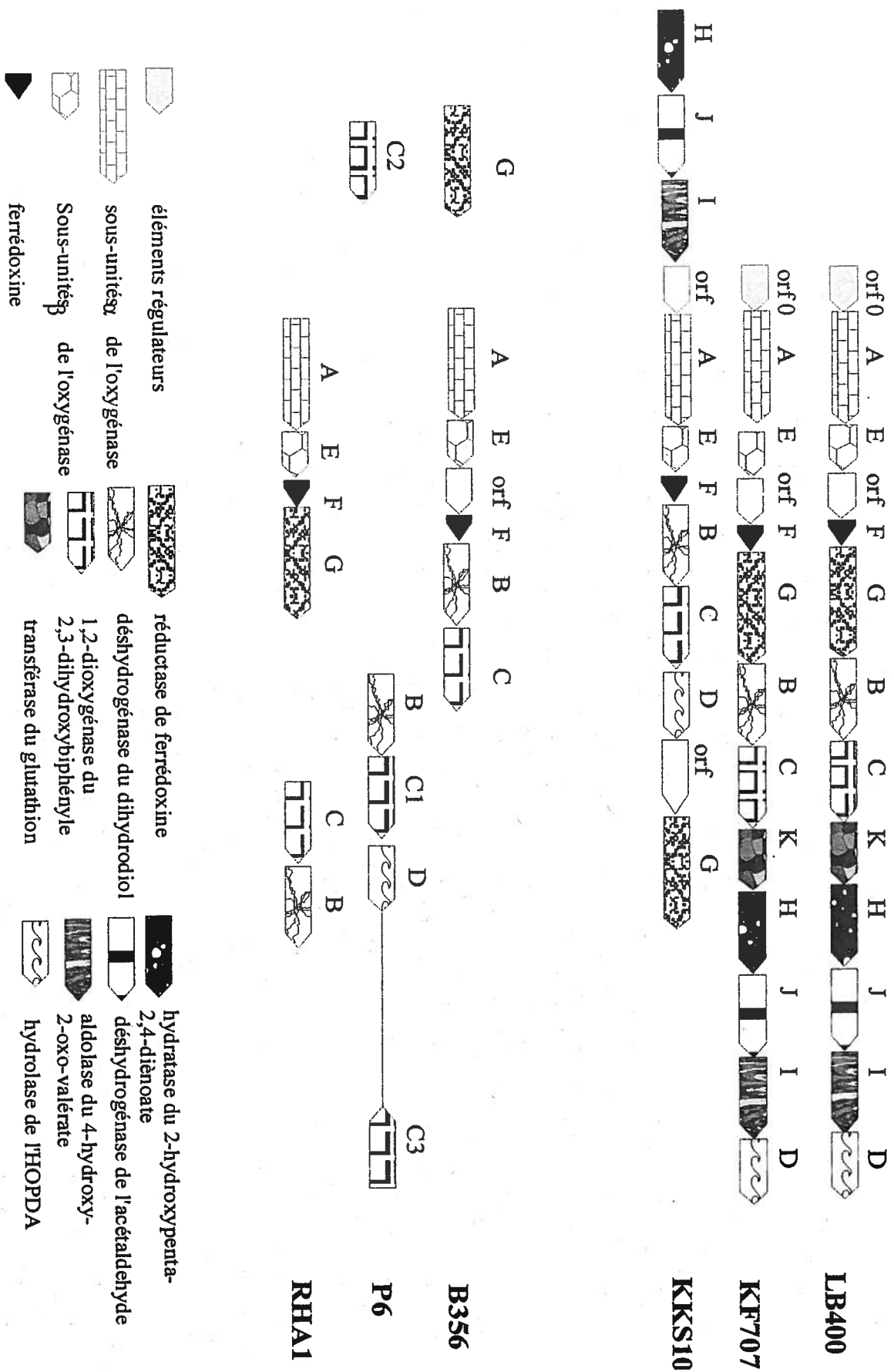
Les premiers locus de gènes associés à la dégradation du biphényle furent identifiés chez les souches KF707 et LB400 (Furukawa et Miyazaki, 1986 : 392; Mondello, 1989 : 1725). Les gènes codant pour la BPDO sont organisés en tandem (Figure 3). Chez LB400, le gène *bphA* code pour la sous-unité  $\alpha$  de l'oxygénase terminale (BphA) de la BPDO et le gène *bphE* pour la sous-unité  $\beta$  (BphE). La ferrédoxine et la réductase de la ferrédoxine sont codées respectivement par les gènes *bphF* et *bphG*. La nomenclature *bphA<sub>1</sub>A<sub>2</sub>* (*bphAE*) , *bphA<sub>3</sub>* (*bphF*) et *bphA<sub>4</sub>* (*bphG*) est utilisée pour certaines souches (Masai et al., 1995 : 2079; Taira et al., 1992 : 4844). Les gènes *bphB*, *bphC* et *bphD* de la souche LB400 codent pour les enzymes catalysant les étapes de transformation subséquentes du biphényle en acide benzoïque et en diénoate. Les gènes *bphKHJI* sont quant à eux impliqués dans la minéralisation des diénoates résultant de la transformation de l'HOPDA par l'hydrolase.

L'organisation génomique des gènes *bph* est similaire d'une souche à l'autre, ce qui dénote une origine commune de cette voie chez les espèces capables de dégrader les BPC (Sylvestre et al., 1996 : 195). Toutefois, les différentes souches connues peuvent être séparées sommairement en deux groupes différents de ceux réalisés sur la base des propriétés catalytiques. Le premier groupe rassemble les gènes des souches telles que LB400 et KF707. Leurs gènes sont encodés au niveau chromosomique sur des îlots génomiques pouvant être transmis d'un organisme à un autre par des processus de conjugaison. Les gènes codant pour les enzymes du tronçon supérieur (*bphAEFGBCD*) et pour les enzymes d'une des voies du tronçon inférieur (*bphKHJI*) sont regroupés ensemble (Pieper, 2005 : 170; Sylvestre et al., 1996 : 195).

Les souches B356, P6 et RHA1 présentent une organisation génomique plus éclatée. Dans le cas de B356, *bphG* est situé à l'extérieur de la région codant pour les enzymes du tronçon supérieur (Sylvestre et al., 1996 : 195). Chez les souches P6 et RHA1, contrairement aux souches Gram (-) connues, les gènes sont localisés sur des

plasmides (Asturias et Timmis, 1993 : 4631; Masai et al., 1995 : 2079). De plus, ces souches possèdent des gènes multiples pour certaines des enzymes de la voie de dégradation du biphenyle, ce qui leur confère une très grande versatilité métabolique tant au niveau des congénères BPC qu'envers leurs analogues (Kosono et al., 1997 : 3282; Vaillancourt et al., 2003 : 1253).

Des segments codant pour des régulateurs sont aussi retrouvés à l'intérieur des différents opérons *bph*. Chez certaines bactéries, Orf0 est un activateur de la famille des régulateurs GntR qui agit sur le promoteur *P-bphA* en présence de biphenyle (Beltrametti et al., 2001 : 2169). Chez KF707, un second gène régulateur, *bphR2*, a été mis en évidence. Ce gène, sous le contrôle du HOPDA produit dans la cellule, code pour un activateur de la famille LysR qui agit sur l'expression de *bphAEFG*, *bphB* et *bphC* (Watanabe, Fujihara et Furukawa, 2003 : 3575).



**Figure 3.** Organisation génomique de l'opéron *bph* chez diverses souches de bactéries. LB400 (Dowling, Pipke et Dwyer, 1993 : 149), KKS102 (Kikuchi et al., 1994 : 4269), KKF707 (Taira et al., 1992 : 4844), B356 (Sylvestre et al., 1996 : 195), P6 (Asturias, Diaz et Timmis, 1995 : 11), RHA1 (Masai et al., 1995 : 2079).

## 1.3 La dioxygénase du biphenyle

### 1.3.1 Généralités

La dioxygénase du biphenyle est largement étudiée pour ses applications dans les procédés de biorémediation des polluants organiques et pour le développement de procédés biocatalytiques de synthèse de composés chimiques. C'est une enzyme énantiosélective de type Rieske qui s'apparente fortement aux dioxygénases de plusieurs autres composés aromatiques dont celles du toluène et du naphthalène. Tel qu'indiqué à la section précédente, la BPDO possède trois composantes distinctes (Figure 4): une composante catalytique, l'oxygénase terminale (BphAE), formée des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , ainsi qu'un système de transport des électrons composé d'une ferrédoxine de type Rieske (BphF) et d'une réductase de ferrédoxine (BphG) (Gibson et Parales, 2000 : 236; Pieper, 2005 : 170).

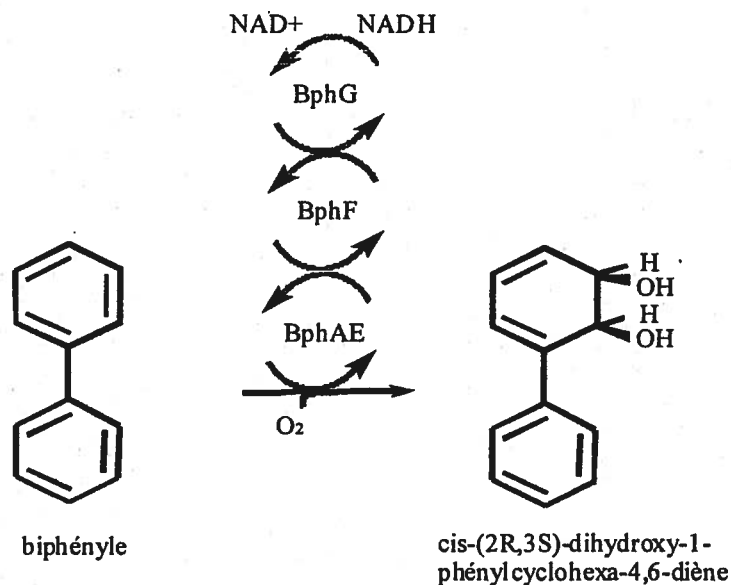


Figure 4. Réaction catalytique de la dioxygénase

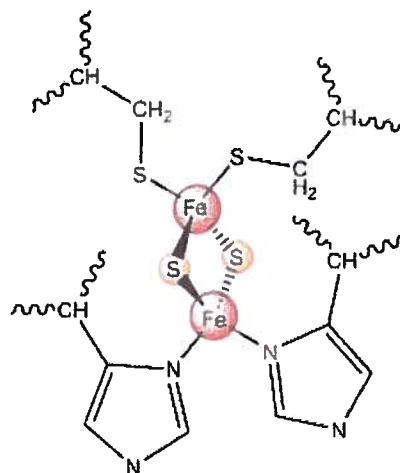
### 1.3.2 Évolution de la BPDO

Les protéines contemporaines de type Rieske sont ubiquitaires chez le vivant et se divisent en deux classes. La première regroupe des protéines formant des complexes avec certaines cytochromes impliquées dans l'emmagasinage de l'énergie. La seconde catégorie est formée d'oxygénases et de ferrédoxines retrouvées au niveau du métabolisme. Les oxygénases de ce dernier groupe servent généralement à la dégradation de composés hydrophobes, en particulier les composés aromatiques. Une cinquantaine d'oxygénases bactériennes associées à cette dernière catégorie ont été caractérisées jusqu'à présent. Elles ont la capacité d'évoluer sur de courtes périodes, ce qui leur permet de s'adapter rapidement aux variations de l'environnement (Schmidt et Shaw, 2001 : 9).

Les protéines de type Rieske se retrouvant tant chez les eucaryotes que les bactéries et les Archea, leur origine remonte probablement avant la séparation de ces trois formes de vie il y a 2 milliards d'années. Leur ancêtre commun serait apparu dans les conditions anoxiques prévalant il y a 3,5 milliards d'années (Doolittle et al., 1996 : 470). Le passage à l'O<sub>2</sub> comme accepteur d'électrons se serait produit au cours de l'augmentation du niveau de ce gaz dans l'atmosphère. Schmidt et Shaw (2001 : 9) proposent un modèle d'évolution des dioxygénases impliquant un ancêtre commun similaire à la rubrédoxine, une protéine très simple servant au transfert d'électron. Ces « pré-dioxygénases » issues d'un ancêtre commun et ayant un potentiel d'oxydoréduction élevé, auraient occupé des fonctions uniques et essentielles dans le développement du métabolisme, ce qui explique leur persistance à travers l'évolution. Par des modifications autour du noyau fer-souffre, ces ancêtres auraient évolué vers une protéine de type Rieske archaïque permettant la formation de chaînes d'oxydoréduction.

Les protéines fer-souffre de type Rieske possèdent une région de forte homologie d'environ 70 acides aminés. Ce segment contient une séquence consensus -Cys-X-His-X-<sub>15-17</sub>-Cys-X-X-His- appelée boîte Cys-X-X-His. Les chaînes latérales des résidus histidine et cystéine de ce segment sont responsables de la liaison des atomes de fer et de soufre

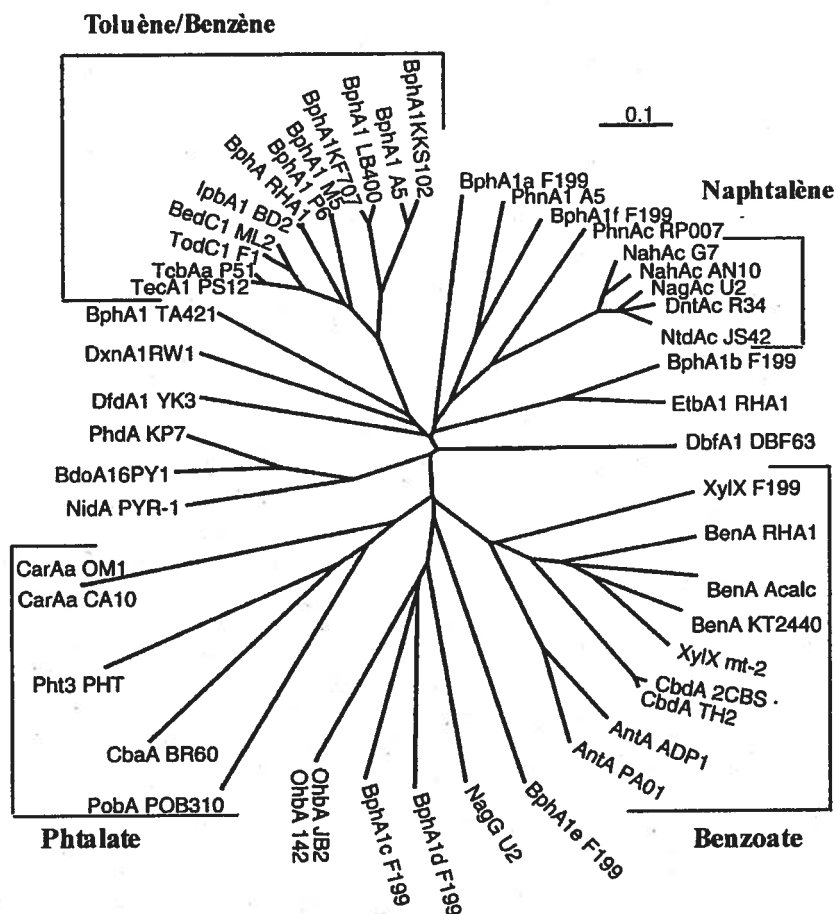
au site catalytique (Figure 5). Deux régions hydrophobes de 3 à 4 résidus flanquant la boîte Cys-X-X-His ainsi qu'un acide aminé hydrophobe situé en amont de cette région sont aussi conservés. La forte homologie de ces régions chez les oxygénases s'expliquent par le fait que les séquences retrouvées sont essentielles à l'établissement du centre Rieske et à ses interactions avec le substrat (Schmidt et Shaw, 2001 : 9).



**Figure 5.** Structure du centre Rieske (tirée de Ferraro, Gakhar et Ramaswamy, 2005 : 175).

Selon l'analyse phylogénétique de leur sous-unité  $\alpha$ , les dioxygénases d'hydroxylation de composés aryl comportant un centre Rieske se subdivisent en 4 groupes principaux, soit le groupe naphthalène, le groupe benzoate, le groupe phtalate et le groupe toluène-biphényle (Figure 6) (Pieper, 2005 : 170; Wackett, 2002 : 577). Les dioxygénases associées au groupe toluène/biphényle contiennent une réductase nécessitant un cofacteur flavine (FAD), une ferrédoxine contenant un centre Rieske [2Fe-2S] et une oxygénase terminale (BphAE) contenant trois centres Rieske et trois atomes de fer mononucléaire ( $\text{Fe}^{2+}$ ).





**Figure 6.** Arborescence phylogénique des sous-unités  $\alpha$  de dioxygénases d'hydroxylation de composés de type aryl, comportant un centre Rieske (tiré de Pieper (2005) (Gibson et Parales, 2000 : 236; Pieper, 2005 : 170)).

### 1.3.3 Mécanisme d'action et spécificité de la BPDO

La BPDO prépare l'un des cycles du biphenyle aux clivages subséquents en utilisant les électrons du NADH pour y introduire une molécule d'oxygène sur deux atomes de carbone adjacents (voir Figure 4). Cette étape initiale est d'une importance particulière, car elle déstabilise le cycle aromatique et initie la dégradation du composé aromatique. La BPDO est largement responsable de la spécificité de substrats et limite le

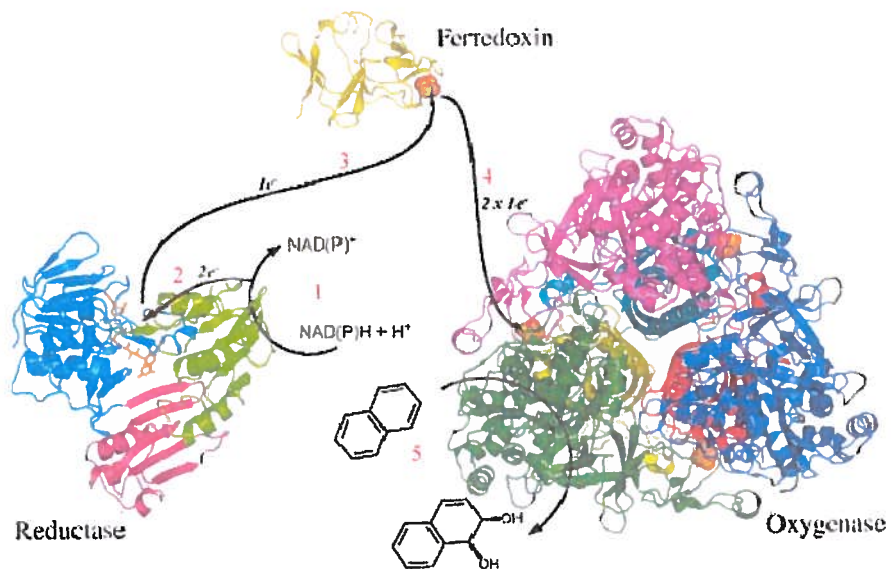
potentiel catabolique envers les analogues du biphenyle (Gibson et Parales, 2000 : 236; Pieper, 2005 : 170).

### 1.3.3.1 Mécanisme d'action

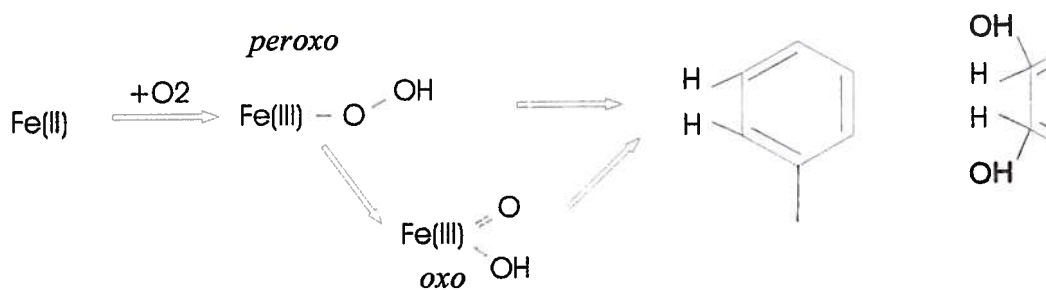
Tous les composés monochlorés et dichlorés peuvent être transformés par l'une ou l'autre des dioxygénases du biphenyle. L'attaque se fait soit sur le cycle non chloré, soit sur celui portant les atomes de chlore si deux carbones adjacents y sont disponibles. La plupart des BPDO attaquent en position *ortho* et *meta* du cycle mais de rares, comme celle de la souche LB400, sont aussi capables de catalyser l'oxygénation en position *meta* et *para* (Barriault et al., 2004 : 47489).

Un modèle possible du mécanisme d'action de l'enzyme a été proposé par Wackett (2002 : 577) et par Ferraro Gakhar et Ramaswamy (2005 : 175). Les centres Rieske ayant des potentiels d'oxydoréduction élevés, ils contrôlent le flux d'électrons lors de la réaction catalytique de la dioxygénase (Figure 7). Le NADH se lie sur la BphG (1) et deux électrons sont transférés sur le cofacteur flavine (FAD) de façon simultanée (2). La molécule de FADH<sub>2</sub> libère alors de façon séquentielle ses électrons vers le centre Rieske de BphF (3) qui dirige un électron vers le centre Rieske de BphAE (4). Pour chaque molécule de substrat, BphF doit répéter cette dernière étape deux fois (5).

La réduction du centre Rieske entraîne un changement de conformation de l'enzyme qui permet la création d'un pont hydrogène entre des résidus du centre Rieske de l'une des sous-unités BphA et le Fe<sup>2+</sup> de la sous-unité adjacente. Le Fe<sup>2+</sup> lie alors l'oxygène moléculaire et l'active. Le radical formé attaque directement le substrat sous forme *peroxo* ou *oxo* (Figure 8) sur deux sites du substrat aromatique *cis*-coordonnés par le solvant (Ferraro, Gakhar et Ramaswamy, 2005 : 175; Wackett, 2002 : 577)



**Figure 7.** Mécanisme de transfert des électrons lors de la réaction de dioxygénation du biphenyle par la BPDO (tirée de Ferraro 2005 (Ferraro, Gakhar et Ramaswamy, 2005 : 175)).



**Figure 8.** Activation de l'O<sub>2</sub> par le Fe<sup>2+</sup> et son insertion au niveau du substrat.

La chlorosubstitution influence de façon dramatique les capacités d'attaque de la BPDO. Les BPC n'occupent pas le centre catalytique de la même manière que le biphenyle, ce qui peut empêcher l'activation efficace du  $Fe^{2+}$  et/ou bloquer le site de liaison pour l' $O_2$ . Dans certains cas, comme pour les BPC fortement chlorés, l'encombrement stérique empêche l'accès du BPC au site catalytique. Les BPC substitués sur un seul des cycles phényle sont généralement plus facilement dégradés que ceux portant des atomes de chlore sur les deux cycles. La capacité catalytique de la BPDO varie aussi selon la disponibilité de l' $O_2$  et la limite de solubilisation des BPC présents (Chebrou et al., 1999 : 4805).

En présence de certains analogues du substrat plus difficilement dégradés, il peut se produire un découplage au cours de la réaction. La durée de vie du radical oxygéné au site actif est prolongée ce qui entraîne la formation de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) toxique pour la cellule. Chez la dioxygénase du naphthalène (NDO), une dioxygénase dont la structure est similaire à la BPDO, près de 50% de l' $O_2$  utilisé peut être détecté sous forme d' $H_2O_2$  lors de l'attaque du benzène. La présence de  $H_2O_2$  peut aussi provoquer l'inactivation irréversible de la dioxygénase. Cette perte d'activité est probablement due à la formation d'un radical hydroxyle issu d'une réaction entre le  $H_2O_2$  et le  $Fe^{2+}$ . Le radical réagit alors avec les acides aminés nécessaires au centre Rieske et rendent celui-ci inopérant (Lee, 1999 : 2719; Wende, Bernhardt et Pflieger, 1989 : 189).

### 1.3.3.2 Angle d'attaque et spécificité

Le type de congénères pouvant être attaqués ainsi que les angles d'attaque d'un même congénère varient en fonction de la spécificité et de la régiospécificité de la dioxygénase impliquée dans la réaction. Le Tableau 1 fait un bref rappel du potentiel catalytique de quelques unes des souches qui ont été largement investiguées.

La régiospécificité de la BPDO détermine le patron métabolique du congénère à être dégradé. Par exemple, en présence du 2,5,4'-CB, la souche KF707 attaque le cycle mono-substitué en position 2,3 et produit un composé de *meta*-clivage. La souche LB400,

attaque préférentiellement le cycle di-substitué en position *meta/para* produisant peu de 2,3-dihydrodiol et surtout du 3,4-dihydrodiol. Cependant, ce dernier diol ne peut être subséquentement transformé par BphC et s'accumule dans la cellule (Kimura et al., 1997 : 3936).

**Tableau 1.** Spécificité de certains isolats de laboratoire capables de transformer les BPC.

Souches	LB400	KF707	H850	B356	RHA1
<u>BPC</u>					
2,6	○	○	○	●	-
2,2'	●	-	●	○	●
2,5,2'	●	-	●	○	●
2,5,2',5'	●	-	●	-	●
2,3,2',5'	●	-	●	N/D	N/D
2,3,2',3'	●	●	●	○	N/D
2,4,5,2',3'	●	-	●	N/D	N/D
2,4,5,2',5'	●	-	●	N/D	-
2,3,4,2',5'	●	-	●	-	N/D
4,4'	●	●	-	●	●
2,4,4'	●	●	-	●	N/D
2,4,2',4'	○	-	-	-	●
2,4,3,4'	○	●	-	-	N/D
3,3'	○	○	○	●	N/D
2,4'	●	●	-	N/D	N/D
2,3	●	●	-	●	●
2,5,4'	●	●	-	N/D	N/D
2,5,3',4'	●			N/D	N/D
2,4,5,2',4'5'	○				○

% de dégradation ●:80-100% ●:60-79% ● 20 - 49%

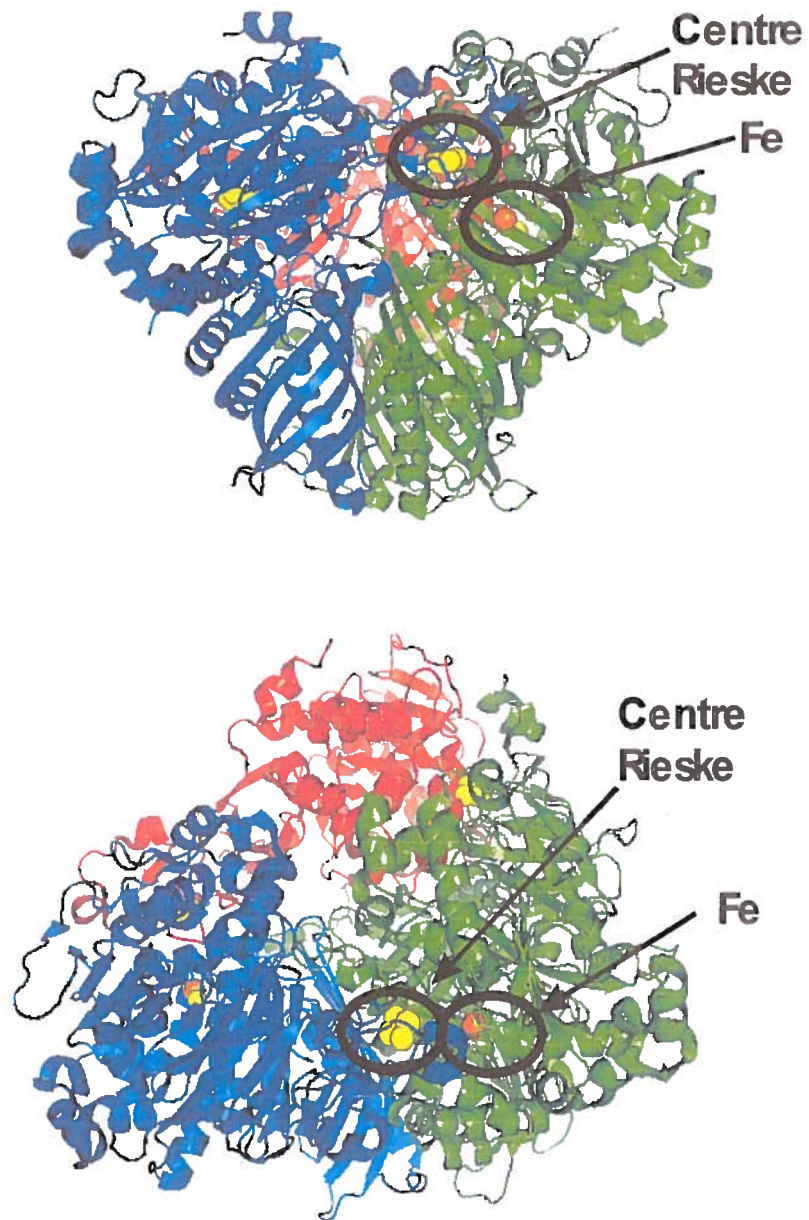
○ trace N/D : non déterminé. (Arnett, Parales et Haddock, 2000 : 2928; Barriault, Plante et Sylvestre, 2002 : 3794; Gibson et al., 1993 : 4561; Iwasaki et al., 2007 : 993).

## 1.4 Structure de la BphAE

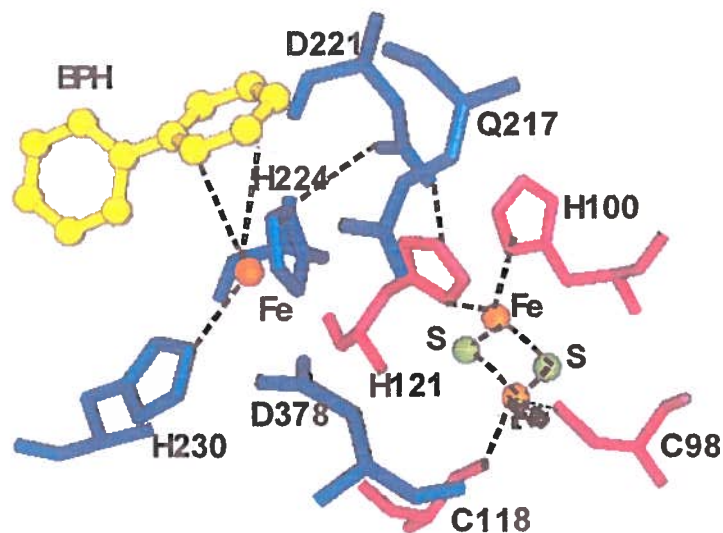
La structure tridimensionnelle de BphAE a été déterminée pour la BPDO de *R. jostii* RHA1 (Furusawa et al., 2004 : 1041). L'analyse de la structure a confirmé que cette protéine est composée de deux sous-unités,  $\alpha$  (BphA,  $M_r=51\ 000$ ) et  $\beta$  (BphE,  $M_r=22\ 000$ ), assemblées sous forme d'un hexamère (Figure 9). La structure quaternaire est essentielle au fonctionnement de l'enzyme, car les sites catalytiques (3 sites par holoenzyme) se retrouvent aux interfaces entre les sous-unités BphA. Le centre Rieske de l'une se trouvant à 12 Å du  $Fe^{2+}$  de la sous-unité voisine, il peut alors y avoir transfert d'électrons. Sur une même sous-unité  $\alpha$ , ces deux éléments sont situés à plus de 44 Å l'un de l'autre, ce qui ne permet pas leur interaction (Wackett, 2002 : 577).

Plusieurs acides aminés de BphA sont essentiels à la formation du centre catalytique (Figure 10). Toute mutation à leur niveau inactive complètement l'enzyme. Les résidus cystéine 98 et 118 (positions chez BphAE<sub>RHA1</sub> correspondant aux résidus 100 et 120 de BphAE<sub>LB400</sub>) ainsi que les résidus histidine 100 et 121 (102 et 123 de BphAE<sub>LB400</sub>) lient les atomes de fer du centre Rieske. Les résidus histidine 224 et 230, et l'asparagine 378 servent à coordonner le  $Fe^{2+}$ . Enfin, l'asparagine 205 (non présentée) permet de créer un pont entre le centre Rieske d'une sous-unité et le  $Fe^{2+}$  de sa voisine en créant des liaisons hydrogène entre des résidus histidine de l'une et l'autre des BphA (Furusawa et al., 2004 : 1041).

La structure tridimensionnelle de la BPDO détermine aussi l'orientation du substrat dans le site actif : les chaînes latérales des résidus situés au site catalytique et dans le canal y menant interagissent avec les anneaux du biphenyle et ses substituants (Figure 10). Ces interactions influencent l'angle d'attaque et l'efficacité de la réaction. Les acides aminés responsables de cette spécificité varient en nombre et en position selon l'enzyme.



**Figure 9.** Structure tridimensionnelle de BphAE provenant de la BPDO de la souche *R. jostii* RHA1. En bleu, rouge et vert/jaune, dimères BphAE, BphA étant située au-dessus de BphE. Les sites catalytiques situés aux jonctions de BphA et de BphE sont encerclés. (a) vue de face (b) vue plongeante (tirée de Furusawa 2004 (Furusawa et al., 2004 : 1041)).



**Figure 10.** Structure détaillée du site actif de BphAE<sub>RHA1</sub> contenant un centre Rieske (2Fe-2S) et un Fe<sup>2+</sup> en présence du biphényle. Modélisation réalisée à l'aide du logiciel Pymol.

Suenaga et al. (2002) (Suenaga et al., 2002 : 3682) ont déterminé la fonction de certains acides aminés formant la paroi hydrophobe du site catalytique et capables d'interagir avec les substrats aromatiques. Chez BphAE<sub>KF707</sub>, ces résidus sont Phe<sup>227</sup>, Leu<sup>332</sup>, Ile<sup>335</sup>, Thr<sup>376</sup>, Phe<sup>377</sup> et Phe<sup>383</sup>. Le mutant Ala<sup>332</sup>Leu excepté, les mutations de ces positions créent des enzymes incapables de transformer le 4,4'-CB et la substitution de l'un ou l'autre des résidus Phe en position 227, 377 et 383 entraîne une perte d'activité de l'enzyme envers le biphényle.

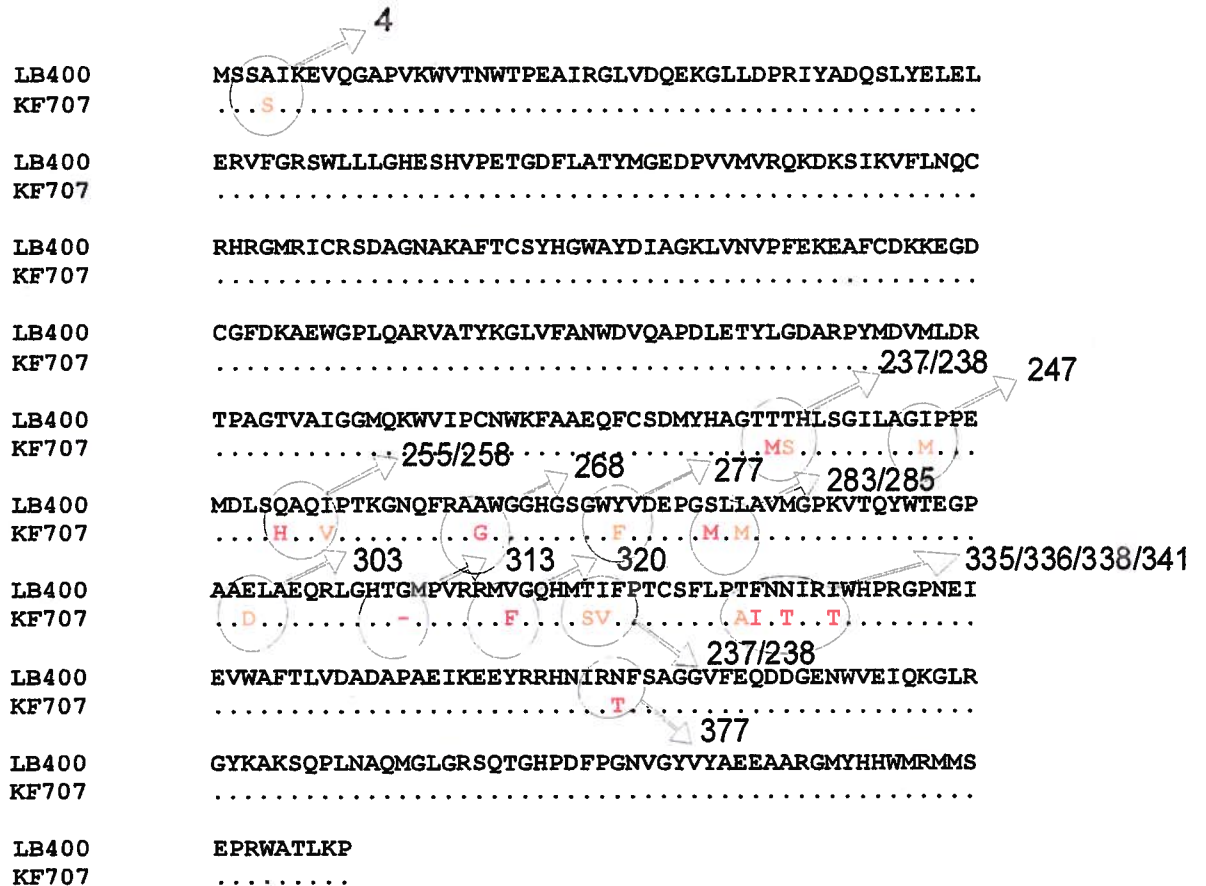
### 1.4.1 Régions de BphAE responsables des variations de spécificité envers le substrat

#### *1.4.4.1 Rôle de BphA*

Des essais effectués en associant les différentes composantes de l'opéron *bph* et de l'opéron *tod* (codant pour les gènes de dégradation du toluène) ont permis de préciser que la composante majeure déterminant la spécificité de substrat chez la BPDO est la sous-unité BphA (Furukawa et al., 1993 : 5224; Hirose et al., 1994 : 27). La comparaison des séquences (à 97% identiques) des enzymes BphAEFG des souches LB400 et KF707



valide ce constat. Les protéines BphF et BphG sont identiques pour les deux souches. Toutes les différences entre BphAE<sub>LB400</sub> et BphAE<sub>KF707</sub> sauf une (20/21) se retrouvent sur BphA : 19 d'entre elles sont des permutations et l'autre, une délétion (Figure 11) (Kimura et al., 1997 : 3936). La 21<sup>ème</sup> mutation est située sur BphE mais la permutation de ces sous-unités entre BphAE<sub>LB400</sub> et BphAE<sub>KF707</sub> n'entraîne pas de modification de phénotype.



**Figure 11.** Alignement des séquences en acides aminés de fragments C-terminaux de BphA<sub>LB400</sub> et BphA<sub>KF707</sub>. Les positions indiquées sont celles de LB400.

Lors d'essais réalisés avec des hybrides *bphAE* où le gène *bphA* de KF707 est remplacé par celui de LB400, la souche recombinante exprimant BphA<sub>LB400</sub>E<sub>KF707</sub> acquiert les capacités de dégradation de BphAE<sub>LB400</sub>. Ce résultat signifie que ce sont les gènes respectifs qui sont responsables des différences observées entre les deux souches et non l'environnement cellulaire propre à chaque bactérie (Erickson et Mondello, 1993 : 3858).

La mutagenèse dirigée sur les acides aminés divergents de BphA entre LB400 et KF707 a permis d'identifier le résidu Asp<sup>377</sup> chez BphAE<sub>LB400</sub> comme étant responsable de la capacité d'attaquer en position 3,4. En remplaçant la Thr<sup>376</sup> de BphAE<sub>KF707</sub> par une Asp, le variant obtenu a acquis la capacité d'attaquer le 2,2',5,5'-CB et le 2,5,4'-CB en position 3,4. Le remplacement des positions 303, 320, 325, 326, 335, 336, 338 de BphAE<sub>LB400</sub> par les résidus correspondants de BphAE<sub>KF707</sub> n'entraîne cependant aucune modification de phénotype. Chez BphAE<sub>KF707</sub>, le remplacement des positions 324, 325 et 340 par les acides aminés présents chez LB400 ne provoque non plus de modification dans les capacités d'attaque, et le remplacement de la Met<sup>283</sup> par la sérine présente chez BphAE<sub>LB400</sub> entraîne l'inactivation de l'enzyme. La raison de ce dernier phénomène n'est toutefois pas connue. Il a aussi été démontré que certaines enzymes étaient plus tolérantes aux modifications de séquences. Si la région 0-836 bp du gène *bphA* de KF707 est placée en aval de la région de 541 bp C-terminale de LB400, il en résulte une enzyme active ayant les propriétés de BphAE<sub>LB400</sub>. Dans le cas inverse, l'enzyme est inactive (Kimura et al., 1997 : 3936).

Suenaga et al. (2002) concluent que le remplacement de Thr<sup>376</sup> par Asp<sup>376</sup>, de Phe<sup>377</sup> par Leu<sup>377</sup> ou de Ile<sup>335</sup> par Phe<sup>335</sup> chez BphAE<sub>KF707</sub> autorise l'enzyme mutante à opérer l'*ortho*-déchloration spécifique à LB400. Ces mutations jouent aussi un rôle important dans l'établissement d'un large spectre de substrat en permettant l'attaque en position 3,4, ce qui confirme les résultats de Kimura et al. (1997) (Kimura et al., 1997 : 3936). Les résultats montrent aussi que ces mutations médient l'attaque en position 3,4 sur le 2,5,2'-CB, le 2,5,4'-CB et le 2,2',5,5'-CB.

Il a aussi été possible de développer des mutants spécifiques au 3,3'-CB en modifiant les Phe en position 227 et 377 chez KF707 pour une Val et une Ala respectivement. Ces mutants perdent toute capacité envers les autres congénères BPC mais peuvent médier une *meta*-déchloration du 3,3'-CB (Pieper, 2005 : 170; Suenaga et al., 2002 : 3682).

En alignant les séquences des familles de gènes *bphA* ayant des fonctions similaires soit à LB400 soit à KF707, Mondello et al. (1997) ont déterminé quatre régions de la partie C-terminale de *bphA* pouvant être responsables des différences de spécificité entre ces enzymes (Figure 12). La région I présente la séquence Met<sup>237</sup> Ser<sup>238</sup> chez BphAE<sub>KF707</sub> et Thr<sup>237</sup> Thr<sup>238</sup> chez BphAE<sub>LB400</sub>. La région II est formée d'un seul acide aminé en position 277; il s'agit d'une Tyr chez LB400 et d'une Phe chez KF707. La région III est formée de sept résidus dont quatre sont variables : 335, 336, 338, 341 (position chez BphAE<sub>LB400</sub>). Finalement la quatrième région se retrouve en position 377 chez BphAE<sub>LB400</sub>. Il s'agit d'une Asp chez BphAE<sub>LB400</sub> et d'une Thr chez BphAE<sub>KF707</sub> (Mondello et al., 1997 : 3096).

L'introduction chez BphAE<sub>LB400</sub> des séquences de BphAE<sub>KF707</sub> au niveau des régions I, II et IV individuellement ne produit pas de changement dans la spécificité des congénères attaqués. Par contre, le remplacement de la Phe<sup>336</sup> par une Ile ou de l'Asp<sup>338</sup> par Thr (région III) permet d'élargir le spectre d'activité de BphAE<sub>LB400</sub> aux congénères *di-para*-substitués. La combinaison des mutations Thr<sup>335</sup>Ala, Phe<sup>336</sup>Ile et Asn<sup>338</sup>Thr chez BphAE<sub>LB400</sub> est encore plus efficace. Cependant la mutation Thr<sup>335</sup>Ala seule est sans effet. La combinaison des mutations ciblant les régions III et IV affecte aussi la spécificité de substrat. Si la région III de BphAE<sub>KF707</sub> est introduite chez BphAE<sub>LB400</sub>, des recombinants ayant une large spécificité ainsi qu'une capacité de dégradation envers les *para*-substitués sont obtenus. Cependant, si la mutation Asp<sup>377</sup>Thr est introduite en plus, le spectre de substrat devient similaire à celui de BphAE<sub>KF707</sub>. L'effet combinatoire de ces régions dépend principalement de l'acide aminé en position 336. En présence de la Phe qui origine BphAE<sub>LB400</sub> en position 336, la mutation Asp<sup>377</sup>Thr n'a pas d'effet (Mondello et al., 1997 : 3096).

		<b>I</b>		<b>II</b>
LB400	237	TTTL	SGILAGIPPEMDLSQAQIPTKGNQFRAAWGGHSG	TYVDEPGSLLA
KF707	237	MS	.....M.....H..V.....G.....	F.....M.M.
LB400	287	VMGPKVTQYWTEGPAAELAEQRLGHTGMPVRRMV	--GQHMTIFPTCSFLP	
KF707	287	.....D.....-	.....F--.....SV.....	
		<b>III</b>		<b>IV</b>
LB400	335	TFNNIRI	WHPRGPNEIEVWAF TLVDADAPAEI	KEEYRRHNI
KF707	334	AI.T.T	.....	RNE SAGGVF
LB400	385	EQDDGENWVEIQKGLR	GYKAKSQPLNAQMGLGRSQTGH	PDFPGNVGYVYA
KF707	384	.....	.....	.....

**Figure 12.** Identification des régions I à IV telles que décrites par Mondello et al. 1997 (Mondello et al., 1997 : 3096).

#### 1.4.4.2 Rôle de BphE

Il est difficile de déterminer le rôle de BphE en comparant les souches LB400 et KF707, car les protéines sont semblables à 99,5%. Des expériences réalisées avec les souches LB400 et B356 (70% d'homologie) démontrent que les recombinants exprimant BphA<sub>B356</sub>BphE<sub>LB400</sub> ont un spectre de substrat semblable à LB400. Le mutant inverse, BphA<sub>LB400</sub>BphE<sub>B356</sub>, présente les caractéristiques des deux souches à la fois, soit la capacité de métaboliser le 2,2'-CB (LB400) et le 3,3'-CB (B356), et la capacité de catalyser l'oxygénation en position 3,4 du 2,2',5,5'-CB(LB400) (Hurtubise, Barriault et Sylvestre, 1998 : 5828). Lorsque les sous-unités de BphA<sub>E<sub>LB400</sub></sub> et de BphA<sub>E<sub>B356</sub></sub> sont permutées avec celles de BphA<sub>E<sub>P6</sub></sub>, les capacités catalytiques des hybrides diffèrent aussi de celles de leurs parents. Bien que BphA<sub>E<sub>B356</sub></sub> transforme difficilement le 2,2'-CB, le recombinant BphA<sub>B356</sub>BphE<sub>P6</sub> le métabolise à un rythme plus rapide que le 3,3'-CB. Le mutant BphA<sub>P6</sub>BphE<sub>LB400</sub> ne peut quant à lui dégrader le 2,2'-CB, mais a acquis la capacité de transformer faiblement le 2,2',5,5'-CB contrairement à BphA<sub>E<sub>P6</sub></sub> (Chebrou et al., 1999 : 4805). La structure tridimensionnelle résultant de l'appariement entre BphA et

BphE étant critique pour la région catalytique de l'enzyme, il est normal que cette dernière ait un rôle à jouer pour déterminer le spectre de substrats pouvant être attaqués par une BPDO donnée.

## 1.5 Évolution moléculaire

L'évolution moléculaire vise à mimer les processus naturels menant au remodelage enzymatique dans le but d'accélérer le processus et de le diriger en fonction d'un but unique et spécifique. Le terme regroupe un ensemble de techniques variées qui visent à générer des protéines recombinantes sélectionnées *in vitro* en fonction d'un phénotype précis. Ces méthodes s'appuient sur le principe que la plupart des protéines peuvent attaquer plus d'un substrat et ne nécessitent que peu de modifications pour en accepter un autre, un phénomène appelé ambiguïté de substrat (Jensen, 1976 : 409). Différentes approches d'évolution moléculaire ont été développées depuis les années 1970. Le tableau 2 décrit quelques unes de ces méthodes.

Les procédés rationnels comme la mutagenèse dirigée sont souvent moins efficaces que les processus d'évolution moléculaire en raison du manque de documentation sur les relations structure-fonction chez la plupart des protéines. Comme de meilleurs résultats ont été observés par un effet coopératif de diverses mutations et que la structure du site actif est déterminée par des segments pouvant être éloignés les uns des autres, il est difficile de prédire quels sont les acides aminés directement responsables d'un phénotype donné.

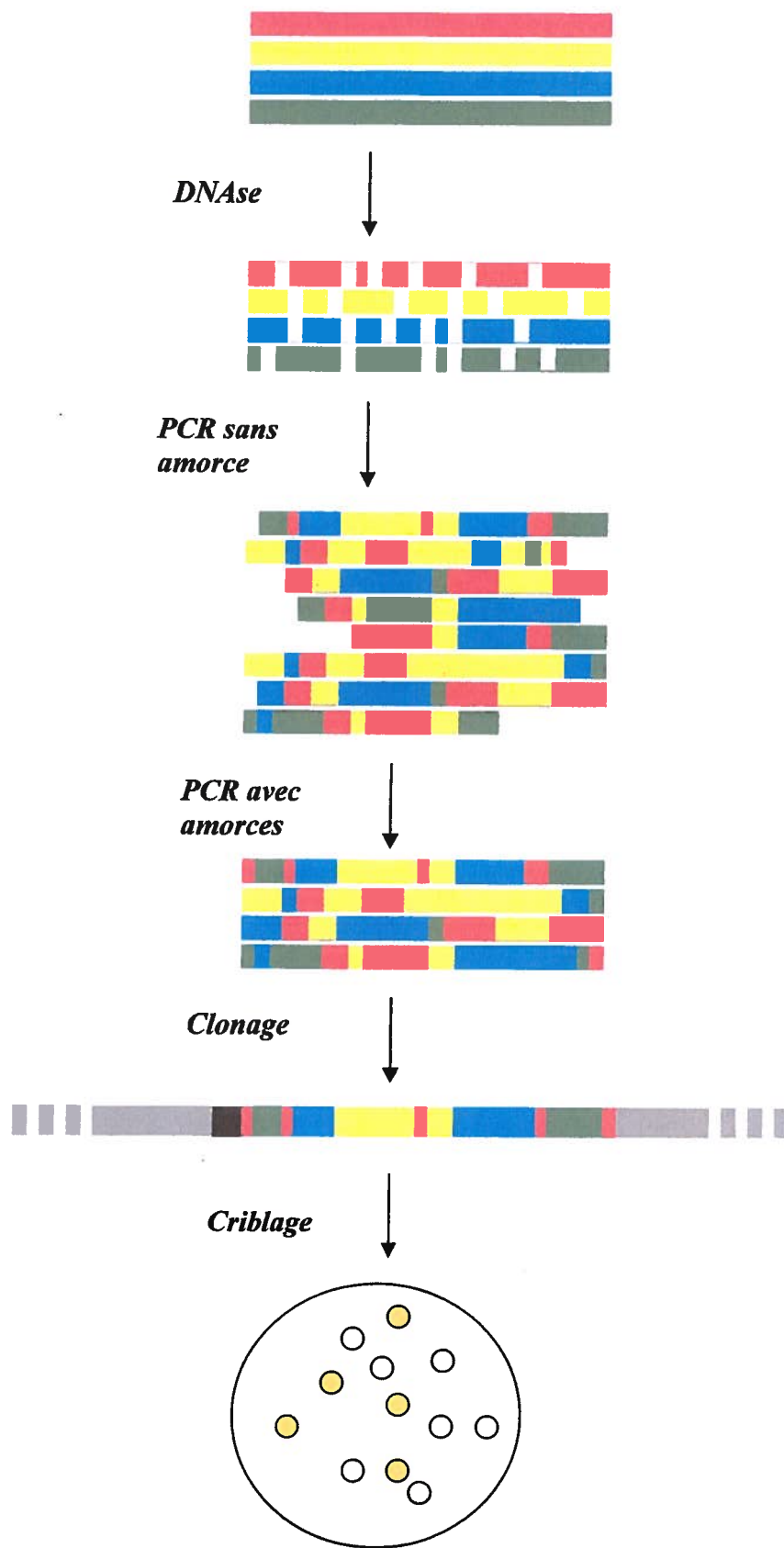
**Tableau 2. Description de diverses méthodes d'évolution moléculaire**

<p><b>Recombinaison aléatoire <i>in vitro</i> (DNA shuffling)</b></p>	<p>(Stemmer, 1994 : 10747)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Un même gène est amplifié par PCR, fragmenté puis réassemblé. La progéniture obtenue est elle-même soumise au processus de fragmentation et de réassemblage</li> <li>• Permet de cibler des régions où les mutations sont significatives dans le gène.</li> </ul>
<p><b>Recombinaison aléatoire <i>in vitro</i> de famille de gènes (Family DNA shuffling)</b></p>	<p>(Cramer et al., 1998 : 288)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Une série de gènes provenant d'une même famille sont amplifiés par PCR, fragmentés puis réassemblés.</li> <li>• Permet de mettre à profit un bassin de mutations significatives présentes dans l'environnement.</li> </ul>
<p><b>Recombinaison aléatoire <i>in vitro</i> indépendante de l'homologie de séquence (SHIPREC)</b></p>	<p>(Sieber, Martinez et Arnold, 2001 : 456)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recombinaison entre deux gènes liés par une courte séquence, fragmentés aux extrémités puis jointes par circularisation.</li> <li>• Permet la recombinaison entre gènes peu homologues</li> </ul>
<p><b>Recombinaison aléatoire <i>in vitro</i> par oligonucléotides synthétiques (synthetic shuffling)</b></p>	<p>(Ness et al., 2002 : 1251)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Une série d'oligonucléotides dégénérés sont utilisés pour assembler une librairie de gènes chimériques</li> <li>• Permet de contrôler la diversité introduite dans le processus.</li> </ul>
<p><b>Recombinaison aléatoire <i>in vitro</i> par hétéroduplexe</b></p>	<p>(Volkov, Shao et Arnold, 1999 : 18)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Des hétéroduplexes sont transformés dans une cellule hôte dont la machinerie de réparation modifiera les mauvais appariements, introduisant de ce fait des mutations.</li> <li>• Ce procédé ne permet de profiter de la diversité que de deux gènes et leur homologie doit être forte.</li> </ul>
<p><b>Recombinaison aléatoire <i>in vitro</i> par génération aléatoire de chimères (RACHITT)</b></p>	<p>(Coco, 2003 : 111; Ojangu et al., 2000 : 6707)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Des fragments de gènes « simple brin » sont appariés sur un gabarit pleine longueur dont les bases thymidine ont été remplacées par des bases uracile. Les produits obtenus sont traités à la klenow et amplifiés par PCR.</li> <li>• Cette technique permet le <i>shuffling</i> entre des gènes présentant une faible homologie.</li> </ul>
<p><b>Recombinaison aléatoire <i>in vitro</i> par oligonucléotides dégénérés (DOGS)</b></p>	<p>(Bergquist, Reeves et Gibbs, 2005 : 63)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Utilisation d'oligonucléotides dégénérés pour amplifier des segments de gènes qui sont ensuite mélangés et associés les uns aux autres.</li> <li>• Permet de minimiser la recombinaison entre les fragments parents</li> </ul>
<p><b>Recombinaison aléatoire <i>in vitro</i> par technologie d'échange de nucléotides et d'excision (NEXT)</b></p>	<p>(Muller et al., 2005 : 117)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Génération d'une banque de gènes à l'intérieur desquels ont été incorporés des résidus uridine qui servent à la fragmentation subséquente des gènes</li> <li>• Permet des résultats plus reproductibles</li> </ul>

### 1.5.1 L'évolution moléculaire par recombinaison aléatoire *in vitro* de familles de gènes

L'évolution moléculaire par recombinaison aléatoire *in vitro* de familles de gènes ou *family shuffling* utilise la fragmentation aléatoire de gènes ou de fragments de gènes d'une même famille ( $\geq 60\%$  homologie). Cette technique permet d'utiliser un bassin de mutations potentiellement avantageuses plutôt qu'aléatoires pour cibler une fonction particulière. Les variations de séquence provenant du processus de sélection naturelle étant pour la plupart fonctionnelles, les mutations apportées lors du processus de *family shuffling* sont plus facilement tolérées par la structure et entraînent moins d'effets négatifs sur l'efficacité de l'enzyme. Le *family shuffling* tient compte des modèles mathématiques de l'évolution des gènes. Ceux-ci mettent en évidence l'importance de la recombinaison homologue itérative dans le processus d'évolution génique, c'est-à-dire l'importance de la recombinaison entre des sections de gènes par rapport aux mutations ponctuelles (Cramer et al., 1998 : 288).

Le *family shuffling* est une méthode en cinq étapes (Figure 13). Des fragments d'ADN provenant de gènes appartenant à la même famille sont d'abord traités à la Dnase I afin de générer un ensemble de courts fragments. Ceux-ci sont ensuite réassemblés pour redonner les fragments pleine longueur par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Les fragments courts s'apparient les uns aux autres selon leur degré d'homologie et des événements de recombinaison se produisent. Ce réassemblage provoque aussi des mutations ponctuelles à un taux d'environ 0,7% (Moore et Maranas, 2002 : 9). Un ensemble de fragments de longueurs variées est alors obtenu. Une seconde réaction PCR est effectuée en présence d'amorces ciblant les extrémités du gène ou du fragment du gène désiré. La progéniture se compose alors de fragments recombinants pleine longueur qui sont ensuite clonés dans un vecteur d'expression portant le gène, le fragment d'opéron ou l'opéron pleine longueur. Les mutants obtenus sont finalement sélectionnés selon une méthode de criblage mimant idéalement la fonction désirée.



**Figure 13.** Schéma du processus de *family shuffling*.



Le succès du *family shuffling* repose sur une combinaison de trois facteurs : la diversité biologique des gènes utilisés, la taille de cette librairie de gènes et la capacité de détecter efficacement des modifications entraînant le gain de fonction désiré.

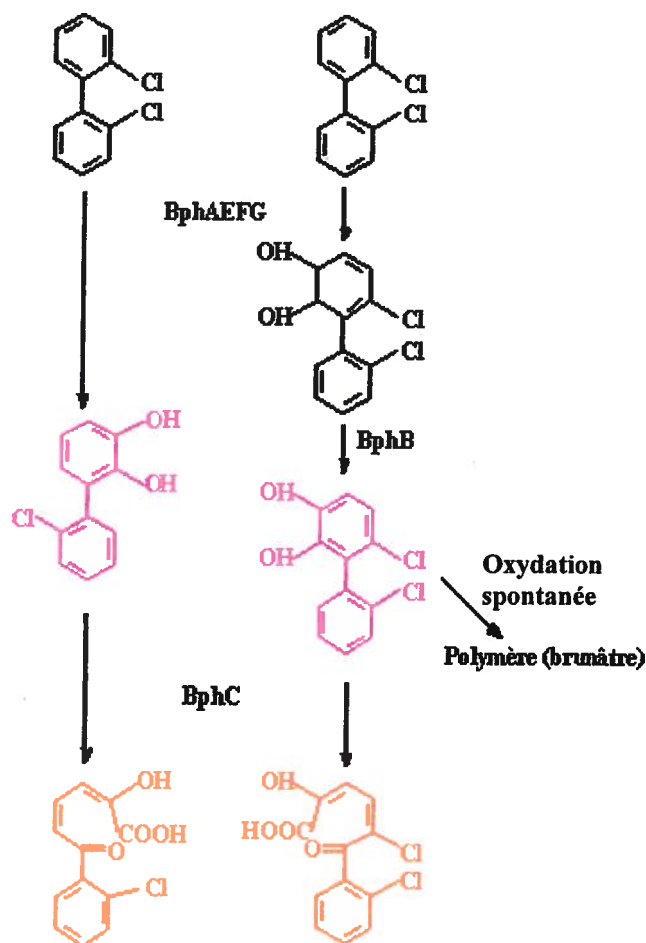
### **1.5.2 Ingénierie de la dioxygénase du biphényle**

La production de BPDO chimériques par *family shuffling* permet d'optimiser la transformation de certains BPC en permettant leur transformation *de novo*, en catalysant leur attaque de façon plus efficace ou en réduisant la formation de métabolites toxiques issus du processus de co-metabolisme (Barriault, Plante et Sylvestre, 2002 : 3794; Brühlmann et Chen, 1999 : 544). Il permet aussi d'élargir les capacités de dégradation de la BPDO à d'autres polluants comme le trichloroéthylène (Maeda et al., 2001 : 29833), le mélange benzène, toluène, éthylbenzène et xylène (BTEX) (Suenaga et al., 2001 : 5441) ou encore les chlorodibenzofuranes (Mohammadi et Sylvestre, 2005 : 835). Certaines BPDO recombinantes développées sont aussi capables de transformer les flavones et les flavanones, des composés phénoliques issus des végétaux et d'intérêt médical (Chun et al., 2003 : 113; Kim et al., 2003 : 261; Seeger et al., 2003 : 5045).

Barriault, Plante et Sylvestre (2002 : 3794) ont proposé une nouvelle approche d'ingénierie de la BPDO appliquant le procédé de *family shuffling* sur la portion codant pour la partie C-terminale de BphA et excluant le centre Rieske. Ce procédé permet de réduire le nombre d'hybrides à cribler pour isoler les variants d'intérêt en ciblant des zones identifiées comme étant critiques pour la spécificité de la BPDO. Cette technique permet aussi d'augmenter le pourcentage de recombinants actifs en gardant intact le centre Rieske de l'enzyme.

La stratégie de criblage est un élément clé dans le succès d'une méthode d'évolution moléculaire. Dans le cas de l'ingénierie de la dioxygénase du biphényle, deux stratégies ont principalement été utilisées (Figure 14). La première stratégie vise à transformer en composé de *meta*-clivage (jaune intense) le dihydrodiol formé par oxygénation catalytique du substrat aromatique (Kumamaru et al., 1998 : 663). L'autre se

fonde sur la capacité qu'ont les catéchols de polymériser en présence d'enzymes oxydatives comme les peroxydases ou en présence de catalyseurs métalliques présents dans le milieu environnant (Borraccino et al., 2001 : 3729). Barriault, Plante et Sylvestre (2002 : 3794) ont démontré que des solutions de catéchols provenant de chlorobiphényles s'oxydent et deviennent de couleur foncée lorsque déposées sur des colonies d'*E. coli* DH11S présentes sur des membranes de nitrocellulose.



**Figure 14.** Stratégies de criblage. Le schéma illustre comment les réactions couplées de la BPDO avec BphB et BphC peuvent être exploitées pour cribler les variants capables de déshalogénéation oxygénolytique comme la BPDO de LB400 ou pour cribler les variants selon qu'ils produisent des métabolites servant ou pas de substrat à BphC.

## Chapitre I

### Étude de la diversité de la partie C-terminale de la sous-unité $\alpha$ de la dioxygénase du biphényle

#### 2.1 Rappel de la problématique et des objectifs de recherche

La microflore présente dans les sols possède la capacité de transformer à des degrés variables certains des 209 congénères BPC existants. La BPDO est une enzyme clé du processus et détermine en grande partie la spécificité d'une souche donnée. Catalysant des réactions énantiosélectives et possédant un spectre de substrat élargi, cette enzyme est particulièrement intéressante pour la biotransformation d'autres polluants et dans le développement de l'industrie chimique. Une meilleure compréhension de la façon dont la BPDO évolue est essentielle au développement de ces biotechnologies afin de mieux cibler les déterminants de l'enzyme.

La première partie de ce travail s'intéresse à la diversité des structures en acides aminés de la région C-terminale de BphA, une sous-unité catalytique de l'enzyme importante pour la spécificité. L'analyse des séquences des produits PCR amplifiés à partir de diverses souches de bactéries non caractérisées ou de la microflore de sols contaminés permet de dessiner un portrait plus précis des régions les plus conservées et les plus variables de la partie C-terminale de *bphA*, et met en relation plus précisément les différentes dioxygénases connues. Les résultats obtenus ont été publiés dans la revue *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* (Vézina, Barriault et Sylvestre, 2008 : 139)

## 2.2 Matériel et méthodes

### 2.2.1 Mise au point des conditions PCR pour amplifier le fragment C-terminal de *bphA* à partir de l'ADN génomique extrait d'isolats bactériens

#### 2.2.1.1 Souches bactériennes et conditions de culture

Les isolats naturels présentés au Tableau 3 ont été utilisés. La souche *Escherichia coli* DH11S (Lin et al., 1992 : 718) ainsi que les souches recombinantes *E. coli* DH11S pQE31 [LB400*bphAE*] et *E. coli* DHIIS pQE31 [B356*bphAE*] (Barriault et al., 2001 : 1025) ont servi de contrôles positifs pour l'amplification PCR.

**Tableau 3.** Isolats naturels utilisés

Souches	Référence	Provenance
<i>B. xenovorans</i> LB400	(Bopp, 1986 : 23)	Sols contaminés
<i>P. pnomenusa</i> B356	(Ahmad, Massé et Sylvestre, 1990 : 53)	Boues activées
<i>C. necator</i> H850	(Bédard et al., 1987 : 1094)	Sols contaminés
<i>Paenibacillus</i> sp. B257	(Massé et al., 1984 : 947)	Sols
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> B357	(Massé et al., 1984 : 947)	Eau (rivière)
B358	(Massé et al., 1984 : 947)	Eau (rivière)
<i>Acidovorax</i> sp. B206	(Massé et al., 1984 : 947)	Boues activées
YT-01	(Ahmad, Massé et Sylvestre, 1990 : 53)	Sols

Les isolats naturels ont été cultivés sur le milieu minimal M9 liquide ou solidifié avec de l'agar 1,5% (Sambrook, Fritsch et Maniatis, 1989). De la thiamine (15  $\mu$ M) fut ajoutée au milieu M9 tel que recommandé par la compagnie Stratagene. Du biphényle provenant de la compagnie Aldrich Chemicals (Milwaukee, Wisconsin) ou du 4-CB provenant de Pfaltz & Bauer, Inc. (Waterbury, Connecticut) ont été ajoutés comme source de carbone dans le milieu M9 sous forme de cristaux à raison de 0,5% (m/v). Les isolats naturels dégradant les BPC ont été cultivés par agitation (200 rpm) à 29°C sur des périodes variant de 18 à 72 h selon la souche.

La souche *E. coli* DH11S a été cultivée dans le milieu Luria-Bertani (LB) solidifié ou non (Sambrook, Fritsch et Maniatis, 1989). De l'ampicilline à raison de 100 µg/ml fut utilisé dans le milieu LB lors de la culture des souches *E. coli* contenant les plasmides pUC19 ou les recombinants pQE31. Les souches recombinantes de *E. coli* DH11S ont été cultivées par agitation (200 rpm) à 37°C sur une période de 18 h dans le milieu LB.

### ***2.2.1.2 Plasmides et protocoles généraux de biologie moléculaire***

#### **2.2.1.2.1 Plasmide**

Le vecteur pUC19 (Yanisch-Perron, Vieira et Messing, 1985 : 103) disponible au laboratoire a été utilisé pour cloner les fragments PCR obtenus afin de générer des régions en amont et en aval du fragment PCR pouvant être facilement utilisées pour séquencer les fragments à l'aide des amorces universelles M13 sens et anti-sens.

#### **2.2.1.2.2 Isolement de l'ADN génomique et plasmidique**

L'ADN génomique des isolats de laboratoire a été extrait selon le protocole décrit dans le Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, 1998) pour les bactéries Gram (-) ou celui de Chater et al. (Chater et al., 1982 : 69) dans le cas des bactéries Gram (+). L'extraction d'ADN plasmidique des clones obtenus a été faite à l'aide de la trousse FlexiPrep™ (Amersham, Piscataway, NJ). La trousse QIAfilter™ Plasmid (Qiagen Inc., Chatsworth, CA) a été utilisée pour extraire l'ADN plasmidique destiné au séquençage. L'ADN du vecteur pUC19 a été isolé à l'aide de la trousse MidiPrep (Qiagen Inc., Chatsworth, CA).

### 2.2.1.2.3 Clonage des fragments PCR obtenus des isolats

Les fragments d'environ 900 pb obtenus par amplification PCR de l'ADN génomique des isolats décrits ont été traités à la T4 DNA polymérase (T4 pol) et à la T4 polynucléotides kinase (T4 PNK) (New England Biolabs (NEB), Ipswich, MA) pour rendre les extrémités franches. Les réactions étaient effectuées dans un volume de 100 µl du tampon PCR NH<sub>4</sub> qui contenait 10 µM d'adénosine triphosphate (ATP), 40 µM de dNTP, 80 U de T4 pol et 5U de T4 PNK. Le milieu réactionnel était incubé à 23°C durant 25 min. Les enzymes étaient ensuite inactivées par ajout d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) 150 mM en incubant à 70°C durant 10 min. L'ADN a été précipité à l'isopropanol et resuspendu dans du tampon Tris-HCl 10 mM pH 8,5. Le vecteur pUC19 quant à lui a été traité à l'endonucléase de restriction Sma I selon les conditions décrites par le fournisseur (Amersham, Piscataway, NJ).

Les milieux réactionnels de ligation contenant 20 U/µl de T4 DNA ligase (NEB) et 1X du tampon fourni par la compagnie ont été placés à 14°C durant une période de 18 h. Le rapport insert/vecteur était ajusté à 3 :1 pour une concentration totale d'ADN de 5 ng/µl. Les plasmides recombinants ainsi obtenus ont été transformés dans la souche *E. coli* DH11S. La souche *E. coli* DH11S permet de produire en grande quantité de l'ADN de grande qualité à partir de plusieurs vecteurs (Lin et al., 1992 : 718). De plus, comme il sera discuté plus loin, il s'agit d'une souche permettant d'exprimer efficacement des protéines codées par des vecteurs différents (Barriault et al., 2001 : 1025 ; Barriault et Sylvestre, 1999 : 293; Hurtubise, Barriault et Sylvestre, 1996 : 8152).

Les cellules compétentes fraîches étaient obtenues selon le protocole fourni dans l'annexe C du manuel d'utilisation de la trousse de mutagénèse dirigée de la compagnie Clontech (Mountain View, CA). Le protocole de transformation chimique était celui fourni par le même manuel et les recombinants étaient sélectionnés sur milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline.

#### 2.2.1.2.4 Séquençage des clones obtenus

Les clones obtenus contenant des fragments amplifiés de *bphA* ont été séquencés par la plate-forme de séquençage du Centre d'Innovation Génome Québec (Montréal, Qc) à l'aide des amorces universelles M13 sens et anti-sens (Yanisch-Perron, Vieira et Messing, 1985 : 103).

#### 2.2.1.3 *Amplification PCR de la partie C-terminale de bphA*

La séquence des amorces a été établie par comparaison des séquences connues de *bphA* provenant de différentes souches disponibles dans les banques de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI). Les séquences ont été alignées à l'aide du logiciel Align Plus pour Windows, version 3.0 (Scientific & Educational Software) et les régions d'homologies ont été déterminées manuellement. Les amorces potentielles ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel Oligo Primer Analysis Software version 5.0 (National Biosciences, Inc.).

L'efficacité des amorces ciblées a été évaluée par amplification PCR du fragment C-terminal des constructions pQE31 [LB400*bphAE*] et pQE31 [B356*bphAE*] (Barriault et al., 2001 : 1025). La polymérase utilisée était la *Expand High Fidelity PCR System* (Roche, Suisse) avec son tampon. La polymérase *Expand* est un mélange de polymérases de type *Taq* et *Pwo*. Après plusieurs essais utilisant des enzymes différentes, il s'est avéré que la polymérase *Expand* était l'enzyme permettant une combinaison optimale entre l'efficacité d'amplification de la polymérase *Taq* et la fidélité de la polymérase *Pwo* qui possède l'activité exo 3'-5' de correction du cadre de lecture. Le milieu réactionnel contenait aussi 0,25 µM de chacune des amorces et 200 µM d'un mélange équimolaire de dinucléotides triphosphates : adénine, guanine, cytosine et tyrosine (dNTP) (Roche). L'amplification s'est faite dans les conditions PCR suivantes : 95°C durant 3 min, 30 cycles (95°C durant 45 sec, 60°C durant 45 sec, 72°C durant 1 min), suivis de 10 min à 72°C.

Les amorces dégénérées actives ont ensuite été analysées en effectuant une amplification PCR de l'ADN génomique extrait des isolats décrits dans le chapitre 2. Le milieu réactionnel contenait 0,5  $\mu\text{M}$  de chacune des amorces, 200  $\mu\text{M}$  d'un mélange équimolaire de dNTP (Roche, Suisse) et 0,001% d'albumine sérique bovine (BSA). Le tampon  $\text{NH}_4$  utilisé contenait 20 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2,25 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1% Tween 80 et 75 mM Tris-Cl pH 9,0. La programmation pour le thermocycleur permettant une amplification efficace des fragments était la suivante : une phase de dénaturation de 5 min à 95°C suivie d'une séquence dite de « touchdown » allant de 68°C à 58°C. Cette séquence « touchdown » comprend une série de cycles composés de 1 minute à 95°C (phase de dénaturation), d'une période d'appariement des amorces de 1 minute dont la température augmente de 1 degré à chaque cycle puis d'une phase d'élongation de 1 minute à 72°C. Ces cycles sont suivis de 30 cycles (95°C durant 1 min, 58°C durant 1min, 72°C durant 1min), puis d'une phase d'élongation finale de 10 min à 72°C.

L'utilisation d'une séquence « touchdown » débutant à une température inférieure à la température optimale d'appariement des amorces permet de favoriser dans un premier temps la liaison des amorces dégénérées avec des séquences similaires peu abondantes dans l'échantillon d'ADN. Ces séquences sont ensuite amplifiées par la première série de 10 cycles peuvent ensuite servir de gabarit plus efficace pour l'amplification spécifique des séquences utilisant une température de renaturation plus élevée et un plus grand nombre de cycles.

#### ***2.2.1.4 Analyse de la variabilité des séquences obtenues***

Les séquences ont été alignées à l'aide du logiciel AlignPlus pour Windows, version 3.0 (Scientific & Educational Software) ou Clustal W version 1.83 (EMBL-EBI European Bioinformatics Institute) puis les arbres phylogéniques ont été dérivés à l'aide du logiciel MEGA (Molecular Evolution Genetics Analysis, version 3.1).



## **2.2.2 Amplification du fragment C-terminal de gènes *bphA* homologues présents dans l'ADN extrait des sols, et évaluation de la variabilité du gène *bphA* dans la nature**

### ***2.2.2.1 Souches bactériennes, sols et conditions de culture***

#### **2.2.2.1.1 Échantillons de sols**

Les sols contaminés, G7, G8, G9 et G11, ont été décrits précédemment (Guilbeault et al., 1994 : 73). Il s'agit d'échantillons de sols provenant de diverses régions de l'est du Canada, obtenus en 1985. Les échantillons ont été conservés dans des contenants de verre hermétiques placés à 4°C, à un taux d'humidité relative de 50%. Bien qu'un certain pourcentage des bactéries présentes dans ces échantillons soient mortes, nous avons misé sur le fait que l'ADN présent est encore suffisamment de bonne qualité pour permettre son amplification PCR.

Peu d'informations sont disponibles sur ces échantillons de sols contaminés, leur provenance étant confidentielle. Toutefois chacun a été prélevé dans la couche arable (10 cm supérieurs) du sol et possède un historique de contamination aux BPC allant de 15 et 50 ans. Cette contamination se compose d'un mélange d'Aroclor 1248, 1254 et 1260 à des concentrations situées entre 10 et 50 ppm. Les congénères présents dans l'Aroclor 1260 représentent plus de 50% de la contamination de ces sols et les BPC sont les seuls contaminants présents dans ces sols.

Le sol témoin non contaminé utilisé dans ce travail était un sol de jardin provenant de la région de Montréal. Il a été prélevé dans la couche arable du sol en 2002 et conservé dans des contenants de verre hermétiques à 4°C.

#### 2.2.2.1.2 Souches bactériennes

L'obtention et le clonage de fragments de la partie C-terminale de *bphA* à partir d'ADN génomique extrait des échantillons de sols s'est révélé plus problématique que pour les isolats. Nous avons donc utilisé le système *pGEM-T® Easy Vector* (Proméga, Madison, WI). Ce plasmide nécessite l'utilisation de la souche *E. coli* JM109 (Yanisch-Perron, Vieira et Messing, 1985 : 103) qui a été utilisée pour le clonage des fragments PCR amplifiés des échantillons de sols. La souche a été cultivée dans le milieu LB tel que décrit dans la section 2.2.1.1

#### 2.2.2.2 *Plasmides et protocoles généraux de biologie moléculaire*

##### 2.2.2.2.1 Isolement de l'ADN génomique et plasmidique

L'ADN extrait des échantillons de sols contaminés et non-contaminés a été obtenu selon deux méthodes : la technique décrite par Cho et al. (1996 : 229) à laquelle une étape finale de purification sur gel d'agarose a été ajoutée, et la trousse UltraClean Soil DNA (MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, CA). Dans le cas de la méthode de Cho et al., l'ADN était extrait du gel d'agarose 0,7% avec la trousse GenElute Gel Extraction (Sigma, St-Louis, MO). Les techniques de purification de l'ADN plasmidique ont été décrites dans la section 2.2.1.2.2.

##### 2.2.2.2.2 Clonage des fragments PCR obtenus des sols

Les fragments de la partie C-terminale de *bphA* d'environ 900 pb obtenus par amplification PCR de l'ADN génomique des échantillons de sols ont été clonés dans le vecteur *pGEM-T* (Proméga, Madison, WI) selon les directives du fournisseur pour ensuite être transformés dans les bactéries *E. coli* JM109 compétentes fraîches selon le protocole décrit à la section 2.2.1.2.3.

#### 2.2.2.2.3 Séquençage des clones obtenus

Les recombinants obtenus par clonage des fragments homologues du gène *bphA* amplifiés des sols ont été séquencés par la plate-forme de séquençage du Centre d'Innovation Génome Québec et de l'Université McGill (Montréal, Qc) à l'aide de l'amorce universelle M13 (Yanisch-Perron, Vieira et Messing, 1985 : 103).

#### 2.2.2.3 *Amplification PCR de la partie C-terminale de bphA*

Des fragments de la partie C-terminale de *bphA* furent amplifiés par PCR sur l'ADN génomique directement isolé du sol selon les conditions d'amplification de l'ADN issu des isolats décrites à la section 2.2.1.3, en utilisant l'amorce sens A1 combinée à l'une des amorces anti-sens A2, A3 ou A4 (Tableau 4).

**Tableau 4.** Séquences des différentes amorces utilisées pour amplifier par PCR la portion C-terminale de *bphA* à partir d'ADN extrait de sols contaminés.

<i>Nom</i>	<i>Brin</i>	<i>Séquence</i>
A1	codant	5' - GGC TGG GCC TAC GAC ANC GC - 3'
A2	non-codant	5' - ADV CCS CGB GCC GCB TCH TCG - 3'
A3	non-codant	5' - CRT CGT CCT GMT CRA AVA CRC C - 3'
A4	non-codant	5' - TT GAG SGY VKC CCA GYB VGG -3

code utilisé : N = A, G, C ou T ; D = A, G ou T ; V = A, C ou G ; S = G ou C ; B = G, C ou T ; H = A, C ou T ; V = A, C ou G ; S = G ou C ; R = A ou G ; M = A ou C ; W = A ou T ; K = G ou T ; Y = C ou T

#### 2.2.2.4 *Analyse de la variabilité des séquences obtenues*

Les séquences ont été alignées à l'aide du logiciel Align Plus pour Windows, version 3.0 (Scientific & Educational Software) ou Clustal W version 1.83 (EMBL-EBI European Bioinformatics Institute) puis les arbres phylogéniques ont été dérivés à l'aide du logiciel MEGA (Molecular Evolution Genetics Analysis, version 3.1) (<http://www.megasoftware.net>) selon la méthode dite de « neighbor-joining » (Saitou et Nei, 1987 :406). Cette méthode simplifie la méthode dite de « minimal evolution (ME) »

en estimant l'arbre dont la somme des distances relatives de chacune des branches est la plus faible. La méthode ME quant à elle se base sur le postulat que les arbres contenant le minimum de changements évolutifs sont les plus probables. Le modèle dit de « p-distance » a été utilisé avec cette méthode. Il estime la distance évolutive entre deux séquences en calculant le rapport *nombre de différences dans l'appariement des séquences sur nombre total de résidus présents* dans les 2 séquences comparées. Le logiciel MEGA a aussi supprimé les appariements manquants des séquences dans son analyse. Les arbres ont ensuite été vérifiés en effectuant 1000 analyses de type « bootstrap » générées pour chacune des séquences. Ce type d'analyse permet de vérifier la stabilité des arbres proposés.

## 2.3 Résultats

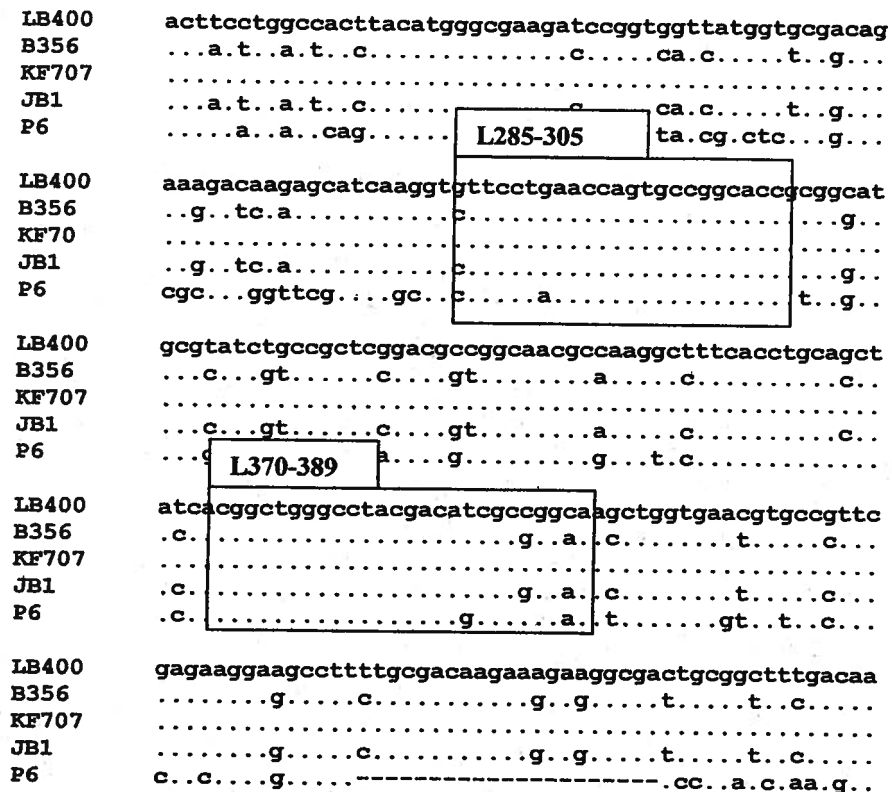
### 2.3.1 Identification des amorces dégénérées potentielles

L'amplification directement à partir de l'ADN de sol des représentants des fragments C-terminaux de gènes *bphA* homologues a nécessité la mise au point d'une série d'amorces dégénérées. Dans un premier temps, les séquences connues de *bphA* d'une dizaine d'isolats naturels pouvant dégrader les BPC (Tableau 5) ainsi qu'une dizaine de séquences de *bphA* de bactéries non cultivées obtenues de la banque de données NCBI ont été ordonnées. Cet alignement a permis d'identifier les zones présentant les homologies les plus élevées de part et d'autre de la portion C-terminale de *bphA* qui est délimitée par la région codant pour le centre Rieske et celle codant pour la fin du gène.

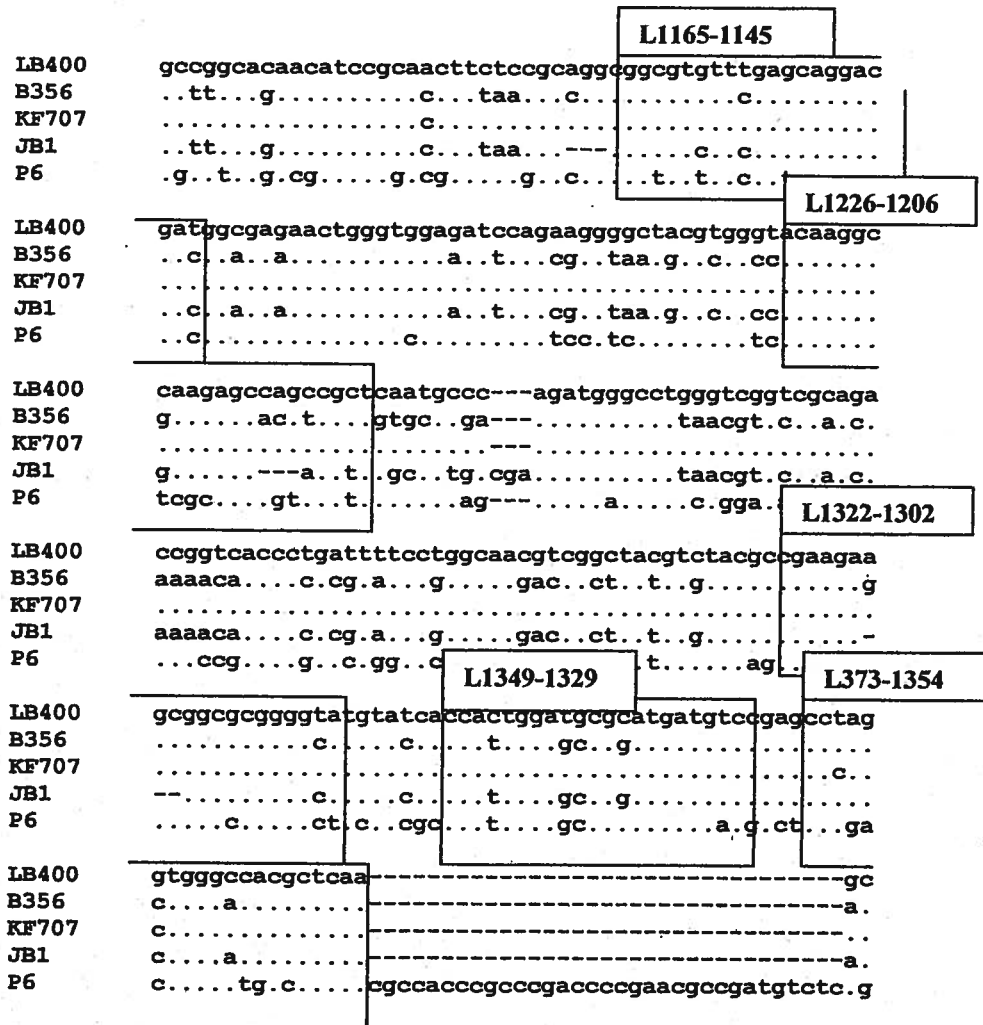
**Tableau 5.** Séquences *bphA* utilisées pour déterminer les amorces dégénérées

<b>Souches</b>	<b>Numéro d'accension dans GenBank</b>
<i>P.pnomenusa</i> B356	U47637
<i>B. xenovorans</i> LB400	M86348
<i>P. pseudoalcaligenes</i> KF707	AF049345
<i>Pseudomonas species.</i> KKS102	D17319
<i>Bacillus sp.</i> JF8	AB113649
<i>C. necator</i> H850	AJ544525
<i>Burkholderia sp.</i> JB1	AJ010057
<i>R. globerulus</i> P6	X80041
<i>R. jostii</i> RHA1	D32142
<i>Rhodococcus sp.</i> M5	U27591
Non cultivé	AF400562
Non cultivé	AF268991
Non cultivé	AF400525
Non cultivé	AF400553
Non cultivé	AF400559
Non cultivé	AF400563
Non cultivé	AF 400544
Non cultivé	AF268988
Non cultivé	AF400564

Une région de forte homologie correspondant aux positions 285 et 400 de *bphA*<sub>LB400</sub> a permis de concevoir les amorces sens L370-389 et L285-305 (Figure 15). L'homologie de la région correspondant à la fin de *bphA* est cependant plus faible. Il a donc fallu concevoir cinq amorces anti-sens pour couvrir le plus grand nombre possible de gènes *bphA* (Figure 16).



**Figure 15.** Alignement des séquences *bphA* situées en aval du centre Rieske. *P. pnomenusa* B356, *B. xenovorans* LB400, *P. pseudoalcaligenes* KF707, *Burkholderia sp.* JB1 et *R. globerulus* P6. Les encadrés correspondent aux amorces sélectionnées, les positions par rapport à LB400 étant indiquées au-dessus.



**Figure 16.** Aligement des séquences situées en C-terminal du gène *bphA* des souches *P. pnomenusa* B356, *B. xenovorans* LB400, *P. pseudoalcaligenes* KF707, *Burkholderia sp.* JB1 et *R. globerulus* P6. Les encadrés correspondent aux amorces sélectionnées, les positions par rapport à LB400 étant indiquées au-dessus.

L'efficacité des différentes amorces ciblées a été analysée lors d'essais d'amplification par PCR du fragment C-terminal des constructions pQE31 [LB400*bphAE*] et pQE31 [B356*bphAE*]. Une amorce sens, L370-389 (A1), et trois des cinq amorces anti-sens, L1165-1145 (A3), L1322-1302 (A2) et L1373-1354 (A4) décrites au Tableau 4, section 2.2.2.3, ont été retenues pour tenter d'amplifier des séquences inconnues de *bphA* provenant d'isolats bactériens et d'ADN amplifié de sols.

## **2.3.2 Isolats bactériens**

### ***2.3.2.1 Amplification PCR de bphA à partir d'ADN génomique extrait d'isolats bactériens***

De façon à vérifier si les amorces décrites à la section 2.3.1 pouvaient permettre d'amplifier une diversité de gènes *bphA* à partir d'ADN génomique, des essais d'amplification PCR ont été réalisés avec des préparations provenant des isolats bactériens capables de métaboliser le biphenyle (Tableau 6). Les séquences des gènes *bphA* de quelques-uns de ces isolats avaient déjà été rapportées, mais pour d'autres, dont les *bphA* des souches B206, B257, B357, B358 et YT-01, la séquence était inconnue. Les essais de PCR ont permis de mettre au point les conditions optimales d'amplification détaillées à la section 2.2.1.3. Il a été déterminé que les quatre amorces A1 à A4 permettaient d'amplifier le fragment correspondant à la partie C-terminale des *bphA* des 9 isolats du Tableau 6.



**Tableau 6.** Amplification par PCR à l'aide d'amorces dégénérées de la partie C-terminale de *bphA* d'isolats bactériens. Quatre isolats ont des séquences connues et 5 isolats ont une séquence *bphA* inconnue.

Souches/sols contaminés	Amorces dégénérées		
	A1/A2	A1/A3	A1/A4
<i>P. pnomenusa</i> B356	+	+	ND
<i>B. xenovorans</i> LB400	+	-	ND
<i>R. glomerus</i> P6	+	-	ND
<i>C. necator</i> H850	+	-	ND
<i>Acidovorax</i> sp. B206	-	+	+
<i>Paenibacillus</i> sp. B257	-	-	+
YT-01	+	-	+
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> B357	+	-	ND
B358	+	-	ND

+ : amplification PCR positive, - : aucune amplification, ND : non déterminé

### 2.3.2.2 Analyse des séquences des fragments C-terminaux de *bphA* provenant d'isolats bactériens

Dans le but de vérifier si les sondes dégénérées ciblaient effectivement la portion C-terminale des gènes *bphA* homologues issus de diverses provenances, les fragments amplifiés à partir de l'ADN génomique extrait d'isolats bactériens ont été clonés puis séquencés. Ce travail a aussi permis de comparer les séquences déduites en acides aminés des fragments C-terminaux de BphA de ces souches, permettant d'en évaluer la diversité. Les séquences des isolats nouvellement caractérisées ont été enregistrées dans la base de données GenBank sous les numéros d'accès EF596932 à EF596936.

L'analyse des séquences en acides aminés déduites des régions codantes amplifiées à partir de l'ADN génomique des isolats énumérés au Tableau 6 a révélé plusieurs régions d'homologie correspondant à BphA<sub>LB400</sub>, ce qui confirme que les amorces sélectionnées ciblent effectivement la partie C-terminale de *bphA* (Figure 17). L'étude des régions I à IV ciblées lors de travaux précédents (Mondello et al., 1997 :

3096) pour leur contribution à la spécificité de la dioxygénase envers les chlorobiphényles révèle une faible variabilité de séquences.

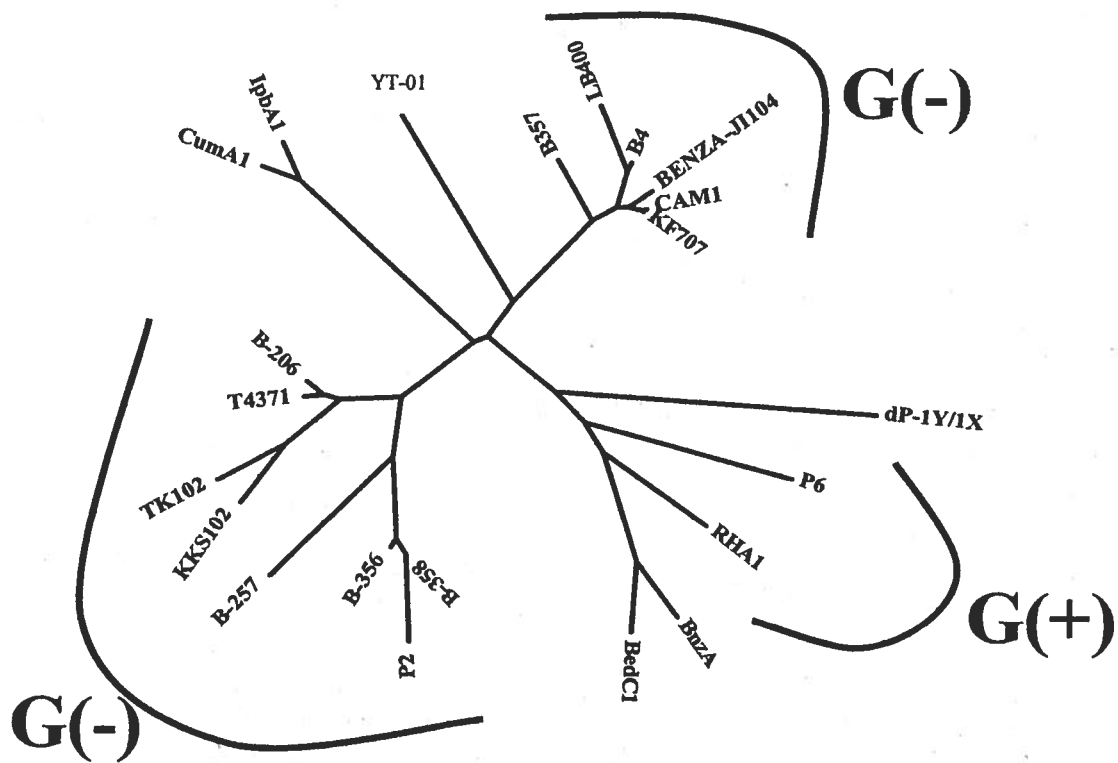
L'application du programme MEGA pour analyser les séquences en acides aminés déduites de séquences ADN permet de tracer un arbre phylogénique présentant trois branches majeures (Figure 18). Les séquences utilisées sont celles inscrites dans des banques de séquences pour les segments compris entre les résidus correspondant aux positions 162 et 382 de BphA<sub>LB400</sub>, ainsi que les fragments séquencés provenant des isolats bactériens. Les BphA de bactéries Gram (+) connues sont regroupées sur une seule branche et se rapprochent des dioxygénases du benzène et du toluène.

LB400	CGFDKAEWGFLQARVATYKGLVFANWDVQAPDLETYLGDARPYMDVMLDR
B206	-----E.....I.....AE.....K.....S.M.....
B257	-----E.....PE.....K.....S.M.....
B357	-----I.....AE.....
B358	-----E.....PE.....K.....S.M.....
YT-01	-----E.....AE.....I.T.F.
LB400	TPAGTVAIGGMQKWVIPCWKFVAAEQFCSDMYHAGT <sup>TT</sup> HLSGILAGIPPE
B206	.E...TIV.....MS...V..SL...
B257	.E...E...I.....MS...V..L...
B357	...E...I.....MS...M...
B358	.E...E...I.....MS...V..L...
YT-01	.A...E.....MS...M...
LB400	MDLSQAQIPTKGNQFRAAWGGHSGWV <sup>V</sup> DEPGSLLAVMGPVKVTQYWTEGP
B206	...T.V.MSKN.....T..FIND.SI.M...I...Q..
B257	...T.I.LSKN.....S.....A..FINDSSI..S.V...I...Q..
B357	...N.V.....N.....T..F.....M.M.....
B358	...T.I.LSKN.....S.....A..FINDSSI..S.V...I...Q..
YT-01	.....PM..T.F.....T..FE..A.F.AT.V...AAA..Y.G.E
LB400	AAELAEQRLGHTGMPVRRMVGQHM <sup>T</sup> IFPTCSFLP <sup>TFNN</sup> IRIWHPRGPNEI
B206	...K.AK.--NQ..TOT.Y...V.....GI.T.S.....V
B257	...K.AK.--NQ..TOT.Y...V.....GI.T.S.....
B357	...D...K...Q...F...N.....AI.T.S.....
B358	...K.AR.--VPQL.ILD.F...V.....
YT-01	SSKRTAE..ADRLPRFL..S...SV.....GI.T.T.....S..
LB400	EVWAFTLVDADAPAEI <sup>K</sup> EYRRHNIR <sup>NFS</sup> AGGVFEQDDGENWVEIQKGLR
B206	....VV..V...ED...F..Q...T.....
B257	.....D.....
B357	.....V...E.....T.....V..
B358	-----
YT-01	.....V...M.D.....T.....D.....

**Figure 17.** Alignement des séquences en acides aminés de la partie C-terminale de BphA de six isolats bactériens et de la souche LB400. En rouge : région I; en violet : région II; en bleu : région III; en orange : région IV.

Les deux autres branches regroupent les BphA de protéobactéries Gram (-). L'une des branches réunit la BphA<sub>B357</sub> aux dioxygénases de KF707 et de LB400. L'autre branche contient les BphA des souches B206, B257 et B358 qui se retrouvent associées aux BphA des souches B356 et KKS102. Ces deux branches sont séparées par une branche constituée des dioxygénases de l'isopropylbenzène et du cumène (IpbA1 et CumA1). Les BphA de tous les isolats analysés, sauf pour YT-01, se positionnent avec l'un ou l'autre des deux groupes de bactéries Gram (-) de l'arbre.

La BphA de l'isolat YT-01 fait partie d'une branche distincte des deux groupes de BphA de Gram (-). YT-01 est une bactérie Gram (-) capable de dégrader l'Aroclor 1242 (Sylvestre, communication personnelle). Cette souche se retrouve dans une nouvelle branche située entre la branche de IpbA1/CumA1 et la branche précédente associée aux souches LB400 et KF707. L'aspect unique de YT-01 se confirme par la comparaison de BphA<sub>YT-01</sub> avec toutes les séquences connues associées aux sous-unités BphA via l'outil *BLAST search* disponible sur le site internet du NCBI.



**Figure 18.** Arbre phylogénique tracé par le programme MEGA, par alignement des séquences déduites en acides aminés des portions C-terminales des gènes *bphA* de différents isolats de séquences connues avec les séquences des souches B206, B257, B357, B358 et YT-01. Sauf pour B358, les acides aminés correspondant aux positions 162 à 382 de *BphA*<sub>LB400</sub> ont été alignés. B4 : *Pseudomonas* sp. B4. [AAB88813]; LB400 : *B.xenovorans* LB400 [YP\_556409]; KF707 : *P. alcaligenes* KF707 [AAF22429]; CAM1 : *Pseudomonas* sp. CAM-1 [AAK14781]; IpbA1 : *Rhodococcus erythropolis* [NP\_89878]; CumA1 : *Pseudomonas fluorescens* IP01. [1WQL\_A]; T4371 : *Cupriavidus oxalaticus* A5. [CAD61140] ; TK102 : *Comamonas testosteroni* TK102 [BAC01052]; KKS102 : *P. sp.* KKS102. [Q52438] ; JB1. *Burkholderia* sp. JB1. [CAA08985]; P6. *R. globerulus* P6. [CAA56346]; BnzA. *P. putida*. [P08084]; BedC1. *P. putida* ML2. [Q07944]; RHA1. *R. jostii* RHA1. [YP\_707265] ;BnzA JI104. *P.aeruginosa* JI104 [E04215] ; dP-1Y/1X : bactérie non cultivée déduite à partir d'ADN extrait d'un sol contaminé au benzène [DQ167013].

### 2.3.3 Sols contaminés aux BPC

#### **2.3.3.1 Amplification PCR de *bphA* à partir d'ADN génomique extrait directement des sols contaminés aux BPC**

L'analyse des séquences des parties C-terminales de BphA d'isolats de laboratoire révèle l'existence d'au moins quatre lignées phylogéniques de BphA chez les bactéries; trois chez les bactéries Gram (-) et une chez les bactéries Gram (+) (Figure 18). De façon à évaluer la diversité de la région C-terminale de BphA dans l'ensemble des populations microbiennes des sols, les séquences en acides aminés déduites à partir d'ADN amplifié de sols ont été comparées. Des fragments d'ADN représentant de façon présumée les parties C-terminales de gènes *bphA* homologues ont été obtenus avec les cinq échantillons de sols analysés (Tableau 7).

**Tableau 7.** Amplification par PCR à l'aide d'amorces dégénérées, de la partie C-terminale de *bphA* de gènes directement isolés de sols contaminés aux BPC.

sols contaminés	Amorces dégénérées		
	A1/A2	A1/A3	A1/A4
NC	+	+	+
Sol G7	+	+	+
Sol G8	+	+	+
Sol G9	+	+	+
Sol G11	+	+	+

+ : amplification PCR positive, - : aucune amplification, ND : non déterminé. G7, G8, G9, G11 sont des sols contaminés, NC est un sol témoin non contaminé.

### 2.3.3.2 Analyse des séquences des fragments C-terminaux de *bphA* provenant des sols contaminés aux BPC

Les fragments correspondant à la portion C-terminale de *bphA* amplifiés à partir de l'ADN des sols ont été clonés et séquencés. Au total, 19 fragments ont été analysés : deux à partir d'ADN extrait du sol non contaminé, 17 à partir de l'un ou l'autre des quatre sols contaminés G7, G8, G9 et G11. Les séquences ont été enregistrées dans la base de données GenBank sous les numéros d'accès EF596913 à EF596931. Cinq des séquences obtenues étaient similaires aux dioxygénases du toluène et du benzène. Ces dioxygénases font partie de la même famille que celle du biphenyle. Pour les 14 autres fragments, il est possible de constater que les séquences correspondent effectivement à des séquences analogues à *BphA*<sub>LB400</sub>, ce qui confirme que le système d'amplification PCR développé permet effectivement de cibler la partie C-terminale des dioxygénases de type biphenyle dans les sols.

Le Tableau 8 présente l'alignement des différentes séquences en acides aminés des *BphA* de sols comparées à celles d'isolats bactériens caractérisés. Dans l'ensemble, comme le constat fait pour les séquences des *BphA* d'isolats de laboratoire, les patrons de séquence en acides aminés retrouvés au niveau des régions I, II, III et IV sont très conservés pour la plupart des fragments séquencés, malgré qu'ils diffèrent considérablement du patron retrouvé chez *BphA*<sub>LB400</sub> et qui singularise cette dioxygénase. La région II ne contient qu'une phénylalanine ou une tyrosine, des résidus connus présents chez KF707 et chez LB400 respectivement. La région IV, tout comme la région II, ne présente que des résidus associés à KF707 (Thr) ou à LB400 (Asn). Douze des 14 fragments issus des sols possèdent une région I identique à celle de KF707 (Met/Ser) et le fragment G7-2 est similaire à LB400 (Thr/Thr).

Lorsque les séquences précédentes sont comparées dans le programme MEGA pour construire un arbre phylogénique, les 4 branches décrites précédemment (trois pour les *BphA* des bactéries Gram (-) et une pour les *BphA* de bactéries Gram (+) de type *Rhodococcus* apparaissent (Figure 19). La plupart des *BphA* obtenues des sols se positionnent au niveau de ces branches. Cependant, à l'intérieur de ces tronçons, les

BphA isolées des sols forment des sous-branches distinctes. C'est le cas des fragments G8-2 et G7-5b par exemple, qui se groupent avec les Gram (-) de type LB400.

Outre ces observations, il est intéressant de constater que l'arbre dressé à partir des BphA amplifiées du sol présente une nouvelle branche. Elle comprend les fragments G11-43, G11-42, G9-26 et G9-28 qui se distinguent de toutes les autres dioxygénases déjà décrites dans la littérature. L'analyse phylogénique des BphA issues des sols permet de constater que la séquence primaire de BphA est plus diversifiée que ne le laissait présumer les analyses précédentes basées sur les isolats de laboratoire ou sur les régions I à IV. Ce constat corrobore celui fait par Witzig et al. dans une étude semblable réalisée avec des sols contaminés au benzène (Witzig et al., 2006 : 3504).





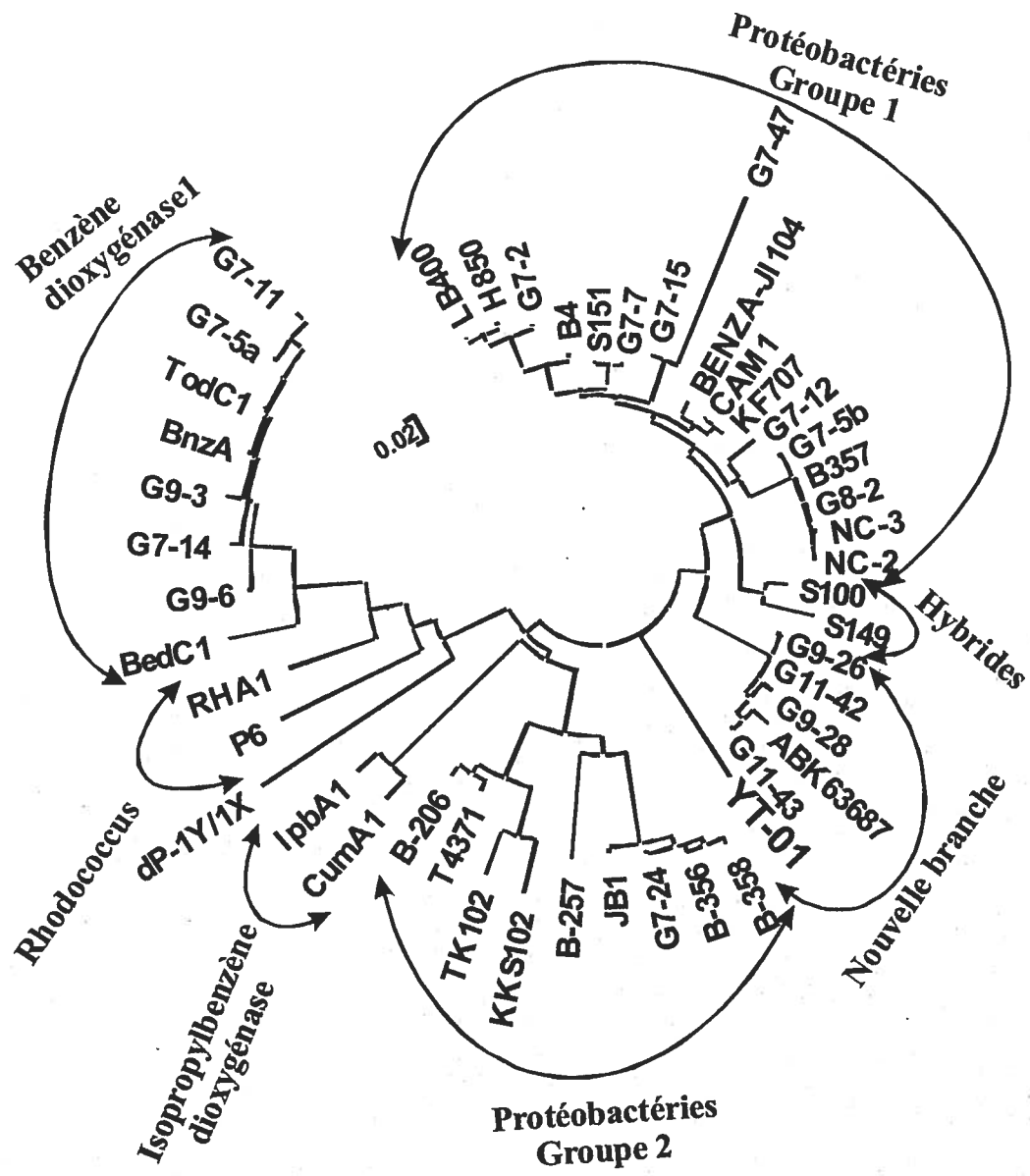


Figure 19. Arbre phylogénique tracé par le programme MEGA, par alignement des séquences en acides aminés déduites des portions C-terminales des gènes *bphA* de différents isolats de séquences connues avec les séquences d'ADN amplifié directement de sols. Alignement des acides aminés correspondant aux positions 162 à 382 de  $BphA_{LB400}$ . S100, S149 et S151 sont des variants de  $BphA_{LB400}$  décrits à la section suivante et obtenus par *family shuffling* avec de l'ADN de sol. La description des oxygénases autres que celles déduites de fragments amplifiés de sols ou des isolats décrits à la section 2.3.2 (B4; LB400; KF707; CAM1; IpbA1; CumA1; T4371; TK102; KKS102; JB1; P6.; BnzA.; BedC1; RHA1; BnzA JI104; dP-1Y/1X) se retrouve à la Figure 18.

## 2.4 Discussion

Peu de travaux se sont intéressés à la diversité de la dioxygénase du biphenyle retrouvée dans la nature. La plupart des analyses regroupent ces enzymes avec les dioxygénases du toluène sous l'appellation dioxygénase du toluène/biphenyle et utilisent les principaux isolats connus comme échantillonnage représentatif (Nam et al., 2001 : 254; Gibson et Parales, 2000 : 236; Taylor et Janssen, 2005 : 140). Des études sur les dioxygénases de type Rieske qui se basent sur des méthodes indépendantes de l'isolement de culture démontrent que les séquences obtenues à partir d'isolats bactériens ne sont pas représentatives des dioxygénases retrouvées dans l'environnement (Yeates, Holmes et Gillings, 2000 : 644). Les travaux réalisés jusqu'à maintenant sont donc peu représentatifs de la diversité phylogénique réelle retrouvée chez la BPDO.

Plusieurs amorces permettant d'amplifier par PCR la région C-terminale des dioxygénases de type aromatique ont été mises aux points lors de travaux précédents (Hendrickx et al., 2006 : 250; Kahl et Hofer, 2003 : 1475; Taylor et al., 2002 : 61; Yeates, Holmes et Gillings, 2000 : 644) et les amorces développées dans la présente recherche mettent à profit les mêmes régions d'homologies que celles identifiées par Witzig et al. (Witzig et al., 2006 : 3504). En amont de la partie C-terminale, se retrouvent deux régions fortement conservées (T285<sub>LB400</sub> à T314<sub>LB400</sub> et G337<sub>LB400</sub> à C389<sub>LB400</sub>) associées au centre Rieske de la protéine (Suenaga, Goto et Furukawa, 2006 : 168). Une seule amorce développée dans l'une de ces régions a été nécessaire pour amplifier des séquences C-terminales diversifiées. La région située en aval est plus variable. L'analyse phylogénique des fragments démontre que les amorces utilisées permettent d'amplifier des fragments C-terminaux de *bphA* appartenant aux trois branches reconnues et des fragments ayant une phylogénie différente des isolats analysés jusqu'à présent.

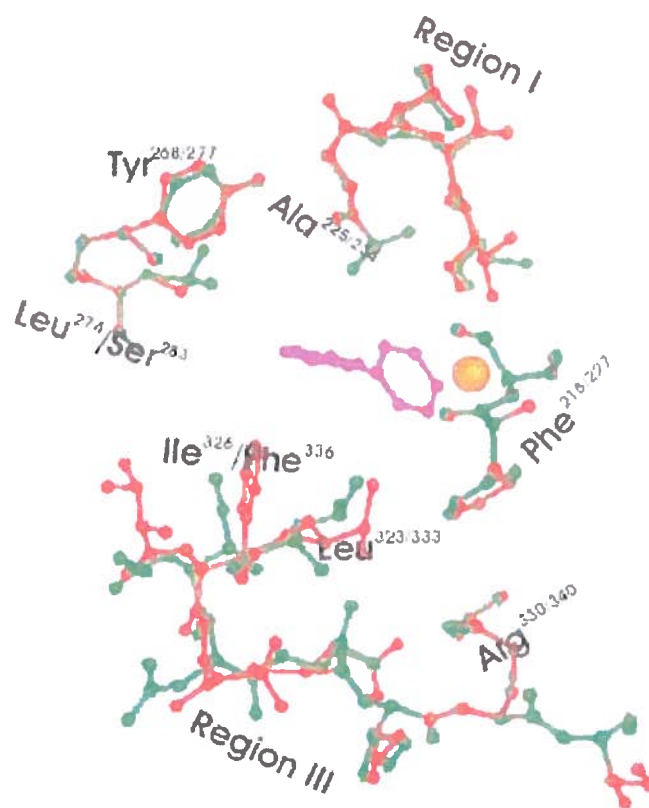
Le quart des fragments amplifiés des sols étaient reliés plus fortement à la dioxygénase du toluène qu'à la dioxygénase du biphenyle. Trois fragments issus du sol G7 et deux fragments issus du sol G9 se retrouvent en effet directement associés avec la dioxygénase du benzène, ce qui signifie que l'amplification PCR ne cible pas strictement

la portion C-terminale des dioxygénases du biphenyle. Les oxygénases de type Rieske partagent des composantes catalytiques ayant un fort degré de similitude et cette parenté est très forte chez les enzymes associées à une même famille (Gibson et Parales, 2000 : 236; Werlen, Kohler et van der Meer, 1996 : 4009). Les dioxygénases du toluène/benzène et du biphenyle sont génétiquement très près l'une de l'autre. Il est donc difficile de développer des amorces qui à la fois sont spécifiques aux dioxygénases du biphenyle et qui ont simultanément un spectre d'action assez étendu pour évaluer de façon adéquate la diversité de la partie-C-terminale de *bphA* dans les sols. Les fragments amplifiés à partir de l'ADN extrait des sols sont tous reliés à la famille toluène/biphenyle et non à d'autres dioxygénases comme celles du naphthalène ou du benzoate. Tenant compte du fait que des conditions PCR trop restrictives pourraient diminuer fortement la diversité des fragments BphA amplifiés, il est possible de conclure que les conditions d'amplification utilisées dans le présent travail constituent un bon outil pour isoler efficacement et spécifiquement des fragments d'ADN associés aux dioxygénases du biphenyle.

Des études ont démontré que la présence de biphenyle et de chlorobiphenyles peu chlorés dans un milieu peut provoquer une sélection positive des microorganismes capables de les métaboliser (Abraham et al., 2002 : 246; WagnerDobler et al., 1998 : 3014). Tenant compte du fait que les fragments analysés dans ce travail sont issus en majorité de sols reconnus comme étant fortement contaminés aux BPC, la prédominance des fragments amplifiés des sols et associés à la dioxygénase du biphenyle peut signifier que la population de bactéries dégradant le biphenyle est plus importante que celle dégradant par exemple le toluène ou le benzène. Cependant, le nombre de fragments analysés ne permet pas d'obtenir un résultat statistiquement valable et une influence des conditions PCR favorisant une amplification des fragments de BphA plutôt que des fragments associés à d'autres types de dioxygénases n'est pas à écarter.

L'un des objectifs de cette démarche était d'identifier des résidus pouvant se révéler intéressants au niveau du potentiel catalytique de la BPDO. L'analyse des séquences primaires de fragments C-terminaux de *bphA* obtenus démontre une variabilité de génotype menant à une variété équivalente des séquences en acides aminés. Toutefois,

plusieurs régions demeurent hautement conservées à travers les différentes dioxygénases. C'est le cas notamment des résidus Ala<sup>234</sup>, His<sup>233</sup> et His<sup>239</sup> ainsi que des séquences environnantes qui assurent la bonne conformation du site catalytique, ce qui concorde avec les résultats déjà obtenus (Witzig et al., 2006 : 3504). Chez RHA1, les deux résidus histidine coordonnent le Fe<sup>2+</sup>, et l'Ala<sup>225</sup> lie le substrat (Figure 20) (Furusawa et al., 2004 : 1041).

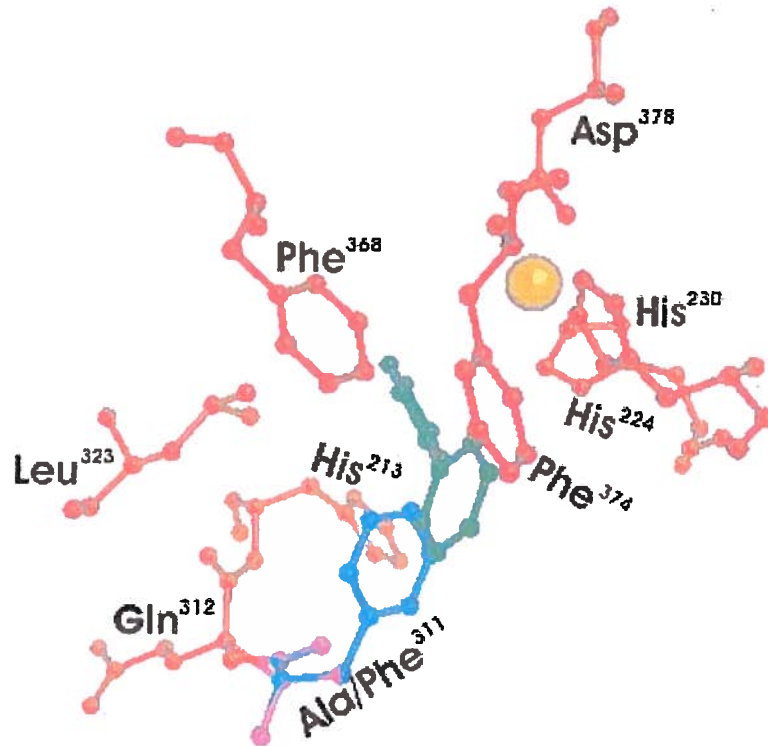


**Figure 20.** Superposition de modèles tridimensionnels des résidus de la région III de BphAE<sub>LB400</sub> (rouge) et de BphAE<sub>RHA1</sub> (vert). L'alignement a été réalisé avec le logiciel Rasmol. LB400 a été modélisé à l'aide du logiciel 3D-JIGSAW (<http://www.bmm.icnet.uk/servers/3djigsaw>) en utilisant la BphA<sub>RHA1</sub> comme structure de référence (Furusawa et al., 2004 : 1041).

Plusieurs résidus sont hautement conservés à travers les différentes séquences. Les résidus 240 et 241 (résidus 231 et 232 chez RHA1) sont probablement impliqués dans le positionnement du résidu 239, essentiel à l'activité de l'enzyme. De la même façon, le résidu 324 est adjacent au résidu 323 (résidus 314 et 313 respectivement chez RHA1) qui fait lui aussi partie de la paroi du site catalytique de l'enzyme (Furusawa et al., 2004 : 1041). Le résidu 333 quant à lui interagit directement avec le substrat (Figure 20). Le résidu correspondant chez RHA1, Leu<sup>323</sup>, ceinture l'un des cycles du biphenyle avec le résidu 224, l'autre cycle étant maintenu par les résidus Ala<sup>225</sup> et Phe<sup>368</sup> (Phe<sup>378</sup> chez LB400). Les résidus 333 et 378 (position chez LB400) étant identiques dans toutes les séquences analysées, il est probable que la présence d'une lysine et d'une phénylalanine respectivement à ces positions soit essentielle à l'activité de l'enzyme. Les résidus 342, 343, 345 et 346 sont eux aussi similaires d'une dioxygénase à l'autre. Cependant, ils sont éloignés du centre catalytique et leur rôle demeure inconnu.

Les résidus 321 et 322 forment une région plus variable jouxant le résidu His<sup>323</sup> qui est identique chez toutes les dioxygénases. L'intérêt de cette région est que le résidu correspondant chez RHA1, His<sup>313</sup> est situé à moins de 4 Å du substrat. Le résidu 321 est majoritairement une glycine mais des valines et des alanines sont aussi retrouvées chez les dioxygénases de type toluène/benzène et cumène respectivement. Récemment, Witzig et al. ont étudié la diversité de la portion C-terminale de BphA de fragments issus de sols contaminés au benzène, au toluène et à l'éthylbenzène (Witzig et al., 2006 : 3504). Ils ont obtenu une très grande diversité au niveau de la position 321 de LB400 : alanine, glycine, méthionine, valine, leucine, phénylalanine. Il demeure cependant que cette position est occupée par des acides aminés de type hydrophobes. La modélisation de certaines mutations en position 311 chez RHA1 à l'aide du logiciel Rasmol permet de constater que la présence d'une valine, d'une leucine ou d'une méthionine à cet endroit permet de réduire considérablement la distance entre le résidu 311 et le substrat. Le déplacement est encore plus important lorsque l'alanine est remplacée par une phénylalanine (Figure 21). Comme toutes les séquences amplifiées de sols contaminés aux BPC et reliées aux dioxygénases du biphenyle possèdent une glycine à cet endroit, cela suggère que ces

dioxygénases ont évolué pour accepter de façon préférentielle la molécule de biphenyle et ses analogues.



**Figure 21.** Superposition de modèles tridimensionnels de certains résidus de la paroi catalytique chez BphA<sub>RHA1</sub> lorsque le résidu alanine (rose) présent à la position 311 de l'enzyme de type sauvage est remplacé par une phénylalanine (bleu). L'alignement a été réalisé avec le logiciel Rasmol.

Les régions I, II et IV identifiées par Mondello et al. (Mondello et al., 1997 : 3096) demeurent similaires aux régions des gènes *bphA* connus, en particulier aux régions de BphA<sub>KF707</sub>, tant au niveau des isolats bactériens que des sols. Kamamura et al. (Kumamaru et al., 1998 : 663) ont proposé que les résidus 236 et 237 formant la région I soient responsables des différences de phénotype observées entre les souches LB400 et KF707, mais le rôle de cette région n'a pas clairement été établi. Les fragments issus des sols présentent des séquences identiques aux dioxygénases qui leur sont proches et un seul des fragments (G7-2) possède la région I spécifique à LB400. Le résidu 277 (région II), correspondant au résidu 268 dans la structure de RHA1, est situé dans la paroi du site catalytique. Cette région est occupée exclusivement par une phénylalanine ou une tyrosine, deux résidus aromatiques et hydrophobes. Toutefois, la permutation de ces résidus n'entraîne pas de modification au niveau du phénotype chez les souches KF707 et LB400 (Mondello et al., 1997 : 3096).

La région IV est particulièrement importante pour l'activité en position *meta/para* observée chez LB400 envers les congénères *ortho*-substitués (Mondello et al., 1997 : 3096; Suenaga et al., 1999 : 430; Suenaga et al., 2002 : 3682). Les alignements montrent que contrairement à LB400, la majorité des fragments issus des sols possèdent une thréonine à cette position. Bien que la présence d'une asparagine à cet endroit augmente le potentiel catalytique de l'enzyme, il est possible qu'en réalité cette mutation ne soit pas favorisée dans le milieu naturel, car le dihydrodiol résultant est dégradé moins efficacement par les enzymes subséquentes de la voie de dégradation (Barriault et al., 2004 : 47489).

La région III formée des résidus 335, 336, 338 et 341 (position chez LB400), est une région particulièrement importante au niveau de la spécificité de l'enzyme (Mondello et al., 1997 : 3096). La mutagénèse intensive de cette région a permis d'étendre et de modifier considérablement le spectre de substrats de la BphA (Barriault, Plante et Sylvestre, 2002 : 3794; Barriault et Sylvestre, 2004 : 47480). Les résultats obtenus suggèrent que les résidus 335 et 336 en particulier sont impliqués dans la liaison et l'orientation du substrat au site actif. La présence de la séquence Ala<sup>335</sup>, Met<sup>336</sup> permet



notamment à la dioxygénase de dégrader le dibenzofurane, un composé extrêmement toxique produit au cours de divers procédés industriels (Mohammadi et Sylvestre, 2005 : 835). L'analyse de la structure cristalline de BphA<sub>RHAI</sub> permet de constater que le résidu 326 (correspondant au résidu 336 chez LB400) est situé très près du substrat (Figure 20).

L'analyse des séquences *bphA* obtenues (Tableau 8) démontre que la position 336 est occupée presque exclusivement par l'isoleucine. Les rares exceptions sont les fragments G7-15, G11-47 et dP-1Y/1X (valine), G7-2 (méthionine) et les souches LB400 et H850 (phénylalanine). Des travaux ont démontré que la présence d'un résidu aliphatique moins volumineux que chez LB400 permet d'accroître le potentiel catalytique de l'enzyme (Barriault et Sylvestre, 2004 : 47480). Les essais de mutagenèse dirigée aléatoire ont déterminé que le remplacement chez LB400 de Thr<sup>335</sup> et Phe<sup>336</sup> par une alanine et une méthionine respectivement favorise l'attaque en position *meta/para* des congénères *ortho*-substitués. Chez les variants *p4* et *p1* développés, la présence d'une alanine en position 335 et la présence d'une leucine et d'une méthionine respectivement à la position 336 ont aussi permis à l'enzyme d'élargir son spectre d'action à des composés *meta* et *para*-substitués. Il pourrait donc exister de façon naturelle dans les sols des BphA ayant des spectres de substrats aussi étendus que les variants développés en laboratoire.

L'étude du modèle tridimensionnel de BphA<sub>E<sub>LB400</sub></sub> (Figure 20) permet de constater que seul le résidu 336 de la région III est situé directement au niveau du site catalytique. Les autres résidus formant cette région sont trop éloignés pour pouvoir interagir avec le substrat ou le Fe<sup>2+</sup>. Il est possible cependant qu'ils aient un effet sur le positionnement des résidus 337 et 340 (position chez LB400), extrêmement conservés, tant chez les dioxygénases du biphenyle que chez les dioxygénases du benzène et du toluène (voir Tableau 8). Les fragments issus des sols G9-3 et G7-11 (reliés aux dioxygénases du toluène et du benzène) sont les seuls à présenter un résidu différent (une glutamine plutôt qu'une arginine) en position 340. Bien qu'une recherche avec l'outil *BLAST search* (NCBI) ne révèle aucune autre dioxygénase connue présentant une glutamine au lieu plutôt qu'une arginine, la présence de deux séquences identiques chez les fragments permet de croire qu'il s'agit réellement d'une variation présente dans les sols et non

simplement d'une mutation résultant de l'amplification PCR. L'analyse de la région III confirme les résultats obtenus antérieurement : bien que cette région influence fortement le potentiel catalytique de l'enzyme, la variabilité de sa séquence est limitée et la souche LB400 présente des caractéristiques qui sont peu répandues dans la nature (Barriault, Plante et Sylvestre, 2002 : 3794; Barriault et Sylvestre, 2004 : 47480; Erickson et Mondello, 1993 : 3858; Witzig et al., 2006 : 3504).

L'analyse phylogénique des séquences C-terminale de BphA permet de constater que la plupart des isolats analysés font partie de la branche Gram (-) associée à B356. Seul YT-01 se retrouve dans une catégorie différente des branches caractéristiques qui regroupent les dioxygénases Gram (-) (Nam et al., 2001 : 254; Sylvestre et al., 1996 : 195; Taylor et Janssen, 2005 : 140). Jusqu'à présent, toutes les souches Gram (+) connues comme pouvant dégrader le biphenyle se retrouvaient dans la même branche (Taylor et al., 2002 : 61; Witzig et al., 2006 : 3504). Les résultats démontrent que la souche B257 (famille des *Firmicutes*), une bactérie Gram (+), possède une dioxygénase similaire à celles des protéobactéries Gram (-) de type B356 plutôt qu'à celles de P6 et de RHA1 (famille des *Rhodococcus*). Les dioxygénases ne sont donc pas spécifiques à des taxons particuliers et des processus évolutifs ont pu survenir entre les bactéries Gram (-) et les bactéries Gram (+).

Les divers isolats analysés provenaient de milieux naturels différents. Des bactéries isolées de sols contaminés (B257), de boues industrielles (B206, B356) ou encore de milieux aquatiques (B357), font partie d'une même lignée phylogénique. Ces résultats signifient que les dioxygénases du biphenyle ne sont pas strictement associées à des niches écologiques particulières et se retrouvent dans tous les milieux indépendamment de la niche écologique de l'organisme hôte. Toutefois, aucune des séquences analysées n'appartient au groupe des *Rhodococcus* dont certaines souches isolées se sont révélées posséder des dioxygénases de biphenyle. Ce phénomène peut s'expliquer par l'absence de végétation dans les échantillons de sols utilisés qui ont été entreposés durant plus d'une décennie. Il est probable que la microflore retrouvée soit représentative d'un sol sans végétation. La présence d'une rizosphère active aurait

probablement permis d'isoler des séquences appartenant au genre *Rhodococcus*. En effet, Leigh et al. (2006 : 2331) ont récemment rapporté que la plupart des bactéries isolées à partir de la rizosphère lors de leur étude sont des *Rhodococcus*.

L'analyse phylogénique des fragments isolés des sols démontre une diversité plus importante que ne le laissait supposer l'analyse des isolats et de la séquence primaire des fragments. Les résultats montrent que quatre des fragments isolés des sols appartiennent à une lignée nouvelle. Le caractère unique des séquences des fragments G9-26, G11-42, G9-28 et G11-43 se confirme par l'analyse à l'aide de l'outil *BLAST search* (NCBI). Elle démontre que si les fragments possèdent le plus fort degré d'homologie avec des dioxygénases du biphenyle (*Pseudomonas sp.* CAM-1 [numéro d'accès GenBank gbAAK14781.1], *P. pseudoalcaligenes* KF707 et *Pseudomonas sp.* B4 [numéro d'accès GenBank gbAAB88813.1]), elles divergent des BphA connues. Une séquence provenant de GenBank [numéro d'accès ABK63687] provenant d'une souche non cultivée et associée à une dioxygénase du phénylpropionate selon le peu d'informations fournies, possède une séquence similaire à G9-26, G11-42, G9-28 et G11-43, et se retrouve dans la même branche. Il est probable que ce fragment appartienne en fait à une dioxygénase ayant évolué pour catalyser la dioxygénation du biphenyle.

L'analyse des séquences primaires et de la phylogénie des fragments obtenus révèle que la majorité des BphA sont similaires à celles connues (Taylor et al., 2002 : 61). Toutefois, la présence d'une nouvelle branche démontre que la diversité présente dans les sols est plus importante que ne le laisse supposer l'analyse des séquences provenant d'isolats. Cette diversité ne se reflète cependant pas au niveau des régions III et IV dont le patron en acides aminés est semblable d'une famille phylogénique à l'autre. La plupart des fragments analysés possèdent des régions III et IV similaires à la séquence de la souche KF707, ce qui laisse à penser que les capacités de dégradation des sols ressemblent plus à celles de KF707 qu'à celles de la souche LB400.

## Chapitre II

### Stratégie de recombinaison aléatoire *in vitro* mettant à profit l'ADN extrait de sols contaminés au BPC afin de modifier la régiospécificité de la souche *Burkholderia xenovorans* LB400

#### 3.1 Rappel de la problématique et des objectifs de recherche

Le développement de biotechnologies permettant de traiter les sols et les sédiments contaminés présente plusieurs avantages. Elles ont un minimum d'effets sur les écosystèmes présents et elles offrent des solutions moins coûteuses aux problèmes environnementaux (Dua et al., 2002 : 143; Straathof, Panke et Schmid, 2002 : 548 ; Wolfe et Bjornstad, 2002 : 429). Le développement d'une BPDO permettant la transformation des 209 congénères BPC étant une utopie, une stratégie plus réaliste est d'élaborer des systèmes combinant les effets de plusieurs souches pouvant dégrader des congénères BPC ciblés.

La seconde partie de ce projet visait à élargir le spectre d'action de la BPDO en lui permettant d'acquérir et d'intégrer des caractéristiques catalytiques de plusieurs types de BphA issues de l'environnement. Elle développe une stratégie de *family shuffling* s'effectuant sur la partie C-terminale de gènes *bphA* amplifiés à partir d'ADN extrait de sols contaminés par les BPC, et identifie des résidus d'acides aminés potentiellement responsables de l'apparition de certains phénotypes. Les résultats de ces travaux ont été publiés dans *Journal of Bacteriology* (Vézina, Barriault et Sylvestre, 2007 : 779).

## 3.2 Matériel et méthodes

### 3.2.1 Évolution moléculaire *in vitro* de famille de gènes (*family shuffling*)

#### *3.2.1.1 Souches bactériennes et conditions de culture, sols et produits chimiques*

Les échantillons des sols G7, G8, G9 et G11 ont été décrits à la section 2.2.2.1. La souche *E. coli* DHIIS a été cultivée selon les conditions décrites dans le Chapitre 1 section 2.2.1.1 La souche *E. coli* DH11S permet d'exprimer efficacement les divers gènes de l'opéron *bph* clonés dans le laboratoire sur les vecteurs d'expression pQE31 et pDB31 (Barriault et al., 2001 : 1025 ; Hurtubise, Barriault et Sylvestre, 1996 : 8152). Le vecteur pDB31 entre autre est un vecteur dérivé du vecteur pQE31 pouvant s'exprimer simultanément à celui-ci. Ces vecteurs nous permettent d'exprimer efficacement les différents gènes de la voie de dégradation afin d'effectuer des essais catalytiques sur des cellules entières. Le vecteur pDB31 s'est révélé stable chez les souches *E. coli* BL21 et DH11S. (Barriault et Sylvestre, 1999 : 293) La souche DH11S a été retenue pour son efficacité.

La souche *E. coli* C41(DE3) (Miroux et Walker, 1996 : 289) a été employée pour cloner les constructions réalisées à partir du vecteur pET-14b (voir section 3.2.1.2.1). Ce système a permis d'exprimer à de très hauts niveaux les protéines afin de les purifier. La souche C41 a été cultivée dans le milieu LB en absence de plasmide, et dans le milieu LB contenant 75 µg/ml d'ampicilline (Fischer Scientific, Waltham, MA) en présence de plasmides.

Les souches *E. coli* DHIIS pQE31 [LB400*bphAE*] pDB31 [LB400*bphFGC*], *E. coli* DHIIS pQE31 [B356*bphAE*] pDB31 [LB400*bphFGC*] et *E. coli* DHIIS pQE31 [*p4bphAE*] pDB31 [LB400*bphFGC*] ont été mises au point lors de travaux antérieurs (Barriault et Sylvestre, 2004 : 47480; Sylvestre et al., 1996 : 2710). Elles ont été cultivées dans le milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline (Fisher Scientific) et 25 µg/ml de kanamicine (Fischer Scientific)

Les souches *E. coli* DHIIS pDB31 [LB400*bphFG*], *E. coli* DHIIS pDB31 [LB400*bphFGB*], *E. coli* DHIIS pDB31 [LB400*bphFGC*] et *E. coli* DHIIS pDB31 [LB400*bphFGBC*] ont aussi été mises au point lors de travaux précédents (Barriault et Sylvestre, 2004 : 47480; Sylvestre et al., 1996 : 2710 ) de même que les souches *E. coli* DH11S pQE31 [LB400*bphB*] et *E. coli* DH11S pQE31 [LB400*bphC*] (Barriault et al., 1999 : 181; Mohammadi et Sylvestre, 2005 : 835). Les souches contenant le plasmide pDB31 ont été cultivées dans le milieu LB contenant 25 µg/ml de kanamycine et les souches contenant le plasmide pQE31, dans le milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline (Fischer Scientific).

Les souches *E. coli* C41 pET-14b [LB400*bphF*], *E. coli* C41 pET-14b [B356*bphF*], *E. coli* C41 pET-14b [LB400*bphAE*] et *E. coli* C41 pET-14b [*p4 bphAE*] ont été utilisées pour purifier les enzymes correspondantes (Mohammadi et Sylvestre, 2005 : 835). Elles ont été cultivées dans le milieu LB contenant 75 µg/ml d'ampicilline (Fischer Scientific, Pittsburgh, PA).

Les biphényles polychlorés utilisés lors de ces travaux viennent de AccuStandard (New Haven, CT). Le benzène, l'éthylbenzène et le toluène ont été obtenus de Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI). L'acétonitrile de grade HPLC et le méthanol viennent des fournisseurs Sigma (St-Louis, MO) et Fisher Scientific (Pittsburgh, PA) respectivement.

### **3.2.1.2 Plasmides et protocoles de biologie moléculaire**

#### **3.2.1.2.1 Plasmides**

Dans toutes les expériences effectuées au cours de ce travail, les gènes *bphA* de LB400 et de B356 utilisés portent une mutation Avr en position 1354 pour *bphA*<sub>LB400</sub> et en position 1348 pour *bphA*<sub>B356</sub> (Barriault et al., 2001 : 1025). Les constructions pDB31 [LB400*bphA*] et pDB31 [B356*bphA*] décrites précédemment par Barriault et al. ont servi à amplifier les fragments des gènes *bphA* de LB400 et B356 nécessaires à la stratégie de

*shuffling* décrite à la section 3.3.1.1. Le plasmide pQE31 [LB400*bphAE*] (Barriault et al., 2001 : 1025) a été utilisé pour le clonage des fragments issus du *family shuffling* décrit à la section 3.3.1.1. ainsi que du processus de mutagenèse dirigée décrit à la section 3.2.4. Le vecteur pET-14b (Novagen, EMD Biosciences, San Diego, CA) a servi à exprimer les gènes recombinants efficacement afin de purifier les enzymes.

#### 3.2.1.2.2 Isolement de l'ADN génomique et plasmidique

L'ADN génomique des isolats a été extrait selon les protocoles décrits dans la section 2.2.1.2.2. L'ADN extrait des échantillons de sols contaminés et non-contaminés a été obtenu selon les méthodes décrites à la section 2.2.2.2.1. Les techniques de purification de l'ADN plasmidique ont été décrites dans la section 2.2.1.2.2.

#### 3.2.1.2.3 Endonucléases de restriction

Le vecteur pQE31 [LB400*bphAE*] et les fragments recombinants obtenus par *family shuffling* ont été traités successivement avec les enzymes de restrictions MluI et AvrII. Les protocoles définissant les conditions de réaction utilisées sont ceux du fournisseur GE Healthcare Bio-Sciences (Piscataway, NJ). Les plasmides pQE31 [*bphAE*] des variants obtenus par *family shuffling* et le vecteur pET-14b ont été digérés par les enzymes de restriction BamHI et HindIII selon les directives du fabricant (GE Healthcare Bio-Sciences).

#### 3.2.1.2.4 Ligation et transformation

Les milieux réactionnels de ligation contenant 20 U/ $\mu$ l de T4 DNA ligase (New England Biolabs (NEB), Ipswich, MA) ainsi que le tampon fourni par la compagnie furent incubés à 23°C durant 3 h. Le rapport insert/vecteur était ajusté à 3 :1 pour une concentration totale d'ADN de 5 ng/ $\mu$ l. Les plasmides recombinants ainsi obtenus ont été transformés dans des cellules compétentes fraîches dont le protocole de transformation chimique est fourni à la section 2.2.1.2.3.

### 3.2.1.2.5 Séquençage des clones obtenus

Les clones obtenus par *family shuffling* ont été séquencés par la plate-forme de séquençage du Centre d'Innovation Génome Québec (Montréal, Qc) à l'aide des amorces sens A1 5' - GGC TGG GCC TAC GAC ANC GC - 3' et anti-sens A10 5'-TTGAGCGTGGCCCCACCTA -3'.

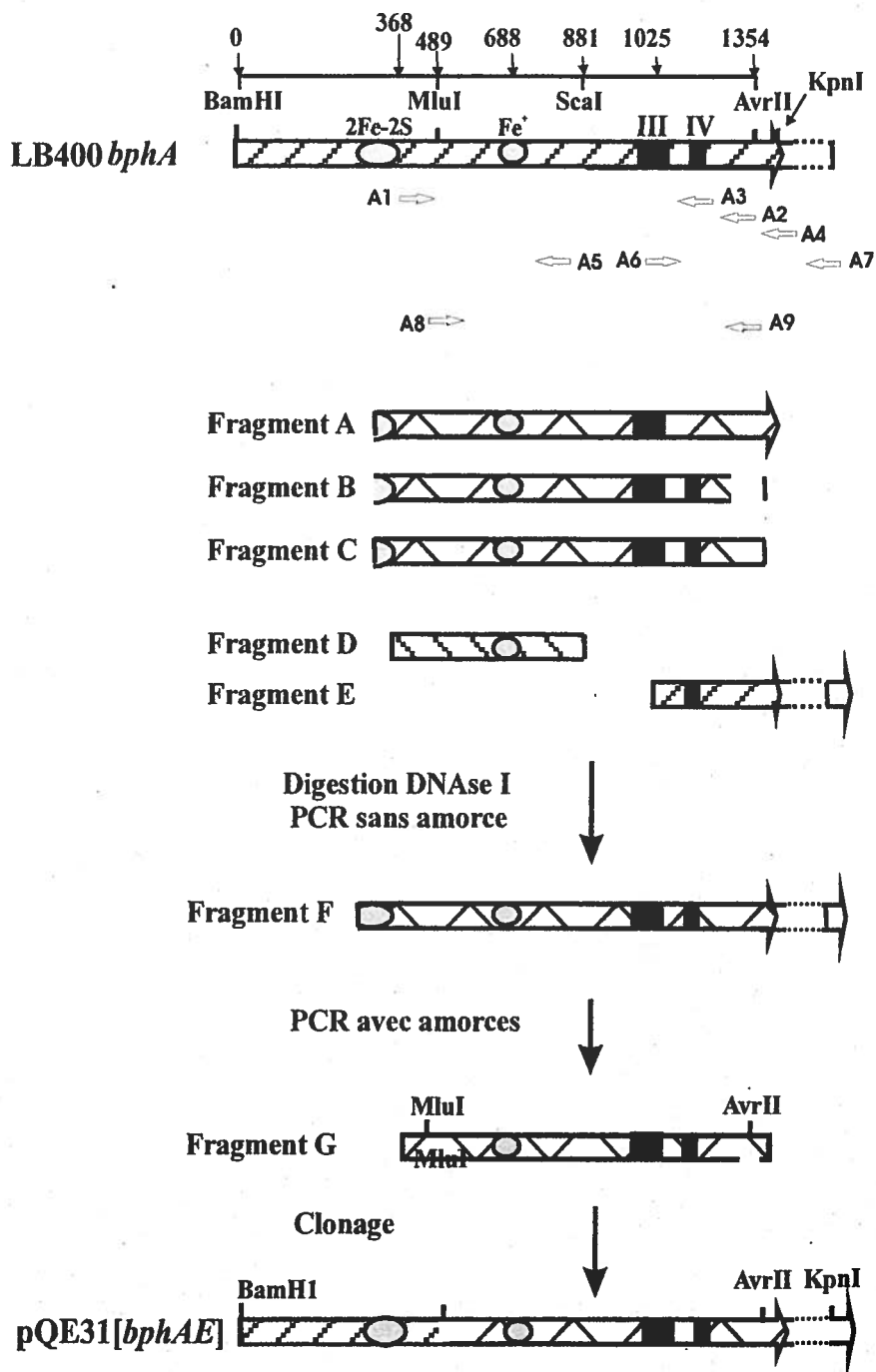
### 3.2.1.3 *Stratégie de recombinaison aléatoire in vitro de famille de gène (family shuffling)*

#### 3.2.1.3.1 Préparation des fragments

La stratégie pour l'ingénierie de BphA s'inspire de celle proposée par Barriault et al. (Barriault, Plante et Sylvestre, 2002 : 3794) et elle est représentée sous forme schématique à la Figure 22. Les fragments C-terminaux de *bphA* ont été amplifiés par PCR à l'aide des amorces dégénérées A1, A2, A3 et A4 (Tableau 9) à partir de l'ADN génomique extrait des isolats B206, B218, B257, B357, H850 et YT-01 décrits à la section 2.2.1.1 ou de l'ADN extrait des sols contaminés. Les produits PCR obtenus ont été purifiés sur gel d'agarose à l'aide de la trousse GenElute™ PCR Purification kit (Sigma)

Les fragments indiqués sur la Figure 22 par les lettres A, B et C ciblaient la partie du gène *bphA* comprise entre la position 370 (amorce sens A1) et les positions 1165 (amorce anti-sens A3), 1322 (amorce anti-sens A2) ou 1373 (amorce anti-sens A4) de *bphA*<sub>LB400</sub>. Afin de générer des sites de restriction connus permettant de cloner ultérieurement les fragments recombinants, la portion codant pour la région entourant le site de restriction MluI de *bphA*<sub>B356</sub> (position 370 à 895) (fragment D) et la région entourant le site AvrII de LB400 (position 1141 jusqu'à la fin du gène *bphA* et débordant de 30 bp dans le plasmide vecteur pQE31) (fragment E) ont aussi été amplifiés par PCR sur les plasmides pDB31 [LB400*bphA*] et pDB31 [B356*bphA*], avec les amorces (Tableau 9) A1 et A5 dans le cas de B356, et A6 et A7 dans le cas de LB400, selon les conditions décrites à la section 2.2.1.3.





**Figure 22.** Stratégie de *family shuffling*. La figure représente le gène *bphA*<sub>LB400</sub> et montre la position des régions III et IV ainsi que celles du centre Rieske et du Fe<sup>2+</sup>. Les amorces dégénérées A1, A2, A3 et A4 ont servi à amplifier l'ADN de sol ou l'ADN génomique des isolats B206, B218, B257, B357, H850 et YT01 pour générer une famille de fragments désignés par les lettres A, B, C. Ces fragments ont été recombinaisonnés selon le protocole de *family shuffling* en présence du fragment D qui a été amplifié avec les amorces A1 et A5 à partir du gène *bphA*<sub>B356</sub> et du fragment E qui a été amplifié avec les amorces A6 et A7 à partir du gène *bphA*<sub>LB400</sub>. La banque de fragments hybrides MluI/AvrII de 864 pb ainsi créée a servi à remplacer le fragment correspondant dans le plasmide pQE31[LB400*bphAE*]. Les séquences des amorces sont indiquées dans le texte. La limite de l'extrémité droite de *bphA* dans pQE31[LB400*bphAE*] est indiquée par une flèche.

Les fragments A, B, C, D, E ont été traités à la DNase I (Sigma) pour générer des fragments d'environ 50 bp. Le choix de cette taille de fragments s'appuie sur l'observation que des fragments trop courts ne permettent pas un degré d'homologie suffisant pour provoquer des recombinaisons efficaces entre les différentes souches. D'autre part, des fragments trop longs diminuent l'efficacité et le nombre de recombinaisons possibles sur un même segment (Lorimer et Pastan, 1995 : 3067).

Les conditions de digestion à la DNase I ont été les suivantes : les préparations d'ADN étaient diluées à raison de 5 µg dans 50 µl puis 5µl d'un tampon 10X contenant 500 mM de Tris-HCl pH 7,4 et 100 mM de MnCl<sub>2</sub> (Sigma) était ajouté au milieu réactionnel. Le MnCl<sub>2</sub> était mélangé à la dernière minute au tampon 10X afin de prévenir son oxydation. Le milieu réactionnel était équilibré à une température de 14°C durant 5 min, puis 10 µl d'une dilution 1/1000 d'une préparation de DNaseI 2 U/µl étaient ajoutés. Le milieu réactionnel était alors placé à 14°C pour 7 min puis traité sur colonne Amicon Micropure-EZ (Millipore, Billerica, MA) afin d'éliminer la DNase.

#### 3.2.1.3.2 PCR sans amorce et amplification des fragments recombinants pleine longueur

Les fragments de 50 bp ont ensuite été assemblés par une amplification PCR sans amorce qui a permis d'obtenir une banque de segments de diverses longueurs codant pour la partie C-terminale du gène *bphA* (fragments F). Le PCR sans amorce a été effectué selon les conditions suivantes : 95°C durant 3 min, 60 cycles (94°C durant 45 sec, 42°C durant 1 min, 72°C durant 1 min), suivis d'une période de 10 min à 72°C. Le milieu réactionnel (100 µl) contenait 0,25 µM de chacune des amorces, 200 µM d'un mélange de dNTP (Roche, Suisse) et 1 à 2 µg de fragments d'ADN. La polymérase utilisée fut la *Expand High Fidelity PCR System* avec son tampon (Roche).

Les fragments C-terminaux pleine longueur ont ensuite été isolés du bassin par un PCR avec les amorces A8 et A10 ciblant les régions MluI et AvrII pour créer une banque de fragments hybrides (fragments G). Les conditions de PCR dans ce cas étaient les suivantes : 95°C durant 3 min, 35 cycles (94°C durant 45 sec, 60°C durant 1 min, 72°C

durant 1 min), suivis d'une période de 10 min à 72°C. Le milieu réactionnel (100 µl) contenait 0,25 µM de chacune des amorces, 200 µM d'un mélange de dNTP (Roche) et 2 µl du produit du PCR sans amorce. La polymérase utilisée fut la *Expand High Fidelity PCR System* avec son tampon (Roche). Les produits PCR obtenus ont été purifiés sur gel d'agarose à l'aide de la trousse *GenElute™ PCR Purification kit* (Sigma). Les fragments purifiés ont été digérés par les enzymes MluI et AvrII, clonés dans le vecteur pQE31 [LB400*bphAE* ΔMluI-AvrII] et insérés dans les souches *E. coli* DH11S pDB31 [LB400*bphFGBC*], *E. coli* DH11S pDB31 [LB400*bphFGB*] ou *E. coli* DH11S pDB31 [LB400*bphFGC*] suivant le processus de criblage choisi. Les protocoles de ligation et de transformation sont décrits à la section 3.2.1.2.3.

**Tableau 9.** Séquences des différentes amorces utilisées pour amplifier par PCR les fragments nécessaires à la stratégie de *family shuffling*

Nom	Brin	Séquence <sup>a</sup>
A1	codant	5' - GGC TGG GCC TAC GAC ANC GC - 3'
A2	non-codant	5' - ADV CCS CGB GCC GCB TCH TCG - 3'
A3	non-codant	5' - CRT CGT CCT GMT CRA AVA CRC C - 3'
A4	non-codant	5' - TTG AGS GYV KCC CAG YBV GG - 3'
A5 (B356)	non-codant	5' - CTT GCG TCC AGT ACT GTG GTG - 3'
A6 (LB400)	codant	5' - GTG TGT CCT GCA ACT TTA TCC - 3'
A7 (pQE31)	non codant	5' - GTG GTC CTG CAA CTT TAT CC - 3'
A8	codant	5' - CTG GGG GCC GTT GCA GGC A - 3'
A9	non-codant	5' - CGT TGT TGC CAT TGC TGC AGG -3'
A10	non-codant	5' - TTGAGCGTGGCCACCTA 3'

<sup>a</sup> code utilisé : N = A, G, C ou T ; D = A, G ou T ; V = A, C ou G ; S = G ou C ; B = G, C ou T ; H = A, C ou T ; V = A, C ou G ; S = G ou C ; R = A ou G ; M = A ou C ; W = A ou T ; K = G ou T ; Y = C ou T

### 3.2.1.3.3 Criblage des variants obtenus

Les bactéries *E. coli* DH11S transformées par la banque de plasmides portant les gènes *bphA* hybrides (section 3.2.1.3.2) ont été étalées sur milieu LB solidifié recouvert d'une membrane de nitrocellulose (Fisher Scientific) puis incubées à 37°C pour une période de 18 h. Les membranes de nitrocellulose ont ensuite été placées sur de nouvelles géloses LB recouvertes d'une solution d'isopropyl- $\alpha$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG)

(Fisher Scientific) 200 mM puis incubées à 37°C pour une période de 3 h. Des cristaux de 2,2'-CB ou de 4'-CB ont ensuite été déposés dans le couvercle des boîtes de Pétri et les cultures ont été placées de nouveau à 37°C pour une période de 18 h. Les colonies présentant une coloration jaune ou brune selon le mode de sélection ont été repiquées. Après culture en milieu liquide, les variants ont été exposés une seconde fois au 2,2'-CB ou au 4-CB pour confirmer leur activité envers le substrat.

Les variants ont été sélectionnés selon l'une ou l'autre des stratégies de criblage suivantes (Figure 14) :

1) capacité à déchloriner le 2,2'-CB (pDB31[LB400*bphFGC*])

La BPDO de LB400 oxygénise le 2,2'-CB principalement sur les carbones 2 et 3. Le 2,3-dihydro-2,3-dihydroxy-2'-CB formé est instable et se transforme spontanément en 2,3-dihydroxy-2'-CB pouvant directement servir de substrat à la réaction catalysée par BphC (Barriault et al., 2004 : 47489). L'HOPDA produit donne une coloration jaune à la colonie et le clonage des BphAE hybrides chez des souches de *E. coli* DH11S qui ne produisent pas BphB permet de sélectionner les variants capables de catalyser le processus de déshalogénéation oxygénolytique en position *ortho*.

2) capacité à transformer le 4-CB ou le 2,2'-CB en chloroHOPDA (pDB31[LB400*bphFGBC*])

La seconde approche de criblage consistait à coupler la réaction de dioxygénation aux réactions catalysées par BphB et BphC pour produire le chloroHOPDA qui est de couleur jaune intense, ce qui permet de reconnaître facilement les colonies de *E. coli* DH11S pQE31 [*bphAE*] pDB31[LB400*bphFGBC*] actives sur une boîte de Pétri exposée aux vapeurs du chlorobiphényle (Muller et al., 2005 : 117).

3) capacité de transformer un chlorobiphényle en un cathécol (pDB31[LB400*bphFGB*])

La stratégie décrite ci-dessus ne permet pas de cribler les variants qui produisent des métabolites que BphC est incapable d'oxyder. Plusieurs études démontrent en effet que BphC est beaucoup plus spécifique que BphB (Barriault et al., 1999 : 181; Barriault et al.,

1998 : 4637; Mohammadi et Sylvestre, 2005 : 835). Cette stratégie de criblage est basée sur la polymérisation des catéchols issus de la réaction par BphB. Cette polymérisation entraîne la formation d'une coloration brune autour des colonies positives portant les plasmides pQE31 [*bphAE*] pDB31[LB400*bphFGB*]. L'intensité de la coloration varie en fonction de l'activité de la BPDO (Barriault, Plante et Sylvestre, 2002 : 3794).

#### 3.2.1.4 *Évaluation du potentiel catabolique des variants envers les chlorobiphényles*

Le potentiel catabolique des variants envers les chlorobiphényles a été évalué en déterminant la capacité des recombinants *E. coli* DH11S exprimant les enzymes modifiées à dégrader un mélange de congénères BPC selon le protocole décrit par Barriault et Sylvestre (Barriault et Sylvestre, 2004 : 47480). Sommairement, selon ce protocole, les cellules en phase de croissance étaient induites par 0,5 mM d'IPTG durant 2 h (37°C, 250 rpm), lavées puis suspendues dans 2 ml de milieu M9 (voir section 2.2.1.1) contenant 0,5 mM d'IPTG et 10 µl d'une solution d'un mélange synthétique de BPC comptant 18 congénères (1 µM) dissous dans l'acétone dont un standard interne, le 2,2',3,3',4,5,5', 6,6'- CB (BZ 208) présumé non dégradable (Tableau 10).

Les suspensions étaient incubées 18 h à 37°C (250 rpm) et les BPC étaient ensuite extraits à l'hexane. Les BPC étaient quantifiés par chromatographie en phase gazeuse (GC) utilisant un détecteur à capture d'électron (ECD). Le pourcentage de déplétion de chaque congénère était évalué en se basant sur la surface de leur pic chromatographique par rapport à la surface du pic du standard interne. La chromatographie a été effectuée sur un chromatographe de modèle HP5890 (série II) de Hewlett Packard, Mississauga, Canada, comportant un injecteur automatique HP7673 et une colonne HP5MS (30 m x 0,2 mm) composée d'une matrice de phénylpolyméthylsiloxane 5% (0,33 µm d'épaisseur). Chaque échantillon était injecté en mode *splitless* et le gaz vecteur était l'hélium à un débit de 1 ml/min. La température initiale de 75°C était maintenue durant 2 min. Ensuite la température était élevée à 290°C à raison de 15°C/min puis maintenue à 290°C durant 2 min.

**Tableau 10. Mélange synthétique de 18 congénères BPC**

BZ 10	2,6-CB
BZ 11	3,3'-CB
BZ 15	4,4'-CB
BZ 54	2,2',6,6'-CB
BZ 25	2,3',4-CB
BZ 28	2,4,4'-CB
BZ 22	2,3,4'-CB
BZ 52	2,2',5,5'-CB
BZ 47	2,2',4,4'-CB
BZ 40	2,2',3,3'-CB
BZ 66	2,3',4,4'-CB
BZ 79	3,3',4',5'-CB
BZ 87	2,2',3,4,5'-CB
BZ 77	3,3',4,4'-CB
BZ 118	2,3,4,4',5-CB
BZ 153	2,2',4,4',5,5'-CB
BZ 141	2,2',3,4,5,5'-CB
BZ 208	2,2',3,3',4,5,5',6,6'-CB

## **3.2.2 Caractérisation biochimique des variants S100, S149 et S151**

### ***3.2.2.1 Essais utilisant des cellules entières***

#### **3.2.2.1.1 Clonage des variants S100, S149, S151 dans l'environnement *bphFG***

Les plasmides pQE31 [S100, S149 ou S151*bphAE*] ont été extraits (voir section 3.2.1.2.2) des recombinants *E. coli* DH11S portant l'un ou l'autre de ces plasmides, puis isolés par migration sur gel d'agarose 0,7% et par la trousse GenElute™ Gel Extraction Kit (Sigma). Les plasmides ont ensuite été transformés de nouveau dans la souche *E. coli* DH11S [pDB31 *bphFG*] selon le protocole décrit à la section 3.2.1.2.4.

### 3.2.2.1.2 Séparation des métabolites par chromatographie en phase gazeuse et analyse par spectrométrie de masse

Les cellules en phase de croissance ont été induites en présence de 0,5 mM d'IPTG durant 3 h (37°C, 250 rpm), lavées puis suspendues dans du milieu M9 (voir section 2.2.1.1) contenant 0,5 mM d'IPTG et 100 nmol du congénère cible dissout dans l'acétone. Les suspensions ont été incubées 18 h à 37°C (250 rpm) et les métabolites ont ensuite été extraits deux fois à l'acétate d'éthyle. Les extraits obtenus ont été déshydratés au sulfate d'ammonium, évaporés puis dissout dans 250 µl d'une solution 25 mM d'acide *n*-butylboronique dans l'acétone. La réaction de couplage se solde par la formation d'un complexe entre une molécule de butylboronate et deux groupements hydroxyles adjacents présents sur la molécule à analyser. Le couplage s'est déroulé à 23°C durant 30 min. L'échantillon est isolé de nouveau par évaporation du solvant puis solubilisé dans 100 µl d'hexane (L'Abbée, Barriault et Sylvestre, 2005 : 506).

Les métabolites ont été séparés et analysés par GC-MS. Le GC utilisé était le modèle HP6980 de Hewlett Packard. Un volume de 1 µl de l'échantillon était injecté par un injecteur automatique en mode *splitless* sur une colonne Supelco 24166 SPB-5 (30 m x 0,2 mm) composée d'une matrice de poly-(5%-diphenyl-95% diméthylsiloxane). Le gaz vecteur était l'hélium avec un débit de 0,8 ml/min L'appareil était programmé comme suit : température initiale de 100°C durant 2 min suivie d'un gradient de température à raison de 15°C/min jusqu'à une température de 200°C. Un second gradient de température élevait la colonne à 250°C à raison de 2,5°C/min puis jusqu'à 300°C à raison de 15°C/min. La température était alors maintenue constante à 300°C durant 2 min. La colonne était couplée à un spectromètre de masse HP6890 de Hewlett Packard en mode d'ionisation d'électron (70eV). L'échelle de masse fut balayée pour les valeurs entre 100 et 600 unités à une vitesse de 2,94 mesures/sec

### **3.2.2.2 Essais utilisant les enzymes purifiées et quantification de l'activité catalytique des BphAE issues des variants**

#### **3.2.2.2.1 Purification des enzymes recombinantes**

Pour effectuer des comparaisons précises nécessitant une concentration de BphAEFG déterminée, les gènes encodant les enzymes recombinantes ont été transférés dans le vecteur pET- 14b (fragment BamHI-HindIII) et transformés dans la souche *E.coli* C41(DE3) suivant les protocoles décrits aux sections 3.2.1.2.3 et 3.2.1.2.4.

Les protéines produites ont été purifiées par chromatographie sur une résine d'affinité nickel-nitriloacétate (Ni-NTA) (GE Healthcare Bio-Sciences, Royaume-Uni) grâce à la queue histidine (MRGSHHHHHHTPD) codée par le vecteur pET-14b et attachée à l'extrémité N-terminale de la protéine. Un volume de culture de 500 ml sur milieu LB des souches *E.coli* DH11S recombinantes portant le plasmide approprié étaient induites par l'IPTG 1 mM durant une période de 18 h (23°C). Les cellules étaient ensuite lavées dans le tampon de sonication (piperazine-N,N'-bis [2-éthanesulfonate] (PIPES) 50 mM, pH 7,2 contenant 10% de glycérol (p/v) et 300 mM de NaCl puis resuspendues dans un volume moindre du même tampon (1/10 du volume initial). Les suspensions ont d'abord été traitées au lysosyme (Sigma) (1 mg/ml, 30 min sur glace) puis les cellules ont été brisées par sonification avec un homogénéisateur ultrasonique Cole-Palmer modèle 4710 (Cole-Palmer Instruments Company, Vernon Hills, IL). Les cellules étaient sonifiées 6 fois 15 sec en les maintenant sur glace et en laissant une période de repos entre chaque séquence afin d'éviter la dénaturation thermique de l'enzyme. Le lysat cellulaire était finalement récupéré par une centrifugation (1 h, 18 000 rpm, 4°C).

La résine Ni-NTA (1 ml d'une suspension 50% v/v) a été équilibrée par une centrifugation à 3000 rpm suivie d'un lavage à l'eau déionisée puis au tampon imidazole 10 mM, pH 7,4. La résine était alors resuspendue dans le lysat cellulaire des souches appropriées et incubée 1 h à 4°C sur rotateur (20 rpm). La résine était de nouveau



centrifugée et lavée 2 fois avec 15 ml de tampon imidazole 20 mM, pH 7,4, puis 2 fois avec 15 ml de tampon imidazole 40 mM pH 7,4. Puis, la résine était mise en suspension dans 5 ml de tampon imidazole 40 mM, pH7,4 et déposée sur une colonne (1 cm x 11 cm). Les protéines étaient éluées avec 5 ml de tampon imidazole 500 mM, pH 7,4 et leur concentration était évaluée par spectrophotométrie. Les enzymes BphAE ont un coefficient d'extinction molaire de  $8300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  à 455 nm, BphG de  $11\,250 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  à 450nm et BphF de  $7455 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  à 460nm (Broadus et Haddock, 1998 : 106; Haddock et Gibson, 1995 : 5834; Haddock, Pelletier et Gibson, 1997 : 355).

L'enzyme BphF est instable et son activité varie d'une préparation à l'autre. Afin de mieux standardiser son activité, l'activité spécifique de BphF a été déterminée envers le cytochrome C et un nombre d'unités précis plutôt qu'une quantité d'enzyme fixe a été utilisé lors des essais afin de les rendre reproductibles. Le milieu réactionnel d'un volume de 1 ml contenait 50 pmol de BphF, 100 pmol de BphG, 0.1mM de NADH et 615  $\mu\text{g}$  cytochrome C dans un tampon d'acide 3-(N-morpholino)-propanesulfonique (MOPS) 100 mM, pH. 7,4. Immédiatement après l'ajout de BphF, une lecture de la densité optique à 550 nm en continu était faite par un spectrophotomètre Cary 50 Bio (Varian Inc. Palo Alto, CA). Le coefficient d'extinction molaire du cytochrome C est de  $21\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Parr, Barber et Greenwood, 1976 : 423) et l'activité de BphF était exprimée en U/nmol d'enzyme où 1 U représente 1 nmol de cytochrome C transformée par seconde.

Les enzymes BphB et BphC ont été purifiées de façon similaire sur colonne Ni-TNA à partir des souches *E. coli* DH11S pQE31 [LB400*bphB*] et *E. coli* DH11S pQE31 [LB400*bphC*] (Mohammadi et Sylvestre, 2005 : 835).

#### 3.2.2.2.2 Analyse des métabolites des réactions enzymatiques par GC-MS

Le protocole utilisé pour déterminer les activités spécifiques et pour analyser les métabolites produits s'inspire de Hurtubise et al. (Hurtubise et al., 1995 : 6610). Les essais ont été faits dans 200  $\mu\text{l}$  de tampon d'acide morpholineéthanesulfonique (MES) à pH 6,0. Ils contenaient 0,4 mM de NADH, 0,0015% de  $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2(\text{NH}_4)_2$  et 0,5 mM de

substrat. Les enzymes étaient ajoutées à raison de 1,2 nmole BphAE, 3,55 U de BphF et 0,6 nmole de BphG. Les réactions étaient incubées de 5 à 10 min à 37°C avec agitation, puis arrêtées par l'ajout de 800 µl de tampon d'acide N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonique (CAPS) 100 mM, pH 9,0 très froid. Les métabolites produits ont été extraits à l'acétate d'éthyle, puis analysés par GC-MS tel que décrit dans la section 3.2.2.1.2.

L'activité des variants envers le benzène, le toluène et l'éthylbenzène a été mesurée par spectrophotométrie. Une réaction témoin utilisant le biphenyle comme substrat servait à préciser l'activité relative de l'enzyme. Les essais ont été réalisés tel que décrit ci-haut. Après ajout du tampon CAPS, les échantillons étaient centrifugés 3 min à 13 000 rpm puis la densité optique était mesurée à 398 nm (éthylbenzène), 389 nm (toluène), 375 nm (benzène) ou 434 nm (biphenyle (Sylvestre et al., 1996 : 2710)) par un spectrophotomètre Cary 50 Bio (Varian, Palo Alto, CA). Les longueurs d'onde maximales d'absorbance pour le benzène, le toluène et l'éthylbenzène ont été déterminées en établissant le spectre UV-visible des préparations du variant S100 présentant une couleur jaune intense à l'œil nu.

#### 3.2.2.2.3 Quantification de l'activité enzymatique basée sur la consommation en oxygène

L'activité spécifique des variants S100, S149 et S151 envers le biphenyle et le 2,2'-CB fut établie par la mesure de la consommation en oxygène (Mohammadi et Sylvestre, 2005 : 835). Le milieu réactionnel (400 µl) contenait 0,0001%  $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2(\text{NH}_4)_2$ , 125 µM du substrat, 0,5 mM de NADH, 3,55 U de BphF, 0,6 nmol de BphG et 1,2 nmol de BphAE dans un tampon MES 50 mM, pH 6,0 saturé en air et maintenu à une température de 37°C. L'oxygraphe utilisé pour mesurer la consommation en oxygène était le modèle DW1 de type Clark (Hansatech Instrument Inc., England) accompagné de l'interface OXYG32 (Hansatech, Allemagne). Les données ont été enregistrées toutes les 0,1 seconde et la vitesse initiale de la réaction (nmol d'O<sub>2</sub> consommé/nmol d'enzyme par min) a été déterminée à partir de la courbe illustrant la concentration d'O<sub>2</sub> consommée par ml en tenant compte des corrections pour le volume de la réaction et pour la quantité d'enzymes BphAE utilisée.

### **3.2.3 Caractérisation du cis-5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-CB**

#### ***3.2.3.1 Purification du métabolite par chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC)***

##### **3.2.3.1.1 Purification du métabolite par HPLC**

Deux volumes de 600 ml de milieu LBensemencé avec une culture de *E. coli* DH11S pDB31[*bphFG*] pQE31[S100*bphAE*] contenant chacun 15 mmol de 2,2'-CB ont été induits à l'IPTG et incubés pendant 18 h. Les métabolites ont été extraits tel que décrit dans la section 3.2.2.1.2. à l'exception du couplage. Après évaporation à l'acétate d'éthyle, le résidu solide était dissous dans un mélange d'eau déionisée/acétonitrile/méthanol 50 :25 :25 (v/v/v). La solution était injectée sur une colonne C8 ZORBAX Eclipse XDB (Agilent, Santa Clara, CA) inversée, équilibrée avec une solution eau déionisée/acétonitrile/méthanol (50 :25 :25). Le HPLC utilisé était un appareil Agilent de la série 1100 (Agilent). Les métabolites étaient élués en conditions isocratiques à un débit de 0,7ml/min et analysés à une longueur d'onde de 276 nm avec un détecteur à longueurs d'onde variables Agilent modèle 1314 (Agilent, Santa Clara, CA). Cette longueur d'onde correspond à la longueur d'onde d'absorption maximale des métabolites de type dihydro-dihydroxy-dichlorobiphényle observés pour le 2,2'-CB (Haddock et Gibson, 1995 : 5834).

##### **3.2.3.1.2 Analyse des métabolites purifiés par HPLC et GC-MS**

Un volume de 25 µl de l'échantillon purifié par HPLC a été évaporé à sec et les résidus étaient resuspendus dans un volume de 1 ml d'une solution d'eau déionisée/acétonitrile/méthanol 50 :25 :25 (v/v/v). L'échantillon était analysé sur HPLC selon les conditions décrites à la section 3.2.3.1. De façon simultanée, l'échantillon était isolé d'un volume de 25 µl par évaporation et dissout dans une solution 25 mM d'acide

butylboronique/acétone pour une analyse en GC-MS selon le protocole décrit à la section 3.2.2.1.2.

#### 3.2.3.1.3 Analyse du métabolite par résonance magnétique nucléaire

Le volume résiduel de l'échantillon purifié sur HPLC a été évaporé à sec dans un tube en verre ambré pour protéger le produit de la lumière et analysé au centre de spectrométrie par résonance magnétique nucléaire de l'INRS-Institut Armand-Frappier à l'aide d'un spectromètre Bruker 500-mHz (Bruker, Allemagne). Les analyses ont été conduites dans l'acétonitrile deutéré et l'interprétation des résultats a été réalisée par M. Nicholas Leberre.

#### 3.2.3.2 *Analyse de l'attaque du cis-5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-CB par BphB et BphC*

La capacité de BphB seule ou couplée avec BphC à oxyder le *cis*-5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-CB a été évaluée avec des préparations enzymatiques purifiées. Les mêmes conditions de réaction ont été utilisées pour les réactions impliquant BphB ou BphB couplée à BphC. Les essais ont été effectués dans 200 µl de tampon MES 50 mM, pH 7,0 contenant 0,4 mM de NAD (Sigma), 0,0015% de  $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2(\text{NH}_4)_2$  et 10 µl du *cis*-5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-CB purifié (75 nmol). Les enzymes étaient ajoutées à raison de 3,0 µl pour chacune des préparations de BphB et de BphC. Les milieux réactionnels étaient incubés 15 min à 37°C avec agitation puis les réactions étaient arrêtées par ajout de 800 µl de tampon CAPS 100 mM, pH 9,0 très froid et placées sur glace pour 5 min. Les métabolites produits ont été extraits à l'acétate d'éthyle puis analysés par GC-MS selon le protocole décrit dans la section 3.2.2.1.2 à l'exception du couplage. Les métabolites ont été dérivés au triméthylsilyle (TMS). Les échantillons extraits étaient évaporés puis solubilisés dans 100 µl d'une solution 99% N,O-Bis(triméthylsilyle)-trifluoroacétamide (BSTFA) et 1% de triméthylchlorosilane (TMCS) (Supelco, Bellefonte). Les solutions étaient incubées à 70°C durant 30 min puis directement injectées sur GC-MS (1 µl).

Pour l'analyse des propriétés spectrales des métabolites du *cis*-5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-CB produits par BphB ou par BphB et BphC, les réactions étaient arrêtées par ajout de tampon CAPS, les échantillons centrifugés 3 min à 13 000 RPM puis le spectre UV-visible des produits était déterminé (voir section 3.2.2.2).

### **3.2.4 Mutagenèse dirigée sur le variant S100**

Des expériences de mutagenèse dirigée ont été réalisées afin d'évaluer quels sont les acides aminés de BphA potentiellement responsables du phénotype observé chez le variant S100. Les positions 237-238, 277, 283, 377, 398 et 407 de BphA ont été étudiées.

#### ***3.2.4.1 Mutagenèse dirigée***

Un protocole de mutagenèse dirigée en deux étapes, semblable à celui décrit par Mohammadi et Sylvestre (Mohammadi et Sylvestre, 2005 : 835) a servi à préparer les BphAE mutantes. Les amorces utilisées pour l'amplification PCR sont décrites au Tableau 11. Le fragment N-terminal a été amplifié par l'amorce A1 conjointement à l'amorce anti-sens correspondant à la mutation. Le fragment C-terminal a été amplifié par l'amorce A11 et l'amorce sens correspondant à la mutation. Le milieu réactionnel contenait 2,5 U de Pfu DNA polymérase (Stratagene, Cedar Creek, TX) et son tampon fourni par le fabricant, 0,2 µM de chacune des amorces, 0,2 mM de dNTP, 0,003% de BSA et 1 µg de l'ADN plasmidique extrait de *E. coli* DH11S pQE31 [S100*bphAE*] pQE31 [LB400*bphFGB*]. Le PCR a été effectué selon les conditions suivantes : 3 min à 95°C, 30 cycles (95°C durant 45 sec, 60°C durant 1 min, 72°C durant 1 min), suivis d'une période de 10 min à 72°C.

Les fragments N-terminaux et C-terminaux ont été associés les uns aux autres pour chacune des mutations grâce au fragment long de l'ADN polymérase I de *E. coli* (fragment Klenow) (USB Cleveland, OH). Un volume de 6 µl de chacun des produits PCR a été dénaturé par une incubation de 10 min à 99°C suivie d'une période de 10 min

sur glace. Des volumes de 2 µl du tampon fourni par le fabricant et de 2 µl d'une solution de BSA 0,1% étaient ensuite ajoutés, et le milieu réactionnel placé à 23°C pour 60 min. Vingt unités de Klenow et 3 µl de dNTP 10 mM étaient alors ajoutés, suivi d'une seconde période d'incubation à 23°C. Après 60 min, 20 unités supplémentaires de l'enzyme Klenow étaient ajoutées et la réaction était incubée de nouveau à 23°C pour 3 h. Les produits PCR étaient finalement purifiés par GenElute™ PCR purification Kit (Sigma).

Les fragments obtenus par mutagenèse dirigée ont été clonés de façon similaire aux fragments issus du *family shuffling* (voir section 3.2.1.3.2) sauf pour les cellules réceptrices. Il s'agissait ici de la souche *E. coli* pDB31 [LB400*bphFG*].

#### **3.2.4.2 Analyse de l'activité des mutants obtenus envers différents congénères BPC**

Les capacités de dégradation des mutants S100 obtenus par mutagenèse dirigée ont été évaluées par des essais en cellules entières tel que décrit à la section 3.2.2.1.

**Tableau 11.** Séquences des différentes amorces utilisées pour amplifier par PCR les fragments nécessaires à la mutagenèse dirigée

<i>Amorce</i>	<i>Brin</i>	<i>Séquence de l'amorce</i>
A1	Codant	5' - GGC TGG GCC TAC GAC ANC GC - 3'
A11	non-codant	5' - TCG ACC CGG GGT ACC CCT CAG - 3'
S100a 237-238 (MS→TT)	non-codant	5' - GGCACCACGACGCACCTGTCC - 3'
S100a 277 (T→A)	non-codant	5' -ATCGACATACCAGCCCGAGCCGTGTC - 3'
S100a 283 (T→A)	non-codant	5' -TTACCGCCATGAGTGAGCCCGGCTCATC - 3'
S100a 370 (F→Y)	non-codant	5' - GTGCCGACGATATTCTTCCTTG - 3'
S100a 377 (T→N)	non-codant	5' - CTGCAGAGAAGTTGCGGATGGTG - 3'
S100a 398 (V→G)	non-codant	5' - CCCACGCAACCCTTTCTGAATCTC - 3'
S100a 407 (R→Q)	non-codant	5' - GGGCATTGAGCGGCTGGC - 3'
S100b 237-238 (MS→TT)	Codant	5' - GGACAGGTGCGTCGTGGTGCC - 3'
S100b 277 (T→A)	Codant	5' -ACACGGCTCGGGCTGGTATGTCGATGAG - 3'
S100b 283 (T→A)	Codant	5' -ATGAGCCGGGCTCACTCATGGCGGTAATG - 3'
S100b 370 (F→Y)	Codant	5' - ATCAAGGAAGAATATCGTCGGCAC - 3'
S100b 377 (T→N)	Codant	5' - CACCATCCGCAACTTCTCTGCAG - 3'
S100b 398 (V→G)	Codant	5' - GAGATTCAGAAAGGGTTGCGTGGG - 3'
S100b 407 (R→Q)	Codant	5' - AGCCAGCCGCTCAATGCC - 3'

### 3.3 Résultats

#### **3.3.1 Recombinaison aléatoire *in vitro* de famille de gènes (*family shuffling*) utilisant des isolats de laboratoire**

Dans le présent travail, nous avons mis au point une stratégie de *family shuffling* (section 3.2.1.3) qui cible la partie C-terminale du gène *bphA* afin de faire évoluer BphAE<sub>LB400</sub>. La stratégie a d'abord été appliquée en utilisant une banque de fragments amplifiés par PCR à partir de l'ADN génomique extraits des isolats B206, B218, B257, B357, H850 et YT-01 décrits à la section 2.2.1.1.

Suivant le protocole (section 3.2.1.3), les fragments provenant de la partie C-terminale des divers gènes *bphA* ont été réassemblés par des amplifications PCR sans amorce qui ont permis d'obtenir une banque d'hybrides. Les BphAE hybrides ont été transformées à l'intérieur d'un recombinant *E. coli* DH11S exprimant les enzymes subséquentes du tronçon supérieur de la voie de dégradation des BPC. Les variants ainsi obtenus ont été criblés en fonction de leurs caractéristiques phénotypiques envers les chlorobiphényles.

##### **3.3.1.1 Sélection des variants issus du *family shuffling* impliquant les gènes *bphA* d'isolats.**

La stratégie de *family shuffling* appliquée dans un premier temps visait une recombinaison entre des portions des fragments C-terminaux de *bphA* des souches LB400 et B356, et les fragments C-terminaux d'une combinaison de gènes *bphA* provenant de l'un ou l'autre des isolats. Neuf essais de *family shuffling* différents ont été effectués en modifiant à chaque essai la combinaison de *bphA* homologues parentaux (Tableau 12). Les clones ont été criblés en utilisant l'approche permettant de repérer les variants capables d'effectuer une déshalogénéation oxygénolytique sur le carbone en position *ortho* du 2,2'-CB (stratégie de criblage 1, section 3.2.1.3.3). Sur un total de 13 430 clones, 82 variants (S1-S82) se sont montrés capables d'effectuer une *ortho*-déchlorination du 2,2'-CB, un résultat représentant une fréquence de variants positifs de 0,6%.



**Tableau 12.** Tableau synthèse des rondes de *family shuffling* effectuées avec l'ADN extrait d'isolats de laboratoire: origine des fragments, mode de sélection, nombres de variants totaux et positifs obtenus et noms associés aux variants.

Origine des fragments	Nombre de colonies obtenues	Mode de sélection	Nombre de variants positifs	Noms associés aux variants
B206 – H850	2240	Déchlorination du 2,2'	0	
B206 – B218	2420	Déchlorination du 2,2'	5	S1-S5
B206 – B218 – B357 – YT-01	3570	Déchlorination du 2,2'	13	S6-S18
B206 – B357 – YT-01	3070	Déchlorination du 2,2'	9	S19-S28
B206 – B257	900	Déchlorination du 2,2'	4	S37-S41
B206 – P2	150	Déchlorination du 2,2'	4	S42-S46
B206 – YT-01	730	Déchlorination du 2,2'	5	S30-35
YT-01 – B257	200	Déchlorination du 2,2'	27	S46-73
YT-01	150	Déchlorination du 2,2'	9	S74-82
<b>Total</b>	<b>13 430</b>		<b>76</b>	

### 3.3.1.2 Caractérisation préliminaire des variants issus du family shuffling impliquant les gènes *bphA* d'isolats.

L'un des principaux objectifs du présent travail était de vérifier si certains de ces variants montraient un potentiel catalytique supérieur à celui de BPDO modifiées déjà décrites dans la littérature, tel les variants *p4* (Barriault et Sylvestre, 2004 : 47480), II-9 (Barriault, Plante et Sylvestre, 2002 : 3794) et RR41 (Mohammadi et Sylvestre, 2005 : 835). Après confirmation du phénotype d'*ortho*-déchlorination par un second criblage sur le 2,2'-CB, 41 variants (Tableau 12) ont été retenus pour déterminer leur potentiel catalytique envers divers congénères BPC; il s'agit des variants S11, S13 à 18, S21 à 22, S30 à 33, S37 à 44, S46 à 50, S53 à 54, S56 à 61, S65, S67, S69, S71 à 73 et S77.

Le potentiel catalytique des hybrides BphAE envers les BPC a d'abord été évalué dans un essai préliminaire utilisant un mélange synthétique de 18 congénères BPC présents dans le mélange commercial d'Aroclor 1242. Les pics représentant chacun des congénères du mélange sont bien résolus par la chromatographie en phase gazeuse. Le Tableau 13 compare le profil de dégradation des cellules *E. coli* DH11S

pQE31[LB400**bphAE**] pDB31[LB400**bphFGC**] induites avec le profil obtenu pour les cellules *E. coli* D11S pDB31[LB400**bphFGC**] transformées avec l'un ou l'autre des plasmides pQE31[**bphAE**] provenant des 41 variants. Le tableau ne tient compte que des congénères du mélange synthétique pour lesquels il était possible d'observer une diminution de la concentration initiale du congénère supérieure à 20% pour au moins une des dioxygénases analysées

La détermination du profil exact de dégradation des BPC par un essai basé sur la disparition du substrat nécessite l'analyse de multiples essais sur un même échantillon. Les résultats du Tableau 13 visaient surtout à permettre une seconde étape de criblage afin de cibler des hybrides BphAE montrant des profils de dégradation de beaucoup supérieurs ou différents de celui propre à LB400. Les résultats démontrent que celui-ci transforme difficilement le 2,6-CB et le 2,2'-6,6'-CB, ainsi que les congénères *di-para*-substitués 4,4'-CB et 2,2',4,4'-CB, en accord avec la littérature (Arnett, Parales et Haddock, 2000 : 2928; Barriault, Plante et Sylvestre, 2002 : 3794; Maltseva et al., 1999 : 363) L'analyse du Tableau 13 indique qu'aucun des hybrides issus des expériences de *family shuffling* décrites au Tableau 12 s'avère supérieur aux BphAE modifiées *p4*, II-9 et RR41 déjà décrites dans la littérature (Barriault et al., 2004 : 47489; Barriault, Plante et Sylvestre, 2002 : 3794; Mohammadi et Sylvestre, 2005 : 835). Certains variants montraient cependant des profils différents de celui de BphAE<sub>LB400</sub>. Les variants S31, S33, S47, S49 et S54 dégradait le 2,3,4'-CB et le 2,3,4'-CB plus efficacement que BphAE<sub>LB400</sub>. Les variants S57, S63 et S69 ont acquis la capacité de dégrader le 2,6-CB et le 2,2',6,6.-CB qui sont des congénères toxiques résistants à la réaction d'oxygénation catalysée par BphAE<sub>LB400</sub> (Gomez-Gil et al., 2007 : 5705) et les variants S54 et S63 sont capables de dégrader le 4,4'-CB. Cependant, aucun de ces variants n'a été retenu pour une analyse plus avancée des capacités catalytiques, car ils ne présentaient pas de profil différent des souches déjà caractérisées.

**Tableau 13.** Dégradation d'un mélange synthétique de 18 congénères BPC par des variants obtenus par *family shuffling* de la partie C-terminale de gènes *bphA* provenant d'isolats.

	26- CB	33'- CB	44'- CB	22'66' -CB	23'4- CB	244'- CB	234'- CB	22'55' -CB	22'33' -CB
<b>LB400</b>		+			+	+	+	+++	++
<b>S11</b>		+			+	+	+	++	++
<b>S13</b>								+	+
<b>S14</b>									+
<b>S15</b>									
<b>S16</b>		+			+	+	+		+
<b>S17</b>		+			+	+	+	+	++
<b>S18</b>		+			+	+	+		+
<b>S21</b>		+			+	+	+		+
<b>S22</b>		+			+	+	+		+
<b>S30</b>									
<b>S31</b>		+			++++	+	++		+
<b>S32</b>		+			+	+	+		+
<b>S33</b>		+			++++	+	++++		+
<b>S37</b>		+			+	+	+	+++	++
<b>S38</b>		+			+	+	+	+++	++
<b>S39</b>		+			+	+	+	+++	++
<b>S40</b>		+			+	+	+	+++	++
<b>S41</b>		+			+	+	+	+++	++
<b>S42</b>		+			+	+	+	+++	++
<b>S43</b>		+			+	+	+	+++	++
<b>S44</b>		+			+	+	++	+	
<b>S46</b>		+			+	+	+		
<b>S47</b>		+			++++	+	+++		
<b>S48</b>		+			+	+	+		
<b>S49</b>		+			+++	+	+++		
<b>S50</b>						+	+		
<b>S53</b>									
<b>S54</b>		+	+		++	+	+++		
<b>S56</b>		+				+	+		
<b>S57</b>	++	+		+	+	+	+	+	
<b>S58</b>						+			
<b>S59</b>		+				+	+	+	
<b>S60</b>		+			+	+	++		
<b>S63</b>	+++	+	+	++	+	+	+	++	+
<b>S65</b>						+			
<b>S67</b>		+				+	+	+	
<b>S69</b>	++					+			
<b>S71</b>						+			
<b>S72</b>									
<b>S73</b>		+				+		+	
<b>S77</b>		+			++	+	+	+	+

+: >20-40%, ++: >40-60%, +++: >60-80%, ++++: >80-100%  
 Seuls les congénères du mélange dégradés par au moins une dioxygénase sont indiqués.

### **3.3.2 Recombinaison aléatoire *in vitro* de famille de gènes (*family shuffling*) utilisant l'ADN extrait de sols contaminés aux BPC.**

#### ***3.3.2.1 Sélection de variants issus du family shuffling impliquant les gènes bphA amplifiés à partir de l'ADN extrait de sols contaminés ou non contaminés.***

Dans le Chapitre 1, nous avons mis en évidence la grande diversité des *bphA* homologues présents dans les sols contaminés. En tenant compte de cette observation, nous pouvons présumer que la fréquence des variants présentant des phénotypes d'intérêt serait plus élevée si les essais de *family shuffling* impliquaient des gènes *bphA* amplifiés de l'ADN extrait des sols plutôt que des isolats de laboratoire. De plus, afin d'élargir le champ des phénotypes, les variants furent criblés en recherchant ceux capables de dégrader le 4-CB ou le 2,2'-CB selon les approches couplant la dioxygénase BphB avec ou sans BphC. Le Tableau 14 résume les différents essais effectués.

**Tableau 14.** Tableau synthèse des rondes de *family shuffling* effectuées avec l'ADN extrait de sols: origine des fragments, mode de sélection, nombres de variants totaux et positifs obtenus et noms associés aux variants.

<b>Origine des fragments</b>	<b>Nombre de colonies obtenues</b>	<b>Mode de sélection</b>	<b>Nombre de variants positifs</b>	<b>Noms associés aux variants</b>
Ronde 1 : Sol G7 – G8- G9-G11	540	Attaque du 2,2'	11	S100 – S110
		Attaque du 4-CB	30	S111 – S140
Ronde 2 : Sol G7 – G8- G9-G11	1000	Attaque du 2,2'	15	S153 – S167
		Attaque du 4-CB	16	S168 – S183
		Coloration bleue des colonies sur milieu LB	12	S141-S152
<b>Total</b>	<b>1540</b>		<b>84</b>	

Parmi 1 540 transformants analysés, 26 variants furent sélectionnés sur le 2,2'-CB (S100-110 et S153-167) et 46 sur le 4-CB (S111-S140 et S168-183). Une dizaine de variants ont été retenus du fait qu'ils produisaient un métabolite de couleur bleue lorsqu'ils étaient cultivés sur milieu LB (S141 à S152). Ces variants sont présumés capables de transformer l'indole résultant de la transformation du tryptophane du milieu LB utilisé, de façon semblable à ceux décrits précédemment par C. Simard (Mémoire de Maîtrise) et par Kumamaru et al. (1998 : 663). Après un second criblage effectué sur le 4-CB ou le 2,2'-CB pour confirmer leur niveau d'activité, les 43 variants suivants ont été retenus : S100 à S103, S106, S108 à S111, S116 à S117, S136, S143, S147 à S149, S151 à S165, S168, S171, S173, S175, S176 à S177, S180, S181, S184 à S187.

### ***3.3.2.2 Caractérisation préliminaire des variants issus du family shuffling impliquant les gènes *bphA* amplifiés du sol***

Un criblage préliminaire des cellules induites de *E. coli* DH11S pQE31[*bphAE*] pDB31[LB400*bphFGB*] ou *E. coli* DH11S pQE31[*bphAE*] pDB31[LB400*bphFGBC*] exprimant les dioxygénases hybrides a été réalisé pour repérer, s'il y a lieu, des variants qui se démarquaient quant à leur profil catabolique envers le mélange synthétique de 18 congénères décrit à la section 3.2.1.4 (Tableau 10).

Un gain d'activité envers le 2,6-CB est apparu chez les variants S100, S102, S103 et S151. La disparition du 2,6-CB était particulièrement élevée chez S100. De plus, l'analyse préliminaire indiquait une possibilité que le variant S100 puisse dégrader faiblement le 2,2',6,6'-CB, un congénère extrêmement résistant à la dégradation. S100 et S151 ont acquis la capacité de transformer le 4,4'-CB mais seul S151 dégrade le 2,4,4'-CB de façon plus importante que LB400. D'autre part, lors de deux études précédentes (Barriault, Plante et Sylvestre, 2002 : 3794-3794-800.; Barriault et Sylvestre, 2004 : 47480), LB400 dégradait le 2,3',4-CB et le 2,3,4'-CB inefficacement dans le mélange synthétique de congénère : le pourcentage de dégradation se situait autour de 20%, seuil en deçà duquel les valeurs obtenues ne sont pas statistiquement valables. Les résultats

présentés au Tableau 15 indiquent une dégradation légèrement supérieure à 20% pour ces congénères dans les essais effectués avec LB400. Toutefois, il faut souligner que notre analyse était basée sur un seul essai et que ce niveau de dégradation reste faible. S149 quant à lui est particulièrement performants envers le 2,3,4'-CB et le 2,3',4-CB. S100 et S103 présentent eux aussi des capacités catalytiques accrues envers ces congénères.

**Tableau 15.** Dégradation d'un mélange synthétique de 18 congénères BPC par des variants obtenus par *family shuffling* de la partie C-terminale de gènes *bphA* issus d'ADN de sols contaminés aux BPC

	26-CB	33-CB	44-CB	22'66'- CB	23'4'- CB	244'- CB	234'- CB	22'55'- CB	22'33'- CB
<b>LB400</b>		+			+	+	+	+++	++
<b>S100</b>	+++	+	+	+	++	+	++		++
<b>S101</b>		+			+	+	+	+++	++
<b>S102</b>	++	+			+	+	+	+++	++
<b>S103</b>	+	+			++	+	++	+++	++
<b>S106</b>		+			+	+	+	+++	++
<b>S108</b>						+	+	++	+
<b>S109</b>						+			
<b>S110</b>							+	+	+
<b>S111</b>					+	+	+	++	+
<b>S116</b>									
<b>S117</b>						+	+		
<b>S136</b>						+			
<b>S143</b>					+	+	+		
<b>S147</b>					+		+		
<b>S148</b>		+			+	+	+		+
<b>S149</b>		+			+++	+	++++		++
<b>S151</b>	+	+	++		+	++	++	++	++
<b>S152</b>					+	+	+		
<b>S153</b>								+	+
<b>S154</b>									
<b>S155</b>									
<b>S156</b>									
<b>S157</b>									
<b>S158</b>									
<b>S159</b>									
<b>S160</b>									
<b>S161</b>							+	+	+
<b>S162</b>									
<b>S163</b>									
<b>S164</b>									
<b>S165</b>									
<b>S168</b>						+	+		
<b>S171</b>		+				+			
<b>S173</b>						+			
<b>S175</b>						+	+		
<b>S176</b>									
<b>S177</b>		+			+	+	+		
<b>S180</b>						+	+		
<b>S181</b>		+				+	+		
<b>S184</b>		+			+	+	+		
<b>S185</b>		+			+	+	+	+	+
<b>S186</b>		+				+	+		
<b>S187</b>		+	+		+	+	++	+	

+: >20-40%, ++: >40-60%, +++: >60-80%, ++++: >80-100%

Seul les congénères du mélange testé qui étaient dégradés par au moins une dioxygénase sont indiqués

### 3.3.2.3 Séquences en acides aminés de variants issus du family shuffling sur l'ADN de sol

Basé sur l'analyse préliminaire des profils de dégradation présentés au Tableau 15, aucun variant ne paraît avoir acquis un potentiel de dégradation qui se démarque par rapport à certains mutants performants déjà décrits dont *p4*, II-9 et RR41 (Barriault, Plante et Sylvestre, 2002 : 3794; Barriault et Sylvestre, 2004 : 47480; Mohammadi et Sylvestre, 2005 : 835). Cependant, il est intéressant de noter la capacité de S100 à attaquer le 2,6-CB et le 2,2',6,6'-CB, et celle de S151 envers le 4,4'-CB et le 2,4,4'-CB, des congénères qui ne sont que peu ou pas dégradés par LB400. Le variants S149 présente un profil similaire à celui de LB400 (il y a toutefois gain d'activité envers le 2,3',4-CB et le 2,3,4'-CB) mais il a perdu complètement (tout comme S100) la capacité d'attaquer en position 3,4 essentielle pour métaboliser le 2,2',5,5'-CB. De plus, comme nous l'avons indiqué plus haut, les variants S149 et S151 produisent un métabolite bleu lorsque cultivés sur milieu LB, ce qui signifie qu'ils ont acquis la capacité de transformer les noyaux indoles.

Les séquences primaires en acides aminés des portions C-terminales des BphA des variants ciblés S100, S149 et S151 ainsi que celles de deux variants actifs mais ayant des profils similaires à celui de LB400, S106 et S161, et de deux variants inactifs, S166 et S167, ont été déterminées afin d'évaluer leur diversité dans l'ensemble (Figure 23) ainsi qu'au niveau des régions plus spécifiques désignées II, III et IV par Mondello et al. (Mondello et al., 1997 : 3096). Les séquences de *bphA* de S100, S149 et S151 ont été déposées dans la banque de gènes GenBank et les numéros d'accèsion sont respectivement EF090937, EF090938 et EF090939.



**II**

LB400 251) MDLSQAQIPTKGNQFRAAWGGHSGWYVDEPGSLLAVMGPKVTQYWTEGP  
 S100 . . . . H . . V . S . . . . . S . . . . . F . . . . . L . M . . . . . I . . . . .  
 S106 . Y . LH . . VL . . . . . S . . . . . F . . . . . L . M . . . . . I . . . . .  
 S149 . . . . H . . V . S . . . . . S . . . . . F . . . . . L . M . . . . . I . . . . .  
 S151 . . . . H . . V . . . . . S . . . . . F . . . . . M . M . . . . .  
 S161 . . . . . EC . . . . H . . - . R . . Q . . . . . S . . . . .  
 S166 . C .  
 S167

**III**

LB400 301) AAELAEQRLGHTGMPVRRMVGQHMTIFPTCSFLPTFENNIRIWHPRGPNEI  
 S100 . . . . . QE . . . . . - . . . . . L . F . . . . . V . . . . . GI . T . T . . . . .  
 S106 .  
 S149 . . . . . QE . . . . . - . . . . . LC . F . . . . . V . . . . . GI . T . T . . . . .  
 S151 .  
 S161 .  
 S166 P . Q . V .  
 S167 . . . . . SIQ . . . . LL . . . . G . . . . . I . T . S . . . . .

**IV**

LB400 351) EVWAFTLVDADAPAEIKEEYRRHNIRNFSAGGVFEQDDGENWVEIQKGLR  
 S100 . . . . . . . . . . . . . . . . F . . . . . T . . . . . . . . . . . V . . . . .  
 S106 .  
 S149 .  
 S151 .  
 S161 .  
 S166 .  
 S167 .  
 T . . . . .

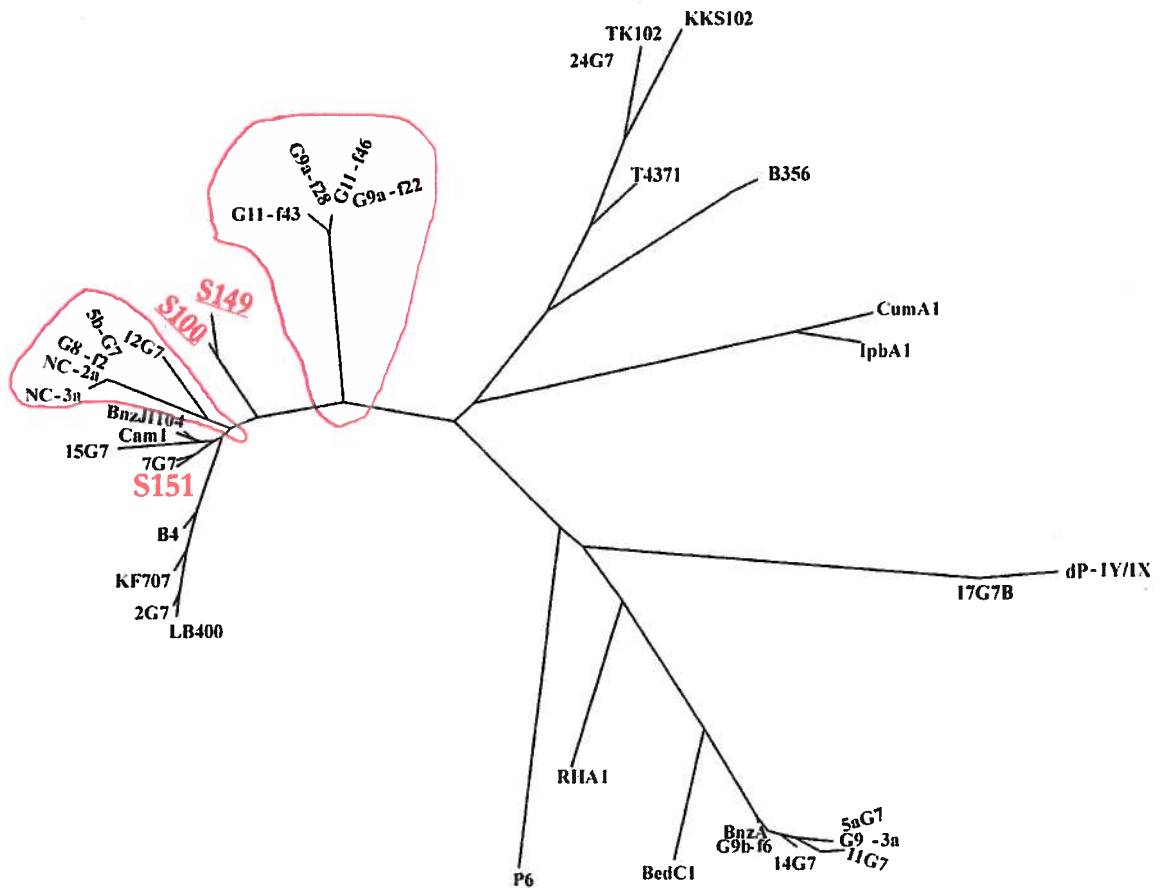
LB400 401) GYKAKSQPLNAQMGLGRSQTGHPDFPGNVGYVYAEAAARGMYHHWRRMMS  
 S100 . H . . . . R .  
 S106 .  
 S149 .  
 S151 .  
 S161 .  
 S166 .  
 S167 .  
 . . . . . Q . . . . .

**Figure 23.** Séquences en acides aminés d'un échantillon de variants provenant du *family shuffling* effectué avec des fragments issus d'ADN de sols.

La variabilité de séquence par rapport à LB400 se trouve principalement en amont de la région III et ce, pour tous les variants. Les régions II et IV ont subi peu de modifications : une phénylalanine (F) est retrouvée au lieu d'une tyrosine (Y) chez les variants S100, S149 et S151 pour la région II, ce qui correspond au résidu retrouvé chez la souche KF707, et une thréonine (T) remplace l'asparagine (N) chez les variants S100 et S167 dans la région IV. Les acides aminés entourant ces deux régions sont extrêmement conservés.

La région III est celle qui a subi le plus de modifications. Les combinaisons, GINTIRT (S100), GINNIRI (S149), AINTIRT (S151) et TINTIRS (S167) remplacent la séquence TFNNIRI de LB400. Cependant sauf pour S167 dont le résidu I<sup>341</sup> de BphA<sub>LB400</sub> est remplacé par une sérine (S), toutes ces séquences ressemblent de très près aux patrons déjà observés pour les régions III des BphA d'un grand nombre d'isolats capables de dégrader les BPC (voir Chapitre 1) (Barriault, Plante et Sylvestre, 2002 : 3794; Mondello et al., 1997 : 3096).

L'analyse des séquences des fragments C-terminaux de *bphA* amplifiés de sols au Chapitre 1 révélait une faible diversité de séquences dans les régions II, III et IV des BphA, mais montrait une variabilité intéressante lorsque les séquences complètes des fragments C-terminaux de ces BphA étaient comparées entre elles. Ici, la faible diversité des régions II, III et IV est aussi présente, mais S100 et S149 font partie d'une lignée phylogénétique distincte des trois lignées qui comprennent les BphA d'isolats de laboratoire (Figure 24). La position de S100 et S149 dans l'arbre phylogénétique permet de supposer que ces variants seraient des hybrides de gènes *bphA* appartenant à des lignées phylogénétiques distinctes. Cette observation a augmenté l'intérêt à examiner de façon plus approfondie les propriétés catalytiques des variants S100 et S149 envers les congénères BPC.



**Figure 24.** Arbre phylogénique tracé à l'aide du programme MEGA par alignement des séquences déduites en acides aminés des portions C-terminales des gènes *bphA* de différents isolats et des fragments amplifiés de l'ADN du sol avec les séquences des variants S100, S149 et S151. Les acides aminés correspondant aux positions 162 à 382 de *BphA*<sub>LB400</sub> ont été alignés. Pour la description des oxygénases se référer à la Figure 18 section 2.3.2.2.

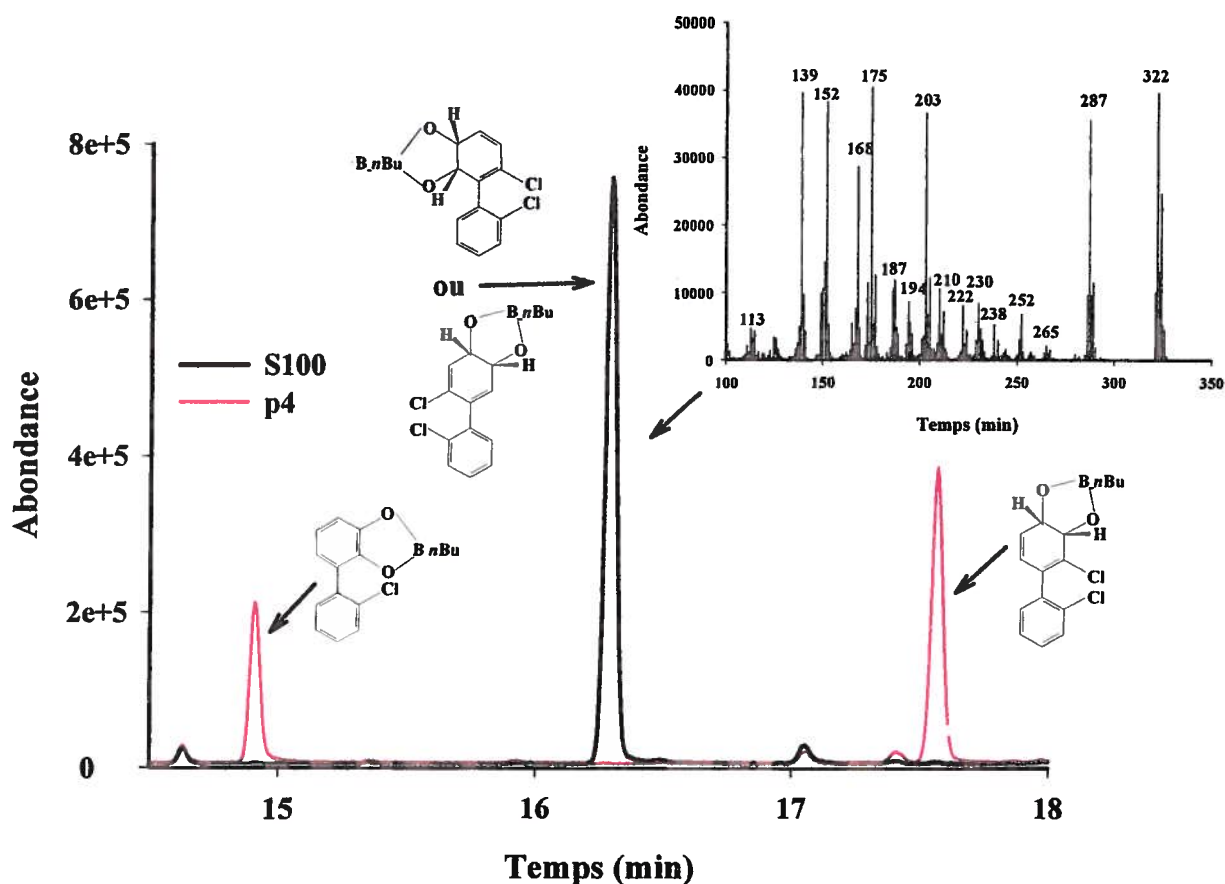
### **3.3.3 Propriétés catalytiques des variants S100, S149 et S151 envers les congénères BPC**

#### ***3.3.3.1 Activité catalytique envers 2,2'-CB***

L'analyse préliminaire du potentiel catabolique des variants envers les BPC et les résultats d'analyse des séquences a permis de retenir les variants S100, S149 et S151 comme étant des variants potentiellement intéressants pour mieux comprendre l'attaque de BphA. Un examen plus approfondi de leurs propriétés catalytiques envers les congénères BPC a été réalisé en analysant par spectrométrie de masse les métabolites produits lors de l'attaque de certains congénères isolés.

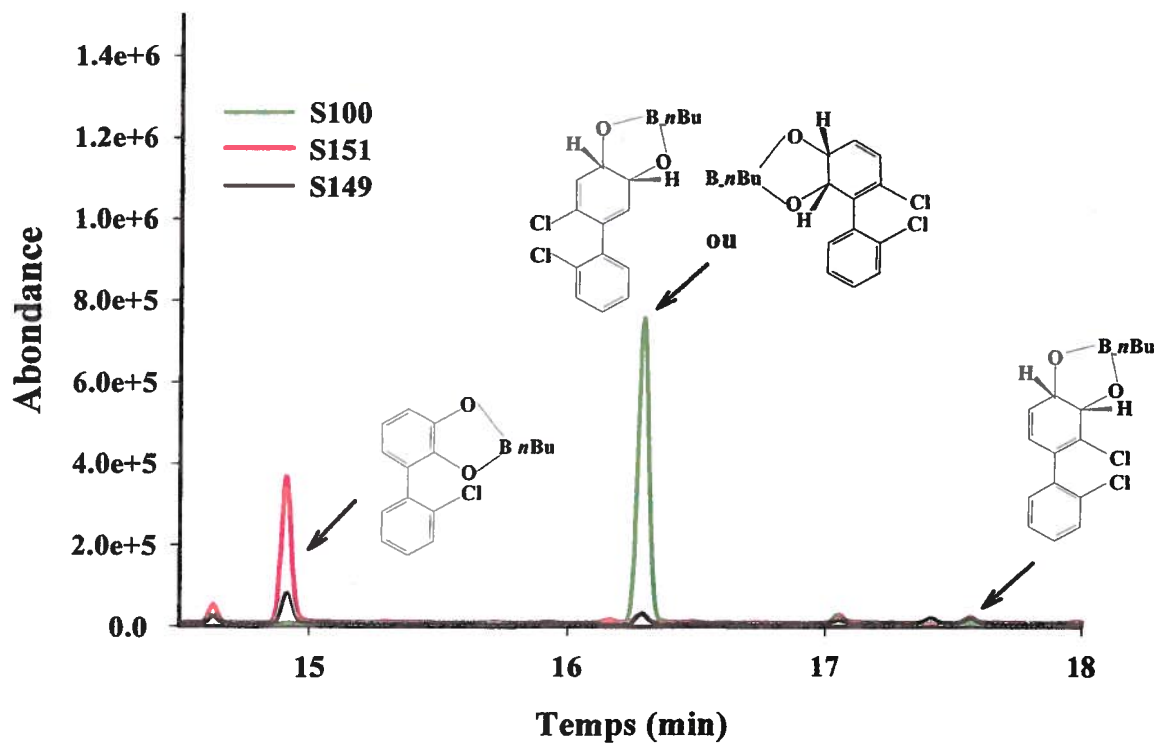
Le 2,2'-CB est un congénère difficilement métabolisé par les diverses dioxygénases du biphenyle. L'analyse par GC-MS des métabolites obtenus lors de l'attaque par la BphAE<sub>S100</sub> montre un métabolite unique dont le temps de rétention est différent des métabolites *cis*-3,4-dihydro-3,4-dihydroxy-2,2'-CB et 2,3-dihydroxy-2'-CB produits par LB400. Le variant *p4* utilisé est issu de la mutagenèse aléatoire de la région III de LB400 (Barriault et Sylvestre, 2004 : 47480). Il permet de mieux discerner le *cis*-3,4-dihydro-3,4-dihydroxy-2,2'-CB produit en très faible quantité par LB400. La Figure 25 compare les spectres GC-MS obtenus lorsque des cellules de *E. coli* DH11S induites produisant BphAE<sub>S100</sub>FG<sub>LB400</sub> ou BphAE<sub>p4</sub>FG<sub>LB400</sub> sont utilisées pour oxyder le 2,2'-CB.

Dans notre système chromatographique, le temps de rétention du métabolite inconnu était de 16,30 min au lieu de 17,17 min pour le 2,3-dihydroxy-2'-CB et de 17,56 min pour le *cis*-3,4-dihydro-3,4-dihydroxy-2,2'-CB (Barriault et Sylvestre, 2004 : 47480). En se basant sur le patron de fragmentation du 2,3-dihydroxy-2,3-dihydro-4-CB, le spectre de masse du nouveau métabolite est caractéristique d'un diol dichloré (Figure 25) (Massé et al., 1989 : 27). L'ion moléculaire a une masse de 322 et les pics correspondant aux fragments ayant perdu un atome de chlore ( $m/z = 287 [M^+ - 35]$ ) et à celle du butylboronate ( $nC_4H_9BO_2$ ) en entier [ $M^+ - 100$ ] sont présents. Il pourrait donc s'agir du 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-CB ou du 4,5-dihydro-4,5-dihydroxy-2,2'-CB.



**Figure 25.** Analyse par GC-MS des métabolites couplés au butylboronate issus de l'attaque du 2,2'-CB par *E. coli* DH11S exprimant soit BphAE<sub>p4</sub>FG<sub>LB400</sub> (rouge) ou BphAE<sub>S100</sub>FG<sub>LB400</sub> (noir).

Le métabolite particulier produit presque exclusivement par S100 est présent chez les variants S149 et S151 dans des proportions moindres (Figure 26). Leur métabolite majeur demeure le 2,3-dihydroxy-2'-CB. L'attaque du 2,2'-CB pour ces deux variants se fait donc principalement sur les carbones 2 et 3 comme chez LB400. La migration d'extraits cellulaires sur gel de retardement en conditions dénaturantes permet de vérifier que les différences observées au niveau de l'efficacité catalytique des variants est attribuable à l'activité même de l'enzyme et non à des variations de niveau d'expression des sous-unités de la BPDO à l'intérieur de la cellule (Figure 27).



**Figure 26.** Analyse par GC-MS des métabolites couplés au butylboronate issus de l'attaque du 2,2'-CB par des cellules *E. coli* DH11S exprimant l'un ou l'autre des variants S100 (vert), S149 (noir) et S151 (rouge).



**Figure 27.** Gel de retardement en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) d'extraits cellulaires provenant des souches *E. coli* DH11S [pDB31**bphFG**<sub>LB400</sub>] exprimant BphAE de LB400 ou des variants S100, S149, S151. Le marqueur de poids moléculaire ainsi que la BphAE purifiée du variant *p4* permettent l'identification des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la BPDO.

L'activité spécifique des dioxygénases purifiées de la souche LB400 et des variants S100, S149 et S151 a été déterminée par oxymétrie (Tableau 16). Les taux de consommation d'oxygène lorsque le 2,2'-CB servait de substrat pour les réactions impliquant les BphAE de S100, S149 et S151 étaient similaires à ceux observés lorsque la réaction était catalysée par BphAE<sub>LB400</sub>. Cependant l'activité spécifique envers le biphenyle était significativement plus importante chez les variants.

**Tableau 16.** Taux de consommation d'O<sub>2</sub> des enzymes purifiées BphAE provenant de la souche LB400 et des variants S100, S149 et S151 en présence de biphenyle et de 2,2'-CB

Enzymes		Biphényl	2,2'-DCB
BphFG <sub>LB400</sub>	BphAE <sub>LB400</sub>	30.5 ± 5 *	16 ± 1
BphFG <sub>LB400</sub>	BphAE <sub>S100</sub>	84.9 ± 2	16 ± 1
BphFG <sub>LB400</sub>	BphAE <sub>S149</sub>	48.7 ± 2	16 ± 1
BphFG <sub>LB400</sub>	BphAE <sub>S151</sub>	74.8 ± 8	13 ± 1

\*Activité spécifique ± déviation standard exprimée en nmole de O<sub>2</sub>/min/nmole d'enzyme

#### 3.3.3.1.1 Identification du nouveau métabolite du 2,2'-CB produit par BphAE<sub>S100</sub>

Le métabolite unique produit par BphAE<sub>S100</sub> a été purifié par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Dans le système chromatographique HPLC utilisé, le temps de rétention de ce métabolite est de 9,4 min. Il présente des longueurs d'ondes d'absorption maximale à 262 nm et à 200 nm.

Le composé purifié a été analysé par résonance magnétique nucléaire (RMN) par le Centre de RMN de l'INRS-Institut Armand-Frappier qui a fait l'analyse des résultats. Selon l'interprétation du spectre RMN obtenu, ce métabolite est le *cis*-5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-CB (Figure 28). Le spectre RMN du composé dans l'acétonitrile deutéré indique des signaux entre 7,30 et 7,40 qui correspondent aux quatre protons aromatiques (m, H<sub>6'</sub>), (m, H<sub>5'-4'</sub>) et (m, H<sub>3'</sub>) (Figure 28). Entre 4,40 ppm et 6,10 ppm, apparaissent des

signaux caractéristiques des protons des chaînes aliphatiques à 6,04 ppm (dd, H<sub>3</sub>), 6,02 ppm (dd, H<sub>4</sub>), 4,56 ppm (m, H<sub>5</sub>) et 4,27 ppm (dd, H<sub>6</sub>).

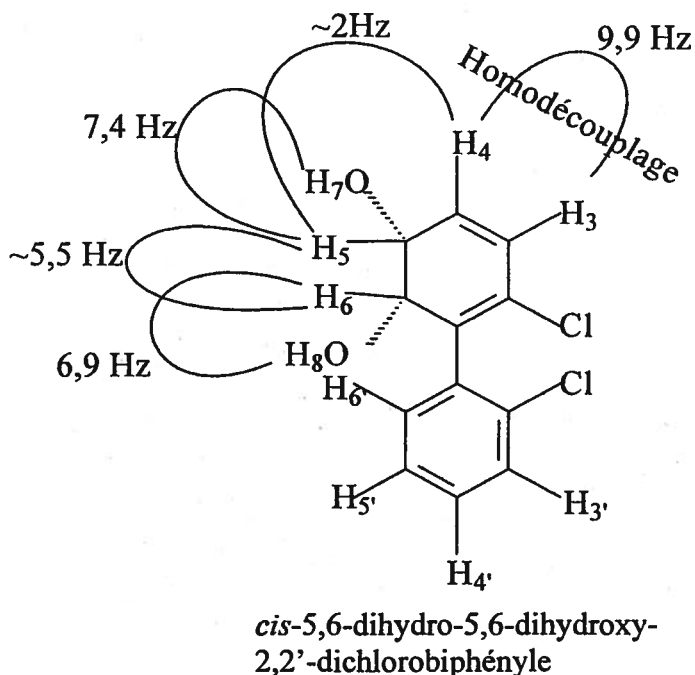


Figure 28. Analyse RMN du métabolite du 2,2'-CB produit par le variant S100.

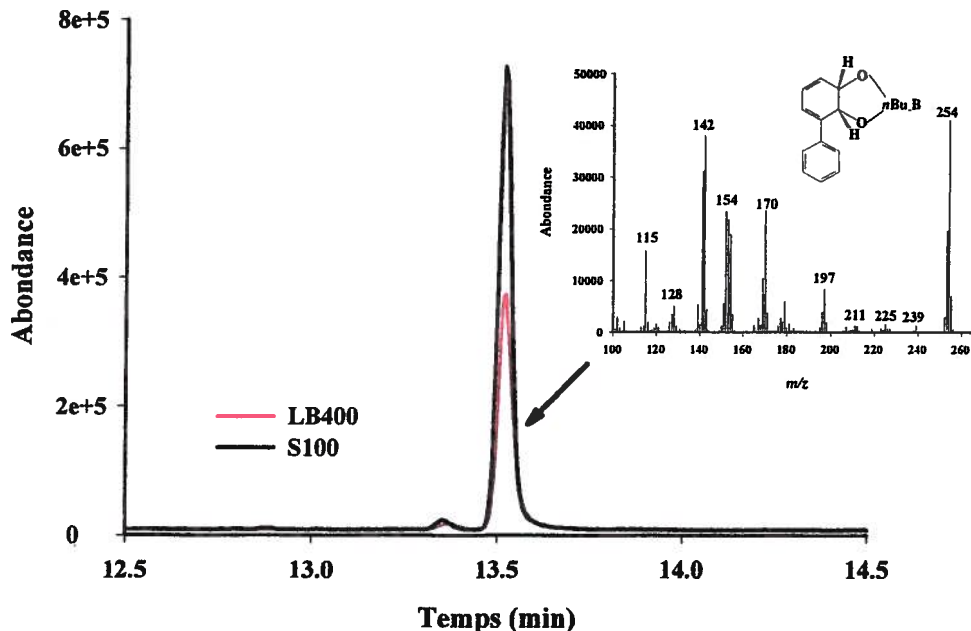
Les protons liés aux groupements hydroxyles ont des déplacements chimiques de 3,25 ppm (d, H<sub>7</sub>) et 3,33 ppm (d, H<sub>8</sub>). La Figure 28 indique les constantes de couplage des différents protons appartenant à la partie aliphatique de la molécule. H<sub>5</sub> est faiblement couplé à H<sub>4</sub> ( $J \sim 2$  Hz). L'absence d'une corrélation entre le proton (H<sub>3</sub>) et les protons de type méthyle (H<sub>5</sub> et H<sub>6</sub>) indique que les deux protons de type vinyle sont vicinaux (H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>), ce qui exclut le 4,5-dihydro-4,5-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphényle comme métabolite. H<sub>5</sub> est couplé à H<sub>7</sub> ( $J = 7,4$  Hz) et H<sub>6</sub> est couplé à H<sub>8</sub> ( $J = 6,9$  Hz) et H<sub>5</sub> et H<sub>6</sub> sont couplés l'un à l'autre ( $J \sim 5,5$  Hz). Cet arrangement est conforme aux valeurs théoriques obtenues par modélisation pour un composé dont les groupements hydroxyle sont en position *cis* l'un par rapport à l'autre. L'irradiation de H<sub>5</sub> à 4,56 ppm provoque l'apparition de deux doublets pour H<sub>3</sub> et H<sub>4</sub> dont la constante de couplage à 9,9 Hz est caractéristique des systèmes de configuration Z. Ceci confirme que les deux protons



vinyle H<sub>3,4</sub> sont vicinaux et que le métabolite produit par le variant S100 est le *cis* 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-CB.

### 3.3.3.2 *Activité catalytique du variant S100 envers le biphenyle*

Tenant compte du profil métabolique de S100 envers le 2,2'-CB et de son activité spécifique accrue envers le biphenyle, le profil métabolique de S100 envers ce dernier a été déterminé. Celui-ci est similaire au profil de LB400 (Figure 29). L'analyse des métabolites produits lorsque *E. coli* DH11S exprime la BphA<sub>S100</sub> révèle la présence d'un métabolite majeur qui correspond au 2,3-dihydro-2,3-CB. Le spectre de masse de ce métabolite dérivé au butylboronate est similaire aux métabolites de type dihydrodihydroxy analysés lors des travaux de Haddock et Gibson (1995 : 5834). Il y a présence d'un ion moléculaire (M<sup>+</sup>) à une masse de 254 et des ions correspondant à la perte du fragment *n*-butyl (m/z = 197 [M<sup>+</sup>-57]) et à la perte du groupement C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>BO (m/z = 170 [M<sup>+</sup>-84]).

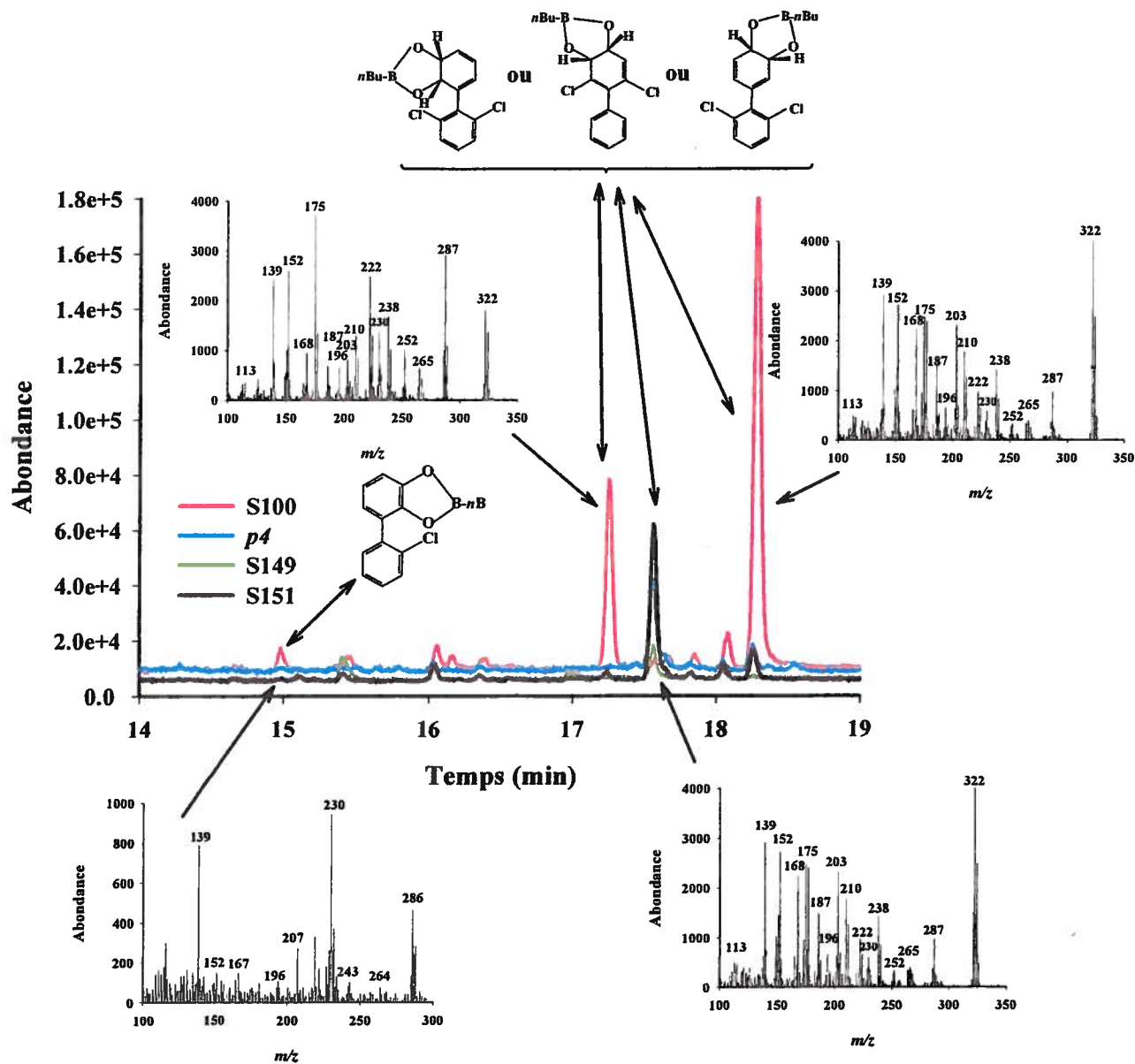


**Figure 29.** Analyse par GC-MS des métabolites couplés au butylboronate issus de l'attaque du biphenyle par LB400 (rouge) et par le variant S100 (noir).

### 3.3.3.3 *Activité catalytique envers différents chlorobiphényles ortho- substitués*

Le 2,6-CB est un congénère BPC très persistant difficilement attaqué par les microorganismes (Maltseva et al., 1999 : 363) et LB400 le métabolise très faiblement. L'analyse par GC-MS des métabolites produits par des préparations purifiées des BphAE de S100 et S151 en présence de BphFG<sub>LB400</sub> montrent que ces deux dioxygénases transforment le 2,6-CB à des taux plus élevés que le variant *p4*. Celui-ci dégrade le 2,6 - CB à des taux plus élevés que LB400 mais avec la même régiospécificité (Figure 30).

La Figure 30 montre que S100 produit deux métabolites principaux à partir du 2,6-CB. Les spectres de masse obtenus correspondent à ceux publiés pour des métabolites similaires dérivés au butylboronate (Barriault et Sylvestre, 2004 : 47480; Hurtubise, Barriault et Sylvestre, 1998 : 5828). Ils possèdent un ion moléculaire à une masse de 322, ainsi que les ions de fragmentation  $m/z = 287$  [M-35, Cl],  $m/z = 238$  [M-84, *n*BuBO],  $m/z = 222$  [M-100, BuBO<sub>2</sub>]. Présument que le métabolite le plus abondant serait celui résultant d'une oxygénation sur les carbones 2 et 3 du cycle non chloré, le 2,3-dihydro-2,3-dihydroxy-2',6'-CB correspondrait au pic du chromatogramme ayant un temps de rétention de 18,5 min. Cependant, le fait que nous ayons un autre métabolite dihydro-dihydroxy-dichlorobiphényle montre que le variant S100 catalyse aussi l'oxygénation de la molécule sur les carbones *meta-para*. Le variant S151, et dans une moindre proportion le variant S149, transforment le 2,6-CB en produisant un seul métabolite principal de type dihydro-dihydroxy présent sous forme trace chez S100 (Tableau 17).



**Figure 30.** Analyse par spectroscopie de masse des métabolites couplés au butylboronate issus de l'attaque du 2,6-CB par *E. coli* DH11S exprimant BphFG<sub>LB400</sub> et l'une des BphAE des variants S100 (rouge), S149 (vert), S151 (noir) ou *p4* (bleu).

Des travaux antérieurs (Barriault et al., 2004 : 47489; Haddock, Horton et Gibson, 1995 : 20) avaient démontré que le 2,2',3,3'-CB et le 2,2',5,5'-CB sont des congénères métabolisés par LB400 à des taux relativement élevés. Cette enzyme catalyse l'hydroxylation du 2,2',3,3'-CB principalement sur les carbones 4 et 5 pour donner le 4,5-dihydro-4,5-dihydroxy-2,2',3,3'-CB et des traces de 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2',3,3'-CB. Notre analyse confirme ces résultats (Tableau 17) et montre que les variants S100, S149 et S151 catalysent l'oxygénation de ce substrat aussi efficacement que LB400, mais le rapport des métabolites est différent. S100 produit un seul métabolite dont le spectre de masse du dérivé butylboronate est caractéristique des dihydro-dihydroxybiphényles tétrachlorés :  $m/z = 390 [M^+]$ ,  $m/z = 355 [M-Cl]$ ,  $m/z = 333 [M-nButyl]$ ,  $m/z = 306 [M^+-nBuBO]$  et  $m/z = 290 [M^+-nBuBO_2]$ . En se basant sur le temps de rétention correspondant aux métabolites produits par LB400, il est possible de déduire que ce métabolite est le 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2',3,3'-CB dont la structure a déjà été déterminée par RMN (Barriault et al., 2004 : 47489). Les variants S149 et S151 catalysent quant à eux la réaction d'oxygénation principalement sur les carbones 5 et 6 produisant une quantité abondante de 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2',3,3'-CB (90%), mais tous deux produisent aussi un second métabolite dont le spectre de masse et le temps de rétention correspondent au 4,5-dihydro-4,5-dihydroxy-2,2',3,3'-CB produit par LB400.

Le variant S100 est inactif sur le 2,2',5,5'-CB. Cela concorde avec l'incapacité de ce variant d'attaquer en position *meta/para* le 2,2'-CB et le 2,2',3,3'-CB (Tableau 17). Les variants S149 et S151 métabolisent le 2,2',5,5'-CB de façon identique à LB400 et produisent un métabolite dont le temps de rétention et le spectre de masse correspondent au 3,4-dihydro-3,4-dihydroxy-2,2',5,5'-CB. Des essais ont aussi été réalisés avec le 2,2',4,4'-CB. Aucun des variants n'a acquis la capacité de dégrader ce congénère.

Tableau 17. Métabolites produits à partir de congénères BPC *ortho*-chlorés par les variants S100, S149 et S151

Congénères	Métabolites	TR <sup>d</sup>	Act. relative à LB400 <sup>a</sup>			Rapport des métabolites produits <sup>b</sup>			
			S100	S149	S151	LB400	S100	S149	S151
2,2'-CB	2,3-dihydroxy-2'-chlorobiphényle	14,9	1	1	1	92(6)	0,2(0,2)	60(1)	63(5)
	5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphényle	16,3				-	99,8(0,2)	23(1)	18(2)
	3,4-dihydro-3,4-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphényle	17,5				8(1)	-	17(1)	19(2)
2,6-CB	2,3-dihydroxy-2'-chlorobiphényle	14,9	1500	1	500	ND	4(1)	-	-
	3,4-dihydro-3,4-dihydroxy-2',6'(or 2,6)-dichlorobiphényle <sup>c</sup>	17,2				ND	27(1)	2(1)	4(1)
	3,4-dihydro-3,4-dihydroxy-2,6(or 2',6')-dichlorobiphényle <sup>c</sup>	17,5				ND	trace	83(1)	71(1)
2,2',3,3'-CB	2,3-dihydro-2,3-dihydroxy-2',6'-dichlorobiphényle <sup>c</sup>	18,5				ND	69(5)	15(1)	25(1)
	5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2',3,3'-tetrachlorobiphényle	25,3	1	1	1	5(1)	100	95(2)	93(5)
	4,5-dihydro-4,5-dihydroxy-2,2',3,3'-tetrachlorobiphényle	26,7				95(1)	-	5(2)	7(4)
2,2',5,5'-CB	3,4-dihydro-3,4-dihydroxy-2,2',5,5'-tetrachlorobiphényle	24,4	0	1	1	100	-	100	100

<sup>a</sup> Les activités relatives à LB400 de chaque BphAE envers le 2,2'-CB, le 2,2',3,3'-CB et le 2,2',5,5'-CB ont été calculées à partir du ratio de la somme des aires sous la courbe de tous les pics de métabolites produits par chaque congénère après 5 min d'incubation en présence de 1-2 nmoles d'enzyme. Les activités relatives à LB400 de chaque BphAE envers le 2,6'-CB ont été calculées à partir du rapport de la somme des aires sous la courbe de tous les pics de métabolites produits lorsque des cellules de *E. coli* exprimant l'un ou l'autre de ces BphAE étaient incubées en présence de chaque congénère individuellement pendant 18 h. La variance observée sur les ratios des pics de métabolites est inférieure à 15% dans tous les cas.

<sup>b</sup> Le rapport des métabolites est basé sur l'aire sous la courbe des pics obtenus par analyse GC-MS des métabolites dérivés au butylboronate produit par les préparations d'enzymes purifiées ou par les suspensions de cellules de *E. coli* exprimant l'enzyme. (-), aucun métabolite détecté, ND, activité non déterminée.

<sup>c</sup> La position exacte de la réaction de dioxygénation n'a pas été déterminée.

<sup>d</sup> TR est le temps de rétention en min de chaque métabolite dans les conditions chromatographiques utilisées.

#### 3.3.3.4 *Activité catalytique envers différents chlorobiphényles meta et para-substitués*

Des études antérieures ont démontré qu'en général les BPDO qui attaquent les congénères *ortho*-chlorés efficacement ne catalysent qu'inefficacement les réactions d'oxygénation des congénères *meta* ou *para* substitués (Mondello et al., 1997 : 3096-3103). Le métabolisme des variants S100, S149 et S151 envers certains de ces congénères a été examiné (Tableau 18). Les activités sont relativement les mêmes pour LB400 et les variants tant pour le 3,3'-CB que pour le 4,4'-CB, qui restent faiblement attaqués. Il n'y a aucune attaque du 3,3',4,4'-CB tant chez LB400 que chez les variants.

Le 2,4',5-CB est un congénère substitué à la fois en position *ortho* sur l'un des cycles (attaque en position 3,4) et à la fois en position *para* sur l'autre cycle (attaque en position 2,3). Les résultats obtenus envers ce congénère illustrent clairement l'incapacité du variant S100 à médier l'attaque en position 3,4 contrairement à LB400 et aux variants S149 et S151 qui attaquent le cycle *ortho*-chloré de façon préférentielle (Tableau 18).

**Tableau 18. Métabolites produits à partir de congénères BPC *meta* et *para*-chlorés par les variants S100, S149 et S151**

Congénères	Métabolites	TR <sup>d</sup>	Act. relative à LB400 <sup>a</sup>			Rapport des métabolites produits <sup>b</sup>		
			S100	S149	S151	LB400	S100	S149
3,3'-DCB	Métabolite A <sup>c</sup>		1	1	1	90	100	100
	Métabolite B <sup>c</sup>					10		
4,4'-DCB	2,3-dihydro-2,3'-dihydroxy-4,4'-dichlorobiphényle		1	0.5	1	100	100	100
2,4',5'-CB	2',3'-dihydro-2,3'-dihydroxy-2,5,4'-trichlorobiphényle	22,7	1	1	0.5	1(1)	100	4(1)
	3,4-dihydro-3,4-dihydroxy-2,5,4'-trichlorobiphényle	24,3				99(1)	0	96(1)

<sup>a</sup> Les activités relatives à LB400 de chaque BphAE envers le 3,3'-CB, le 4,4'-CB ont été calculées à partir du ratio de la somme des aires sous la courbe de tous les pics de métabolites produits par chaque congénère après 5 min d'incubation en présence d'enzyme. Les activités relatives à LB400 de chaque BphAE envers le 2,5,4'-CB ont été calculées à partir du rapport de la somme des aires sous la courbe de tous les pics de métabolites produits lorsque des cellules de *E. coli* exprimant l'un ou l'autre de ces BphAE étaient incubées en présence de chaque congénère individuellement pendant 18 h. La variance observée sur les ratios des pics de métabolites est inférieure à 15% dans tous les cas.

<sup>b</sup> Le rapport des métabolites est basé sur l'aire sous la courbe des pics obtenus par analyse GC-MS des métabolites dérivés au butylboronate produit par les préparations d'enzymes purifiées ou par les suspensions de cellules de *E. coli* exprimant l'enzyme. (-), aucun métabolite détecté, ND, activité non déterminée.

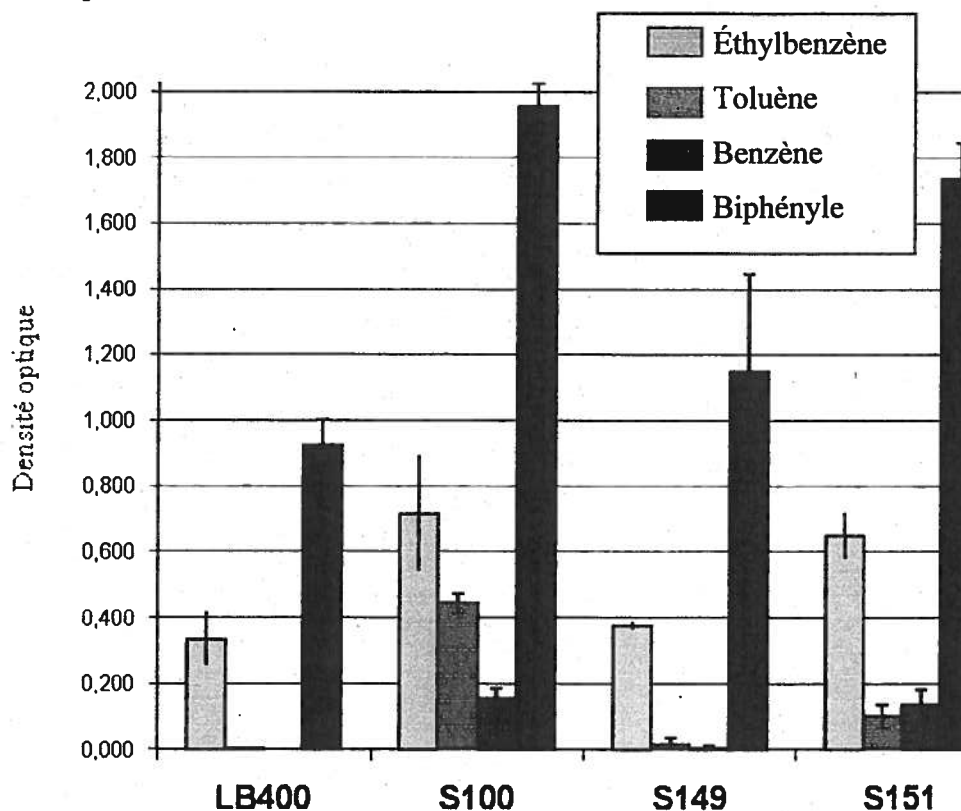
<sup>c</sup> La position exacte de la réaction de dioxygénation n'a pas été déterminée.

<sup>d</sup> TR est le temps de rétention en min de chaque métabolite dans les conditions chromatographiques utilisées.



### 3.3.3.5 Activité catalytique envers divers composés aromatiques

La souche LB400 attaque difficilement les composés monoaromatiques comme le benzène, le toluène et l'éthylbenzène (Haddock et Gibson, 1995 : 5834). Le comportement des variants envers ces composés fut analysé. La Figure 31 indique les résultats de la quantification du métabolite de *meta*clivage (jaune) résultant de l'oxydation du toluène, de l'éthylbenzène ou du benzène par des réactions couplées catalysées par des préparations purifiées de BphAE de LB400 ou des variants, avec BphFG, BphB et BphC provenant de LB400. Les composés de *meta*clivage produits dans le milieu réactionnel étaient quantifiés par spectrophotométrie à la longueur d'onde maximale d'absorption pour chacun d'eux. Il apparaît clairement que le variant S100 et le variant S151 dans une moindre proportion, oxydent le toluène et le benzène de façon plus efficace que LB400.



**Figure 31.** Absorbance des métabolites produits par des préparations purifiées de BphAE de LB400, S100, S149 et S151 en présence de BphFGBC<sub>LB400</sub> et de biphenyle, de toluène, de benzène ou d'éthylbenzène. L'absorbance a été déterminée à la valeur maximale d'absorption de 434 nm, 375 nm, 389 nm et 398 nm pour les métabolites du biphenyle, du benzène, du toluène et de l'éthylbenzène respectivement.

Le rapport entre l'activité spécifique envers le benzène, le toluène ou l'éthylbenzène et l'activité spécifique envers le biphenyle a été calculé pour chaque BphAE (S100, S149, S151 et LB400). Le Tableau 19 présente les résultats. Ces données permettent de constater qu'aucun variant n'a acquis de préférence envers l'éthylbenzène puisque le rapport entre l'activité spécifique envers ce substrat et l'activité spécifique envers le biphenyle reste inchangé. Cependant, il est clair que le variant S100 a acquis la capacité d'attaquer le toluène et le benzène, et le variant S151 présente une faible capacité d'attaque envers le toluène et une capacité d'attaque équivalente à S100 envers le benzène. Ces résultats confirment ceux obtenus à la Figure 31.

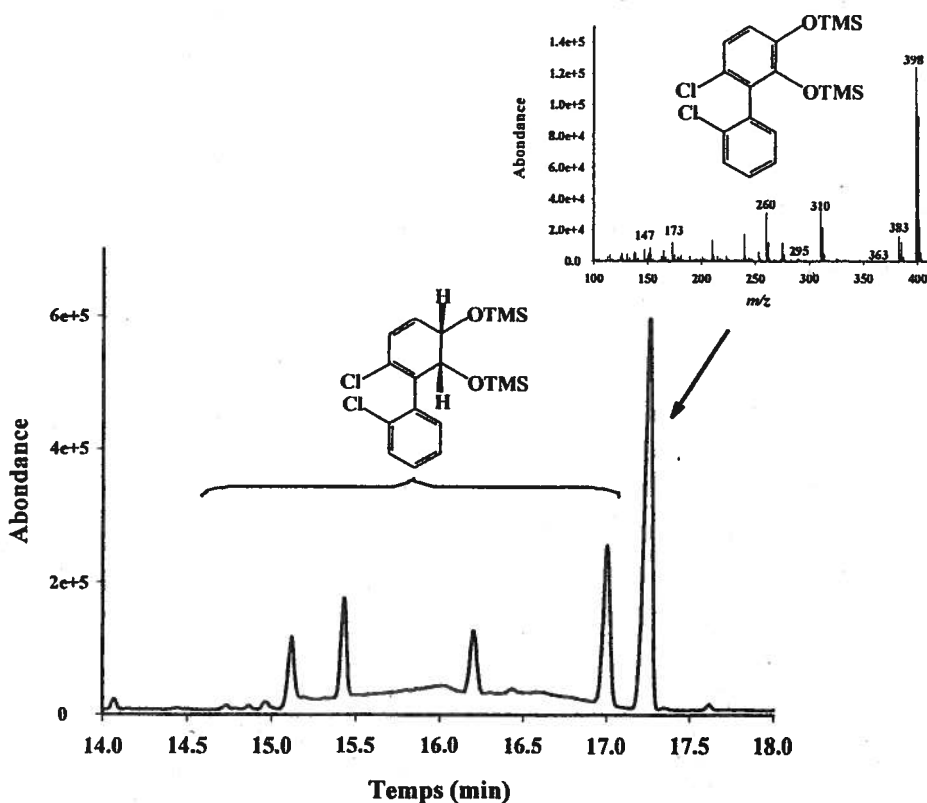
**Tableau 19.** Activités relatives des BphAE des variants S100, S149 ou S151 envers le toluène, le benzène et l'éthylbenzène comparées à l'activité envers biphenyle de BphAE<sub>LB400</sub>.

	<i>LB400</i>	<i>S100</i>	<i>S149</i>	<i>S151</i>
<b>Éthylbenzène</b>	36.2% ± 1.6	36.6% ± 10.1	32.5% ± 9.1	37.3% ± 6.3
<b>Toluène</b>	0.15% ± 0.01	22.7% ± 2.3	1.2% ± 2.3	5.7% ± 2.3
<b>Benzène</b>	0.0% ± 0.0	8.1% ± 1.5	0.4% ± 0.5	7.8% ± 3.0
<b>Biphenyle</b>	100%	100%	100%	100%

### **3.3.4 Métabolisme du 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-CB par les enzymes de la voie catabolique du biphényle**

Il a été démontré que le *cis*-3,4-dihydro-3,4-dihydroxy-2,2'-CB, l'un des métabolites produits par LB400 lors de l'attaque du 2,2'-CB, ne peut être attaqué par l'une des enzymes subséquentes de la voie catabolique du biphényle (Barriault et al., 1998 : 4637; Barriault et al., 2004 : 47489). BphC est une oxygénase qui transforme le 2,3-dihydroxybiphényle en acide 2-hydroxy-6-phényl-hexa-2,4-diénoïque (HOPDA) (voir Figure 5, section 1.2.1). Toutefois, elle est incapable de catalyser cette réaction dans le cas du 3,4-dihydroxy-2,2'-CB. Nous avons donc vérifié si l'enzyme BphB requise pour transformer le *cis*-5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-CB en 5,6-dihydroxy-2,2'-CB et l'enzyme BphC nécessaire à l'ouverture du cycle aromatique du 5,6-dihydroxy-2,2'-CB sont capables d'effectuer ces réactions.

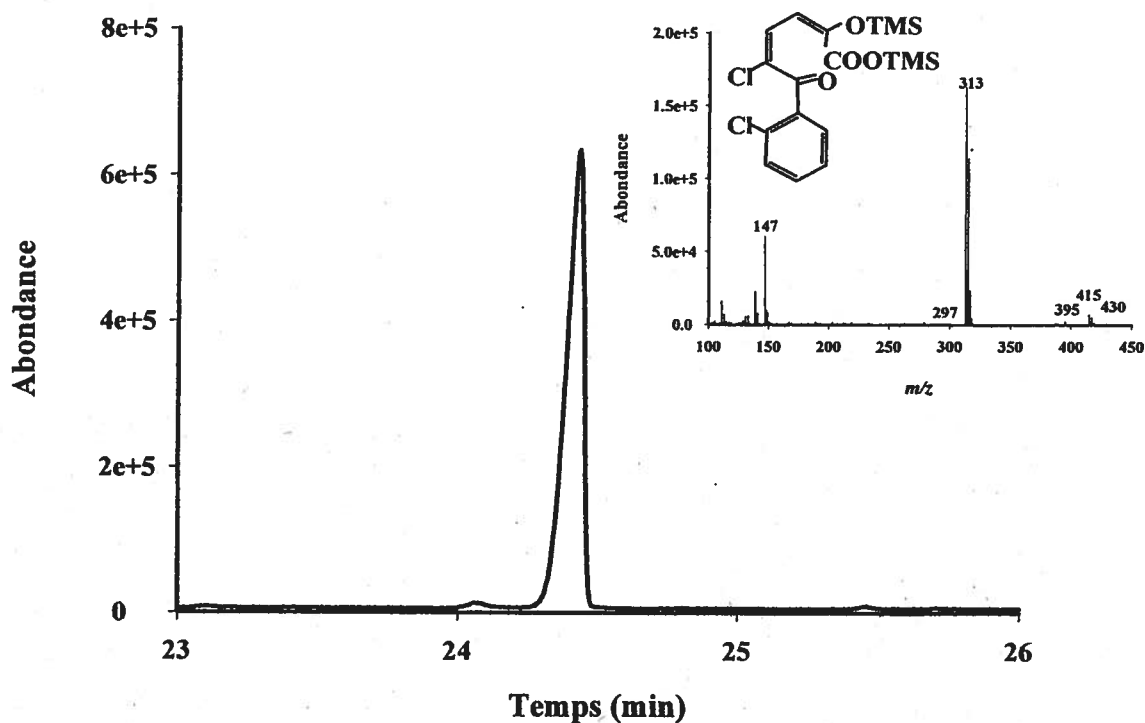
L'analyse du spectre de masse des métabolites obtenus lorsque le *cis*-5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-CB sert de substrat à un extrait purifié de BphB<sub>LB400</sub> démontre que celui-ci peut être transformé par cette enzyme. Sur le spectre, apparaît un pic élargi résultant de la mauvaise résolution du substrat couplé au TMS dans notre système chromatographique (Figure 32). Cependant, il est suivi d'un pic bien résolu dont le spectre de masse correspond à un catéchol et présente les ions caractéristiques à  $m/z = 398 [M^+]$ ,  $383 [M^+ - 15, Me]$ ,  $310 [M^+ - 88, TMS]$  et  $295 [M^+ - 15 - 88, Me, TMS]$ . L'ion  $m/z = 310$  est caractéristique des composés comportant un groupement catéchol (Massé et al., 1989 : 27). Ce métabolite serait donc le 5,6-dihydroxy-2,2'-CB résultant de l'attaque par BphB.



**Figure 32.** Analyse par GC-MS du métabolite couplé au TMS produit lorsque BphB<sub>LB400</sub> purifiée catalyse l'oxydation du *cis*-5,6-dihydro-5,6- dihydroxy-2,2'-CB

Lorsque le *cis*-5,6-dihydro-5,6- dihydroxy-2,2'-CB sert de substrat à une réaction couplée comprenant BphB et BphC purifiées, il y a formation d'un métabolite jaune caractéristique des produits résultant de la fission *meta* du cycle aromatique. Le chloroHOPDA a aussi été détecté par GC-MS (Figure 33). Le chromatogramme présentait un pic dont le spectre de masse du dérivé TMS comportait les ions à  $m/z = 430$  [ $M^+$ ],  $m/z = 415$  [ $M-CH_3$ ],  $m/z = 395$  [ $M-Cl$ ],  $m/z = 313$  [ $M-COOTMS$ ] est caractéristique des chloroHOPDA (Massé et al., 1989 : 27). Dans cette réaction couplée, aucune trace résiduelle de catéchol n'est visible. BphC n'est donc pas une étape limitante à la réaction. En se basant sur la surface du pic de substrat détecté au GC-MS, nous avons calculé que 10 nmol des 75 nmol de 5,6-dihydrodiol introduites dans le milieu réactionnel

étaient transformées après 5 min lorsque la réaction était effectuée à 37°C en présence de 0,6 nmol de BphB et de BphC purifiées.



**Figure 33.** Analyse par GC-MS du métabolite HOPDA couplé au TMS produit lorsque BphB<sub>LB400</sub> et BphC<sub>LB400</sub> catalysent l'oxydation du *cis*-5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-CB dans une réaction couplée.

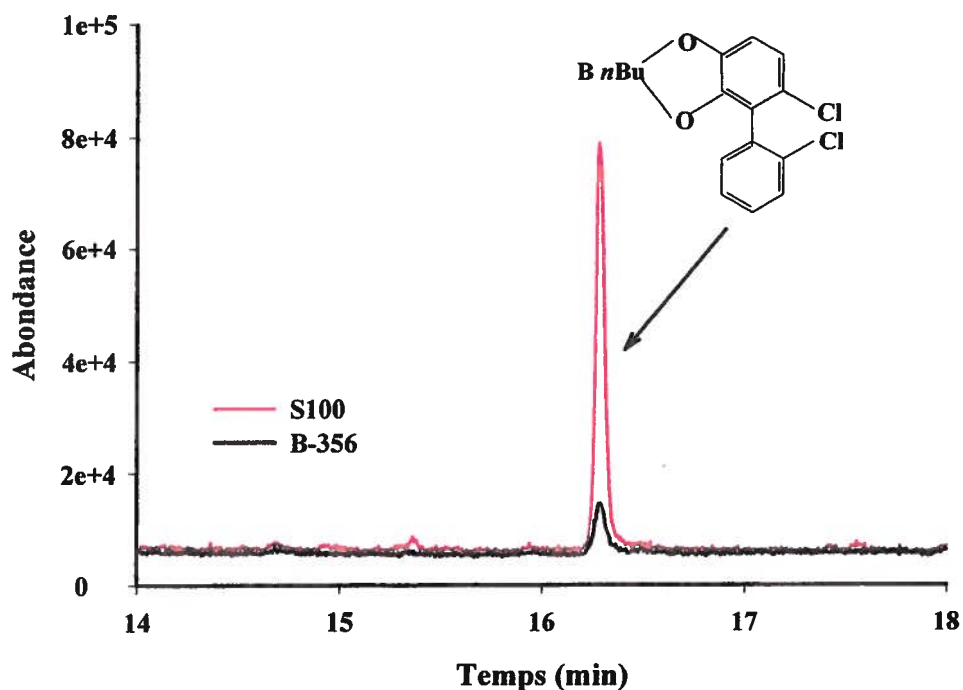
L'analyse spectrale des métabolites produits à partir du 2,2'-CB par des cellules de *E. coli* DH11S produisant BphAE<sub>S100</sub> et BphB<sub>LB400</sub> auxquelles a été ajoutée l'enzyme BphC purifiée montre l'apparition d'un composé présentant un  $\lambda_{\max} = 395$  qui est caractéristique des chloroHOPDA provenant des congénères *ortho*-chlorés (Seeger, Timmis et Hofer, 1995 : 2654).

### **3.3.5 Identification de quelques caractéristiques structurales de BphAE<sub>S100</sub> associées à la régiospécificité de S100 envers les congénères ortho-chlorés**

#### ***3.3.5.1 Comparaison de la régiospécificité envers le 2,2'-CB de S100 avec celle de BphAE<sub>B356</sub>***

Des travaux récents ont montré que les acides aminés de la région III de BphA contribuent de façon importante aux propriétés catalytiques de l'enzyme envers les chlorobiphényles (Barriault et Sylvestre, 2004 : 47480). Le variant II-9 développé par Barriault et al. (Barriault, Plante et Sylvestre, 2002 : 3794) présente un potentiel catalytique accru. La séquence primaire en acides aminés de BphA est identique à celle de LB400 sauf pour les acides aminés de la région III dont la séquence est identique à celle de *P. pnomenusa* B356. Cependant, la régiospécificité de II-9 envers le 2,2'-CB est considérablement différente de celle de LB400. Contrairement à LB400, II-9 catalyse principalement l'oxygénation du 2,2'-CB sur les carbones 3 et 4 montrant une influence des acides aminés de la région III sur la régiospécificité envers le 2,2'-CB. Toutefois, ce variant ne produit aucun 5-6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-CB (résultats non présentés).

Puisque la séquence en acide aminé de la région III de BphA<sub>S100</sub> est identique à celle du variant II-9, les résidus de la région III ne peuvent expliquer la régiospécificité de S100 envers le 2,2'-CB. La région III de BphA<sub>II-9</sub> ayant été héritée de B356, la régiospécificité de cette enzyme envers le 2,2'-CB a été étudiée. Des travaux antérieurs avaient montré que BphAE<sub>B356</sub> dégrade le 2,2'-CB inefficacement (Imbeault et al., 2000 : 12430). Cependant, le spectre GC-MS présenté à la Figure 34 démontre que cette enzyme produit des traces d'un métabolite du 2,2'-CB dont le temps de rétention et le spectre de masse sont identiques au 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-CB produit par le variant S100.

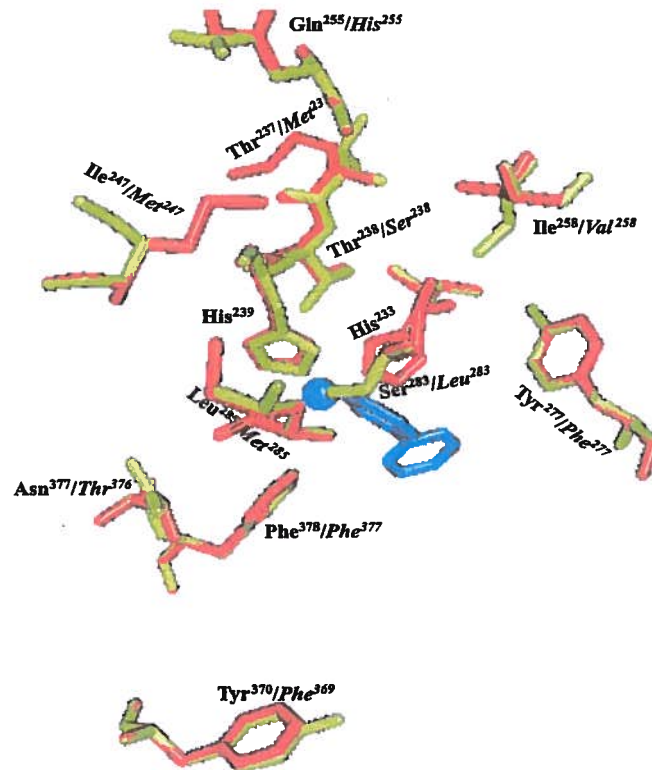


**Figure 34.** Analyse par GC-MS des métabolites couplés au butylboronate issus de l'attaque 2,2'-CB par des préparations purifiées de BphAE de S100 et de B356 en présence de BphFG de LB400

### 3.3.5.2 Mutagenèse dirigée sur des résidus choisis de *BphA<sub>S100</sub>*

L'alignement des séquences présentées à la Figure 23 met en évidence le fait que les résidus E<sup>179</sup>, M<sup>237</sup>S<sup>238</sup> et F<sup>277</sup> sont identiques chez les variants S100, S149 et S151 ainsi que chez BphA<sub>B356</sub>. Cependant, ils diffèrent des résidus correspondants chez BphA<sub>LB400</sub> et BphA<sub>II-9</sub>. Le résidu en position 283 chez BphA<sub>LB400</sub> est un acide aminé polaire (sérine) alors que la position correspondante est occupée par un acide aminé non polaire (méthionine, leucine ou isoleucine) chez les variants S100, S149 S151 et chez B356. L'analyse du modèle tridimensionnel du variant S100 révèle qu'aucun de ces résidus n'est situé à moins de 4 Å du centre catalytique (Figure 35). Cependant, M<sup>237</sup>S<sup>238</sup> font partie d'un court segment dont les extrémités (H<sup>233</sup> et H<sup>239</sup>) coordonnent le Fe<sup>2+</sup>. De plus, selon les observations faites à partir de la structure de RHA1 (Furusawa et al., 2004 : 1041), la position du résidu 283 est modifiée de façon significative lors de la

liaison au substrat. Deux autres résidus ont retenu notre intérêt. Le résidu Tyr<sup>370</sup> de LB400 est remplacé par une phénylalanine chez S100 et chez B356 tandis que le résidu Asn<sup>377</sup> présent chez BphA<sub>LB400</sub> est remplacé par une thréonine chez BphA<sub>S100</sub> et BphA<sub>B356</sub>.

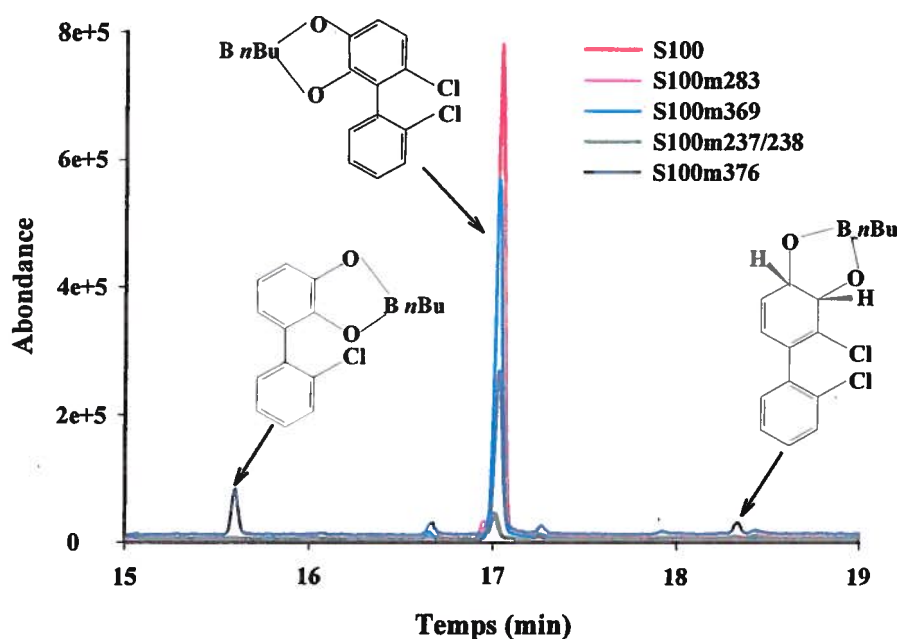


**Figure 35.** Superposition des centres catalytiques des BphA de LB400 (vert) et de S100 (rouge) montrant certains résidus ciblés à partir de la comparaison des séquences primaires. Les structures ont été modélisées à l'aide du programme 3D-JIGSAW en se servant de la structure de référence BphA<sub>ERHA1</sub> (Furusawa et al., 2004 : 1041). La superposition des structures a été effectuée à l'aide du logiciel Pymol.

Certains de ces résidus ont été modifiés par mutagenèse dirigée afin de vérifier leurs effets sur l'activité de S100. Des mutants ont été développés au niveau des résidus 237 (Thr→Met)/238 (Thr→Ser), 283 (Leu→Ser), 369 (Phe→Tyr) et 376 (Thr→Asn).

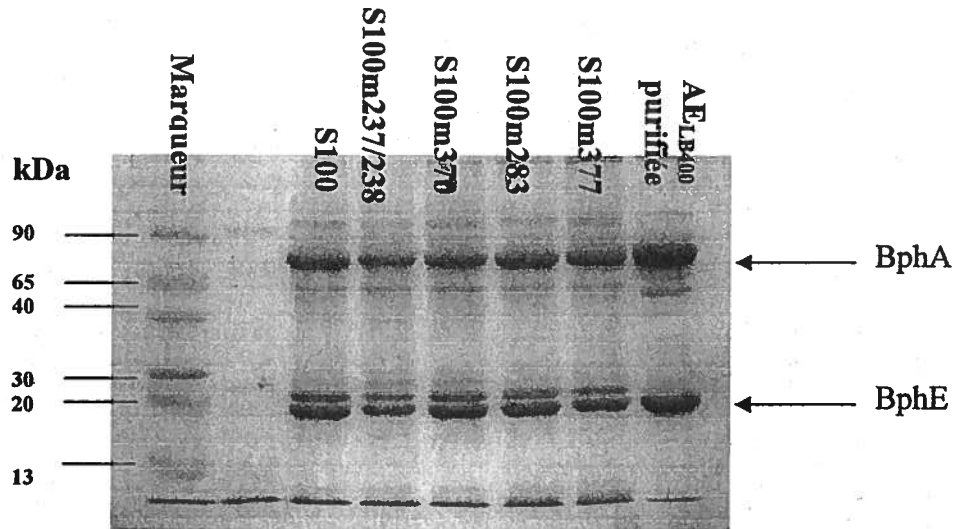


Les mutants obtenus ont été examinés pour évaluer leur régiospécificité envers le 2,2'-CB. Les essais ont été effectués avec des cellules *E. coli* DH11S produisant l'une ou l'autre des enzymes mutantes et les métabolites produits ont été analysés par GC-MS en comparant les spectres obtenus avec ceux produits lorsque des cellules de *E. coli* DH11S produisant BphAE<sub>S100</sub> catalysait la même réaction (Figure 36). Cette analyse montre que le remplacement de la Thr<sup>376</sup> de BphA<sub>S100</sub> par une asparagine se traduit par une modification significative de la régiospécificité de l'enzyme envers le 2,2'-CB. Bien que le mutant S100m376 produit principalement du 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-CB, des quantités non négligeables de 2,3-dihydroxy-2'-CB ainsi que de 3,4-dihydro-3,4-dihydroxy-2,2'-CB peuvent être détectées (Figure 36).



**Figure 36.** Analyse par GC-MS des métabolites couplés au butylboronate issus de l'attaque 2,2'-CB par des cellules de *E. coli* DH11S produisant BphFG<sub>LB400</sub> et BphAE de S100, S100m237/238, S100m283, S100m369 ou S100m376.

Dans le cas du mutant S100m283, les résultats présentés à la Figure 36 montrent que cette mutation n'a pas affecté la régiospécificité de l'enzyme envers le 2,2'-CB, mais son efficacité envers le substrat. Une analyse d'un gel SDS-PAGE des extraits cellulaires utilisés pour faire l'essai a montré que cette modification de l'activité n'était pas causée par une différence dans l'expression protéinique (Figure 37). L'analyse des métabolites du mutant S100m237/238 indique que de façon semblable à la mutation du résidu 283, ces mutations causent une baisse d'activité envers le 2,2'-CB sans toutefois modifier la régiospécificité envers ce substrat. Enfin, la mutation du résidu 370, un résidu est très loin du centre catalytique, n'affecte pas significativement le comportement de S100.



**Figure 37.** Gel de retardement en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) d'extraits cellulaires provenant des souches *E. coli* DH11S [pDB31**bphFG**<sub>LB400</sub>] exprimant BphAE de LB400, de S100 ou des mutants S100m237/238, S100m370, S100m283 et S100m377. Le marqueur de poids moléculaire ainsi que la BphAE purifiée du variant *p4* permettent l'identification des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la BPDO.

### 3.4 Discussion

Les approches existantes ont permis d'obtenir plusieurs variants plus performants que les enzymes sauvages (Barriault, Plante et Sylvestre, 2002 : 3794; Brühlmann et Chen, 1999 : 544; Maeda et al., 2001 : 29833 ; Suenaga et al., 2001 : 5441 ; Mohammadi et Sylvestre, 2005 : 835 ; Kumamaru et al., 1998 : 663 ; Mondello et al., 1997 : 3096). Certaines de ces approches utilisent l'ingénierie par mutagénèse de résidus ou de fragments de gènes ciblés. D'autres exploitent une approche plus aléatoire en utilisant des stratégies de *shuffling* ciblant des gènes homologues présents chez des souches cultivables. Le point commun de ces techniques est qu'elles ne mettent à profit que la diversité des gènes *bphA* présente au niveau des isolats de laboratoire.

Un des objectifs de ces travaux était de développer une méthode d'évolution moléculaire mettant à profit la diversité des capacités catalytiques envers les BPC présents dans les sols. Les résultats obtenus au Chapitre 1 démontrent qu'il était possible d'inclure dans une stratégie de *shuffling* des séquences appartenant à des groupes peu ou non représentés chez les gènes des isolats de laboratoire en partant de fragments directement amplifiés des sols à l'aide de réactions PCR utilisant des amorces dégénérées. Une méthode de *family shuffling* a donc été mise au point en utilisant ces fragments d'ADN directement amplifiés du sol. La variabilité accrue de la progéniture recombinante permet ainsi de multiplier les chances d'obtenir des variants présentant de nouvelles capacités catalytiques.

Il était cependant important de tenir compte de deux facteurs. Plus la diversité des fragments parentaux augmente, plus le pourcentage de variants inactifs issus du *family shuffling* est élevé. Il a aussi été démontré que plus les segments couverts par le *shuffling* sont importants, plus le pourcentage de variants inactifs est grand (Voigt, Kauffman et Wang, 2001 : 79). Des expériences précédentes ont révélé que lorsque la portion contenant le centre Rieske de la dioxygénase est incluse dans le *shuffling*, moins de 1% des variants sont actifs envers le biphényle (Barriault, Plante et Sylvestre, 2002 : 3794). Le centre Rieske étant extrêmement sensible à toute modification dans la séquence en acides

aminés, la méthode développée dans le présent travail ciblait donc la partie C-terminale du gène *bphA* à l'intérieur de laquelle sont retrouvées des régions identifiées comme particulièrement importantes au niveau de la spécificité de l'enzyme (Mondello et al., 1997 : 3096).

La stratégie de *family shuffling* reposait d'abord sur l'amplification efficace par PCR de la diversité des fragments C-terminaux du gène *bphA* naturellement présente dans les sols. Des amorces dégénérées ont été développées (Chapitre 1) afin d'amplifier la plus grande variété possible de fragments C-terminaux. Le mélange de fragments obtenu était combiné à des fragments du gène *bphA*<sub>B356</sub> entourant le site MluI et des fragments ciblant la partie du gène *bphA*<sub>LB400</sub> entourant la région AvrII. Ces deux portions du fragment C-terminal servaient à reconstituer les sites de restriction MluI et AvrII afin de faciliter le remplacement de ce segment du gène *bphA* par la banque de fragments hybrides chez *bphAE*<sub>LB400</sub>. Ces fragments MluI et AvrII ne se rejoignaient pas afin de s'assurer qu'aucun hybride de la progéniture ne soit produit par une recombinaison simple entre B356 et LB400.

Les variants ont été sélectionnés selon plus d'une stratégie. La première approche de criblage consistait à coupler la réaction de la BPDO à la réaction catalysée par BphC en absence de BphB. Le 2,2'-CB étant l'un des congénères les plus résistants à l'attaque par les dioxygénases d'origine naturelle, seuls les variants aptes à reproduire le processus de déshalogénéation oxygénolytique présent chez LB400 pouvaient produire le chloroHOPDA de couleur jaune intense (Haddock, Horton et Gibson, 1995 : 20; Barriault et al., 2004 : 47489). Le 2,2'-CB a été choisi au départ comme substrat, car bien qu'il soit plus difficilement dégradé par certaines souches, il était toutefois possible d'avoir un contrôle positif en utilisant LB400. Cette stratégie permettait de mettre en évidence des capacités de dégradation particulières tout en validant l'essai. Il était plus probable d'obtenir des variants ayant de nouvelles capacités en comparant avec une souche active connue plutôt que de cibler des propriétés qu'aucun des parents ne possèdent.

Lors de ces essais, le taux de variants actifs envers le 2,2'-CB fut d'environ 0,6%, un taux relativement faible. De plus, aucun des 76 variants sélectionnés n'a démontré de capacités catalytiques accrues ou nouvelles par rapports à la souche LB400, au variant *p4* développé par mutagenèse aléatoire (Barriault et Sylvestre, 2004 : 47480) ou au variant II-9 développé par *family shuffling* (Barriault, Plante et Sylvestre, 2002 : 3794). La capacité de médier l'*ortho*-déchlorination est une caractéristique peu répandue chez les dioxygénases du biphenyle. Tel que décrit dans le Chapitre 1, les fragments isolés des sols et dont la séquence a été analysée possédaient des régions de spécificité plus près des souches KF707 et B356 que de LB400, ce qui pourrait signifier que les capacités de dégradation des sols sont différentes de la souche LB400. Il est probable dans ce contexte que le processus de criblage ciblant une caractéristique spécifique à LB400 ait été inefficace à évaluer la diversité des échantillons utilisés dans le présent travail et à cibler les capacités de dégradation nouvelles présentes dans les sols.

Une seconde stratégie de criblage en deux volets a donc été développée afin de permettre une sélection plus large des capacités de dégradation. Une partie des *bphAE* recombinantes obtenues par *shuffling* étaient sélectionnées par complémentation avec *bphFGBC<sub>LB400</sub>*, soit sur le 4-CB, soit sur le 2,2'-CB (Furukawa et Miyazaki, 1986 : 392; Kumamaru et al., 1998 : 663). Les variants présentant une coloration jaune étaient repiqués. Plusieurs études démontrent cependant que BphC est beaucoup plus spécifique que BphB (Barriault et al., 1998 : 4637.; Barriault et al., 1999 : 181; Eltis et al., 1993 : 2727; Mohammadi et Sylvestre, 2005 : 839). Barriault, Plante et Sylvestre (2002 : 3794) ont décrit une méthode de criblage qui permet de repérer des variants produisant des métabolites que BphC est incapable d'oxyder et d'accéder à un plus grand éventail d'enzymes actives. Cette stratégie de criblage est basée sur la polymérisation des catéchols issus de la réaction par BphB. Elle entraîne la formation d'une coloration brune autour des colonies positives et l'intensité de la coloration diffère en fonction de l'activité de la BPDO variante. Le processus de polymérisation des catéchols est mal connu, mais il est possible que l'oxydation résulte de la présence dans les cellules *E. coli* DH11S d'ions métalliques ou d'enzymes capables de catalyser cette réaction. L'intensité de la coloration peut varier en fonction de certains facteurs dont la stabilité et la solubilité de l'enzyme à

l'intérieur de la cellule. Cette méthode permet d'évaluer de façon grossière les variations d'activité des mutations qui affectent la spécificité de l'enzyme. La seconde moitié des *bphAE* recombinantes obtenues a donc été sélectionnée par complémentation avec *bphFGB<sub>LB400</sub>*, soit sur le 4-CB, soit sur le 2,2'-CB.

Près d'une dizaine de variants ont été sélectionnés pour leur capacité de métaboliser en indigo le tryptophane présent dans le milieu (Ferraro, Gakhar et Ramaswamy, 2005 : 175). Cette capacité est caractéristique de diverses dioxygénases, en particulier les dioxygénases monoaromatiques du benzène et du toluène, mais demeure absente chez la plupart des dioxygénases du biphenyle (Tan et Cheong, 1994 : 912). Il a été démontré au Chapitre 1 que l'utilisation de conditions moins restrictives de PCR permettait d'amplifier des dioxygénases autres que celles du biphenyle, notamment des dioxygénases associées au sous-groupe toluène/benzène de la famille toluène/biphenyle des dioxygénases (voir Figure 19 Chapitre 1). Il est donc probable que ces variants aient acquis des capacités catalytiques provenant des fragments issus de ces dioxygénases.

Après l'analyse des profils de dégradation sur un mélange synthétique de 18 congénères BPC et de la séquence primaire en acides aminés, les variants S100, S149 et S151 ont été retenus. L'analyse phylogénique de ces variants confirme que la stratégie de *family shuffling* proposée a effectivement permis d'incorporer des caractéristiques propres aux dioxygénases des sols. Les variants S100 et S149 se retrouvent sur une branche située entre la nouvelle constituée de l'isolat YT-01 et des fragments G9-26, G9-28, G11-42 et G11-43 (voir Chapitre 1), et la sous-branche du groupe I des protéobactéries regroupant les fragments NC-2, NC-3, G8-2 et G7-5b. Les résultats obtenus sur le mélange de BPC n'étant pas probants, une analyse plus précise des capacités catalytiques des variants a été réalisée en examinant par GC-MS les métabolites provenant de l'attaque de congénères individuels.

L'activité relative à LB400 des variants S100, S149 et S151 envers les congénères *ortho*-chlorés démontre qu'aucun des variants n'a acquis de potentiel catabolique accru envers ce type de congénères. L'activité spécifique des variants sur le 2,2'-CB est pratiquement identique chez les variants et chez LB400. De plus, le variant S100 a perdu

la capacité d'attaquer en position *meta-para* la plupart des cycles *ortho*-chlorés tel que le démontre les résultats obtenus sur le 2,2',5,5'-CB et le 2,4',5-CB. Cependant, S100 et S151 ont acquis un potentiel catabolique particulièrement élevé envers le 2,6-CB qui n'est pas métabolisé par LB400, et S100 a conservé une capacité d'attaque en position 3,4 pour ce congénère particulier. Ce résultat est intéressant car le 2,6-CB, un congénère particulièrement persistant, est un métabolite majeur du processus de déshalogénéation réductrice présent dans les sédiments (Maltseva et al., 1999 : 363). Les résultats obtenus envers les congénères *meta* et *para*-substitués démontrent que les variants S100, S149 et S151 ont un potentiel catabolique similaire à LB400 envers ce type de congénère.

Un des objectifs du *family shuffling* sur le segment C-terminal de BphA était de développer des variants ayant un potentiel catabolique supérieur au parent LB400 ou aux variants *p4* et II-9 développés antérieurement (Barriault, Plante et Sylvestre, 2002 : 3794; Barriault et Sylvestre, 2004 : 47480). Aucun des variants obtenus ne présente un potentiel catabolique nettement supérieur. Cependant, les variants S100 et S151 possèdent une activité spécifique de deux à trois fois plus élevée que LB400 envers le biphényle.

Les particularités des variants S100, S149 et S151 se retrouvent dans la régiospécificité des enzymes. Principalement, les variants S100, S149 et S151 ont acquis la capacité d'attaquer le 2,2'-CB différemment de la souche LB400. L'analyse du métabolite obtenu démontre clairement qu'il s'agit d'un dihydrodiol qui n'est pas présent chez LB400. L'analyse spectrale du métabolite démontre des pics d'absorption caractéristiques à 262 nm ainsi qu'autour de 200 nm qui sont caractéristiques des diols et des composés aromatiques respectivement (Gibson et al., 1968 : 3795). L'analyse par résonance magnétique confirme qu'il s'agit bien du 5,6-dihydrodiol. Haddock et al. (Haddock et Gibson, 1995 : 5834) et Suenaga et al. (Suenaga, Goto et Furukawa, 2001 : 22500) ont déjà proposé, sans le démontrer, que les souches LB400 et KF707 pourraient avoir une activité en position 5,6. Il a été révélé ultérieurement qu'en réalité il s'agit d'une activité en position 3,4 chez LB400 (Barriault et al., 2004 : 47489). La nature du métabolite produit par KF707 n'a été déduite qu'à partir de son temps de rétention différent des ceux des métabolites produits par LB400 (Suenaga et al., 2002 : 3682). De plus, KF707 attaque avec difficulté les congénères *ortho*-chlorés.

Le variant S100 attaque le 2,2'-CB de façon aussi efficace que LB400 mais presque exclusivement en position 5,6 et a perdu la capacité de médier une attaque en position 3,4 sur ce congénère. Les variants S149 et S151 attaquent principalement en position 2,3 puis 3,4 comme c'est le cas pour la souche parentale LB400 mais ont aussi acquis la capacité d'attaquer en position 5,6. L'incapacité de S100 à médier une attaque en position 3,4 tel que démontré par l'absence d'activité envers le 2,2',5,5'-CB s'observe aussi dans la régiospécificité envers d'autres congénères. Le variant S100 s'attaque principalement au cycle non-chloré du 2,6-CB alors que les variants S149 et S151 attaquent en position 3,4 du cycle chloré. Le même phénomène est observé avec le 2,4',5-CB. S100 s'attaque exclusivement au cycle substitué en position *para* contrairement à LB400, S149 et S151 qui attaquent en position 3,4 à plus de 90%. L'absence chez S100 de cette capacité pourrait sembler un désavantage. Cependant, les dihydroxybiphényles substitués en position 3 et 4 sont de puissants inhibiteurs pour la BphC (Dai et al., 2002 : 934). De plus, la capacité de S100 à médier l'attaque en position 5,6 du 2,2',3,3'-CB évite de produire une 4,5-dihydrodiol comme chez LB400 et qui ne peut être transformé plus avant (Barriault et Sylvestre, 2004 : 47480). Dans l'optique d'un processus de minéralisation du congénère BPC, il faut tenir compte des capacités catalytiques des enzymes subséquentes de la voie de dégradation envers le nouveau métabolite produit, car il est fréquent que des produits obtenus par des processus de co-metabolisme ne puissent être dégradés plus subséquentement (Altenschmidt et al., 1993 : 4851; Eaton et Chapman, 1992 : 7542). Les résultats démontrent que ce n'est pas le cas pour le 5,6-dihydrodiol qui est transformé autant par BphB que par BphC.

L'ingénierie de la BphA permet de mieux comprendre le fonctionnement de l'enzyme en faisant apparaître ou disparaître des capacités catalytiques qui, lorsqu'elles sont reliées à des variations de séquences, peuvent mettre à jour des résidus ou des portions de gènes responsables d'un phénotype donné. L'analyse des métabolites produits par l'attaque du 2,2'-CB par B356 démontre que cette souche possède, tout comme les variants, la capacité de médier une attaque en position 5,6. Cependant, la souche LB400 et le variant II-9 provenant du *shuffling* entre les souches LB400, B356 et P6 (Barriault, Plante et Sylvestre, 2002 : 3794) demeurent incapables d'une attaque en position 5,6.



La région III a été identifiée comme étant importante pour influencer le Kcat de l'enzyme envers les congénères *ortho*-chlorés (Barriault, Plante et Sylvestre, 2002 : 3794; Barriault et Sylvestre, 2004 : 47480; 188; Mondello et al., 1997 : 3096; Suenaga et al., 2002 : 3682). Les variants S149 et S151 diffèrent par respectivement 2 et 1 acides aminés de la séquence de LB400 dans la région III : Thr<sup>337</sup> et Thr<sup>340</sup> sont remplacés par Asn<sup>337</sup> et Ile<sup>340</sup> chez S149 et chez S151, le Gly<sup>334</sup> est remplacé par un Ala<sup>334</sup>. Toutefois, il est peu probable que la séquence en acides aminés de cette région soit responsable de l'apparition des capacités d'attaque en position 5,6. Le variant II-9 est un variant quasi identique à LB400 sauf pour la région III qui correspond à celle de P6 et de B356 (Barriault, Plante et Sylvestre, 2002 : 3794). Ce variant possède exactement la même séquence que S100 au niveau de la région III mais n'a pas la capacité d'attaquer en position 5,6 (résultats non présentés). La substitution par mutagenèse dirigée de Thr<sup>335</sup> par une alanine entre les souches S151 et S149 ne semble pas affecter la spécificité de substrat, tel qu'observé précédemment par Barriault et Sylvestre (2004 : 47480). Ces résultats démontrent que les acides aminés de la région III ne sont pas les seuls à influencer la régiospécificité envers les congénères *ortho*-chlorés et suggèrent que d'autres résidus présents dans BphAE<sub>B356</sub> mais absents dans BphAE de LB400 et de II-9 contribuent à conférer une régiospécificité favorisant l'attaque des carbones 5 et 6 des composés *ortho*-chlorés.

Les travaux réalisés par Barriault, Plante et Sylvestre (2002 : 3794) ont mis en évidence le résidu 267 (position chez LB400) comme pouvant être responsable de la spécificité plus ou moins élargie de BphA : une sérine à cette position résulte en un spectre de substrat plus étroit que lorsque cette position est occupée par une asparagine. Chez les variants S100, S149 et S151, cette position est occupée par une asparagine, et, en accord avec les résultats précédents, leur spectre de substrats est plus large que celui de la souche B356.

La Figure 38 montre l'alignement des séquences de BphA<sub>LB400</sub> avec les séquences de BphA de B356 et des variants S100, S149, S151 et II-9. Les résidus en rouge, 179, 237-238 et 277, sont communs à BphA de B356, S100, S149 et S100. Quelques autres résidus indiqués en bleu sur la Figure (370, 377, 398 et 402) sont communs aux BphA de

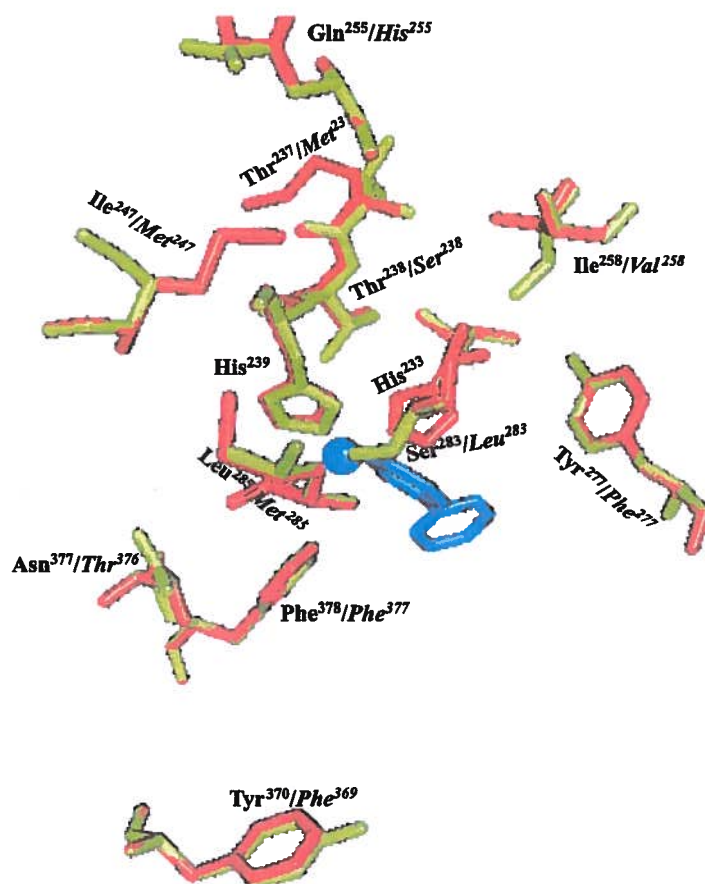
B356 et S100 qui sont les deux seules enzymes effectuant exclusivement une oxygénation du 2,2'-CB en position 5 et 6. Enfin, les résidus en vert (247, 255, 258, 283 et 285) sont communs aux trois variants S100, S149 et S151. Des essais de mutagenèse dirigée sur certains de ces résidus ont été effectués pour tenter d'identifier les résidus responsables de l'apparition de la capacité d'attaque en position 5,6 chez les variants S100, S149 et S151.

		282	281	280	279	278	277	274	268	267	261	260	259	258	256	255	254	247	243	238	237	211	208	206	202	196	191	188	184	179	178	172	166		
<b>LB400</b>		A	V	V	Q	E	G	R	V	P	V	I	M	T	T	I	I	S	Q	A	I	P	T	K	A	A	S	Y	V	D	E	P	G		
<b>S149</b>		E	P	E	K	S	M			E	E		I	M	S	M		H		V		S		S		E									
<b>S100</b>		I	A	E				I		E	V		M	S	M		H		V		S		S		E										
<b>S151</b>		I	A	E				I					M	S	M		H		V				S		E										
<b>II-9</b>																																			
<b>B356</b>		E	P	E	K	S	M			E	E		I	M	S	V	L	T					I	L	S	K	N	S	A	F	I	N	D	S	S
<hr/>																																			
		377	373	372	370	365	364	356	350	341	338	336	335	326	320	318	317	316	314	313	312	311	310	309	307	306	304	298	292	288	286	285	283		
<b>LB400</b>		S	L	A	M	V	E	L	E	Q	L	G	H	T	G	M	V	R	R	V	I	T	F	N	I	I	T	A	E	Y	R	H	N		
<b>S149</b>		L	M		I		Q	E							-				L	C	F	V	G	I											
<b>S100</b>		L	M		I		Q	E							-				L	R	F	V	G	I	T	T					F		T		
<b>S151</b>		M	M																			A	I	T	T										
<b>II-9</b>																							G	I	T	T									
<b>B356</b>		I		S	V	I	Q	K	A	R	-	-	V	P	Q	L	I	L	D	F	V	G	I	T	T	V	V	E	D	F	L	Q	T		
<hr/>																																			
		455	446	430	429	428	425	424	422	421	420	419	418	417	416	412	410	408	407	402	399	398	397	379											
<b>LB400</b>		S	K	G	L	Y	Q	P	N	Q	G	R	S	Q	F	G	H	D	F	N	V	G	M		A										
<b>S149</b>																																			
<b>S100</b>			V		H	R																													
<b>S151</b>																																			
<b>II-9</b>																																			
<b>B356</b>		N	R	V	M	H	T	S	C	K	N	V	P	N	K	N	N	A	Y	K	T	A	S		D										

**Figure 38.** Séquences primaires en acides aminés de la partie C-terminale de BphA des souches LB400, B356 et des variants S100, S149, S151 et II-9. Seules les positions qui diffèrent pour au moins un des variants sont indiquées. En rouge, les résidus identiques pour BphA de B356 et des variants S100, S149 et S151; en vert, les résidus identiques pour les variants S100, S149 et S151; en bleu, les résidus identiques pour S100 et B356

Bien que selon un modèle basé sur la structure de BphAE<sub>RHAI</sub> le résidu Thr<sup>376</sup> de BphA<sub>S100</sub> soit localisé à 8.2 Å du substrat, plusieurs études ont démontré l'importance du résidu correspondant, Asn<sup>377</sup> (région IV) de BphA<sub>LB400</sub>, sur les propriétés catalytiques de l'enzyme, en particulier sur la régiospécificité (Barriault et Sylvestre, 2004 : 47480). L'influence de ce résidu sur les propriétés catalytiques de BphAE<sub>S100</sub> méritait donc aussi d'être examinée. Les résultats obtenus avec le mutant Thr<sup>376</sup> → Asn chez S100 démontrent qu'effectivement ce résidu est responsable de la disparition de l'activité en position 3,4 chez ce variant. Les modèles tridimensionnels de S100 et de LB400 (rappel Figure 35 ci-après) permettent de constater que la Thr<sup>376</sup> de S100 n'est pas située directement dans la paroi du site catalytique mais jouxte plutôt le résidu 377 qui est situé à 3,9 Å du substrat. Le logiciel 3D-JIGSAW utilisé pour réaliser la modélisation n'était cependant pas assez précis pour visualiser l'effet de la mutation.

Les résidus Met<sup>237</sup>Ser<sup>238</sup> (région I) font partie d'un court segment d'acides aminés terminé de part et d'autre par les deux histidines His<sup>233</sup> et His<sup>239</sup> qui coordonnent le Fe<sup>2+</sup>. Ces résidus pourraient donc influencer de façon indirecte la réaction enzyme-substrat en affectant la configuration du Fe<sup>2+</sup>. Notre modèle (Figure 13) positionnait la Leu<sup>283</sup> de S100 à plus de 6.8 Å du substrat. Le résidu correspondant chez BphA<sub>RHAI</sub> (Furusawa et al., 2004 : 1041) se déplace de façon significative au cours du processus de liaison du substrat au site catalytique de l'enzyme. De plus, le résidu correspondant sur la structure tridimensionnelle de la dioxygénase du cumène de *Pseudomonas fluorescens* IP01 fait partie intégrante du centre catalytique (Aoki, 2001 : 2). Enfin, l'analyse de la structure tridimensionnelle des cristaux de BphAE<sub>B356</sub> révèle que le résidu Ile<sup>283</sup> est à 6.3 Å du centre catalytique chez l'enzyme native, mais qu'il se déplace de 2 Å pour se rapprocher à 4.4 Å du substrat après liaison avec le biphenyle (Gomez-Gil et al., 2007 : 5705) suggérant que notre modèle ne tient pas compte d'un déplacement allostérique possible au cours de la liaison avec le substrat.



**Figure 35 (rappel).** Superposition des centres catalytiques des BphA de LB400 (vert) et de S100 (rouge) montrant certains résidus ciblés à partir de la comparaison des séquences primaires. Les structures ont été modélisées à l'aide du programme 3D-JIGSAW en se servant de la structure de référence BphAE<sub>RHA1</sub> (Furusawa et al., 2004 : 1041). La superposition des structures a été effectuée à l'aide du logiciel Pymol.

Le remplacement chez S100 du segment Met<sup>237</sup>Ser<sup>238</sup> par la séquence Thr<sup>237</sup>Thr<sup>238</sup> présente chez LB400, et du résidu Leu<sup>283</sup> par une sérine ne modifie pas la régiospécificité de l'enzyme. Toutefois l'activité des mutants envers le 2,2'-CB est moindre que celle de S100, particulièrement en ce qui concerne le mutant Leu<sup>283</sup> → Ser. Ces résidus influenceraient donc la distance entre les divers réactifs impliqués plutôt que l'orientation du substrat. La mutation chez S100 des résidus correspondant aux positions 277, 370 et

398 de LB400 ne modifie pas la régiospécificité et l'activité du variant (résultats non présentés). Pour le moment, il a été impossible de déterminer exactement quels résidus en dehors des régions III et IV sont responsables de l'orientation différente du substrat au niveau du site catalytique du variant S100.

Les variants S100 et S151 ont acquis la capacité d'attaquer le benzène et le toluène, des composés aromatiques monocycliques difficilement dégradés par la souche parentale LB400. Suenaga et al. ont obtenu des variants capables d'attaquer le toluène et le benzène en effectuant des essais de *shuffling* entre les gènes *bphA* des souches LB400 et KF707 (Suenaga et al., 2002 : 3682). Dans leur cas, il semble que l'apparition de ces capacités de dégradation résulte de l'introduction dans la séquence de KF707 de la séquence Q<sup>255</sup>I<sup>258</sup>A<sup>268</sup>Y<sup>277</sup>. L'effet individuel de chacun des résidus est nul et il faut la combinaison des quatre pour que KF707 puisse métaboliser les composés monoaromatiques. Chez les variants S100 et S151, ces résidus correspondent à ceux de KF707 (H<sup>255</sup>V<sup>258</sup>Q<sup>268</sup>F<sup>277</sup>), sauf pour la Glu<sup>268</sup> qui est remplacée par une sérine chez LB400. Suenaga, Goto et Furukawa (2001 : 22500) ont démontré à l'aide de leur modèle tridimensionnel que le remplacement de la Glu<sup>268</sup> par une sérine provoque un léger agrandissement au niveau du site catalytique. Il est difficile de tirer des conclusions sur les résidus responsables de l'apparition des capacités catalytiques envers les composés monoaromatiques. Il est probable que les modifications de phénotype soient dues à un ensemble de changement au niveau de la séquence plutôt qu'à quelques mutations isolées.

La comparaison des séquences de S100 et de S151 avec la séquence de la dioxygénase du toluène (TodC1) et du benzène (BnzA) (Chapitre 1 Tableau 8) permet de voir que plusieurs résidus correspondant à ceux des dioxygénases du toluène et du benzène et absents chez LB400 ont été introduits dans la séquence de S100, S149 et S151 au cours du processus de *shuffling*. En comparant les séquences du Tableau 8 avec les séquences des variants (Figure 38), et contrairement aux résultats obtenus par Suenaga et al. (2001 : 5441), il semble que les résidus Asn<sup>338</sup> et Ile<sup>341</sup> (notation LB400) aient un rôle à jouer. Ce sont les seuls résidus absents chez S149 mais présents à la fois chez S100 et S151. Le variant II-9 a lui aussi acquis des capacités de dégradation envers le benzène

et le toluène (Barriault, Plante et Sylvestre, 2002 : 3794). Il possède une région III similaire à celle de S100, le reste de la séquence étant semblable à celle de LB400. Il apparaît donc évident que les résidus Asn<sup>338</sup> et Ile<sup>341</sup> sont directement impliqués dans la capacité de BphA à catalyser les composés monocycliques aromatiques.

Les résultats obtenus démontrent que le processus d'évolution de la dioxygénase visant à augmenter le potentiel catabolique de l'enzyme est un processus complexe qui doit s'intéresser autant aux résidus du site catalytique qu'à des résidus situés à l'extérieur et dont il est impossible de définir le rôle par les modèles tridimensionnels. Ces résidus peuvent modifier la structure générale de l'enzyme et, simultanément, la structure des composantes catalytiques, ou encore pourraient être impliqués dans les changements de conformation de l'enzyme lorsqu'elle se lie au substrat.

## Conclusion

L'étude et l'évolution de la dioxygénase du biphenyle (BPDO) sont particulièrement intéressantes dans l'optique de la biotransformation de polluants et pour le développement de biotechnologies destinées à l'industrie chimique. La BPDO est une enzyme catalysant des réactions énantiosélectives qui possède un spectre de substrat élargi. Ce complexe multi-protéique présent chez diverses souches de bactéries ainsi que chez certains types de champignons a été largement étudié chez les isolats de laboratoire depuis les années 1980.

La première partie de ce travail s'intéressait à la diversité présente dans les sols des structures en acides aminés de la région C-terminale de BphA, une sous-unité catalytique de l'enzyme ayant un rôle essentiel au niveau de la spécificité de la BPDO. Une meilleure compréhension de la façon dont la BphA évolue permet de mieux cibler les déterminants de l'enzyme et d'optimiser les processus d'évolution moléculaire. L'analyse des séquences des produits PCR amplifiés à partir de diverses souches de bactéries non caractérisées ou de la microflore de sols contaminés révèle la présence d'une nouvelle branche phylogénique qui démontre que la diversité présente dans les sols est plus importante que ne le laisse supposer l'analyse des séquences des isolats connus. Cependant, cette diversité ne se reflète pas au niveau des régions identifiées comme étant importantes pour la spécificité de l'enzyme. Leurs patrons en acides aminés sont similaires à la séquence de la souche KF707 d'une famille phylogénique à l'autre.

La seconde partie de ce projet visait à élargir le spectre d'action de la BPDO en lui permettant d'acquérir et d'intégrer des caractéristiques catalytiques de plusieurs types de BphA issues de l'environnement. Pour ce faire, elle développait une stratégie de *family shuffling* s'effectuant sur la partie C-terminale de gènes *bphA* amplifiés à partir d'ADN extrait de sols contaminés par les BPC. Un des objectifs du *family shuffling* sur le segment C-terminal de BphA était de développer des variants ayant un potentiel catabolique accru par rapport au parent LB400 ou aux variants développés antérieurement. Aucun des variants obtenus ne présente un potentiel nettement supérieur.



Cependant, les variants S100, S149 et S151 possèdent une régiospécificité différente envers les congénères *ortho-chlorés*, en particulier au niveau du 2,2'-CB qu'il attaque en position 5,6. Le variant S100 ne possède plus que cet angle d'attaque pour 2,2'-CB. Pour le moment, il a été impossible de déterminer exactement quels résidus en dehors des régions III et IV sont responsables de l'orientation différente du substrat au niveau du site catalytique du variant S100. La modification des résidus 237, 238 et 283 diminue cependant l'efficacité de l'enzyme à attaquer en position 5,6. Ces résidus influenceraient la distance entre les divers réactifs impliqués plutôt que l'orientation du substrat.

Le présent travail se basait sur l'hypothèse que la diversité de la partie C-terminale de BphA est plus importante au niveau des sols que ne le laissait entendre l'analyse des séquences de souches isolées en laboratoire. De plus, il proposait qu'une stratégie de *family shuffling* permettrait de mettre à profit cette diversité afin de faire évoluer la BPDO. Les résultats obtenus démontrent qu'effectivement il est possible par *family shuffling* d'intégrer dans le processus d'évolution ciblée de la BPDO la diversité unique présente dans les sols. Cependant, ils indiquent aussi que l'augmentation du potentiel catabolique de la dioxygénase est un processus complexe qui doit s'intéresser autant aux résidus présents au niveau du site catalytique qu'aux résidus situés à l'extérieur et dont il est impossible de définir le rôle par les modèles tridimensionnels.

Étant difficile au Canada d'obtenir des échantillons de sols contaminés, le début de cette recherche a été réalisé sur des échantillons de sols prélevés en 1985 et conservés depuis à basse température à l'intérieur de contenants hermétiques. Bien qu'il ait été possible d'amplifier par PCR des fragments de gènes *bphA*, ce qui dénote un ADN ayant conservé une certaine qualité, il est probable que l'efficacité d'amplification sur ces sols et de ce fait la diversité qui peut en être récupérée, sont plus faibles que sur des échantillons de sols récents et contenant une rizosphère. En effet, le système racinaire des plantes permet d'extraire les polluants du sol et les rends ainsi biodisponibles aux microorganismes présents (Pilon-Smits, 2005 : 15). De plus, les racines produisent des composés chimiques qui favorisent la croissance et le métabolisme des organismes présents au niveau de la rizosphère (Singer, Crowley et Thompson, 2003 : 123).

Des échantillons frais contenant de la rizhosphère ont été prélevés ultérieurement au cours de ces travaux sur un site fortement contaminé situé dans la région de Netolice en République Tchèque. Toutefois, ces prélèvements sont survenus trop tard pour permettre d'intégrer des résultats concluants à la présente thèse. L'application de la stratégie de *family shuffling* développée dans ce travail sur ces sols frais permettra d'obtenir un plus grand nombre de variants actifs et de multiplier les chances de produire des phénotypes particuliers en augmentant la diversité des fragments parentaux.

Il sera aussi intéressant, pour les mêmes raisons, d'étudier la diversité présente dans ces échantillons récents, non pas seulement sur la portion C-terminale de *bphA*, mais sur une portion plus grande du gène et même de l'opéron. Cela pourrait permettre de cibler des régions génomiques autres que celles déjà identifiées comme étant responsables de la variation de spécificité entre certaines souches connues afin de mener plus loin le processus évolutif de l'enzyme.

Les potentiels cataboliques présents chez les microorganismes ne pouvant être isolés en laboratoire, pourraient être mis à profit pour développer d'autres stratégies moléculaires. Le laboratoire explore entre autre le développement de plantes transgéniques exprimant des enzymes de dégradation des BPC issues des bactéries (Mohammadi et al, 2007 : 496). Tel que cité plus haut, les plantes permettent de rendre biodisponibles les polluants peu solubles dans l'eau. De plus elles permettent, en particuliers celles des zones humides, de relier les processus anaérobies nécessaires à la déchlorination des congénères hautement chlorés et les processus aérobies essentiels à la dégradation des congénères peu chlorés (Smith, Schwab et Banks, 2007 : 239). Toutefois, la faible transformation des BPC par les cytochromes P450 présentes à l'intérieur des cellules végétales produisent des métabolites monohydroxylés toxiques pour les plantes (Macek et al., 2004 : 63-82). De plus, les diols produits eux-aussi lors du processus et libérés subséquemment au niveau de la rizhosphère nuisent aux processus bactériens (Patel et Gibson, 1976 : 842). L'expression d'enzymes recombinantes obtenues par ce type de stratégie de *shuffling* chez les plantes pourraient permettre de minimiser ces difficultés.

## Appendice A

VÉZINA J, D. Barriault et M. Sylvestre. 2008. Diversity of the C-terminal portion of the biphenyl dioxygenase large subunit. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology , vol. 15, no. 2-3, p. 139-151.

# Diversity of the C-Terminal Portion of the Biphenyl Dioxygenase Large Subunit

Julie Vézina Diane Barriault Michel Sylvestre

Institut national de la recherche scientifique (INRS-Institut Armand-Frappier), Laval, Qué., Canada

## Key Words

PCB · Biodegradation · Biocatalysis · Bph A · Phylogeny

## Abstract

The biphenyl dioxygenase (BPDO) catalyses a stereospecific dioxygenation of biphenyl and analogs of it. Aside from being involved in the destruction and detoxification of toxic pollutants in soil, in the context of the green chemistry concept, this enzyme is a promising biocatalyst to design new more selective and more environmentally friendly approaches to manufacture fine chemicals. At this time, most of our knowledge about the variability of key residues determining the substrate specificity and regioselectivity of the enzyme oxygenase component (BphAE) toward biphenyl analogs and about the effect of altering these residues on catalytic properties is based on investigations made with BphAEs from cultured organisms and engineered enzymes derived from them. The purpose of this work was to examine the diversity of the amino acid sequence patterns of the  $\alpha$  subunit (BphA) C-terminal domain deduced from PCR products amplified from DNA extracted from cultured bacteria of various phylogenetic lines and from the soil microflora of PCB-contaminated soils. Of special interest were segments of the C-terminal portion called regions I, III and IV. Altogether, the phylogenetic tree obtained from aligning the deduced amino acid sequences of BphAs C-terminal domain from cul-

tured bacteria belonging to various ecological niches and from uncultured soil bacteria reveals that most of the BphAs were linked to the three clusters of BphAs previously reported. However, few belong to new branches that diverge from the previously known branches showing a high diversity of BphAs in natural environment. Furthermore, data show a wide distribution of BphAs with family linkages that not only crosses bacterial taxonomic frontiers but also ecological niches. Nevertheless, in spite of this divergence, the sequence patterns of regions III and IV amino acids that are known to influence substrate specificity and regioselectivity are rather conserved among BphAs and the pattern was independent of the family cluster to which they belong. In most cases, regions III and IV amino acid patterns are closer to those of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 BphA1 than to the most versatile *Burkholderia xenovorans* LB400 BphA. This might suggest that the PCB-degrading potency of soil bacteria is closer to the one observed for KF707 BphAE than from LB400 BphAE. However, the fact that among less than 20 PCR products amplified from soil DNA that we have sequenced, one of them was very homologous to that of LB400 BphA and in addition, residues 335 and 336 of LB400 were replaced by residues that previous enzyme engineering had shown to extend the range of PCB substrate used by the enzyme strongly suggest that PCB-degrading bacteria are evolving in soil to optimize their PCB-degrading capacity.

Copyright © 2008 S. Karger AG, Basel

## KARGER

Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail [karger@karger.ch](mailto:karger@karger.ch)  
[www.karger.com](http://www.karger.com)

© 2008 S. Karger AG, Basel  
1464–1801/08/0153–0139\$24.50/0

Accessible online at:  
[www.karger.com/mmb](http://www.karger.com/mmb)

Michel Sylvestre  
Institut national de la recherche scientifique (INRS-Institut Armand-Frappier)  
531, Boul. des Prairies  
Laval, Qué. H7V 1B7 (Canada)  
Tel./Fax +1 450 687 5010, E-Mail [Michel.Sylvestre@iaf.inrs.ca](mailto:Michel.Sylvestre@iaf.inrs.ca)

## Introduction

Prototrophic soil bacteria are major contributors to the process of mineralization of organic matter because they can use a large array of organic compounds as source of carbon and energy. The sequential enzymatic reactions involved in this process are organized into pathways. The ability of enzymes to undergo a relaxation of their specificities without loss of function and to exhibit catalytic activity toward a range of structurally distinct substrates is critical to expend metabolic versatility. Several man-made compounds persist in the environment because efficient pathways for their elimination are lacking. The pathway used by aerobic bacteria to degrade biphenyl (BPH) is also able to degrade several of the 209 polychlorinated biphenyl (PCB) congeners co-metabolically into chlorobenzoates (CBA) [Furukawa, 2003; Pieper, 2005; Sylvestre, 2004, for reviews]. It thus provides an example of an emerging pathway. The upper pathway (fig. 1) comprises 4 enzymatic steps [Sylvestre, 2004]. The initial step is catalyzed by the biphenyl dioxygenase (BPDO), which catalyses a stereospecific dioxygenation of BPH (fig. 1) to generate a *cis*-dihydrodiol metabolite [Haddock et al., 1995; Hurtubise et al., 1996]. The substrates for BPDOs include many benzene or diphenyl skeletons, whose hydrogens are substituted with either methyl, ethyl, vinyl, carboxyl, halogenated or nitro groups [Misawa et al., 2002; Resnick and Gibson, 1996; Shindo et al., 2005]. It can also oxygenate to *cis*-diol bicyclic- or tricyclic-fused heterocyclic aromatics such as quinoline, dibenzofuran and phenanthridine [Misawa et al., 2005; Mohammadi and Sylvestre, 2005; Resnick and Gibson, 1996; Resnick et al., 1996; Seeger et al., 2003; Shindo et al., 2005]. In addition to the relaxed substrate specificity observed in asymmetric *cis*-dihydroxylation, it catalyzes oxygenolytic dehalogenation, monooxygenation, sulfoxidation, *O*- and *N*-dealkylation and desaturation reactions for a number of aromatic and benzocyclic compounds [Resnick et al., 1996]. Aside from being involved in the destruction and detoxification of toxic pollutants in soil, in the context of the green chemistry concept, this enzyme is a promising biocatalyst to design new more selective and more environmentally friendly approaches to manufacture fine chemicals. Therefore, understanding how residues lining the catalytic pocket interact with the substrate (and substrate analogs) to bind them and orient them into the catalytic cavity and understanding the mechanisms by which the enzyme can evolve to enhance its specificity toward new substrate analogs will help design novel biocatalysts useful

in biotechnological processes for the destruction of persistent pollutants or biocatalytic processes for green production of chemicals.

BPDO comprises three components [Haddock and Gibson, 1995; Hurtubise et al., 1995]: The iron-sulfur oxygenase (hereinafter referred to as BphAE or BphA1A2 for some BPDOs) is a heterohexamer comprised of three  $\alpha$  ( $M_r = 51,000$ ) and three  $\beta$  ( $M_r = 22,000$ ) subunits, the ferredoxin (BphF,  $M_r = 12,000$ ) and the ferredoxin reductase (BphG,  $M_r = 43,000$ ). The encoding genes for *Burkholderia xenovorans* LB400 [Erickson and Mondello, 1992] which is the best PCB-degrading isolate of natural origin are *bphA* (BphAE  $\alpha$  subunit), *bphE* (BphAE  $\beta$  subunit), *bphF* (BphF) and *bphG* (BphG). BPDOs catalyze a 2,3-dihydroxylation of biphenyl [Haddock et al., 1995] (fig. 1). The turnover rate of reaction as well as the specificity and regiospecificity toward substrate analogs are crucial for its application as biocatalyst. The C-terminal portion of BphAE  $\alpha$  subunit is involved in substrate specificity and regiospecificity toward substrates analogs.

Of particular interest is a segment of seven amino acid residues of the  $\alpha$  subunit (BphA) called region III [Barriault et al., 2002, 2004; Mondello et al., 1997] which was found to influence significantly the specificity and regiospecificity of the enzyme toward biphenyl analogs [Barriault and Sylvestre, 2004; Barriault et al., 2002; Mohammadi and Sylvestre, 2005; Mondello et al., 1997]. Furthermore, based on the crystal structure of *Rhodococcus* sp. RHA1 BphA1A2 [Furusawa et al., 2004], the residues that are in direct contact with the substrate and thus likely to influence substrate binding and orientation inside the catalytic pocket have now been identified. Other reports also showed that several amino acid residues outside region III that are not in direct contact with the substrate can significantly influence the range of PCB substrates oxygenated by the enzyme [Zielinski et al., 2003, 2006]. The mechanism by which the residues that interact directly with the substrate and those that do not interact with it can influence substrate binding and orientation inside the catalytic pocket is still unclear. However, since naturally occurring homologous genes retain principally the beneficial mutations through natural selection, the diversity of these genes in the microflora of soil exposed to pollutants can provide some indications on the functional adaptation toward new substrates. In a recent report, sequence analyses revealed substantial diversity of genes encoding the oxygenase  $\alpha$  subunit in benzene-toluene-ethylbenzene (BTEX)-contaminated soils [Witzig et al., 2006]. Furthermore, a

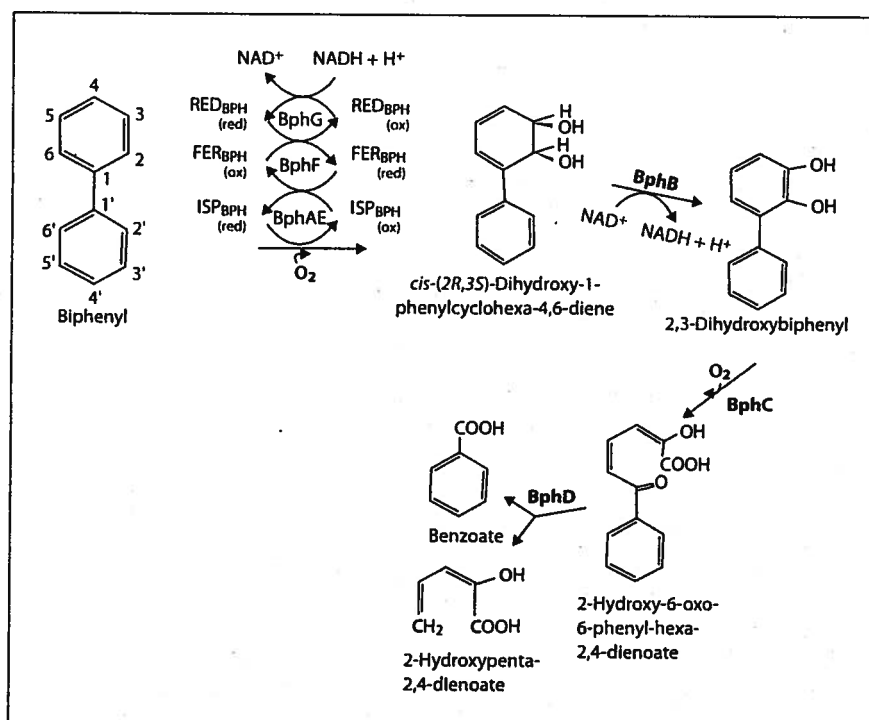


Fig. 1. The bacterial biphenyl catabolic pathway.

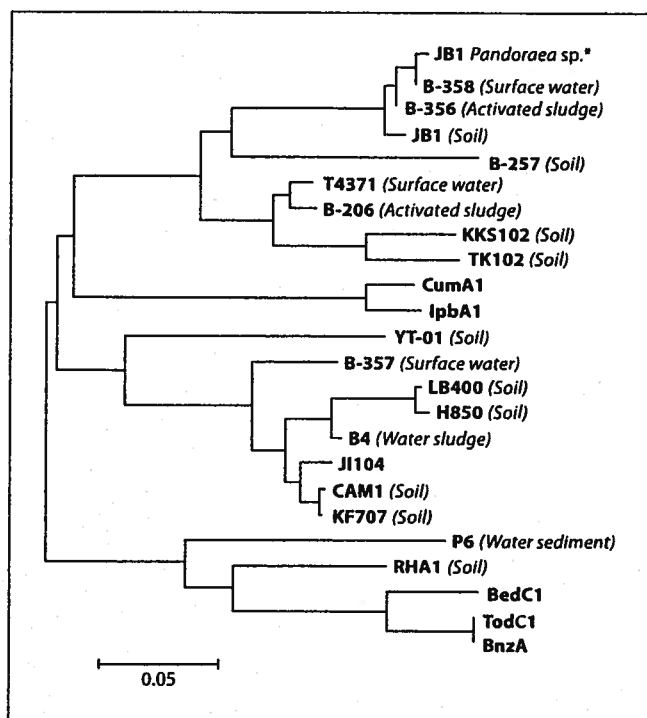
strong correlation between sequence type and substrate utilization pattern of isolates harboring these genes was observed. This observation allowed the identification of residues that contribute to differential catalytic properties toward benzene and toluene [Witzig et al., 2006]. In the case of biphenyl dioxygenases, a better assessment of the diversity of BphA residues involved in catalytic activity toward biphenyl analogs will help design new enzymes endowed with altered catalytic properties. At this time, most of our knowledge about the variability of key residues determining the substrate specificity and regio-specificity of BphAE toward biphenyl analogs and about the effect of altering these residues on catalytic properties are based on investigations made with BphAEs from cultured organisms and engineered enzymes derived from them. The purpose of this work was to examine the diversity of the amino acid sequence patterns of the BphA C-terminal domain deduced from PCR products amplified from DNA extracted from cultured bacteria of various phylogenetic lines and from the soil microflora of PCB-contaminated soils. The diversity of selected residues presumed to be involved in catalytic properties is also examined.

## Results and Discussion

### Family Clustering of BphAs from Cultured Bacteria

The sets of four degenerated primers described in the 'Experimental Procedures' section were used to amplify the C-terminal portion of *bphA* from 9 culturable isolates from diverse sources that are known to carry the biphenyl degrading genes. Four of these (*Burkholderia xenovorans* LB400, *Ralstonia eutropha* H850, *Pandoraea pnomensua* B-356 (previously *Comamonas testosteroni*), *Rhodococcus globerulus* P6) whose *bphA* sequence has already been reported [Asturias et al., 1995; Erickson and Mondello, 1992; Kahl and Hofer, 2003; Sylvestre et al., 1996] were used as controls. Data reported previously [Vézina et al., 2007] showed that under the PCR conditions described in the 'Experimental Procedures' section, these sets of primers amplified a band of expected size from DNA extracted from each soil and culturable bacterial strain used in this study.

The phylogenetic analysis obtained when sequences of known aryl dioxygenases genes from cultured bacteria are aligned, shows three branches for the biphenyl dioxygenases  $\alpha$  subunits [Taylor et al., 2002; Witzig et al., 2006]. All biphenyl dioxygenases isolated from Gram-positive rhodococcal (*Actinobacteria*) known to date cluster in a



**Fig. 2.** Phylogenetic tree showing the clustering of deduced amino acid sequences of BphAs C-terminal domain from bacterial isolates of various ecological niches. B-206, B-257, B-357, B-358 and YT-01 are BphAs C-terminal domain deduced from PCR products amplified from genomic DNA of respective strain as described in the text. For the other strains, the sequence accession numbers are the following, for each strain producing a biphenyl dioxygenase, the accession number is followed by the reference providing the origin the strains: JB1 *Pandoraaea*: deduced BphA sequenced based on PCR product amplified from genomic DNA of *Pandoraaea* sp. JB1 [AAZ95274]; B-356: *P. pnomenus* (*C. testosteroni*) B-356 [CTU47637] [Ahmad et al., 1990]; JB1: *Burkholderia* sp. JB1 [CAA08985] [Parsons et al., 1988]; T4371: *Cupriavidus oxalaticus* A5 [CAD61140] [Sayler et al., 1977]; KKS102: *Pseudomonas* sp. KKS102 [Q52438] [Kimbara et al., 1989]; TK102: *Comamonas testosteroni* TK102 [BAC01052] [Hiraoka et al., 2002]; CumA1: *Pseudomonas fluorescens* IP01 [1WQL\_A]; IpbA1: *Rhodococcus erythropolis* [NP\_89878]; LB400: *B. xenovorans* LB400 [YP\_556409] [Bedard et al., 1986]; H850: *R. eutropha* H850 [AJ544525] [Bedard et al., 1987]; B4: *Pseudomonas* sp. B4 [AAB88813] [Ducrocq et al., 1999]; JI104: *Pseudomonas aeruginosa* JI104 [E04215]; CAM1: *Pseudomonas* sp. CAM-1 [AAK14781] [Master and Mohn, 1998]; KF707: *Pseudomonas alcaligenes* KF707 [AAF22429] [Furukawa et al., 1986]; P6: *Rhodococcus globerulus* P6 [CAA56346] [Furukawa et al., 1978]; RHA1: *Rhodococcus* sp. RHA1 [YP\_707265] [Massai et al., 1995]; BedC1: *Pseudomonas putida* ML2 [Q07944]; TodC1: *Pseudomonas putida* F1 TodC1 [P08084]; BnzA: *Pseudomonas putida* [P08084].

single branch whereas BphAs from *Proteobacteria* are distributed into two distinct families. Among our test strains, strain LB400 and H850 BphA belong to one of these families along with *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 BphA1 [Taira et al., 1992] and *Pseudomonas* sp. Cam-1 BphA1 [Master and Mohn, 1997] which are well-characterized biphenyl dioxygenase. Strain B-356 BphA belongs to the second family which also comprises BphA1 from *Pseudomonas* sp. JB-1 [Parsons et al., 1988], *Pseudomonas* sp strain KKS102 [Fukuda et al., 1994], *Comamonas testosteroni* TK102 [Hiraoka et al., 2002] and from the *Cupriavidus necator* strain A5 (transposon Tn4371) [Merlin et al., 1997; Sayler et al., 1977] which are also well characterized BphAs. Phylogenetic trees drawn on the basis of the ClustalW sequence alignment of the portion of *bphA* from bp 480 to bp 1350 of LB400 *bphA* or of the deduced amino acid fragment corresponding to BphA C-terminal domain are similar to trees drawn based on alignment of whole gene (fig. 2).

The same sets of primers and PCR conditions were used to amplify the C-terminal portion of *bphA* from five culturable isolates that can grow on biphenyl but whose *bph* genes sequences had never been examined. The five isolates are *Acidovorax* sp. strain B-206, *Paenibacillus* strain B-257 (previously *Bacillus brevis* B-257), *Pseudomonas alcaligenes* strain B-357, plus the two unidentified strains B-358 and YT-01. It is noteworthy that strain B-257 is one of the few biphenyl-degrading bacteria belonging to the phylum *Firmicutes* that have been reported to date. Strain B-257 and YT01 were isolated from soil samples whereas strain B-206 and B-356 were isolated from activated sludges and strain B-357 and B-358 were from river water. Based on the ClustalW alignments of the deduced amino acid sequences of BphAs C-terminal portion, strain B-357 BphA clusters with LB400 and H850 BphA, whereas the other strains cluster with the BphA family that includes strain B-356 which is an organism isolated from an activated sludge and KKS102 which is a soil organism [Kimbara et al., 1989] (fig. 2). Interestingly, the deduced amino acid sequence of YT-01 BphA C-terminal portion diverges significantly from that of other *Proteobacteria* BphAs. The uniqueness of YT-01 BphA was confirmed by aligning this sequence with all sequences available from a Blast search at NCBI website. In this case, YT-01 BphA did not branch with any of the biphenyl dioxygenases  $\alpha$  subunits that are available in public data banks (not shown).

Data indicates that the PCR conditions used to amplify the C-terminal portion of the biphenyl dioxygenase gene allowed recovery of products from all three known

*bphA* families and also amplified TY-01 *bphA* that diverge significantly from other *bphAs* of cultured bacteria. Under the PCR conditions used, *nahAc* was not amplified.

Together, data confirm a high diversity of the C-terminal portion of the biphenyl dioxygenase  $\alpha$  subunits in bacteria. Two major observations are striking from examination of the tree shown in figure 2. First, the BphA families are not associated to a specific ecological niche of the producing organism. For example, bacterial strains JB-1 isolated from soil and B-356 isolated from an activated sludge produce closely related BphAs. Similarly, B4 BphA and B-357 BphA which are both produced by bacteria isolated from water samples cluster with LB400 and KF707 BphAs which are both produced by a soil organism. Second, BphA from strain B-257, which is a *Firmicutes*, clusters with BphAs from Proteobacteria. Together, these observations show a wide distribution of BphAs with family linkages that not only crosses bacterial taxonomic frontiers but also ecological niches. Therefore, data suggest that BphAs are widely distributed in the environment independently of the ecological niche in which the bacterial host is living.

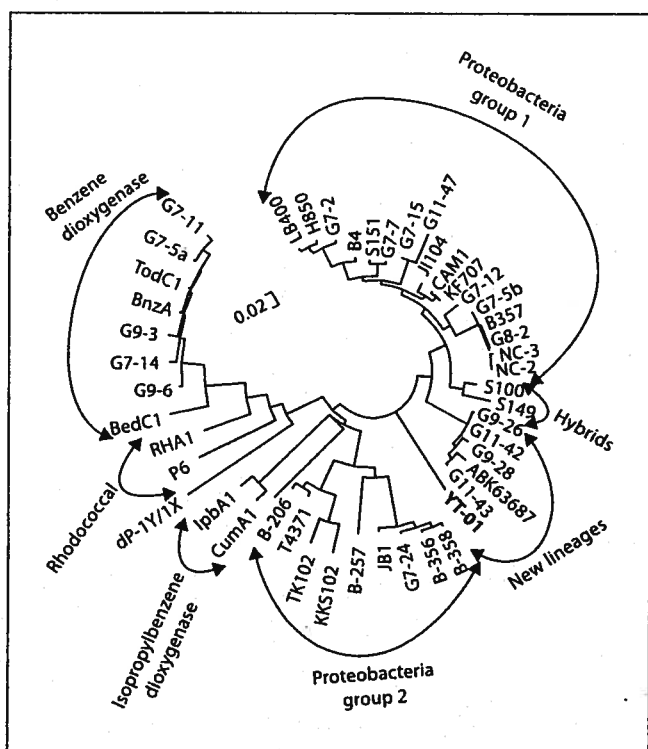
#### *Family Clustering of BphAs from Uncultured Soil Bacteria*

The DNA preparations extracted from each of the four contaminated soils (G7, G8, G9 and G11) and from one pristine soil (NC) were amplified separately with a mixture of the three primers pairs 1 and 2, 1 and 3 and 1 and 4. The amplified DNA products were then cloned in pUC19 or pGEM-T. Nine clones were picked randomly from soil G-7 for sequencing, one from soil G-8, four from soil G-9, three from soil G11 and two clones were picked from the noncontaminated soil. Together, 19 clones were sequenced; the sequence of each of the nineteen PCR products was unique, showing the diversity of *bphA* in soil organisms. We did not include any benzene-degrading bacteria among our controls; however, the fact that 3 PCR products from soil G7 (G7-14, G7-5a and G7-11) and two from soil G9 (G9-6, G9-3) clustered with the BnzA and BedC1 family show that the PCR conditions used were not strictly selecting for BphAs. This reflects the very close relationship between the benzene-toluene and biphenyl dioxygenases where most of the critical structural features (Rieske cluster and catalytic center) are highly conserved in both enzymes [Witzig et al., 2006]. In spite of the fact that strictly selective PCR conditions to amplify BphA are impracticable, 14 of 19 fragments exhibited more relationship with biphenyl dioxy-

genase families than with benzene-toluene or isopropylbenzene dioxygenases (fig. 3). This observation indicates a predominance of biphenyl-degrading, over benzene-degrading bacteria in the soils we have analyzed which is in agreement with the fact that these soils were contaminated with PCBs. It is therefore likely that although PCBs are very slowly degraded in soil, the lesser chlorinated congeners drive the selection to favor the enrichment of biphenyl-degrading organisms in the microbial population.

Based on alignment of the BphA sequences from these uncultured soil organisms with the sequences of known BphAs, one fragment (G7-24) clustered with the same family as strain B-356 BphA; four fragments (G7-2, G7-7, G7-15, G11-47) are closely related with LB400 and KF707 BphAs family, one of which (G7-2) showing very high homology with LB400 BphA. Fragment G7-12, G7-5b and G8-2 are members of a subfamily that is linked to the LB400 and KF707 BphAs family and showed high similarity with the two fragments obtained from the noncontaminated soil (NC-2 and NC-3) and with BphA from *P. pseudoalcaligenes* B-357. Two PCR products amplified from DNA extracted from soils G9 (G9-28, G9-26) were very similar to the two PCR products amplified from soil G11 DNA (G11-43 and G11-42). Together, these four fragments make up a new branch which diverges from the branch that comprises LB400 BphA (fig. 3). The uniqueness of these BphAs was confirmed from computing BLAST pairwise alignments with the deduced amino acid sequence of either one of the four PCR products G9-28, G9-26 G11-43 or G11-42. Based on the phylogenetic trees obtained from these alignments each of these BphAs diverged from known BphAs (not shown). However, for all four sequences, the highest E-value scores were obtained with biphenyl dioxygenases of the databanks; BphA S100 [accession number EF090939] and BphA S151 [accession number EF0909390] being on the top of the list, but very close are also *Pseudomonas* sp. Cam1 BphA [accession number gbAAK14781.1] and *P. pseudoalcaligenes* KF707 as well as *Pseudomonas* sp. B4 BphA1 [gbAAB88813.1]. Sequence accession number ABK63687, which is a partial sequence obtained from an uncultured soil bacterium is the only sequence from databanks available through NCBI website that belongs to this new branch. Sequence ABK63687 was annotated with no explanation, as phenylpropionate dioxygenase in NCBI website, but in view of the close similarity of the other members of this branch with the  $\alpha$  subunit of the biphenyl dioxygenases, these enzymes have most likely evolved to catalyze dioxygenation of biphenyl.





**Fig. 3.** Phylogenetic tree showing the clustering of deduced amino acid sequences of BphAs C-terminal portion from PCR products amplified from DNA extracted from soil. Each PCR product obtained by amplifying DNA extracted from soil is identified based on the name of the soil from which it comes (G7, G-8, G-9, G11 or NC) followed by their identification number. BphA sequences for strain B-206, B-257, B-357, B-358 and YT-01 were deduced from the PCR product amplified from the genomic DNA of these strains. The other dioxygenase  $\alpha$  subunits were obtained from databanks for which the information is provided in figure 2. dp-1Y/1X. PCR product obtained by amplifying DNA extracted from benzene contaminated soil [DQ167013].

Interestingly, BphA S100 and BphA S149 which are two variants obtained by shuffling a mixture of DNA fragments amplified from DNA extracted from soil G7, G9 and G11 with B-356 BphA and LB400 BphA [Vézina et al., 2007] branch midway between the family comprising LB400 BphA and the family comprising the four fragments obtained by amplifying DNA from soil G11 and G9 discussed above. It is thus likely that their position on the tree reflects the fact that they represent hybrids between LB400 and BphAs belonging to the branch clustering with soil G9 and G11 DNA. On the other hand, variant S151 which was obtained by shuffling the same DNA preparation amplified from soil DNA [Vézina et al., 2007]

clusters very closely with LB400 and KF707 BphA (fig. 3) suggesting that this variant is a hybrid deriving from one of the *bphAs* that belong to the same family as LB400 BphA.

None of the 19 PCR products from soil DNA clustered with isopropyl dioxygenases. Since we did not have any control of bacteria carrying the isopropyl-degrading genes, we cannot figure out whether this observation results from the rather selective PCR conditions used in this investigation or if isopropyl-degrading bacteria were less abundant than the biphenyl and benzene degrading organisms in the soils we have examined. Similarly, none of the PCR products from the soils we have analyzed clustered with the divergent branch of toluene-biphenyl dioxygenase sub-family detected by Witzig et al. [2006] and represented in figure 3 by the PCR product dp-1Y/1X. More strikingly, none of the fragments branched with the rhodococcal biphenyl dioxygenase. In a recent investigation, Leigh et al. [2006] reported that most of the PCB-degrading culturable isolates obtained from roots zone and the rhizosphere of various plants and trees were Gram-positive rhodococcal. However, since the soil samples used in our investigation had been stored for a long period of time, their microflora is representative of a nonvegetated soil which might explain the absence of rhodococcal BphAs that are likely to be more abundant in the microflora directly associated to the vegetation.

#### Sequence Analyses of BphAs with Respect to Substrate Specificity

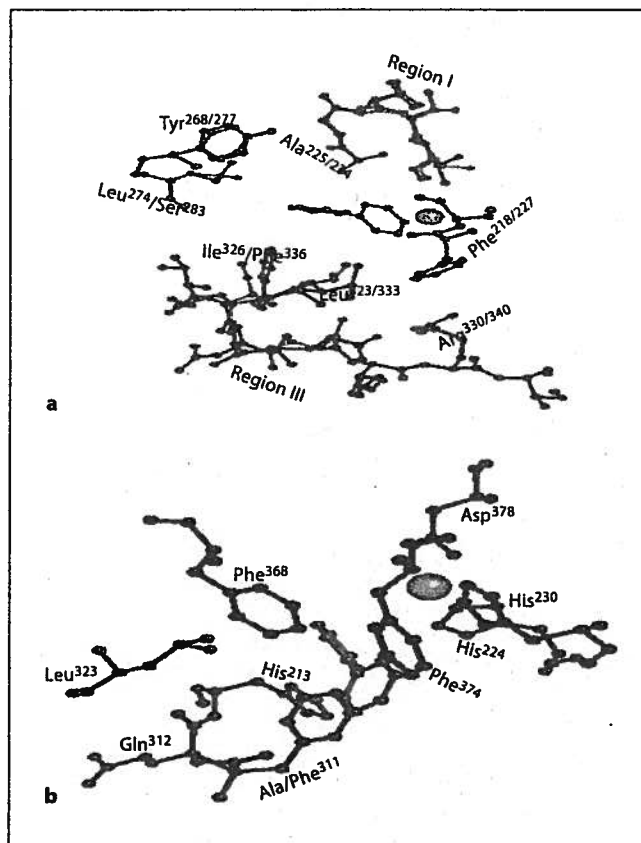
One of the objectives of this work was to examine the sequence diversity of BphA domains that are involved in substrate binding and orientation inside the catalytic pocket. We especially examined the diversity of the amino acid sequences of residues that based on the known structure of RHA1 BphA1A2, are involved in substrate binding and also of residues that are known from biochemical investigations to influence the enzyme's catalytic properties.

Region III is one of the domains known to influence substrate binding and specificity. This is a segment of 7 amino acids that has been shown, in several reports to influence the enzymes specificity [Barriault et al., 2002; Barriault and Sylvestre, 2004; Mohammadi and Sylvestre, 2005; Mondello et al., 1997]. Region III of strain LB400 BphA is comprised of Thr<sup>335</sup>Phe<sup>336</sup>Asn<sup>337</sup>Asn<sup>338</sup>Ileu<sup>339</sup>Arg<sup>340</sup>Ile<sup>341</sup>. Changing Thr<sup>335</sup>Phe<sup>336</sup>Asn<sup>337</sup>Asn<sup>338</sup>Ileu<sup>339</sup>Arg<sup>340</sup>Ile<sup>341</sup> to Ala<sup>335</sup>Ile<sup>336</sup>Asn<sup>337</sup>Thr<sup>338</sup>Ileu<sup>339</sup>Arg<sup>340</sup>Thr<sup>341</sup> as in *P. pseudoalcaligenes* KF707 BphA1 [Mondello et al., 1997] or to Gly<sup>335</sup>Ile<sup>336</sup>Asn<sup>337</sup>Thr<sup>338</sup>Ileu<sup>339</sup>Arg<sup>340</sup>Thr<sup>341</sup> as

in B-356 BphA [Barriault et al., 2002] created variants that exhibited a degrading capacity toward a wider range of chlorobiphenyls than parent LB400 BphA. Site-directed [Mondello et al., 1997] and random mutagenesis [Barriault and Sylvestre, 2004; Mohammadi and Sylvestre, 2005] of residues 335, 336, 338 and 341 of LB400 BphA, were used to examine the contribution of each of these residues to substrate specificity and regiospecificity and to the turnover rate of reaction toward chlorobiphenyls. The fact that changing Thr<sup>335</sup>Phe<sup>336</sup> to Ala<sup>335</sup>Met<sup>336</sup> has increased the range of substrate used by the enzyme [Barriault and Sylvestre, 2004], including dibenzofuran [Mohammadi and Sylvestre, 2005], and that it had altered the regiospecificity of the enzyme toward chlorobiphenyls [Barriault et al., 2004] suggests a major role for one or both of residues 335 and 336 in substrate binding and orienting. The fact that the turnover rate of reaction of variant RR41 (Ala<sup>335</sup>Met<sup>336</sup>Gln<sup>338</sup>Val<sup>341</sup>) toward dibenzofuran is higher than that of variant *p4* (Ala<sup>335</sup>Met<sup>336</sup>) showed an influence of either residue 338 or 341 on catalytic activity [Mohammadi and Sylvestre, 2005]. However, the mechanism by which these residues influence catalytic activity and their likely contribution to substrate binding and positioning inside the catalytic pocket is yet unclear.

Among the 7 residues of region III, based on the crystal structure of *Rhodococcus* sp. RHA1 BphA1 [Furusawa et al., 2004] residue Ile<sup>326</sup> which correspond to Phe<sup>336</sup> of LB400 BphAE is the closest to the substrate. Ile<sup>326</sup> of RHA1 BphA1 is at 5.3 Å from ring 2 of biphenyl (the one that is not oxidized). On the other hand, Phe<sup>336</sup> of LB400 BphAE model based on RHA1 crystal structure is at only 3.8 Å from ring 2 of biphenyl (fig. 4). This residue can therefore most likely affect binding of bi-cyclic substrates such as biphenyl and especially of their substituted analogs.

Ile was the amino acid residue most frequently occupying the position corresponding to Phe<sup>336</sup> of LB400 BphA among the 46 BphA sequences we examined from cultured and noncultured organisms (fig. 5). It was replaced by Val in G7-15, G11-47 and dP-1Y/1X and by Met in G7-2. Interestingly, selecting mutants exhibiting enhanced activity toward chlorobiphenyls among variants obtained by random mutagenesis of residues 335 and 336 of LB400 BphA identified variants *p4* and *p1* where Phe<sup>336</sup> was replaced by a Met or Leu [Barriault and Sylvestre, 2004]. Therefore, replacing the bulky and hydrophobic Phe by less bulky and hydrophobic residues facilitates the binding to a wider range of chlorobiphenyls. The fact that G7-2 BphA amplified from soil exhibited 98% identity with LB400 BphA which is the most versatile biphenyl



**Fig. 4.** a Super position of the three-dimensional model of region III amino acids of LB400 BphAE (red) and RHA1 BphA1A2 (green), using Rasmol software. LB400 BphAE was modeled with the 3D-JIGSAW software (<http://www.bmm.icnet.uk/servers/3djigsaw/>) using as template, RHA1 BphAE crystal structure. b Three-dimensional model of RHA1 BphA1A2 showing selected residues of lining the catalytic pocket and showing the conformation of the modeled mutation of position 311 replacing Ala by Phe (blue).

dioxygenase of natural occurrence, and that in G7-2 BphA positions 335–336 were occupied by Ala Met and residue 341 by Val, can be taken as evidence for a natural selection occurring in soil to optimize BphAs catalytic properties toward chlorobiphenyls.

Based on LB400 BphAE structural model, residue 336 of BphA is the only one from the segment between 335 and 341 (region III) that lines the catalytic pocket, all other residues are far from the substrate and from the catalytic iron (fig. 4). Therefore, their influence in catalytic activity cannot be explained to their proximity to the catalytic cavity. These residues must therefore influence the catalytic properties indirectly by influencing the confor-

	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	276	277	321	322	323	324	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	377	378				
CAM1	D	M	Y	H	A	G	T	M	S	H	L	S	G	I	-	F	-	G	Q	H	M	-	L	P	A	I	N	T	I	R	T	W	H	P	R	G	-	T	F	
KF707	D	M	Y	H	A	G	T	M	S	H	L	S	G	I	-	W	F	-	G	Q	H	M	-	L	P	A	I	N	T	I	R	T	W	H	P	R	G	-	T	F
ABK63687	D	M	Y	H	A	G	T	M	S	H	L	S	G	V	-	W	F	-	G	Q	H	M	-	L	S	G	I	N	T	V	R	T	W	H	P	R	G	-	-	-
G11-43	D	M	Y	H	A	G	T	M	S	H	L	S	G	V	-	W	F	-	G	Q	H	M	-	L	S	G	I	N	T	V	R	T	W	H	P	R	G	-	T	F
G9-28	D	M	Y	H	A	G	T	M	S	H	L	S	G	V	-	W	F	-	G	Q	H	M	-	L	S	G	I	N	T	V	R	T	W	H	P	R	G	-	T	F
G9-26	D	M	Y	H	A	G	T	M	S	H	L	S	G	V	-	W	F	-	G	Q	H	M	-	L	S	G	I	N	T	V	R	T	W	H	P	R	G	-	T	F
G11-42	D	M	Y	H	A	G	T	M	S	H	L	S	G	V	-	W	F	-	G	Q	H	M	-	L	S	G	I	N	T	V	R	T	W	H	P	R	G	-	T	F
G7-24	D	M	Y	H	A	G	T	M	S	H	L	S	G	V	-	W	F	-	G	Q	H	M	-	L	P	G	I	N	T	I	R	T	W	H	L	R	G	-	-	-
B-356	D	M	Y	H	A	G	T	M	S	H	L	S	G	V	-	W	F	-	G	Q	H	M	-	L	P	G	I	N	T	I	R	T	W	H	P	R	G	-	T	F
JB1	D	M	Y	H	A	G	T	M	S	H	L	S	G	V	-	W	F	-	G	Q	H	M	-	L	P	G	I	N	T	I	R	T	W	H	P	R	G	-	T	F
B-257	D	M	Y	H	A	G	T	M	S	H	L	S	G	V	-	W	F	-	G	Q	H	M	-	L	P	G	I	N	T	I	R	S	W	H	P	R	G	-	N	F
KKS102	D	M	Y	H	A	G	T	M	A	H	L	S	G	V	-	W	F	-	G	Q	H	M	-	L	P	G	I	N	T	I	R	S	W	H	P	R	G	-	T	F
TK102	D	M	Y	H	A	G	T	M	S	H	V	S	G	V	-	W	Y	-	G	Q	H	M	-	L	P	G	I	N	T	I	R	T	W	H	P	R	G	-	T	F
T4371	D	M	Y	H	A	G	T	M	S	H	L	S	G	V	-	W	F	-	G	Q	H	M	-	L	P	G	I	N	T	I	R	S	W	H	P	R	G	-	T	F
B-206	D	M	Y	H	A	G	T	M	S	H	L	S	G	V	-	W	F	-	G	Q	H	M	-	L	P	G	I	N	T	I	R	S	W	H	P	R	G	-	T	F
G7-5a	D	M	Y	H	A	R	T	T	S	H	L	S	G	I	-	F	Y	-	V	E	H	M	-	L	P	G	I	N	T	V	R	T	W	H	P	R	G	-	-	-
G7-11	D	M	Y	H	A	R	T	T	S	H	L	S	G	I	-	F	Y	-	V	E	H	M	-	L	P	G	I	N	T	V	Q	T	W	H	P	-	-	-	-	
G7-14	D	M	Y	H	A	G	T	T	S	H	L	S	G	I	-	F	Y	-	V	E	H	M	-	L	P	G	I	D	T	V	R	T	W	H	P	R	G	-	-	-
TodC1	D	M	Y	H	A	G	T	T	S	H	L	S	G	I	-	F	Y	-	V	E	H	M	-	L	P	G	I	N	T	V	R	T	W	H	P	R	G	-	T	F
BnzA	D	M	Y	H	A	G	T	T	S	H	L	S	G	I	-	F	Y	-	V	E	H	M	-	L	P	G	I	N	T	V	R	T	W	H	P	R	G	-	T	F
G9-6	D	M	Y	H	A	G	T	T	S	H	L	S	G	I	-	F	Y	-	V	E	H	M	-	L	P	G	I	N	T	V	R	T	W	H	P	R	G	-	T	F
G9-3	D	M	Y	H	A	G	T	T	S	H	L	S	G	I	-	F	Y	-	V	E	H	M	-	L	P	G	I	N	T	V	Q	T	W	H	P	R	G	-	T	F
BedC1	D	M	Y	H	A	G	T	T	A	H	L	S	G	I	-	F	Y	-	L	E	H	M	-	L	P	G	V	N	T	I	R	T	W	H	P	R	G	-	T	F
RHA1	D	M	Y	H	A	G	T	T	S	H	L	S	G	I	-	F	Y	-	A	Q	H	M	-	L	P	G	I	N	T	I	R	A	W	H	P	R	G	-	T	F
P6	D	M	Y	H	V	G	T	T	S	H	L	S	G	L	-	F	Y	-	G	Q	H	M	-	L	P	G	I	N	T	I	R	T	W	H	P	R	G	-	T	F
dP-1Y/1X	D	M	Y	H	A	G	T	T	S	H	I	S	G	I	-	F	F	-	F	Q	H	M	-	L	P	G	V	N	T	I	R	M	W	H	P	R	G	-	T	F
YT-01	D	M	Y	H	A	G	T	M	S	H	L	S	G	I	-	W	F	-	G	Q	H	M	-	L	P	G	I	N	T	I	R	T	W	H	P	R	G	-	T	F
S100	D	M	Y	H	A	G	T	M	S	H	L	S	G	I	-	W	F	-	G	Q	H	M	-	L	P	G	I	N	T	I	R	T	W	H	P	R	G	-	T	F
S149	D	M	Y	H	A	G	T	M	S	H	L	S	G	I	-	W	F	-	G	Q	H	M	-	L	P	G	I	N	N	I	R	I	W	H	P	R	G	-	N	F
NC-3	D	M	Y	H	A	G	T	M	S	H	L	S	G	I	-	W	F	-	G	Q	H	M	-	L	P	A	I	N	T	I	R	S	W	H	P	R	G	-	T	F
G8-2	D	M	Y	H	A	G	T	M	S	H	L	S	G	I	-	W	F	-	G	Q	H	M	-	L	P	A	I	N	T	I	R	S	W	H	P	R	G	-	T	F
NC-2	D	M	Y	H	A	G	T	M	S	H	L	S	G	I	-	W	F	-	G	Q	H	M	-	L	P	A	I	N	T	I	R	S	W	H	P	R	G	-	T	F
G7-5b	D	M	Y	H	A	G	T	M	S	H	L	S	G	I	-	W	F	-	G	Q	H	M	-	L	P	A	I	N	T	I	R	S	W	H	P	R	G	-	T	F
B357	D	M	Y	H	A	G	T	M	S	H	L	S	G	I	-	W	F	-	G	Q	H	M	-	L	P	A	I	N	T	I	R	S	W	H	P	R	G	-	T	F
G11-47	D	M	Y	H	A	G	T	M	S	H	L	S	G	I	-	W	F	-	G	Q	H	M	-	L	T	A	V	N	T	I	R	T	W	H	P	R	G	-	T	F
G7-12	D	M	Y	H	A	G	T	M	S	H	L	S	G	I	-	W	F	-	G	Q	H	M	-	L	P	A	I	N	T	I	R	T	W	H	P	R	G	-	T	F
S151	D	M	Y	H	A	G	T	M	S	H	L	S	G	I	-	W	F	-	G	Q	H	M	-	L	P	A	I	N	T	I	R	T	W	H	P	R	G	-	N	F
G7-7	D	M	Y	H	A	G	T	M	S	H	L	S	G	I	-	W	F	-	G	Q	H	M	-	L	P	A	I	N	T	I	R	T	W	H	P	R	G	-	N	F
G7-15	D	M	Y	H	A	G	T	M	S	H	L	S	G	I	-	W	F	-	G	Q	H	M	-	L	T	A	V	N	T	I	R	T	W	H	P	R	G	-	T	F
JI104	D	M	Y	H	A	G	T	M	S	H	L	S	G	I	-	W	F	-	G	Q	H	M	-	L	P	A	I	N	T	I	R	T	W	H	P	R	G	-	T	F
LB400	D	M	Y	H	A	G	T	T	T	H	L	S	G	I	-	W	Y	-	G	Q	H	M	-	L	P	T	F	N	N	I	R	I	W	H	P	R	G	-	N	F
H850	D	M	Y	H	A	G	T	T	T	H	L	S	G	I	-	W	Y	-	G	Q	H	M	-	L	P	T	F	N	N	I	R	I	W	H	P	R	G	-	N	F
G7-2	D	M	Y	H	A	G	T	T	T	H	L	S	G	I	-	W	Y	-	G	Q	H	M	-	L	P	A	M	N	N	I	R	V	W	H	P	R	G	-	N	F
B4	D	M	Y	H	A	G	T	M	A	H	L	S	G	I	-	W	Y	-	G	Q	H	M	-	L	P	A	I	N	T	I	R	T	W	H	P	R	G	-	T	F
CumA1	D	M	Y	H	A	G	T	M	A	H	L	S	G	V	-	W	F	-	A	Q	H	M	-	L	P	G	I	N	T	V	R	T	W	H	P	R	G	-	T	F
IpbA1	D	M	Y	H	A	G	T	M	A	H	L	S	G	V	-	W	F	-	A	Q	H	M	-	L	P	G	I	N	T	V	R	T	W	H	P	R	G	-	T	F

**Fig. 5.** Alignment of residues of the BphA C-terminal domain that are likely to influence catalytic properties. The designations of PCR products or BphAs from databank are identical to those indicated in figure 3.

mation of key residues that interact with the substrate. Unfortunately, the software we used to model LB400 BphA was not accurate enough to show the impact of altering these residues on the conformation of residues lin-

ing the catalytic pocket. Nevertheless, it is noteworthy that BphAs carrying a Thr at position 335 are rather uncommon, all sequences examined, except LB400 and H850 contained a Gly or Ala. On the other hand, posi-

tions corresponding to 337, 338 and 340 of LB400 BphA are highly conserved; the position corresponding to Asn<sup>337</sup> was occupied by Asn in all sequences examined, for both BphA and benzene-toluene dioxygenases. Except for LB400 and H850 BphA and the soil fragment G7-2, all BphAs analyzed contained a Thr at position 338. Arg<sup>340</sup> is conserved in all 46 BphAs examined (fig. 5). It is noteworthy that the residue corresponding to Arg<sup>340</sup> of LB400 BphA was replaced by a Gln in two of the five fragments amplified from soil DNA that clustered with benzene dioxygenases (not shown). However, a Blast search to find sequences that are similar to the one occurring in G9-3 and G7-11 (Gly<sup>335</sup>Ile<sup>336</sup>Asn<sup>337</sup>Thr<sup>338</sup>Val<sup>339</sup>Gln<sup>340</sup>Thr<sup>341</sup>) did not reveal the existence of any other known dioxygenases carrying a Gln at a position corresponding to Arg<sup>340</sup>. The fact that we found two similar sequences out of five sequences clustering with toluene/benzene dioxygenases suggests that they are more likely variant dioxygenases present in the soils we examined than variants caused by a mutation that occurred during PCR amplification. Residue 339 is also conserved; this position is occupied by an Ile in all known BphA. Ile is replaced by Val in TodC1, BnzA, CumA1, IpbA1 and all fragments from soil G7 and G9 that cluster with BnzA. This position is also occupied by Val in G9-28, G9-28, G11-42 and G11-43 which are members of a divergent branch of BphAs. Residues corresponding to Ile<sup>341</sup> of LB400 BphA are the least conserved of the region III residues where Ile is replaced by Ser, Ala, Thr, Met or Val.

Altogether, data are consistent with the observations made with BphAs from culturable bacteria whereby, in spite of its critical role in substrate specificity, region III sequence pattern is rather conserved in nature and the sequence pattern of strain LB400 BphA is rather uncommon in nature. Leu<sup>333</sup> of LB400 BphA is the only other residue close to position 336 that lines the catalytic cavity. However, sequence alignment shows that the Cys<sup>330</sup>Ser<sup>331</sup>Phe<sup>332</sup>Leu<sup>333</sup> pattern of LB400 BphA is highly conserved in all the BphAs we have aligned (not shown). Therefore, this sequence arrangement appears to be critical to maintain optimal enzymatic activity.

The importance of region IV amino acid on substrate specificity has been shown in many investigations [Mondello et al., 1997; Suenaga et al., 1999, 2002]. Asn<sup>377</sup> in LB400 BphA allows a *meta-para* oxygenation of *ortho-meta* substituted biphenyl rings, and its replacement by Thr prevents this catalytic reaction. This position is rather conserved in our alignments where Thr is the predominant amino acid. Therefore, although Asn might confer advantages with respect to the range of chlorobiphenyls

used as substrate, in natural environments, it might not be a real advantage for the bacterial strains expressing such enzyme since the *meta-para* dihydrodiol generated by this reaction is less prone for further degradation [Sylvestre, 2004].

The segment comprised between residue His<sup>224</sup> and His<sup>230</sup> of RHA1 BphA1 is critical for enzyme activity. His<sup>230</sup> and His<sup>224</sup> coordinate the mononuclear iron of the active center and residue Ala<sup>225</sup> participates in the binding of ring 2 of biphenyl [Furusawa et al., 2004]. These 3 positions are highly conserved in BphAs. Three other residues, comprising the short segment Thr<sup>236</sup>Thr<sup>237</sup>Thr<sup>238</sup> of LB400 BphA which was previously called region I [Mondello et al., 1997] was regarded as one of the region that could explain why the catalytic properties of LB400 BphA differs from that of KF707 BphA [Kamamaru et al., 1998]. In KF707 BphA and most of the BphA sequences we examined, this segment is replaced by Thr<sup>236</sup>Met<sup>237</sup>Ser<sup>238</sup> (in a few instances, Ser<sup>238</sup> is replaced by Ala) in most BphAs except in rhodococcal BphAs where the Thr<sup>236</sup>Thr<sup>237</sup>Ser<sup>238</sup> is identical to the pattern observed for the benzene/toluene dioxygenases (fig. 5). Nevertheless, there are no reports in the literature that clearly show an influence of these residues on catalytic properties. At this time, the significance of these variations is unknown, but it is noteworthy that beside LB400, only one DNA fragment from soil (G7-2) exhibits this pattern which is a fragment exhibiting more than 98% identity with LB400.

Another region of interest involves residues 321–323. His<sup>323</sup> is highly conserved among all benzene-toluene/biphenyl dioxygenases. The corresponding His<sup>313</sup> of RHA1 BphA1 is located at less than 4 Å from the substrate. Residue Gly<sup>321</sup> of LB400 BphA is replaced by Ala<sup>311</sup> in RHA1 BphA1. In fact, this residue is highly conserved in all known biphenyl dioxygenases, being either a Gly or Ala, two small amino acid residues (fig. 5). In a recent study, Witzig et al. [2006] have amplified DNA fragments encoding the C-terminal portion of dioxygenases  $\alpha$  subunits from isolates growing on benzene-toluene-ethylbenzene and from the DNA of soil from which they were isolated. The position corresponding to Gly<sup>321</sup> of LB400 BphA was highly variable among the fragments they amplified where it was either occupied by Ala, Gly, Met, Val, Leu or Phe. Interestingly, the isolates that produced a dioxygenase carrying a Met at this position were only able to grow on benzene [Witzig et al., 2006]. Introducing a mutation to replace Ala<sup>311</sup> of RHA1 BphA1 by Val, Leu or Met using the Rasmol software, have considerably reduced the distance between residue 311 and the substrate;

this was the most remarkable when Ala was replaced by Phe leaving no space between the amino acid residue and the substrate (fig. 4b). Aside from PCR products G7-5a, G7-11, G7-14, G9-6 and G9-3 that clustered with TodC1 and BnzA, the presence of a Gly or Ala at that position on all other fragments we have amplified from the soil DNA strongly suggests that these dioxygenases have evolved to catalyze the oxygenation of a biphenyl molecule or of an analog of it.

Altogether, the phylogenetic tree obtained from aligning the deduced amino acid sequences of BphAs C-terminal domain from cultured bacteria belonging to various ecological niches and from uncultured soil bacteria (fig. 3) reveals that most of the BphAs were linked to the three clusters of BphAs previously reported [Taylor et al., 2002]. However, few belong to new branches that diverge from the previously known branches showing a high diversity of BphAs in natural environment. Nevertheless, in spite of this divergence, the sequence patterns of region III and IV amino acids that are known to influence substrate specificity and regiospecificity are rather conserved among BphAs and the pattern was independent of the family cluster to which they belong. In most cases, region III and IV amino acid patterns are closer to those of KF707 BphA1 than to the most versatile LB400 BphA. This might suggest that the PCB-degrading potency of soil bacteria is closer to the one observed for KF707 BphAE than from LB400 BphAE. However, the fact that among less than 20 PCR products amplified from soil DNA that we have sequenced, one of them was very homologous to that of LB400 BphA and in addition, residues 335 and 336 of LB400 were replaced by residues that previous enzyme engineering had shown to extend the range of PCB substrate used by the enzyme [Barriault and Sylvestre, 2004] strongly suggests that PCB-degrading bacteria are evolving in soil to optimize their PCB-degrading capacity.

## Experimental Procedures

### Bacterial Strains and Soil Sample Used in This Investigation

Strain B-356 was identified as *Pseudomonas testosteroni* in the late 1980s based on biochemical features matching those of this species except for its inability to degrade testosterone [Ahmad et al., 1990]. It was later renamed *Comamonas testosteroni* following the reclassification of *P. testosteroni* [Bergeron et al., 1994; Tamaka et al., 1987]. However recent 16S rRNA gene sequencing of a subculture of strain B-356 sent to Aurélie Cébron at Université Henri Poincaré (Nancy, France) showed more than 99% identity with *Pandoraea pnomenusa*. We have confirmed that the 16S rRNA sequence of the original strain B-356, which had been

**Table 1.** Biochemical features of *P. pnomenusa* B-356

Taxonomic features of <i>P. pnomenusa</i> B-356	Specific for <i>Pandoraea</i>	Specific for <i>P. pnomenusa</i>
Catalase	+	
Growth at 30, 37 and 42°C	+	
6.0% NaCl	-	
10% lactose	-	
Easeulin hydrolysis	-	
Gelatin liquefaction	-	
Fructose	-	
Xylose	-	
Indole production	-	
Manitol	-	
Maltose	-	
Lysine decarboxylase	-	
Polar flagella	+	
Denitrification		-
Nitrite reduction		-
Citrate assimilation		+
Urease		+
Catalase		+
Nitrate reduction		+
Oxidase		+

maintained as a lyophilized culture since 1982 matches with that of *P. pnomenusa*. The accession number for B-356 16S rRNA gene sequence is EF596910. As further evidences the biochemical features of strain B-356 (table 1) matches those that differentiate *P. pnomenusa* among other *Pandoraea* species [Coenye et al., 2000]. Furthermore, the sequence of the PCR product amplified from genomic DNA of the strain identified as *P. pnomenusa* B-356 was identical to the one amplified from genomic DNA of the original strain B-356 that had been maintained lyophilized since 1982 and it was identical to the previously reported sequence of strain B-356 *bphA* [Sylvestre et al., 1996; GeneBank accession number U47637].

Other bacterial strains used in this investigation are *P. alcaligenes* B-357 [Ahmad, 1990], *Bacillus brevis* B-257 [Massé et al., 1984] and strain B-206 previously identified as the belonging to the bacterial group IVe [Sylvestre and Fauteux, 1982]. Based on the 16S rRNA gene sequence analyses, *B. brevis* B-257 is now renamed *Paenibacillus* sp. B-257 and strain B-206 is renamed *Acidovorax* sp. B-206 (the sequence accession number for the 16S rRNA genes are respectively EF596911 for B-257 and EF596912 for B-206). Strain B-358 and YT01 have been reported previously as PCB-degrading bacteria [Ahmad et al., 1990] but have never been identified. The other PCB-degrading bacteria used in this investigation are *R. globerulus* P6 [Asturias et al., 1995; Chebrou et al., 1999], *B. xenovorans* LB400 [Erickson and Mondello, 1992; Goris et al., 2004], *R. eutropha* H850 [Ahmad et al., 1990].

The PCB contaminated soil samples used in this investigation G7, G8, G9 and G11 were all from different locations of the Eastern region of Canada. Direct access to PCB-contaminated soils are very difficult in Canada. All the soils used in this investigation

were soils collected in 1985 [Guilbeault et al., 1994] and they were kept since in tightly capped glass bottles at 4°C under controlled humidity at 50%. They all had a history of 15–50 years of PCB contamination with a mixture of Aroclor 1248, 1254 and 1260 (10–50 ppm). Aroclor 1260 representing more than 50% of total PCBs and PCBs were the sole contaminants. These soil samples represent the top 10 cm of the soil. The pristine soil (NC) was collected in summer 2002 from the top 10 cm of a garden soil in Montreal (Quebec, Canada). It was also stored in a tightly capped glass bottle at 4°C.

#### Molecular Biology Protocols

DNA was extracted from soil according to the protocol described by Cho et al. [1996], except that the final DNA preparation was further purified by agarose gel electrophoresis. DNA fragments were PCR amplified from DNA extracted from soil or from genomic DNA extracted from individual bacterial strains [Sambrook et al., 1989]. Forward primer 1, 5' GGC TGG GCC TAC GAC ANC GC 3' which starts at position corresponding to bp 370 of LB400 *bphA* was used in combination with either one of the three reverse primer 2, 5' ADV CCS CGB GCC GCB TCH TCG 3', primer 3, 5' CRT CGT CCT GMT CRA AVA CRC C 3', or primer 4, 5' TT GAG SGY VKC CCA GYB VGG 3', which start at positions corresponding to bp 1322, 1165, and 1373, respectively, of LB400 *bphA*. Each pair of PCR primers, 1 and 2, 1 and 3 or 1 and 4 were used to PCR-amplify DNA extracted from soil or from genomic DNA of cultured bacteria. The PCR conditions which were optimal to amplify DNA from all isolates and soil DNA were as follows: The 5-min denaturation period at 95°C was followed by a touchdown sequence from 68 to 58°C and then by 30 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 58°C, 1 min at 72°C followed by 10 min at 72°C. Expand high fidelity DNA polymerase was used under

the conditions recommended by Roche Diagnostics, Canada. Each of the three pairs of primers generated a PCR product from each of the 5 soils. The three PCR products deriving from each soil were then pooled together and the PCR band corresponding to the expected size was purified. The purified PCR products were cloned blunt end into pGEM-T or pUC19 and sequenced using M13 universal primers. DNA was sequenced at the Genome Quebec DNA Sequencing Center (Montreal, Quebec, Canada). The partial sequences of *bphA* amplified from cultured bacteria and uncultured soil bacteria are available under the GenBank accession numbers EF596913 to EF596936.

Sequence similarity searches were performed with the BLAST algorithm and databases available from NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). DNA and protein alignments were performed with the Clone Manager and Align software from Scientific and Education Software Version 4.1 (Cary, NC 27513 USA) and with ClustalW. Phylogenetic trees were obtained with MEGA software version 3.1 (<http://www.megasoftware.net/>). Neighbor-joining method with the p-distance model and pairwise deletion of gaps/missing data were applied. Trees were constructed from a total of 1,000 bootstrap trees generated for each data set.

Structural modeling of LB400 BphAE was performed using the interactive JIGSAW structural modeling software of the UK Cancer Research Institute (<http://www.bmm.icnet.uk/servers/3djigsaw/>) and using the crystal structure of *Rhodococcus* sp. RHA1 BphA1 as template.

#### Acknowledgement

This work was supported by the Natural Science and Engineering Research Council of Canada grant number 0039579.

#### References

- Ahmad D, Masse R, Sylvestre M: Cloning and expression of genes involved in 4-chlorobiphenyl transformation by *Pseudomonas testasteroni*: homology to polychlorobiphenyl-degrading genes in other bacteria. *Gene* 1990;86:53–61.
- Asturias JA, Diaz E, Timmis KN: The evolutionary relationship of biphenyl dioxygenase from gram-positive *Rhodococcus globerulus* P6 to multicomponent dioxygenases from gram-negative bacteria. *Gene* 1995;156:11–18.
- Barriault D, Lepine F, Mohammadi M, Milot S, Leberre N, Sylvestre M: Revisiting the regio-specificity of *Burkholderia xenovorans* LB400 biphenyl dioxygenase toward 2,2'-dichlorobiphenyl and 2,3,2',3'-tetrachlorobiphenyl. *J Biol Chem* 2004;279:47489–47496.
- Barriault D, Plante MM, Sylvestre M: Family shuffling of a targeted *bphA* region to engineer biphenyl dioxygenase. *J Bacteriol* 2002; 184:3794–3800.
- Barriault D, Sylvestre M: Evolution of the biphenyl dioxygenase BphA from *Burkholderia xenovorans* LB400 by random mutagenesis of multiple sites in region III. *J Biol Chem* 2004;279:47480–47488.
- Bedard DL, Unterman R, Bopp LH, Brennan MJ, Haberl ML, Johnson C: Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade polychlorinated biphenyls. *Appl Environ Microbiol* 1986; 51:761–768.
- Bedard DL, Wagner RE, Brennan MJ, Haberl ML, Brown JF Jr: Extensive degradation of Aroclors and environmentally transformed polychlorinated biphenyls by *Alcaligenes eutrophus* H850. *Appl Environ Microbiol* 1987; 53:1094–1102.
- Bergeron J, Ahmad D, Barriault D, Larose A, Sylvestre M, Powlowski J: Identification and mapping of the gene translation products involved in the first steps of the *Comamonas testasteroni* B-356 biphenyl/chlorobiphenyl biodegradation pathway. *Can J Microbiol* 1994;40:743–753.
- Chebrou H, Hurtubise Y, Barriault D, Sylvestre M: Heterologous expression and characterization of the purified oxygenase component of *Rhodococcus globerulus* P6 biphenyl dioxygenase and of chimeras derived from it. *J Bacteriol* 1999;181:4805–4811.
- Cho JC, Lee DH, Cho YC, Cho JC, Kim SJ: Direct extraction of Dna from soil for amplification of 16S RNA gene sequences by polymerase chain reaction. *J Microbiol* 1996;34:229–235.
- Coenye T, Falsen E, Hoste B, Ohlen M, Goris J, Govan JR, et al: Description of *Pandoraea* gen. nov. with *Pandoraea apista* sp. nov., *Pandoraea pulmonicola* sp. nov., *Pandoraea pnomenusa* sp. nov., *Pandoraea sputorum* sp. nov. and *Pandoraea norimbergensis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2000;50 Pt 2: 887–899.
- Ducrocq V, Pandard P, HallierSoulie S, Thybaud E, Truffaut N: The use of quantitative PCR, plant and earthworm bioassays, plating and chemical analysis to monitor 4-chlorobiphenyl biodegradation in soil microcosms. *Appl Soil Ecol* 1999;12:15–27.

- Erickson BD, Mondello FJ: Nucleotide sequencing and transcriptional mapping of the genes encoding biphenyl dioxygenase, a multi-component polychlorinated-biphenyl-degrading enzyme in *Pseudomonas* strain LB400. *J Bacteriol* 1992;174:2903-2912.
- Fukuda M, Yasukochi Y, Kikuchi Y, Nagata Y, Kimbara K, Horiuchi H, et al: Identification of the *bphA* and *bphB* genes of *Pseudomonas* sp. strain KKS102 involved in degradation of biphenyl and polychlorinated biphenyls. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;202:850-856.
- Furukawa K: 'Super bugs' for bioremediation. *Trends Biotechnol* 2003;21:187-190.
- Furukawa K, Matsumura F, Tonomura K: *Alcaligenes* and *Acinetobacter* strains capable of degrading polychlorinated biphenyls. *Agric Biol Chem* 1978;42:543-548.
- Furukawa K, Miyazaki T: cloning of a gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *J Bacteriol* 1986;166:392-398.
- Furusawa Y, Nagarajan V, Tanokura M, Masai E, Fukuda M, Senda T: Crystal structure of the terminal oxygenase component of biphenyl dioxygenase derived from *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *J Mol Biol* 2004;342:1041-1052.
- Goris J, De Vos P, Caballero-Mellado J, Park J, Falsen E, Quensen JF 3rd, et al: Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400T and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54:1677-1681.
- Guilbeault B, Sondossi M, Ahmad D, Sylvestre M: Factors affecting the enhancement of PCB degradative ability of soil microbial populations. *Int Biodet Biodeg* 1994;33:73-91.
- Haddock JD, Gibson DT: Purification and characterization of the oxygenase component of biphenyl 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain LB400. *J Bacteriol* 1995;177:5834-5839.
- Haddock JD, Horton JR, Gibson DT: Dihydroxylation and dechlorination of chlorinated biphenyls by purified biphenyl 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain LB400. *J Bacteriol* 1995;177:20-26.
- Hiraoka Y, Kimbara K: Rapid assessment of the physiological status of the polychlorinated biphenyl degrader *Comamonas testosteroni* TK102 by flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:2031-2035.
- Hurtubise Y, Barriault D, Powlowski J, Sylvestre M: Purification and characterization of the *Comamonas testosteroni* B-356 biphenyl dioxygenase components. *J Bacteriol* 1995;177:6610-6618.
- Hurtubise Y, Barriault D, Sylvestre M: Characterization of active recombinant his-tagged oxygenase component of *Comamonas testosteroni* B-356 biphenyl dioxygenase. *J Biol Chem* 1996;271:8152-8156.
- Kahl S, Hofer B: A genetic system for the rapid isolation of aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase activities. *Microbiology SGM* 2003;149:1475-1481.
- Kimbara K, Hashimoto T, Fukuda M, Koana T, Takagi M, Oishi M, et al: Cloning and sequencing of two tandem genes involved in degradation of 2,3-dihydroxybiphenyl to benzoic acid in the polychlorinated biphenyl-degrading soil bacterium *Pseudomonas* sp. strain KKS102. *J Bacteriol* 1989;171:2740-2747.
- Kumamaru T, Suenaga H, Mitsuoka M, Watanabe T, Furukawa K: Enhanced degradation of polychlorinated biphenyls by directed evolution of biphenyl dioxygenase. *Nat Biotechnol* 1998;16:663-666.
- Leigh MB, Prouzova P, Mackova M, Macek T, Nagle DP, Fletcher JS: Polychlorinated biphenyl (PCB)-degrading bacteria associated with trees in a PCB-contaminated site. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:2331-2342.
- Masai E, Yamada A, Healy JM, Hatta T, Kimbara K, Fukuda M, Yano K: Characterization of biphenyl catabolic genes of gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:2079-2085.
- Massé R, Messier F, Pélouin L, Ayotte C, Sylvestre M: Microbial biodegradation of 4-chlorobiphenyl, a model compound of chlorinated biphenyls. *Appl Environ Microbiol* 1984;47:947-951.
- Merlin C, Springael D, Mergeay M, Toussaint A: Organisation of the *bph* gene cluster of transposon Tn4371, encoding enzymes for the degradation of biphenyl and 4-chlorobiphenyl compounds. *Mol Gen Genet* 1997;253:499-506.
- Misawa N, Nakamura R, Kagiya Y, Ikenaga H, Furukawa K, Shindo K: Synthesis of vicinal diols from various arenes with a heterocyclic, amino or carboxyl group by using recombinant *Escherichia coli* cells expressing evolved biphenyl dioxygenase and dihydrodiol dehydrogenase genes. *Tetrahedron* 2005;61:195-204.
- Misawa N, Shindo K, Takahashi H, Suenaga H, Iguchi K, Okazaki H, et al: Hydroxylation of various molecules including heterocyclic aromatics using recombinant *Escherichia coli* cells expressing modified biphenyl dioxygenase genes. *Tetrahedron* 2002;58:9605-9612.
- Mohammadi M, Sylvestre M: Resolving the profile of metabolites generated during oxidation of dibenzofuran and chlorodibenzofurans by the biphenyl catabolic pathway enzymes. *Chem Biol* 2005;12:835-846.
- Mondello FJ, Turcich MP, Lobos JH, Erickson BD: Identification and modification of biphenyl dioxygenase sequences that determine the specificity of polychlorinated biphenyl degradation. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:3096-3103.
- Parsons JR, Sijm DTHM, van Laar A, Hutzinger O: Biodegradation of chlorinated biphenyls and benzoic acids by a *Pseudomonas* strain. *Appl Microbiol Biotechnol* 1988;29:81-84.
- Pieper DH: Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005;67:170-191.
- Resnick SM, Gibson DT: Oxidation of 6,7-dihydro-5H-benzocycloheptene by bacterial strains expressing naphthalene dioxygenase, biphenyl dioxygenase, and toluene dioxygenase yields homochiral mono or *cis*-diol enantiomers as major products. *Appl Environ Microbiol* 1996;62:1364-1368.
- Resnick SM, Lee K, Gibson DT: Diverse reactions catalyzed by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp strain NCIB 9816. *J Indust Microbiol Biotech* 1996;17:438-457.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, ed 2. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Sayler GS, Shon M, Cowell RR: Growth of an estuarine *Pseudomonas* sp. on polychlorinated biphenyl. *Microb Ecol* 1977;3:241-255.
- Seeger M, Camara B, Hofer B: Dehalogenation, denitration, dehydroxylation, and angular attack on substituted biphenyls and related compounds by a biphenyl dioxygenase. *J Bacteriol* 2001;183:3548-3555.
- Seeger M, Gonzalez M, Camara B, Munoz L, Ponce E, Mejias L, et al: Biotransformation of natural and synthetic isoflavonoids by two recombinant microbial enzymes. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:5045-5050.
- Shindo K, Nakamura R, Osawa A, Kagami O, Kanoh K, Furukawa K, et al: Biocatalytic synthesis of monocyclic arene-dihydrodiols and -diols by *Escherichia coli* cells expressing hybrid toluene/biphenyl dioxygenase and dihydrodiol dehydrogenase genes. *J Mol Cat [B]* 2005;35:134-141.
- Suenaga H, Nishi A, Watanabe T, Sakai M, Furukawa K: Engineering a hybrid pseudomonad to acquire 3,4-dioxygenase activity for polychlorinated biphenyls. *J Bioscience Bioeng* 1999;87:430-435.
- Suenaga H, Watanabe T, Sato M, Ngadiman, Furukawa K: Alteration of regioselectivity in biphenyl dioxygenase by active-site engineering. *J Bacteriol* 2002;184:3682-3688.
- Sylvestre M: Genetically modified organisms to remediate polychlorinated biphenyls. Where do we stand? *Int Biodet Biodeg* 2004;54:153-162.
- Sylvestre M, Fauteux J: A new facultative anaerobe capable of growth on chlorobiphenyls. *J Gen Appl Microbiol* 1982;28:61-72.
- Sylvestre M, Sirois M, Hurtubise Y, Bergeron J, Ahmad D, Shareck F, et al: Sequencing of *Comamonas testosteroni* strain B-356-biphenyl/chlorobiphenyl dioxygenase genes: evolutionary relationships among Gram-negative bacterial biphenyl dioxygenases. *Gene* 1996;174:195-202.

- Taira K, Hirose J, Hayashida S, Furukawa K: Analysis of *bph* operon from the polychlorinated biphenyl-degrading strain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *J Biol Chem* 1992;267:4844–4853.
- Tamaoka J, Ha D-M, Komagata K: Reclassification of *Pseudomonas acidovorans* den Dooren de Jong 1926 and *Pseudomonas testosteroni* Marcus and Talalay 1956 as *Comamonas acidovorans* comb. nov. and *Comamonas testosteroni* comb. nov., with an emended description of the genus *Comamonas*. *Int J Syst Bacteriol* 1987;37:52–59.
- Taylor PM, Medd JM, Schoenborn L, Hodgson B, Janssen PH: Detection of known and novel genes encoding aromatic ring-hydroxylating dioxygenases in soils and in aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2002;216:61–66.
- Vézina J, Barriault D, Sylvestre M: Family shuffling of soil DNA to change the regiospecificity of *Burkholderia xenovorans* LB400 biphenyl dioxygenase. *J Bacteriol* 2007;189:779–788.
- Witzig R, Junca H, Hecht HJ, Pieper DH: Assessment of toluene/biphenyl dioxygenase gene diversity in benzene-polluted soils: links between benzene biodegradation and genes similar to those encoding isopropylbenzene dioxygenases. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:3504–3514.
- Zielinski M, Kahl S, Hecht HJ, Hofer B: Pinpointing biphenyl dioxygenase residues that are crucial for substrate interaction. *J Bacteriol* 2003;185:6976–6980.
- Zielinski M, Kahl S, Standfuss-Gabisch C, Camara B, Seeger M, Hofer B: Generation of novel-substrate-accepting biphenyl dioxygenases through segmental random mutagenesis and identification of residues involved in enzyme specificity. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:2191–2199.



## Appendice B

VÉZINA J, D. Barriault et M. Sylvestre. 2007. Family shuffling of soil DNA to change the regiospecificity of *Bulkholderia xenovorans* LB400 biphenyl dioxygenase. *Journal of Bacteriology* , vol. 189, no. 3, p. 779-788.

## Family Shuffling of Soil DNA To Change the Regiospecificity of *Burkholderia xenovorans* LB400 Biphenyl Dioxygenase<sup>∇</sup>

Julie Vézina, Diane Barriault, and Michel Sylvestre\*

Institut national de la recherche scientifique (INRS-Institut Armand-Frappier),  
245 Boul. Hymus, Pointe-Claire, Québec, Canada H9R 1G6

Received 11 August 2006/Accepted 15 November 2006

Previous work has shown that the C-terminal portion of BphA, especially two amino acid segments designated region III and region IV, influence the regiospecificity of the biphenyl dioxygenase (BPDO) toward 2,2'-dichlorobiphenyl (2,2'-CB). In this work, we evolved BPDO by shuffling *bphA* genes amplified from polychlorinated biphenyl-contaminated soil DNA. Sets of approximately 1-kb DNA fragments were amplified with degenerate primers designed to amplify the C-terminal portion of *bphA*. These fragments were shuffled, and the resulting library was used to replace the corresponding fragment of *Burkholderia xenovorans* LB400 *bphA*. Variants were screened for their ability to oxygenate 2,2'-CB onto carbons 5 and 6, which are positions that LB400 BPDO is unable to attack. Variants S100, S149, and S151 were obtained and exhibited this feature. Variant S100 BPDO produced exclusively *cis*-5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphenyl from 2,2'-CB. Moreover, unlike LB400 BPDO, S100 BphA catalyzed the oxygenation of 2,2',3,3'-tetrachlorobiphenyl onto carbons 5 and 6 exclusively and it was unable to oxygenate 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl. Based on oxygen consumption measurements, variant S100 oxygenated 2,2'-CB at a rate of  $16 \pm 1$  nmol min<sup>-1</sup> per nmol enzyme, which was similar to the value observed for LB400 BPDO. *cis*-5,6-Dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphenyl was further oxidized by 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphenyl dehydrogenase (BphB) and 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase (BphC). Variant S100 was, in addition, able to oxygenate benzene, toluene, and ethyl benzene. Sequence analysis identified amino acid residues M<sup>237</sup>S<sup>238</sup> and S<sup>283</sup> outside regions III and IV that influence the activity toward doubly *ortho*-substituted chlorobiphenyls.

Biphenyl dioxygenase (BPDO) catalyzes the first reaction of the biphenyl catabolic pathway. BPDO is of particular interest because of its potential application as biocatalyst to oxygenate polychlorinated biphenyls (PCBs) and also to manufacture fine chemicals. BPDO comprises three components: the iron-sulfur oxygenase (BphAE) made up of  $\alpha$  (BphA;  $M_r = 51,000$ ) and  $\beta$  (BphE;  $M_r = 22,000$ ) subunits, the ferredoxin (BphF;  $M_r = 12,000$ ), and the ferredoxin reductase (BphG;  $M_r = 43,000$ ) (15, 17). The encoding genes for *Burkholderia xenovorans* LB400 (10, 13), which is the best PCB degrader of natural origin, are *bphA* (BphAE  $\alpha$  subunit), *bphE* (BphAE  $\beta$  subunit), *bphF* (BphF), and *bphG* (BphG). BPDO catalyzes a 2,3-dihydroxylation of biphenyl (15) (Fig. 1). The turnover rate of reaction as well as the specificity and regiospecificity toward substrate analogs are crucial for its application as biocatalyst. The C-terminal portion of BphAE  $\alpha$  subunit is involved in substrate specificity and regiospecificity toward substrate analogs (11, 33). Identification of the amino acid residues that are critical to determine the substrate specificity and regiospecificity and their mechanism of action will help design strategies to engineer new, higher performing enzymes. Several investigations using site-directed mutagenesis, and molecular evolution approaches have allowed the identification of amino acids that are critical for the enzyme specificity and regiospecificity toward chlorobiphenyls (11, 33). Of particular interest is a seg-

ment of seven amino acid residues called region III (3, 5, 24). The sequence of amino acids for region III of *B. xenovorans* LB400 BphA is T<sup>335</sup>F<sup>336</sup>N<sup>337</sup>N<sup>338</sup>I<sup>339</sup>R<sup>340</sup>T<sup>341</sup> (24). Besides region III amino acids, other residues, among which are residues Asn<sup>377</sup>Phe<sup>378</sup> (also called region IV) of LB400 BphA (24, 30, 32) as well as Phe<sup>384</sup> (36) and Gln<sup>255</sup>, Ile<sup>258</sup>, and Ala<sup>268</sup> (29), were also found to influence the catalytic properties of the dioxygenase. Furthermore, structural analysis of *Rhodococcus* sp. strain RHA1 BphA1A2 (corresponding to BphAE of LB400) (12) and comparison with other aryl hydroxylating dioxygenases has confirmed the fact that some of the residues listed above are near the substrate inside the catalytic pocket and thus likely to interact with it to determine the specificity and regiospecificity. However, other residues that according to a model based on the structure of the naphthalene dioxygenase were not in direct contact with the substrate were also found to influence the enzyme specificity and regiospecificity (36).

LB400 BPDO is among the few BPDOs that oxygenate the doubly *ortho*-substituted congener 2,2'-dichlorobiphenyl (2,2'-CB). The oxygenation occurs principally on the vicinal *ortho-meta* carbons 2 and 3 (3, 16). For many years, 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphenyl was believed to be the minor metabolite generated when LB400 BPDO catalyzed the oxygenation of 2,2'-CB. However, it was recently shown that LB400 BphAE produced *cis*-3,4-dihydro-3,4-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphenyl as a minor metabolite and that 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphenyl was not generated by this reaction (3). Saturation mutagenesis of region III amino acids generated variant BphAEs with extended PCB-degrading potency (5). Many of these variants had changed their regiospecificity toward 2,2'-CB to oxygenate principally the vicinal *meta-*

\* Corresponding author. Mailing address: Institut national de la recherche scientifique (INRS-Institut Armand-Frappier), 245 Boul. Hymus, Pointe-Claire, Québec, Canada H9R 1G6. Phone: (514) 630-8829. Fax: (514) 630-8850. E-mail: Michel.Sylvestre@iaf.inrs.ca.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 1 December 2006.

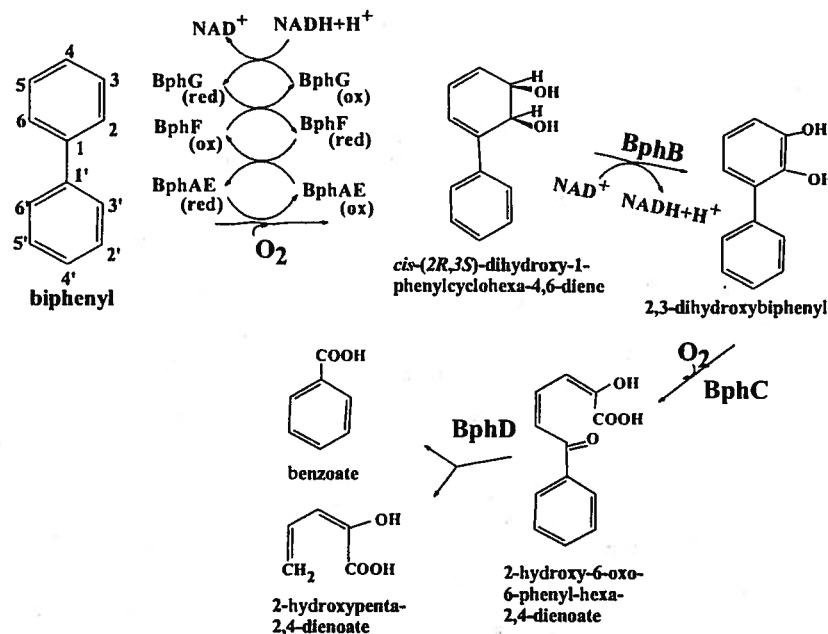


FIG. 1. The biphenyl catabolic pathway of *B. xenovorans* LB400, showing the three components of LB400 BPDO.

*para* carbons 3 and 4 instead of carbons 2 and 3 (3, 5), and none of them catalyzed vicinal *ortho-meta* carbons 5 and 6. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 produced a BPDO presumed to catalyze a 5,6-dioxygenation of 2,2'-CB (28, 32). However, the catalytic activity of KF707 BPDO toward this congener and other *ortho*-substituted chlorobiphenyls is poor (32). Furthermore, the identity of the dihydrodiol metabolite produced from 2,2'-CB has only been deduced by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis (32) and further analyses are needed to assess its identity as 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphenyl.

Natural diversity of homologous genes retains principally the beneficial mutations through natural selection. It is therefore far more conservative, functionally and structurally, than random mutations. This explains why family shuffling of homologous genes generates libraries that comprise a high proportion of active clones covering a large array of the sequence space (8, 27). However, family shuffling is limited to the genes available in databanks that were cloned from cultivable bacteria. On the other hand, it has been estimated that only 1% of the soil microorganisms can be cultured (2). The size of the population that contributes to the diversity of natural genes in the environment is therefore considerably bigger than the one that is accessible from cultivated bacteria (34). Given these premises, in order to increase the diversity of the library of chimeric genes generated from family shuffling, we have designed a strategy that uses soil DNA to evolve *bphA*. Amplifying a whole gene from soil microbial populations is not feasible because conserved sequences are required to design the degenerate primers used for the polymerase reaction, and these are not usually located at the extremities of genes. Therefore, we chose to amplify from soil DNA a segment of the *bphA* C-terminal portion that, based on the crystal structure of *Rhodococcus* sp. strain RHA1 BphA1 (12), comprised the res-

idues that are lining the BphAE catalytic site. The resulting bank of amplified DNA fragments was shuffled to generate a library of hybrid fragments that was used to replace the corresponding portion of LB400 *bphA*.

As mentioned above, in previous investigations (3, 4, 5) we have examined the effect of altering the region III amino acid pattern on the catalytic activity towards *ortho*-substituted chlorobiphenyls. None of the numerous variants obtained in the course of these investigations was able to catalyze a 5,6-dioxygenation of *ortho*-chlorinated congeners. This suggested that other residues influence the capacity to bind and orient these congeners inside the catalytic pocket. In this regard, the purpose of this work was to isolate from the environment new sets of amino acid combinations of the C-terminal portion of BphA that would allow the resulting BphAE enzymes to catalyze an efficient dioxygenation of 2,2'-CB onto carbons 5 and 6. We anticipated that such variants would oxygenate efficiently onto carbons 5 and 6 and other congeners, such as 2,2',3,3'-tetrachlorobiphenyl, which are oxygenated principally onto carbons 4 and 5 by LB400 BPDO (5). Therefore, we have also examined the catalytic properties of these variants towards 2,2',3,3'-CB and towards other biphenyl analogs.

#### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, plasmids, chemicals, and general protocols.** *Escherichia coli* DH11S (20) and C41(DE3) (22) (Statagene, La Jolla, CA) were used in this study. Plasmids pQE31[LB400 *bphAE*], pDB31[LB400 *bphFG*], and pDB31[LB400 *bphFGBC*] were described previously (3, 4, 5). DNA protocols were done according to Sambrook et al. (26). DNA was extracted from soil according to the protocol described by Cho et al. (7), except that the final DNA preparation was further purified by agarose gel electrophoresis. DNA was sequenced at the Genome Quebec DNA Sequencing Center (Montreal, Quebec, Canada). The chlorobiphenyls (>99% pure) used in this work were from AccuStandard (New Haven, CT). Benzene, toluene, and ethyl benzene were from Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI).

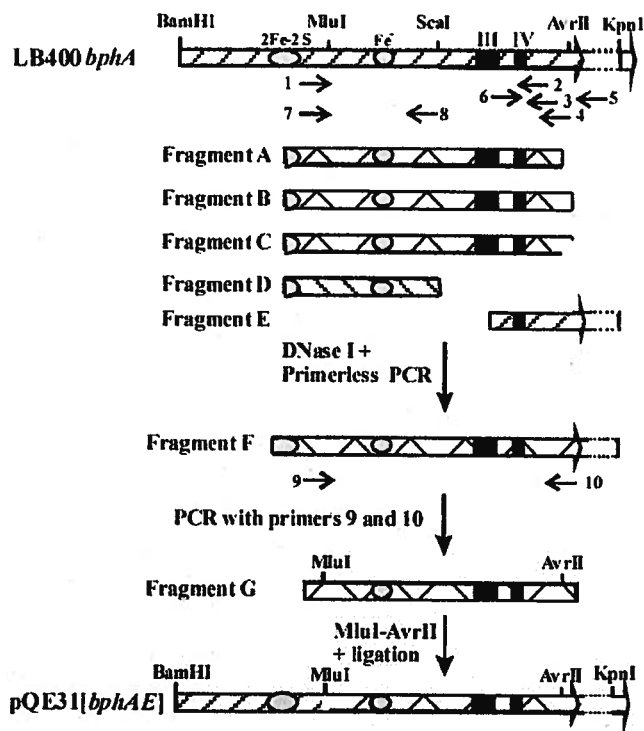


FIG. 2. Strategy used to shuffle soil DNA with LB400 *bphA*. LB400 *bphA* is drawn at the top, showing the positions of regions III and IV, the Rieske cluster, and the mononuclear iron. Degenerate primers (small arrows) 1, 2, 3, and 4 were used to amplify fragments A, B, and C from soil DNA. These fragments were shuffled with D and E amplified, respectively, from B-356 *bphA* with primers 7 and 8 and from LB400 *bphAE* with primers 5 and 6. The resulting library of 864-bp MluI-AvrII fragments was used to replace the corresponding fragment in pQE31[LB400 *bphAE*]. The sequences of the primers are indicated in the text. The right-end side limit of *bphA* in pQE31[LB400 *bphAE*] is indicated by the large arrowhead.

**Strategy to shuffle soil DNA.** The strategy to evolve LB400 *bphA* is depicted in Fig. 2. DNA extracted from PCB-contaminated soils was PCR amplified with degenerate primers designed to amplify the C-terminal portion of *bphA*. The resulting DNA was evolved by one round of shuffling to generate a library of DNA fragments that was used to replace the corresponding portion of LB400 *bphA*. Contaminated soils G7, G8, and G9 used in this study were described previously (14).

In a first series of experiments, sets of primers were designed to recover an optimal representation of *bphA* from soil DNA. Based on sequence alignment of *bphA* genes, four degenerate primers (one forward and three reverse) were designed. These four primers could potentially amplify three DNA fragments, A, B, and C, from *bphA*. Forward primer 1 (5' GGC TGG GCC TAC GAC ANC GC 3') started at a position corresponding to bp 370 of LB400 *bphA*; reverse primers 2 (5' ADV CCS CGB GCC GCB TCH TCG 3'), 3 (5'-CRT CGT CCT GMT CRA AVA CRC C 3'), and 4 (5' TT GAG SGY VKC CCA GYB VGG 3') started at positions corresponding to bp 1322, 1165, and 1373, respectively, of LB400 *bphA*. These primers were tested to amplify ten homologous *bphA* genes from our collection plus the DNA extracted from each of the soils, G7, G8, and G9. As shown in Table 1, a fragment of expected size was amplified from all of the ten homologous genes tested with at least one of the three possible sets of primers. Furthermore, the three sets of primers amplified DNA fragments of expected sizes from each sample of soil DNA.

Based on these results, the DNA from each soil, G7, G8, and G9, was PCR amplified individually using a mixture of primers 1, 2, 3, and 4. Then, the DNA fragments amplified from each soil sample were combined. The resulting mixture of fragments was shuffled with fragments D and E, using the strategy shown in Fig. 2, which was designed to prevent self-hybridization of the parental LB400 *bphA*. Fragment D was amplified from *Comamonas testosteroni* B-356 *bphA*, and

fragment E was amplified from LB400 *bphA* (Fig. 2). The 525-bp fragment D was amplified with the set of forward and reverse primers 7 (5' GGC TGG GCC TAC GAC ATC GC 3') and 8 (5' CTT GCG TCC AGT ACT GTG TGA 3'). The 447-bp fragment E was amplified with primers 5 (5' GTG GTC CTG CAA CTT TAT CC 3') and 6 (5'-CAA TGA AAT CGA GGT GTG GG 3'). Neither fragments D nor E encoded the portion of BphA corresponding to the fragment comprised between residues E<sup>298</sup> and P<sup>347</sup> of LB400 BphA. Therefore, this segment of the library of evolved proteins could only be encoded by DNA amplified from soil. The combined DNA fragments amplified from soil plus fragments D and E were digested with DNase I to prepare the 50- to 100-bp fragments for DNA shuffling according to the method of Zhao and Arnold (35). Expand high-fidelity DNA polymerase was used for the primerless PCR step. Conditions were as recommended by Roche Diagnostics Canada except that the program was as follows for 60 cycles: 94°C for 45 s, 42°C for 1 min, and 72°C for 1 min followed by a 10-min period at 72°C. The approximately 1-kb fragment F obtained from the primerless PCR was amplified with the inner primers 9 (5' CTG GGG GCC GTT GCA GGC AC 3') and 10 (5' TTG AGC GTG GCC CAC CTA 3'). Expand high-fidelity DNA polymerase was used under the conditions recommended by Roche Diagnostics Canada. The resulting 903-bp fragment G was digested with MluI and AvrII to replace the corresponding 864-bp fragment in pQE31[LB400 *bphAE*]. This library of plasmids was transformed into *E. coli* DH11S(pDB31[*bphFGBC*]) or *E. coli* DH11S(pDB31[*bphFGB*]), and the clones were screened for their capacity to transform 2,2'-CB into a yellow or pinkish metabolite as described previously (3).

**Site-directed mutagenesis.** Site-directed mutagenesis of variant S100 *bphA* to change positions M<sup>237</sup>S<sup>238</sup> → T<sup>237</sup>T<sup>238</sup>, L<sup>283</sup> → S<sup>283</sup>, F<sup>370</sup> → Y<sup>370</sup>, and T<sup>377</sup> → N<sup>377</sup> were performed using a two-step mutagenesis protocol similar to the one described for saturation mutagenesis of *bphA* (23). For each mutant, as the first step, the right-end side of S100 *bphA* was amplified using forward primers F100-237-38 (5' GGCACCACGACGCACCTGTCC 3'), F100-283 (5' ATGAG CCGGGCTCACTCATGGCGGTAATG 3'), F100-370 (5' ATCAAGGAAGA ATATCGTCGGCAC 3'), and F100-377 (5' CACAACATCCGCAACTTCTCT CGAG 3') individually, in conjunction with the reverse primer 2059R (5' GGATCCCCTAGAAGAACATGCT 3') (23); for the second step, the left-end side of S100 *bphA* was amplified using reverse primers R100-237-238 (5' GGACAGGTGCGTCGTGGTGCC 3'), R100-283 (5' TTACCCCATGAGT GAGCCCGGCTCATC 3'), R100-370 (5' GTGCCGACGATATTTCTTCTTG 3'), and R100-377 (5' CCTGCAGAGAAGTTGCGGATGTTGTG 3'), in conjunction with the forward primer 1F (5' CGGGATCCGATGAGTTCAGCA ATCA 3') (23). All other steps to assemble the two fragments and to subclone the 864-bp MluI-AvrII fragment into pQE31[LB400 *bphAE*] were performed exactly as described previously (23).

**Assays to examine the catalytic activity of *E. coli* cells with BphAE expression variants.** The identities and amounts of metabolites produced from chlorobiphenyls or other biphenyl analogs by resting cell suspensions of isopropyl-β-D-

TABLE 1. Ability of degenerate primers to PCR amplify a segment of *bphA* from indicated strain or soil DNA

PCB-degrading strain or contaminated soil (reference)	Degenerate primers <sup>a</sup>		
	1 and 2	1 and 3	1 and 4
<i>C. testosteroni</i> B-356 (1)	+	+	ND
<i>B. xenovorans</i>			
LB400 (1)	+	-	ND
B-206 (1)	-	+	+
<i>Bacillus</i> sp. strain B-257 (1)			
	-	+	ND
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> B-357 (1)	+	-	ND
<i>Pseudomonas</i> sp.			
B-218 (1)	-	-	+
YT-01 (1)	+	-	+
<i>Ralstonia eutropha</i> H850 (1)	+	-	ND
<i>Corynebacterium</i> sp. strain MB-1 (1)	+	-	ND
<i>Pseudomonas</i> sp. strain P2 (25)	-	-	+
Soil G7 (14)	+	+	+
G8 (14)	+	+	+
G9 (14)	+	+	+

<sup>a</sup> See text for the bp sequence of each primer. +, presence of a DNA fragment of expected size; -, no DNA fragment of expected size; ND, not determined.

thiogalactopyranoside (IPTG)-induced *E. coli*(pDB31[*bphFG*])(pQE31[LB400 *bphAE*]), *E. coli*(pDB31[*bphFG*])(pQE31[S100 *bphAE*]), *E. coli*(pDB31[*bphFG*])(pQE31[S149 *bphAE*]), or *E. coli*(pDB31[*bphFG*])(pQE31[S151 *bphAE*]) and by *E. coli* carrying pDB31[*bphFG*] plus one of the variants M<sup>237</sup>S<sup>238</sup> → T<sup>237</sup>T<sup>238</sup>, L<sup>283</sup> → S<sup>283</sup>, F<sup>370</sup> → Y<sup>370</sup>, or T<sup>377</sup> → N<sup>377</sup> of pQE31[S100 *bphAE*] were evaluated using previously described procedures (3, 4) to grow the cell and to quantify and analyze the metabolites by GC-MS after derivatization with *n*-butyl boronate (*n*BuB) or *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) to produce the trimethylsilyl (TMS) derivatives.

Assays to examine the catalytic activity of His tag-purified BphAE variants. The catalytic activity of variant BphAEs toward chlorobiphenyls or benzene, toluene, or ethyl benzene was evaluated using BPDOS reconstituted from His-tagged purified components. Each enzyme component was produced in *E. coli* C41(DE3) expressing the encoding gene from pET-14b (Novagen, Madison, WI), following previously published procedures (23). Plasmids pET-14b *bphAE* S100, S149, S151, and II-9 were constructed by subcloning the 2,079-bp BamHI-HindIII DNA fragment from each of the pQE31 S100, S149, S151, and II-9 *bphAE* plasmids. The enzyme purification was performed according to previously described protocols for LB400 and RR41 BphAE (23).

The enzyme assays to examine the catalytic activities toward chlorobiphenyls were performed in 50 mM morpholineethanesulfonic (MES) buffer (pH 6.1, 37°C) as described previously (17). The metabolites were extracted from the reaction vial and analyzed by GC-MS after derivatization with *n*BuB or BSTFA according to previously described protocols (3, 23). Catalytic activities were quantified according to protocols described previously from the measurement of substrate depletion (18) or from the sum of the area of the peaks of metabolites (3) recorded by GC-MS analysis. In some cases, the catalytic activity was evaluated by recording the oxygen consumption rates using a Clarke-type Hansatech model DW1 oxygraph (19). In this case, the assay conditions were as above, except that the pH of the 50 mM MES buffer was adjusted to 5.5.

The activities toward benzene, toluene, and ethyl benzene were evaluated in a coupled reaction by measuring the production of their *meta* cleavage metabolite at the optimal wavelengths of absorption, which were found to be, respectively, 375 nm, 389 nm, and 398 nm for the *meta* cleavage metabolites derived from benzene, toluene, and ethyl benzene.

Isolation and characterization of 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphenyl. 5,6-Dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphenyl was produced from a resting cell suspension of IPTG-induced *E. coli*(pDB31[*bphFG*])(pQE31[S100 *bphAE*]). It was extracted with ethyl acetate and purified by high-performance liquid chromatography (HPLC). The ethyl acetate extract was evaporated under a stream of nitrogen and the residues were dissolved in a mixture of water-methanol-acetonitrile (50:25:25, vol/vol). The solution was injected onto an analytical Eclipse XDB-C8 reverse-phase column (4.6 mm by 150 mm). The column was equilibrated with water-methanol-acetonitrile (50:25:25). The compound was eluted using the same solvent mixture at 1 ml/min. The Agilent model 1314 variable wavelength detector was set at 276 nm, which was previously determined to be the maximal wavelength of the dihydro-dihydroxy-dichlorobiphenyl metabolite of 2,2'-CB (16). Under these conditions, 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphenyl eluted as a single peak. The peak of the metabolite was collected, the solvent phase was evaporated under a stream of nitrogen, and the residual aqueous phase was extracted with ethyl acetate. The identity and purity of the metabolite was confirmed by GC-MS analyses of its butylboronate derivative (5, 21). Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were obtained at the NMR spectrometry center of INRS-Institut Armand-Frappier with a Bruker 500-MHz spectrometer. The analyses were carried out in deuterated acetonitrile at room temperature.

Metabolism of 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphenyl by biphenyl catabolic enzymes. Purified preparations of *B. xenovorans* LB400 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphenyl dehydrogenase (BphB) and 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase (BphC) were used to assess their ability to metabolize the 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphenyl. The procedures to produce these enzymes as His-tagged proteins by recombinant *E. coli* cells and to purify them have been described previously (3, 6). BphB assays using as substrate HPLC-purified 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphenyl were performed in 400- $\mu$ l 50 mM MES buffer, pH 7.0. The catalytic activity was measured by recording the substrate depletion by GC-MS analysis. The metabolites were extracted from the reaction vial with ethyl acetate at neutral pH and derivatized with *n*BuB or BSTFA for GC-MS analysis (3).

The ability of BphC to oxidize 5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphenyl was verified in a coupled reaction using His-tagged purified BphB plus His-tagged purified BphC and HPLC-purified 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphenyl as substrate. The activity was measured in 50 mM MES buffer, pH 7.0, containing 0.6 nmol BphB, 0.6 nmol His-tagged purified LB400 BphC, and 200  $\mu$ M NAD in

a final volume of 400  $\mu$ l. The enzyme activity was monitored by measuring substrate depletion by GC-MS analysis. For GC-MS analysis of the *meta* cleavage metabolites, the assay medium was acidified to pH 3.5, extracted with ethyl acetate, and treated with BSTFA.

Structural modeling of variant BphAEs. The interactive 3D-JIGSAW structural modeling software of the UK Cancer Research Institute (<http://www.bmm.icnet.uk/servers/3djigsaw/>) was used to model the structure of S100, S149, and S151 BphAEs using as template the crystal structure of *Rhodococcus* sp. strain RHA1 BphA1.

Nucleotide sequence accession numbers. The accession numbers for DNA sequences of S100, S149 and S151 *bphA* are respectively EF090937, EF090938 and EF090939.

## RESULTS

Screening of BphAE variants able to oxygenate 2,2'-CB onto carbons 5 and 6. A library of BphAE variants was prepared using the protocol shown in Fig. 2 and screened for their ability to transform 2,2'-CB to a yellow- or pinkish-colored metabolite. Among 1,200 *E. coli* DH11S(pDB31[*bphFGBC*])(pQE31[*bphAE*]) transformants, 20 were able to transform 2,2'-CB. Ten of those were sequenced (not shown). None of them were identical. Their MluI-AvrII fragment exhibited between 70 and 95% homology with the corresponding fragment of LB400 *bphA*. One of the variants (S100) produced a single dihydro-dihydroxy-2,2'-CB metabolite that exhibited a gas chromatographic retention time clearly distinct from that of *cis*-3,4-dihydro-3,4-dihydroxy-2,2'-CB (Table 2), which was previously identified as a major metabolite produced by the evolved *p4* BphAE (5). Two other variants (S149 and S151) that produced 2,3-dihydroxy-2'-dichlorobiphenyl as a major metabolite plus a small amount of this new metabolite were retained for further characterization.

The specific activity of the His-tagged purified preparations of S100, S149, and S151 BphAEs toward biphenyl was evaluated at 37°C and pH 5.5. Under these conditions, the initial rates of oxygen consumption were, respectively, 30.5  $\pm$  5, 84.9  $\pm$  2, 48.7  $\pm$  2, and 74.8  $\pm$  8 nmol<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> per nmol LB400, S100, S149, and S151 BphAE. Under the same conditions, when 2,2'-CB was the substrate, the oxygen consumption rates were, respectively, 16  $\pm$  1, 16  $\pm$  1, 16  $\pm$  1, and 13  $\pm$  1 nmol min<sup>-1</sup> per nmol of LB400, S100, S149, and S151 BphAE. Therefore, these variants oxygenated 2,2'-CB at rates comparable to that of LB400 BphAE.

The single metabolite produced from 2,2'-CB by S100 BphAE eluted as a single peak at 9.4 min in the HPLC system described in Materials and Methods. It exhibited a  $\lambda_{\max}$  at 262 nm. The compound could only be either 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphenyl or 4,5-dihydro-4,5-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphenyl. When the NMR spectrum was taken in deuterated acetonitrile, signals were detected at values between 7.30 and 7.40 ppm, which correspond to the four aromatic protons (*m*, H<sub>6'</sub>), (*m*, H<sub>5',4'</sub>), and (*m*, H<sub>3'</sub>) (Fig. 3). In the higher portion of the field, signals characteristic of aliphatic protons were recorded at 6.04 ppm (dd, H<sub>3</sub>), 6.02 ppm (dd, H<sub>4</sub>), 4.56 ppm (*m*, H<sub>5</sub>), and 4.27 ppm (dd, H<sub>6</sub>), in addition to the two hydroxylic protons at 3.25 ppm (d, H<sub>7</sub>) and 3.33 ppm (d, H<sub>8</sub>), respectively. H<sub>5</sub> was weakly coupled to H<sub>4</sub> (*J* = 2 Hz). The absence of correlation between the other vinyl proton (H<sub>3</sub>) and the methine protons (H<sub>5</sub> and H<sub>6</sub>) indicated that the two vinyl protons were vicinal. This excludes 4,5-dihydro-4,5-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphenyl as metabolite. H<sub>5</sub> was coupled

TABLE 2. Metabolites produced from *ortho*-substituted PCB congeners by variant dioxygenases

Congener	Metabolite	RT <sup>c</sup>	Activity relative to LB400 <sup>a</sup>			Ratio of metabolites produced <sup>b</sup>			
			S100	S149	S151	LB400	S100	S149	S151
2,2'-CB	2,3-Dihydroxy-2'-chlorobiphenyl	14.9	1	1	1	92 (6)	0.2 (0.2)	60 (1)	63 (5)
	5,6-Dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphenyl	16.3	—	—	—	—	99.8 (0.2)	23 (1)	18 (2)
	3,4-Dihydro-3,4-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphenyl	17.5	—	—	—	8 (1)	—	17 (1)	19 (2)
2,6-CB	3,4-Dihydro-3,4-dihydroxy-2',6'(or 2,6)-dichlorobiphenyl <sup>c</sup>	17.2	1,500	1	500	ND	24 (1)	0.5 (1)	10 (1)
	3,4-Dihydro-3,4-dihydroxy-2,6(or 2',6')-dichlorobiphenyl <sup>c</sup>	17.5	—	—	—	ND	1 (1)	99 (1)	74 (1)
	2,3-Dihydro-2,3-dihydroxy-2',6'-dichlorobiphenyl <sup>c</sup>	18.5	—	—	—	ND	70 (5)	0.5 (1)	16 (1)
2,4',5-CB <sup>d</sup>	2',3'-Dihydro-2',3'-dihydroxy-2,5,4'-trichlorobiphenyl	22.7	1	1	0.5	1 (1)	100	4 (1)	1 (1)
	3,4-Dihydro-3,4-dihydroxy-2,5,4'-trichlorobiphenyl	24.3	—	—	—	99 (1)	0	96 (1)	99 (1)
2,2',3,3'-CB	5,6-Dihydro-5,6-dihydroxy-2,2',3,3'-tetrachlorobiphenyl	25.3	1	1	1	5 (1)	100	95 (2)	93 (5)
	4,5-Dihydro-4,5-dihydroxy-2,2',3,3'-tetrachlorobiphenyl	26.7	—	—	—	95 (1)	—	5 (2)	7 (4)
2,2',5,5'-CB <sup>d</sup>	3,4-Dihydro-3,4-dihydroxy-2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl	24.4	0	1	1	100	—	100	100

<sup>a</sup> Activity of each BphAE relative to LB400 BphAE was calculated from the ratio of the sum of the area under the peaks of all metabolites produced from each congener after 2 min of incubation with 1 nmol of enzyme following the protocol described in Materials and Methods. The variance of the ratio of the sum of metabolites was <15% in all cases.

<sup>b</sup> Metabolite ratio based on the area of the peaks of metabolites detected by GC-MS analysis of butylboronate-derived metabolites produced by purified enzyme preparations. —, no metabolite detected; ND, not determined.

<sup>c</sup> The exact position of dioxygenation has not been determined precisely.

<sup>d</sup> Data were obtained with IPTG-induced *E. coli* cells expressing the indicated BphAE following the protocol described in Materials and Methods. SDS-PAGE gels of cell total proteins indicate similar levels of expression of BphAEFG for all clones used in this experiment.

<sup>e</sup> RT is retention time in min of each metabolite under the chromatographic conditions used.

to H<sub>7</sub> (J = 7.4) and H<sub>6</sub> was coupled to H<sub>8</sub> (J = 6.9 Hz), and H<sub>5</sub> and H<sub>6</sub> were coupled to each other (J ~ 5.5). These latter values are consistent with the theoretical values predicted for the *cis* configuration. When H<sub>2</sub> was irradiated at 4.56 ppm, two doublets for H<sub>3</sub> and H<sub>4</sub> were observed with a coupling constant of 9.9 Hz, characteristic of a *Z*-configuration of this system (Fig. 3). This confirmed that the two vinyl protons H<sub>3,4</sub> were vicinal. Together, these data confirmed the identity of the metabolite as *cis*-5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphenyl.

**Metabolism of *cis*-5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphenyl.** When 0.6 nmol His-tagged purified BphB, 100 nmol NAD, and 75 nmol *cis*-5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphenyl were added to the enzyme assay, approximately 10 nmol of substrate was consumed when the reaction was run for 5 min at 37°C. The BSTFA-derivatized *cis*-5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphenyl decomposed under the chromatographic settings we used. However, a peak corresponding to TMS-5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphenyl was well resolved

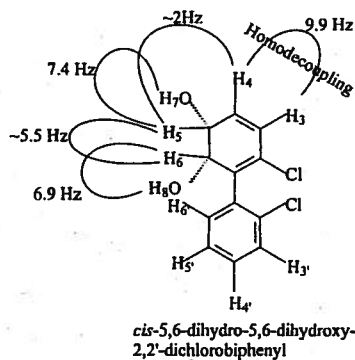


FIG. 3. Structure of *cis*-5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphenyl produced from catalytic oxygenation of 2,2'-CB by S100 BphAE and their NMR coupling constants. The coupling constant of 9.9 Hz shown between H<sub>3</sub> and H<sub>4</sub> was obtained after homodecoupling by irradiating H<sub>2</sub> at 4.56 ppm.

and could be analyzed by mass spectrometry. The spectrum included ions at  $m/z = 398$  (M<sup>+</sup>),  $m/z = 383$  (M-15),  $m/z = 363$  (M-Cl),  $m/z = 310$  (M-Me<sub>4</sub>Si),  $m/z = 275$  (M-Cl-Me<sub>4</sub>Si), and  $m/z = 260$  (M-Cl-Me<sub>4</sub>Si-Me), which are characteristic features of hydroxy-chlorobiphenyls (21).

*cis*-5,6-Dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphenyl was transformed to a yellow-colored metabolite by a coupled reaction involving BphB plus BphC. The metabolite exhibited a  $\lambda_{\max}$  at 395 nm. When the reaction was initiated with 75 nmol *cis*-5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphenyl, 10 nmol of substrate was consumed after 5 min and no 5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphenyl was detected. This indicates that BphC is not the limiting step in this reaction. The yellow metabolite was extracted with ethyl acetate and derivatized with BSTFA for GC-MS analysis. A single peak of metabolite was detected. Its MS spectrum comprised diagnostically important ions at  $m/z = 430$  (M<sup>+</sup>),  $m/z = 415$  (M-CH<sub>3</sub>),  $m/z = 395$  (M-Cl), and  $m/z = 313$  (M-COOTMS). Based on a previous report (21), these features identified the resulting metabolite as 2-hydroxy-5-chloro-6-oxo-6-(2-chlorophenyl)-hexa-2,4-dienoic acid, the *meta* cleavage metabolite produced from catalytic dioxygenation of 5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphenyl.

**Catalytic properties of evolved BphAEs toward *ortho*-substituted chlorobiphenyls and other biphenyl analogs.** The apparent ratio of metabolites generated from 2,2'-CB, 2,2',3,3'-CB, and 2,2',5,5'-CB by purified enzyme preparations of LB400, S100, S149, and S151 BphAEs were compared (Table 2). As indicated above, all three variants oxygenated 2,2'-CB at a rate similar to that of LB400 BphAE. When 2,2'-CB was the substrate, S100 BphAE produced almost exclusively *cis*-5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphenyl. On the other hand, similar to LB400 BphAE, both S149 and S151 produced 2,3-dihydroxy-2'-chlorobiphenyl as a major metabolite, but in addition both enzymes generated *cis*-5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphenyl. In a previous report, LB400 BphAE was found to oxygenate 2,2',3,3'-CB principally onto carbons 4 and

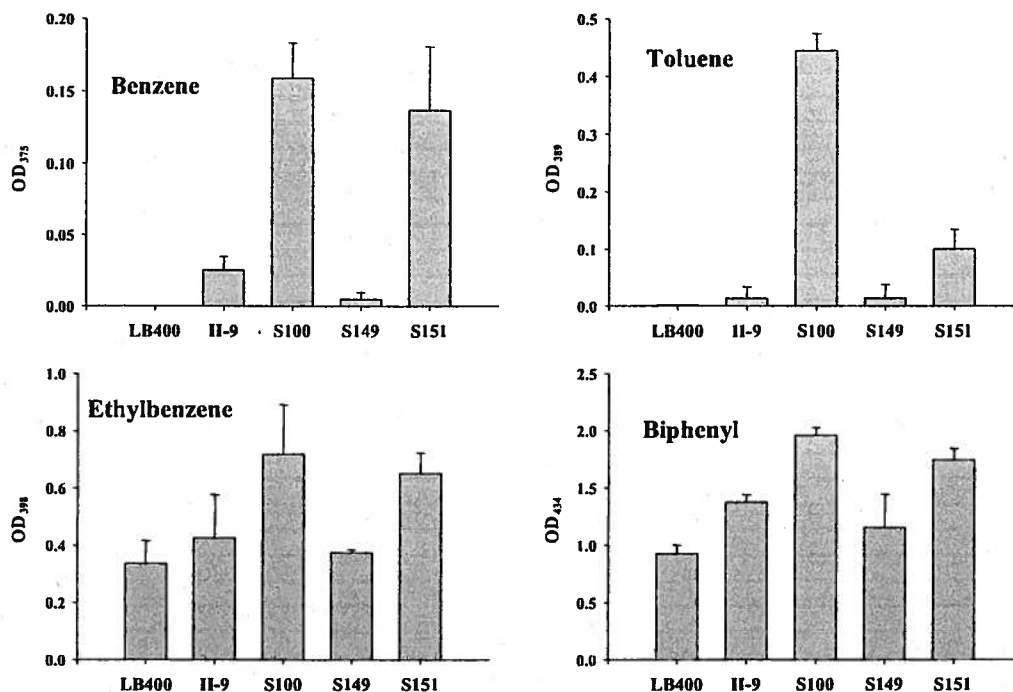


FIG. 4. Production of yellow *meta* cleavage metabolites from benzene, toluene, and ethyl benzene by a coupled reaction involving the indicated His-tagged purified BphAEFGs plus His-tagged purified LB400 BphB and LB400 BphC. The formation of the yellow metabolite was quantified at the corresponding maximum wavelength of absorption. Results are expressed as average values  $\pm$  the standard deviations.

5 to generate *cis*-4,5-dihydro-4,5-dihydroxy-2,2',3,3'-tetrachlorobiphenyl as the major metabolite and *cis*-5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2',3,3'-tetrachlorobiphenyl resulting from a 5,6-dioxygenation reaction was produced in a much lesser amount (3). Based on the area of GC-MS peaks of metabolites, purified preparations of S100, S149, and S151 BphAE oxygenated 2,2',3,3'-CB at rates similar to that of LB400 BphAE. However, S100 BphAE oxygenated this substrate onto carbons 5 and 6 exclusively to produce *cis*-5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2',3,3'-tetrachlorobiphenyl, which was also the major metabolite produced by S149 and S151 BphAEs (Table 2). Unlike purified preparations of S149 and S151 BphAEs that produce 3,4-dihydro-3,4-dihydroxy-2,2',5,5'-CB from 2,2',5,5'-CB, S100 BphAE was unable to oxygenate this substrate. Therefore, S100 is unable to effect a 3,4-dioxygenation of 2,2',5,5'-CB. This explains why S100 BphAE exhibited a much different pattern of metabolites toward 2,4',5-CB than LB400, S149, and S151 BphAEs. Two dihydro-dihydroxy metabolites are likely to be produced from 2,4',5-CB, 2',3'-dihydro-2',3'-dihydroxy-2, and 4',5-trichlorobiphenyl resulting from a 2,3-dioxygenation of the *para*-substituted ring and 3,4-dihydro-3,4-dihydroxy-2,4',5-trichlorobiphenyl resulting from a 3,4-dioxygenation of the disubstituted ring. Suenaga et al. (28) have shown that LB400 BphAE produced 3,4-dihydro-3,4-dihydroxy-2,4',5-trichlorobiphenyl from 2,4',5-CB. S149 and S151 BphAEs metabolized 2,4',5-CB very similarly to LB400 BphAE. On the other hand, S100 metabolized 2,4',5-CB similarly to *P. pseudoalcaligenes* KF707 BPDO, which was found to generate 2',3'-dihydro-2',3'-dihydroxy-2,4',5-trichlorobiphenyl exclusively from 2,4',5-CB (28). This is consistent with the inability of these two dioxygenases to effect a 3,4-dioxygenation of the

2,5-substituted ring. Finally, when IPTG-induced resting cells of recombinant *E. coli* expressing S100, S149, or 151 BphAE were incubated with 2,2',4,4'-CB for 18 h, a small amount (approximately 1%) of the substrate was converted into a single metabolite whose GC-MS features corresponded to a dihydro-dihydroxy-tetrachlorobiphenyl which can only be 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2',4,4'-tetrachlorobiphenyl (data not shown in Table 2). This metabolite was not produced when recombinant *E. coli* cells expressing LB400 BphAE were incubated in identical conditions. Interestingly, based on the sum of metabolites produced, when 1 nmol of enzyme was reacted with 2,6-CB for 1 min, S100 BphAE oxygenated this substrate 1,500 times better than LB400 BphAE (Table 2). Three metabolites were produced. Assuming the major metabolite was the one derived from a 2,3-dioxygenation of the nonchlorinated ring, the two others must have been produced from a 3,4-dioxygenation of the chlorinated or unchlorinated ring. It is noteworthy that the ratio of metabolites produced from 2,6-CB by S151 and S149 BphAE differed significantly from the one produced by S100 BphAE. At this time, the exact position of 3,4-dioxygenation (on the chlorinated or nonchlorinated ring) is not known, but data show that although S100 BphAE cannot catalyze a 3,4-dioxygenation of 2,2'-CB or 2,2',5,5'-CB, it certainly catalyzes a 3,4-dioxygenation of 2,6-CB.

It has been reported that purified LB400 BphAE cannot oxygenate benzene and toluene (15). *E. coli* cells expressing LB400 BphAE poorly oxygenated ethyl benzene (29). Unlike LB400 BphAE, purified preparations of S100 BphAE oxygenated benzene and toluene efficiently and they oxygenated ethyl benzene more efficiently than LB400 BphAE (Fig. 4). To a lesser degree, S149 and S151 BphAEs were also able to oxy-





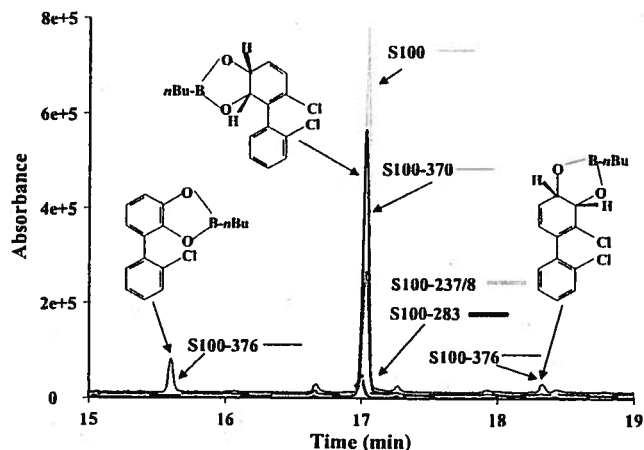


FIG. 7. Total ion chromatogram showing the metabolites produced from 2,2'-CB by *E. coli* expressing either S100 BphAE or the indicated S100 variants. IPTG-induced cells were incubated for 18 h with 100 nmol 2,2'-CB and then extracted with ethyl acetate, and the metabolites were derivatized with butylboronate for GC-MS analysis. Controls of *E. coli* cells incubated in identical conditions produced similar amounts of 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphenyl when biphenyl was the substrate. Furthermore, SDS-PAGE of the cell extracts showed similar levels of production of BphAE for all strains.

GC-MS peaks of metabolites, this enzyme was less efficient than the parent S100 BphAE in converting the substrate (Fig. 7). In addition, S100 (T<sup>376</sup>→N) BphAE produced 2,3-dihydroxy-2'-chlorobiphenyl and 3,4-dihydro-3,4-dihydroxy-2,2'-chlorobiphenyl in an approximately 50-50 ratio. This confirms the importance of residue N<sup>377</sup> of LB400 BphA in determining its capacity to oxygenate the biphenyl ring onto carbons 3 and 4, although in our model T<sup>377</sup> of S100 BphA is at 8.2 Å from the substrate, thus far from it.

In previous work, variant II-9 BphA was described with an amino acid sequence that is identical to that of LB400 BphA except that the sequence pattern of region III of II-9 BphA is G<sup>335</sup>I<sup>336</sup>N<sup>337</sup>T<sup>338</sup>I<sup>339</sup>R<sup>340</sup>T<sup>341</sup> instead of T<sup>335</sup>F<sup>336</sup>N<sup>337</sup>N<sup>338</sup>I<sup>339</sup>R<sup>340</sup>T<sup>341</sup> (4). Therefore, the amino acid sequence pattern of region III of variant II-9 is identical to that of S100 BphA. However, II-9 BphAE is unable to oxygenate 2,2'-CB onto carbons 5 and 6 (Table 2). The fact that S100, the T<sup>376</sup>→N mutant of S100, S149, and S151 BphAEs were able to catalyze a 5,6-dioxygenation of 2,2'-CB but II-9 BphAE was not shows that amino acid residues other than those of region III influence the regiospecificity of BphA toward di-*ortho*-substituted biphenyl analogs and their capacity to catalyze the oxygenation onto the *ortho-meta* carbons 5 and 6.

Several other residues that are not shared by all three variants and that were far from the active center on our S100 BphA model were also exchanged individually for the residue of LB400 BphA. None of them affected the specificity or regiospecificity toward 2,2'-CB. Residue F<sup>369</sup> of S100 BphA which is located at 13.5 Å is an example. As shown in Fig. 7, recombinant *E. coli* cells expressing S100 (F<sup>369</sup>→Y<sup>369</sup>) or parental S100 BphA produced similar amounts of 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-dichlorobiphenyl.

## DISCUSSION

Shuffling of soil DNA to evolve LB400 *bphA* generated variants S100, S149, and S151 that exhibited novel catalytic properties toward di-*ortho*-substituted chlorobiphenyls. All three variants have acquired the capacity to oxygenate 2,2'-CB onto the *ortho-meta* carbons 5 and 6. In addition, unlike variants S149 and S151, variant S100 was unable to oxygenate the *meta-para* carbons of any of the *ortho*-substituted congeners tested (2,2'-CB, 2,5,4'-CB, 2,2',3,3'-CB, and 2,2',5,5'-CB) but it was able to effect a 3,4-dioxygenation of 2,6-CB. Unlike LB400 BphAE that preferentially oxygenates carbons 2 and 3 of 2,2'-CB to catalyze an oxygenolytic dehalogenation (3, 16), *P. pseudoalcaligenes* KF707 BPDO was reported to catalyze the oxygenation of 2,2'-CB exclusively on carbons 5 and 6 (28). However, the latter performed poorly on *ortho*-substituted chlorobiphenyls. Interestingly, variant S100 BphAE performed as well as LB400 BphAE on 2,2'-CB and 2,2'-3,3'-CB and it performed much better than LB400 BphAE on 2,6-CB. Although the inability of S100 BphAE to effect an oxygenolytic dehalogenation appears to be a disadvantage compared to LB400 BphAE, data show that 5,6-dihydro-5,6-dihydroxy-2,2'-chlorobiphenyl can be further metabolized by BphB and BphC. Furthermore, the ability of S100 BphAE to catalyze a 5,6-dihydroxylation of 2,2',3,3'-CB represents an advantageous feature compared to LB400 BphAE that preferentially oxygenates this congener onto carbons 4 and 5 to produce a dead end dihydrodiol metabolite (3).

Data obtained with the T<sup>376</sup>→N mutant of S100 BphA confirm previous reports (28, 30), showing that this residue is critical to confer the capacity to catalyze a 3,4-dioxygenation of the biphenyl ring. Yet, according to our model of S100 BphAE, this residue does not interact directly with the substrate. It therefore might play its role indirectly by modulating the positions of residues that interact with the substrate. For example, residue F<sup>377</sup> of S100 BphA is lining the catalytic center (located at 3.9 Å from the substrate). Using the Rasmol software, we have superposed the S100 BphAE model created by the 3D-JIGSAW software with that of the S100 (T<sup>376</sup>→N) mutant. However, this software was not precise enough to show the influence of this mutation on the conformation of the residues lining the catalytic pocket. In fact, as shown in Fig. 6, Phe<sup>378</sup> of LB400 BphA aligns perfectly with Phe<sup>377</sup> of S100 BphA.

On the other hand, based on previous reports (3, 5, 24) that showed that region III of BphA strongly influences the turnover rate of reaction and regiospecificity toward *ortho*-chlorinated congeners, it would have been possible that the different sequence patterns at positions 335 to 340 of variants S100, S149, and S151 were responsible for at least part of their phenotypic differences. However, it is noteworthy that the amino acid sequence pattern of region III of the previously described II-9 BphA (4) is identical to the one of S100 BphA, and yet, this variant is unable to oxygenate 2,2'-CB onto carbons 5 and 6. Therefore, residues other than those of region III and of region IV influence the regiospecificity toward di-*ortho*-substituted chlorobiphenyls.

According to the sequence alignment shown on Fig. 5, at least nine residues are common to S100, S149, and S151 and could be responsible for the capacity to effect a 5,6-dioxy-

generation of 2,2'-CB. We have examined the effect of exchanging three of the residues that based on our model were likely to influence either the substrate activity or the regio-specificity. Interestingly, exchanging M<sup>237</sup>S<sup>238</sup> for T<sup>237</sup>T<sup>238</sup> and L<sup>283</sup> for S<sup>283</sup> of S100 BphA as in LB400 BphA created variants that exhibited lower reactivity toward 2,2'-CB but did not change their regio-specificity toward this substrate. Therefore, these positions appear to influence the distance between the reactants involved in the catalytic reaction, but they do not seem to influence the orientation of the substrate inside the catalytic pocket. Therefore, based on the data provided in this work, it is impossible at this time to identify specific residues outside regions III and IV that are responsible for the capacity of S149, S151, and especially S100 to orient the substrate in the proper position to allow catalytic dioxygenation onto carbons 5 and 6 of the chlorobiphenyl carrying an *ortho* substituent on both rings. However, data show that regio-specificity is a complex process that depends upon interactions that occur between amino acid residues that line the catalytic pocket and the substrate, but in addition it involves other residues that might act by modulating the conformation of the residues lining the catalytic pocket.

In a previous work, changing H<sup>255</sup>V<sup>258</sup>G<sup>268</sup>F<sup>277</sup> of *P. pseudoalcaligenes* KF707 BphA1 to Q<sup>255</sup>I<sup>258</sup>A<sup>268</sup>Y<sup>277</sup> as in LB400 BphA created variant 1072 that, unlike both parents, had acquired the capacity to oxygenate benzene, toluene, and ethyl benzene efficiently (29). Individually these residues did not significantly affect the specificity toward monocyclic compounds. The combination of the four mutations was required to change the specificity. Surprisingly, although the sequence pattern of variant S100 BphA for these positions (H<sup>255</sup>V<sup>258</sup>S<sup>268</sup>F<sup>277</sup>) is very similar to that of KF707 BphA1, like variant 1072, S100 BphAE can oxygenate these compounds efficiently. None of these residues are located in the vicinity of the catalytic center of our model, which confirms data obtained by modeling KF707 BphA1A2 (31). Based on their model structures, Suenaga et al. (31) found that changing H<sup>255</sup>V<sup>258</sup>S<sup>268</sup>F<sup>277</sup> of KF707 BphA to Q<sup>255</sup>I<sup>258</sup>A<sup>268</sup>Y<sup>277</sup> caused a slight enlargement of the enzyme substrate binding cavity. Our model was not precise enough to reveal such changes, but our results show that the same residues contribute differently to the substrate specificity, depending on the overall structure of the catalytic pocket.

Altogether, the observation made regarding the catalytic features of the variant BphAEs obtained in this investigation brings to mind that changing substrate specificity is a complex process; as pointed out recently by Zielinski et al. (37), it not only involves amino acid residues that interact directly with the substrate, but it also involves residues that are not part of the pocket lining and that are not predictable through structural modeling. These residues might indirectly influence the shape of the catalytic pocket or the conformation of the residues that are involved in substrate binding and positioning inside the catalytic pocket. Furthermore, we cannot exclude the possibility that these residues modulate the conformational changes induced during substrate binding which might be required to accommodate substrate analogs.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Natural Science and Engineering Research Council of Canada grant numbers STPGP 257566-02 and 0039579.

We thank Nicolas Leberre for assistance in NMR analyses and their interpretation.

## REFERENCES

- Ahmad, D., R. Massé, and 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* 86:53-61.
- Amann, R. L., W. Ludwig, and K. H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143-169.
- Barriault, D., F. Lépine, M. Mohammadi, S. Milot, N. Leberre, and M. Sylvestre. 2004. Revisiting the regio-specificity of *Burkholderia xenovorans* LB400 biphenyl dioxygenase toward 2,2'-dichlorobiphenyl and 2,3,2',3'-tetrachlorobiphenyl. *J. Biol. Chem.* 279:47489-47496.
- Barriault, D., M. M. Plante, and M. Sylvestre. 2002. Family shuffling of a targeted *bphA* region to engineer biphenyl dioxygenase. *J. Bacteriol.* 184:3794-3800.
- Barriault, D., and M. Sylvestre. 2004. Evolution of the biphenyl dioxygenase BphA from *Burkholderia xenovorans* LB400 by random mutagenesis of multiple sites in region III. *J. Biol. Chem.* 279:47480-47488.
- Barriault, D., M. Vedadi, J. Powlowski, and M. Sylvestre. 1999. *cis*-2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybiphenyl dehydrogenase and *cis*-1,2-dihydro-1,2-dihydroxynaphthalene dehydrogenase catalyze dehydrogenation of the same range of substrates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260:181-187.
- Cho, J. C., D. H. Lee, Y. C. Cho, J. C. Cho, and S. J. Kim. 1996. Direct extraction of DNA from soil for amplification of 16S rRNA gene sequences by polymerase chain reaction. *J. Microbiol.* 34:229-235.
- Cramer, A., S. A. Raillard, E. Bermudez, and W. P. Stemmer. 1998. DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature* 391:288-291.
- Dong, X. S., S. Fushinobu, E. Fukuda, T. Terada, S. Nakamura, K. Shimizu, H. Nojiri, T. Omori, H. Shoun, and T. Wakagi. 2005. Crystal structure of the terminal oxygenase component of cumene dioxygenase from *Pseudomonas fluorescens* IP01. *J. Bacteriol.* 187:2483-2490.
- Erickson, B. D., and F. J. Mondello. 1992. Nucleotide sequencing and transcriptional mapping of the genes encoding biphenyl dioxygenase, a multi-component polychlorinated-biphenyl-degrading enzyme in *Pseudomonas* strain LB400. *J. Bacteriol.* 174:2903-2912.
- Furukawa, K., H. Suenaga, and M. Goto. 2004. Biphenyl dioxygenases: functional versatility and directed evolution. *J. Bacteriol.* 186:5189-5196.
- Furusawa, Y., V. Nagarajan, M. Tanokura, E. Masai, M. Fukuda, and T. Senda. 2004. Crystal structure of the terminal oxygenase component of biphenyl dioxygenase derived from *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *J. Mol. Biol.* 342:1041-1052.
- Goris, J., P. De Vos, J. Caballero-Mellado, J. Park, E. Falsen, J. F. Quensen III, J. M. Tiedje, and P. Vandamme. 2004. Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400T and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1677-1681.
- Guilbeault, B., M. Sondosi, D. Ahmad, and M. Sylvestre. 1994. Factors affecting the enhancement of PCB degradative ability of soil microbial populations. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 33:73-91.
- Haddock, J. D., and D. T. Gibson. 1995. Purification and characterization of the oxygenase component of biphenyl 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain LB400. *J. Bacteriol.* 177:5834-5839.
- Haddock, J. D., J. R. Horton, and D. T. Gibson. 1995. Dihydroxylation and dechlorination of chlorinated biphenyls by purified biphenyl 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain LB400. *J. Bacteriol.* 177:20-26.
- Hurtubise, Y., D. Barriault, and M. Sylvestre. 1996. Characterization of active recombinant his-tagged oxygenase component of *Comamonas testosteroni* B-356 biphenyl dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 271:8152-8156.
- Hurtubise, Y., D. Barriault, and M. Sylvestre. 1998. Involvement of the terminal oxygenase  $\beta$  subunit in the biphenyl dioxygenase reactivity pattern toward chlorobiphenyls. *J. Bacteriol.* 180:5828-5835.
- Imbeault, N. Y., J. B. Powlowski, C. L. Colbert, J. T. Bolln, and L. D. Eltis. 2000. Steady-state kinetic characterization and crystallization of a polychlorinated biphenyl-transforming dioxygenase. *J. Biol. Chem.* 275:12430-12437.
- Lin, J. J., M. Smith, J. Jessee, and F. Bloom. 1992. DH11S: an *E. coli* strain for preparation of single-stranded DNA from phagemid vectors. *BioTechniques* 12:718-7721.
- Massé, R., F. Messier, C. Ayotte, M.-F. Lévesque, and M. Sylvestre. 1989. A comprehensive gas chromatographic/mass spectrometric analysis of 4-chlorobiphenyl bacterial degradation products. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 18:27-47.
- Miroux, B., and J. E. Walker. 1996. Over-production of proteins in *Esche-*

- richia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* **260**:289–298.
23. Mohammadi, M., and M. Sylvestre. 2005. Resolving the profile of metabolites generated during oxidation of dibenzofuran and chlorodibenzofurans by the biphenyl catabolic pathway enzymes. *Chem. Biol.* **12**:835–846.
  24. Mondello, F. J., M. P. Turcich, J. H. Lobos, and B. D. Erickson. 1997. Identification and modification of biphenyl dioxygenase sequences that determine the specificity of polychlorinated biphenyl degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3096–3103.
  25. Novakova, H., M. Vosahlikova, J. Pazlarova, M. Mackova, J. Burkhard, and K. Demnerova. 2002. PCB metabolism by *Pseudomonas* sp. P2. *Int. Biodegrad. Biodegradation* **50**:47–54.
  26. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
  27. Stemmer, W. P. C. 2002. Molecular breeding of genes, pathways and genomes by DNA shuffling. *J. Mol. Catal. B* **19**:3–12.
  28. Suenaga, H., M. Goto, and K. Furukawa. 2006. Active-site engineering of biphenyl dioxygenase: effect of substituted amino acids on substrate specificity and regiospecificity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**:168–176.
  29. Suenaga, H., M. Mitsuoka, Y. Ura, T. Watanabe, and K. Furukawa. 2001. Directed evolution of biphenyl dioxygenase: emergence of enhanced degradation capacity for benzene, toluene, and alkylbenzenes. *J. Bacteriol.* **183**:5441–5444.
  30. Suenaga, H., A. Nishi, T. Watanabe, M. Sakai, and K. Furukawa. 1999. Engineering a hybrid pseudomonad to acquire 3,4-dioxygenase activity for polychlorinated biphenyls. *J. Biosci. Bioeng.* **87**:430–435.
  31. Suenaga, H., M. Sato, M. Goto, M. Takeshita, and K. Furukawa. 2006. Steady-state kinetic characterization of evolved biphenyl dioxygenase, which acquired novel degradation ability for benzene and toluene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**:1021–1025.
  32. Suenaga, H., T. Watanabe, M. Sato, Ngadiman, and K. Furukawa. 2002. Alteration of regiospecificity in biphenyl dioxygenase by active-site engineering. *J. Bacteriol.* **184**:3682–3688.
  33. Sylvestre, M. 2004. Genetically modified organisms to remediate polychlorinated biphenyls. Where do we stand? *Int. Biodegrad. Biodegradation* **54**:153–162.
  34. Torsvik, V., L. Ovreas, and T. F. Thingstad. 2002. Prokaryotic diversity—magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* **296**:1064–1066.
  35. Zhao, H., and F. H. Arnold. 1997. Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination. *Nucleic Acids Res.* **25**:1307–1308.
  36. Zielinski, M., S. Kahl, H. J. Hecht, and B. Hofer. 2003. Pinpointing biphenyl dioxygenase residues that are crucial for substrate interaction. *J. Bacteriol.* **185**:6976–6980.
  37. Zielinski, M., S. Kahl, C. Standfuss-Gabisch, B. Camara, M. Seeger, and B. Hofer. 2006. Generation of novel-substrate-accepting biphenyl dioxygenases through segmental random mutagenesis and identification of residues involved in enzyme specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:2191–2199.

## Bibliographie

ABRAHAM, W. R. et al. 2002. Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments. Current Opinion in Microbiology, vol. 5, no. 3, p. 246-253.

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, no. 1, p. 53-61.

AHMED, M. et D. D. Focht. 1973. Degradation of polychlorinated biphenyls by two species of *Achromobacter*. Canadian Journal of Microbiology, vol. 19, no. 1, p. 47-52.

ALTENSCHMIDT, U. et al. 1993. New aerobic benzoate oxidation pathway via benzoyl-coenzyme A and 3-hydroxybenzoyl-coenzyme A in a denitrifying *Pseudomonas sp.* Journal of Bacteriology, vol. 175, no. 15, p. 4851-4858.

AOKI, Y. 2001. Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, and polychlorinated dibenzofurans as endocrine disrupters - What we have learned from Yusho disease. Environmental Research, vol. 86, no. 1, p. 2-11.

ARNETT, C. M., J. V. Parales et J. D. Haddock. 2000. Influence of chlorine substituents on rates of oxidation of chlorinated biphenyls by the biphenyl dioxygenase of *Burkholderia sp* strain LB400. Applied and Environmental Microbiology, vol. 66, no. 7, p. 2928-2933.

ASTURIAS, J. A., E. Diaz et K. N. Timmis. 1995. The evolutionary relationship of biphenyl dioxygenase from gram-positive *Rhodococcus globerulus* P6 to multicomponent dioxygenases from gram-negative bacteria. Gene, vol. 156, no. 1, p. 11-18.

ASTURIAS, J. A. et K. N. Timmis. 1993. Three different 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase genes in the gram-positive polychlorobiphenyl-degrading bacterium *Rhodococcus globerulus* P6. Journal of Bacteriology, vol. 175, no. 15, p. 4631-4640.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). 2000. Annual report. The Agency for Toxic Substances and Disease Atlanta, Georgia.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). 1996. Annual report. The Agency for Toxic Substances and Disease . Atlanta, Georgia.

AUSUBEL, F. M. 1998. Current Protocols in Molecular Biology vol. 1-4. John Wiley & Sons, Inc. Boston, Massachusetts.

BARRIAULT, D. et al. 1998. Degradation of polychlorinated biphenyl métabolites by naphthalene-catabolizing enzymes. Applied and Environmental Microbiology, vol. 64, no. 12, p. 4637-4642.

BARRIAULT, D. et al. 2004. Revisiting the regiospecificity of *Burkholderia xenovorans* LB400 biphenyl dioxygenase toward 2,2'-dichlorobiphenyl and 2,3,2',3'-tetrachlorobiphenyl. Journal of Biological Chemistry, vol. 279, no. 46, p. 47489-47496.

BARRIAULT, D., M. M. Plante et M. Sylvestre. 2002. Family shuffling of a targeted *bphA* region to engineer biphenyl dioxygenase. Journal of Bacteriology, vol. 184, no. 14, p. 3794-3800.

BARRIAULT, D. et al. 2001. Characterization of hybrid biphenyl dioxygenases obtained by recombining *Burkholderia sp* strain LB400 *bphA* with the homologous gene of *Comamonas testosteroni* B-356. Canadian Journal of Microbiology, vol. 47, no. 11, p. 1025-1032.

BARRIAULT, D. et M. Sylvestre. 1999. Functionality of biphenyl 2,3-dioxygenase components in naphthalene 1,2-dioxygenase. Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 51, no. 5, p. 592-597.

BARRIAULT, D. et M. Sylvestre. 2004. Evolution of the biphenyl dioxygenase BphA from *Burkholderia xenovorans* LB400 by random mutagenesis of multiple sites in region III. Journal of Biological Chemistry, vol. 279, no. 46, p. 47480-47488.

BARRIAULT, D. et al. 1999. *cis*-2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphenyl dehydrogenase and *cis*-1, 2-dihydro-1,2-dihydroxynaphthalene dehydrogenase catalyze dehydrogenation of the same range of substrates. Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 260, no. 1, p. 181-187.

BAXTER, R. A. et al. 1975. The degradation of polychlorinated biphenyls by microorganisms. Science of the Total Environnement, vol. 4, no. 1, p. 53-61.

BEDARD, D. L., K. M. Ritalahti et F. E. Löffler. 2007. The *Dehalococcoides* population in sediment-free mixed cultures metabolically dechlorinates the commercial polychlorinated biphenyl mixture aroclor 1260. Applied and Environmental Microbiology, vol. 73, no. 8, p. 2513-2521.

BEDARD, D. L. et al. 1986. Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade polychlorinated biphenyls. Applied and Environmental Microbiology, vol. 51, no. 4, p. 761-768.

BEDARD, D. L. et al. 1987. Extensive degradation of Aroclors and environmentally transformed polychlorinated biphenyls by *Alcaligenes eutrophus* H850. Applied and Environmental Microbiology, vol. 53, no. 5, p. 1094-1102.

BELTRAMETTI, F. et al. 2001. Analysis of transcription of the *bph* locus of *Burkholderia sp* strain LB400 and evidence that the ORF0 gene product acts as a regulator of the *bphA1* promoter. Microbiology, vol. 147, no. 2169-2182.

BERGQUIST, P. L., R. A. Reeves et M. D. Gibbs. 2005. Degenerate oligonucleotide gene shuffling (DOGS) and random drift mutagenesis (RNDM): two complementary techniques for enzyme evolution. Biomolecular Engineering, vol. 22, no. 1-3, p. 63-72.

BOPP, L. H. 1986. Degradation of highly chlorinated PCBs by *Pseudomonas* strain LB400. Journal of Industrial Microbiology, vol. 1, no. 23-29.

BORRACCINO, R. et al. 2001. Abiotic transformation of catechol and 1-naphthol in aqueous solution - Influence of environmental factors. Water Research, vol. 35, no. 15, p. 3729-3737.

BRENNER, V., J. J. Arensdorf et D. D. Focht. 1994. Genetic construction of PCB degraders. Biodegradation, vol. 5, no. 3-4, p. 359-377.

BROADUS, R. M. et J. D. Haddock. 1998. Purification and characterization of the NADH:ferredoxinBPH oxidoreductase component of biphenyl 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas sp.* strain LB400. Archives of Microbiology, vol. 170, no.2, p. 106-121.

BROWN J. F., J. R. et al. 1984. Polychlorinated biphenyls transformation in upper Hudson USA sediments. Northeastern Environmental Science, vol. 3, no. 3-4, p. 167-179.

BRÜHLMANN, F. et W. Chen. 1999. Tuning biphenyl dioxygenase for extended substrate specificity. Biotechnology and Bioengineering, vol. 63, no 5, p. 544-551.

CHATER, K. F. et al. 1982. Gene cloning in *Streptomyces*. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 96, p. 69-95.

CHEBROU, H. et al. 1999. Heterologous expression and characterization of the purified oxygenase component of *Rhodococcus globerulus* P6 biphenyl dioxygenase and of chimeras derived from it. Journal of Bacteriology, vol. 181, no. 16, p. 4805-4811.

CHO, J. C., D. H. LEE, Y. C. et S. J. KIM. 1996. Direct extraction of DNA from soil for amplification of 16S RNA gene sequences by polymerase chain reaction. Journal of Microbiology, vol. 34, p. 229-235.

CHUN, H. K. et al. 2003. Biotransformation of flavone and flavanone by *Streptomyces lividans* cells carrying shuffled biphenyl dioxygenase genes. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, vol. 21, no. 3, p. 113-121.

- CLARK, R. R., E. S. Chian et R. A. Griffin. 1979. Degradation of polychlorinated biphenyls by mixed microbial cultures. Applied and Environmental Microbiology, vol. 37, no. 4, p. 680-685.
- COCO, W. M. 2003. RACHITT: Gene family shuffling by Random Chimeragenesis on Transient Templates. Methods in Molecular Biology, vol. 231, p. 111-127.
- CRAMERI, A. et al. 1998. DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. Nature, vol. 391, no. 6664, p. 288-291.
- DAI, S. et al. 2002. Identification and analysis of a bottleneck in PCB biodegradation. Nature Structural and Molecular Biology, vol. 9, no.12, p. 934-939.
- DE, S., M. Perkins et S. K. Dutta. 2006. Nitrate reductase gene involvement in hexachlorobiphenyl dechlorination by *Phanerochaete chrysosporium*. Journal of Hazardous Material, vol. 135, no. 1-3, p. 350-354.
- DENEF, V. J. et al. 2006. Genetic and genomic insights into the role of benzoate-catabolic pathway redundancy in *Burkholderia xenovorans* LB400. Applied and Environmental Microbiology, vol. 72, no. 1, p. 585-595.
- DIETRICH, D., W. J. Hickey et R. Lamar. 1995. Degradation of 4,4'-dichlorobiphenyl, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl, and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology, vol. 61, no. 11, p. 3904-3909.
- DOOLITTLE, R. F. et al. 1996. Determining divergence times of the major kingdoms of living organisms with a protein clock. Science, vol. 271, no. 5248, p. 470-477.
- DOWLING, D. N., R. Pipke et D. F. Dwyer. 1993. A DNA module encoding *bph* genes for the degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs). FEMS Microbiology Letters, vol. 113, no. 2, p. 149-154.
- DRINKER C.K. 1937. The problem of possible systemic effects from certain chlorinated hydrocarbons. Journal of Industrial Hygiene and Toxicology, vol. 19, no. 7, p. 283-311.
- DUA, M. et al. 2002. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 59, no. 2-3, p.143-152.
- EATON, R. W. et P. J. Chapman. 1992. Bacterial metabolism of naphthalene: construction and use of recombinant bacteria to study ring cleavage of 1,2-dihydroxynaphthalene and subsequent reactions. Journal of Bacteriology, vol. 174, no. 23, p. 7542-7554.

- EDGINGTON, S. M. 1994. Environmental biotechnology. Biotechnology, vol. 12, no. 13, p. 1338.
- ELTIS, L. D. et al. 1993. Purification and crystallization of 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase. Journal of Biological Chemistry, vol. 268, no. 4, p. 2727-2732.
- ERICKSON, B. D. et F. J. Mondello. 1993. Enhanced biodegradation of polychlorinated biphenyls after site-directed mutagenesis of a biphenyl dioxygenase gene. Applied and Environmental Microbiology, vol. 59, no. 11, p. 3858-3862.
- FAVA, F. et al. 1994. Degradation and dechlorination of low-chlorinated biphenyls by a three-membered bacterial co-culture. Applied Microbiology Biotechnology, vol. 41, no. 1, p. 117-123.
- FAVA, F., D. DiGioia et L. Marchetti. 2000. Role of the reactor configuration in the biological detoxification of a dump site-polychlorobiphenyl-contaminated soil in lab-scale slurry phase conditions. Applied Microbiology Biotechnology, vol. 53, no. 2, p. 243-248.
- FEDI, S. et al. 2005. T-RFLP analysis of bacterial communities in cyclodextrin-amended bioreactors developed for biodegradation of polychlorinated biphenyls. Research in Microbiology, vol. 156, no. 2, p. 201-210.
- FERRARO, D. J., L. Gakhar et S. Ramaswamy. 2005. Rieske business: structure-function of rieske non-heme oxygenases. Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 338, no.1, p.175-190.
- FISHBEIN, L. 1972. Chromatographic and biological aspects of polychlorinated biphenyls. Journal of Chromatography, vol. 68, no. 2, p. 345-426.
- FOLCH, I. et al. 1996. Extraction and clean-up methods for improvement of the chromatographic determination of polychlorinated biphenyls in sewage sludge-amended soils: Elimination of lipids and sulphur. Journal of Chromatography A, vol. 719, no. 1, p. 121-130.
- FRIES, G. F. 1995. Transport of organic environmental contaminants to animal products. Review in Environmental Contamination and Toxicology, vol. 141, p. 71-109.
- FURUKAWA, K. 1994. Molecular genetics and evolutionary relationship of PCB-degrading bacteria. Biodegradation, vol. 5, no. 3-4, p. 289-300.
- FURUKAWA, K. et al. 1993. Gene components responsible for discrete substrate specificity in the metabolism of biphenyl (*bph* operon) and toluene (*tod* operon). Journal of Bacteriology, vol. 175, no. 16, p. 5224-5232.



FURUKAWA, K. et F. Matsumura. 1976. Microbial metabolism of polychlorinated biphenyls. Studies on the relative degradability of polychlorinated biphenyl components by *Alkaligenes sp.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 24, no. 2, p. 251-256.

FURUKAWA, K., F. Matsumura et K. Tonomura. 1978. *Alcaligenes* and *Acinetobacter* strains capable of degrading polychlorinated biphenyls. Agricultural and Biological Chemistry, vol. 42, no. 3, p. 543-548.

FURUKAWA, K. et T. MIYAZAKI. 1986. Cloning of a gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. Journal of Bacteriology, vol. 166, no. 2, p. 392-398.

FURUSAWA, Y. et al. 2004. Crystal structure of the terminal oxygenase component of biphenyl dioxygenase derived from *Rhodococcus sp.* Strain RHA1. Journal of Molecular Biology, vol. 342, no. 3, p. 1041-1052.

GIBSON, D. T. et al. 1993. Oxidation of polychlorinated biphenyls by *Pseudomonas sp.* strain LB400 and *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. Journal of Bacteriology, vol. 175, no. 14, p. 4561-4564.

GIBSON, D. T. et al. 1968. Oxidative degradation of aromatic hydrocarbons by microorganisms. II. Metabolism of halogenated aromatic hydrocarbons. Biochemistry, vol. 7, no. 11, p. 3795-3802.

GIBSON, D. T. et R. E. Parales. 2000. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. Current Opinion in Biotechnology, vol.11, no.3, p.236-243.

GOLBECK, J. H., S. A. Albaugh et R. Radmer. 1983. Metabolism of biphenyl by *Aspergillus toxicarius*: induction of hydroxylating activity and accumulation of water-soluble conjugates. Journal of Bacteriology, vol. 156, no. 1, p. 49-57.

GOMEZ-GIL, L. et al. 2007. Characterization of biphenyl dioxygenase of *Pandoraea pnomenus* B-356 as a potent polychlorinated biphenyl-degrading enzyme. Journal of Bacteriology, vol. 189, no. 15, p. 5705-5715.

GUILBEAULT, B. et al. 1994. Factors affecting the enhancement of PCB degradative ability of soil microbial populations. International Biodeterioration & Biodegradation, vol. 33, p. 73-91.

HADDOCK, J. D. et D. T. Gibson. 1995. Purification and characterization of the oxygenase component of biphenyl 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas sp.* strain LB400. Journal of Bacteriology, vol. 177, no. 20, p. 5834-5839.

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. Journal of Bacteriology, vol. 177, no. 1, p. 20-26.

HADDOCK, J. D., D. A. Pelletier et D. T. Gibson. 1997. Purification and properties of ferredoxin(BPH), a component of biphenyl 2,3-dioxygenase of *Pseudomonas sp* strain LB400. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, vol. 19, no. 5-6, p. 355-359.

HENDRICKX, B. et al. 2006. Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. Journal of Microbiological Methods, vol. 64, no. 2, p. 250-265.

HIGSON, F. K. 1992. Microbial degradation of biphenyl and its derivatives. Advanced in Applied Microbiology, vol. 37, p. 135-164.

HIROSE, J. et al. 1994. Construction of hybrid biphenyl (*bph*) and toluene (*tod*) genes for functional analysis of aromatic ring dioxygenases. Gene, vol. 138, no. 1-2 p. 27-33.

HOFER, B., S. Backhaus et K. N. Timmis. 1994. The biphenyl/polychlorinated biphenyl-degradation locus (*bph*) of *Pseudomonas sp.* LB400 encodes four additional metabolic enzymes. Gene, vol. 144, no. 1, p. 9-16.

HURTUBISE, Y. et al. 1995. Purification and characterization of the *Comamonas testosteroni* B-356 biphenyl dioxygenase components. Journal of Bacteriology, vol. 177, no. 22, 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. Journal of Biological Chemistry, vol. 271, no. 14, 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. Journal of Bacteriology, vol. 180, no. 22, p. 5828-5835.

IMBEAULT, N. Y. et al. 2000. Steady-state kinetic characterization and crystallization of a polychlorinated biphenyl-transforming dioxygenase. Journal of Biological Chemistry, vol. 275, no. 17, p. 12430-12437.

IWASAKI, T. et al. 2007. Characterization of two biphenyl dioxygenases for biphenyl/PCB degradation in a PCB degrader, *Rhodococcus sp* strain RHA1. Biosciences, Biotechnology and Biochemistry, vol. 71, no. 4, p. 993-1002.

JENSEN, R. A. 1976. Enzyme recruitment in evolution of new function. Annual Review in Microbiology, vol. 30, p. 409-425.

KAHL, S. et B. Hofer. 2003. A genetic system for the rapid isolation of aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase activities. Microbiology, vol. 149, no. 6, p. 1475-1481.

- KIKUCHI, Y. et al. 1994. Nucleotide sequence and functional analysis of the meta-cleavage pathway involved in biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation in *Pseudomonas sp.* strain KKS102. Journal of Bacteriology, vol. 176, no. 14, p. 4269-4276.
- KIM, S. Y. et al. 2003. cis-2', 3'-dihydrodiol production on flavone b-ring by biphenyl dioxygenase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 expressed in *Escherichia coli*. Antonie Van Leeuwenhoek, vol.84, no.4, p.261-268.
- KIMBARA, K. et al. 1988. Isolation and characterization of mixed culture that degrades polychlorinated biphenyl. Journal of Agricultural and Biological Chemistry, vol. 52, no. 11, p. 2885-2892.
- KIMBROUGH, R. D. 1995. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and human health: An update. Critical Review in Toxicology, vol. 25, no. 2, p. 133-163.
- KIMURA, N. et al. 1996. Analysis of substrate range of biphenyl-catabolic enzymes. Biosciences, Biotechnology and Biochemistry, vol. 60, no. 2, p. 220-223.
- KIMURA, N. et al. 1997. Functional analyses of a variety of chimeric dioxygenases constructed from two biphenyl dioxygenases that are similar structurally but different functionally. Journal of Bacteriology, vol. 179, no. 12, p. 3936-3943.
- KIYOHARA, H., K. Nagao et K. Yana. 1982. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. Applied and Environmental Microbiology, vol. 43, no. 2, p. 454-457.
- KOSONO, S. et al. 1997. Three of the seven *bphC* genes of *Rhodococcus erythropolis* TA421, isolated from a termite ecosystem, are located on an indigenous plasmid associated with biphenyl degradation. Applied and Environmental Microbiology, vol. 63, no. 8, p. 3282-3285.
- KRCMAR, P. et R. Ulrich. 1998. Degradation of polychlorinated biphenyl mixtures by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Folia Microbiology, vol. 43, no. 1, p. 79-84.
- KUBATOVA, A. et al. 2001. PCB congener selective biodegradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in contaminated soil. Chemosphere, vol. 43, no. 2, p. 207-215.
- KUMAMARU, T. et al. 1998. Enhanced degradation of polychlorinated biphenyls by directed evolution of biphenyl dioxygenase. Nature Biotechnology, vol. 16, no. 7, p. 663-666.
- L'ABBÉE, J. B., D. Barriault et M. Sylvestre. 2005. Metabolism of dibenzofuran and dibenzo-p-dioxin by the biphenyl dioxygenase of *Burkholderia xenovorans* LB400 and *Comamonas testosteroni* B-356. Applied Microbiology and Biotechnology, vol.67, no.4, p.506-514.

- LEE, K. 1999. Benzene-induced uncoupling of naphthalene dioxygenase activity and enzyme inactivation by production of hydrogen peroxide. Journal of Bacteriology, vol.181, no.9, p.2719-2725.
- LEIGH, M. B. et al. 2006. Polychlorinated biphenyl (PCB)-degrading bacteria associated with trees in a PCB-contaminated site. Applied and Environmental Microbiology, vol. 72, no. 4, p. 2331-2342.
- LIN, J. J. et al. 1992. DH11S: an *Escherichia coli* strain for preparation of single-stranded DNA from phagemid vectors. Biotechniques, vol. 12, no. 5, p. 718-721.
- LORIMER, I. A. et I. Pastan. 1995. Random recombination of antibody single chain Fv sequences after fragmentation with DNaseI in the presence of Mn<sup>2+</sup>. Nucleic Acids Researchs, vol. 23, no. 15, p. 3067-3068.
- LUNT, D. et W. C. Evans. 1970. The microbial metabolism of biphenyl. Biochemistry Journal, vol. 118, no. 3, p. 54-55.
- MACEK T, et al. 2004. Phytoremediation: biological cleaning of a polluted environment. Reviews on environmental health, vol. 19, no. 1, p. 63-82.
- MAEDA, T. et al. 2001. Functional analyses of Bph-Tod hybrid dioxygenase, which exhibits high degradation activity toward trichloroethylene. Journal of Biological Chemistry, vol. 276, no. 32, p. 29833-29838.
- MALTSEVA, O. V. et al. 1999. Degradation of anaerobic reductive dechlorination products of Aroclor 1242 by four aerobic bacteria. Biodegradation, vol. 10, no. 5, p. 363-371.
- MASAI, E. et al. 1995. Characterization of biphenyl catabolic genes of gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus sp* strain RHA1. Applied and Environmental Microbiology, vol. 61, no. 6, p. 2079-2085.
- MASSÉ, R. et al. 1989. A Comprehensive gas chromatographic/Mass spectrometric analysis of 4-chlorobiphenyl bacterial degradation products. Biomedical and Environmental Mass Spectrometry, vol. 18, p.27-47.
- MASSÉ, R. et al. 1984. Microbial biodegradation of 4-chlorobiphenyl, a model compound of chlorinated biphenyls. Applied and Environmental Microbiology, vol. 47, no.5, p. 947-951.
- MCFARLAND, V. A. et J. U. Clarke. 1989. Environmental occurrence, abundance, and potential toxicity of polychlorinated biphenyl congeners: considerations for a congener-specific analysis. Environmental Health Perspectives, vol. 81, p.225-239.

- MCKAY, D. B. et al. 1997. Heterologous expression of biphenyl dioxygenase-encoding genes from a gram-positive broad-spectrum polychlorinated biphenyl degrader and characterization of chlorobiphenyl oxidation by the gene products. Journal of Bacteriology, vol. 179, no. 6, p. 1924-1930.
- MCKINNEY, J. D. et C. L. Waller. 1994. Polychlorinated biphenyls as hormonally active structural analogues. Environmental Health Perspectives, vol. 102, no. 3, p. 290-297.
- MIROUX, B. et J. E. Walker. 1996. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. Journal of Molecular Biology, vol. 260, no. 3, p. 289-298.
- MOHAMMADI, M. et al. 2007. Expression of bacterial biphenyl-chlorobiphenyl dioxygenase genes in tobacco plants. Biotechnology and bioengineering, vol. 97, no. 3, p. 496-505.
- MOHAMMADI, M. et M. Sylvestre. 2005. Resolving the profile of metabolites generated during oxidation of dibenzofuran and chlorodibenzofurans by the biphenyl catabolic pathway enzymes. Chemistry and Biology, vol.12, no.7, p.835-846.
- MONDELLO, F. J. 1989. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Pseudomonas* strain LB400 genes encoding polychlorinated biphenyl degradation. Journal of Bacteriology, vol. 171, no. 3, p. 1725-1732.
- MONDELLO, F. J. et L. H. Bopp. 1987. "Genetic and cell-free studies of PCB biodegradation in *Pseudomonas putida* LB400". In Proceedings of Biotech USA 1987, p. 171-181. London : Online International Ltd.
- MONDELLO, F. J. et al. 1997. Identification and modification of biphenyl dioxygenase sequences that determine the specificity of polychlorinated biphenyl degradation. Applied and Environmental Microbiology, vol. 63, no.8, p. 3096-3103.
- MOORE, G. L. et C. D. Maranas. 2002. Predicting out-of-sequence reassembly in DNA shuffling. Journal of Theoretical Biology, vol. 219, no. 1, p. 9.
- MULLER, K. M. et al. 2005. Nucleotide exchange and excision technology (next) dna shuffling: a robust method for dna fragmentation and directed evolution. Nucleic Acids Research, vol.33, no.13, p.117.
- NAM, J. W. et al. 2001. New classification system for oxygenase components involved in ring-hydroxylating oxygenations. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, vol. 65, no. 2, p. 254-263.
- NESS, J. E. et al. 2002. Synthetic shuffling expands functional protein diversity by allowing amino acids to recombine independently. Nature Biotechnology, vol. 20, no. 12, p. 1251-1255.

NOLLET, H. et al. 2005. Carbon/electron source dependence of polychlorinated biphenyl dechlorination pathways for anaerobic granules. Chemosphere, vol. 58, no. 3, p. 299-310.

OHTSUBO, Y. et al. 2001. BphS, a key transcriptional regulator of bph genes involved in polychlorinated biphenyl/biphenyl degradation in Pseudomonas sp KKS102. Journal of Biological Chemistry, vol. 276, no. 39, p. 36146-36154.

OJANGU, E. L. et al. 2000. Effects of combination of different-10 hexamers and downstream sequences on stationary-phase-specific sigma factor sigma(S)-dependent transcription in Pseudomonas putida. Journal of Bacteriology, vol. 182, no. 23, p. 6707-6713.

PARR, S. R., D. Barber et C. Greenwood. 1976. A purification procedure for the soluble cytochrome oxidase and some other respiratory proteins from Pseudomonas aeruginosa. Biochemistry Journal, vol. 157, no. 2, p. 423-430.

PATEL, T.R. et D.T. Gibson. 1976. Bacterial cis-dihydrodiol dehydrogenases: comparison of physicochemical and immunological properties. Journal of bacteriology, vol. 128, no. 3, p.842-850.

PIEPER, D. H. 2005. Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls. Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 67, no. 2, p. 170-191.

PILON-SMITS, E. 2005. Phytoremediation. Annual Review of Plant Biology, vol. 56, p.15-39.

POLLUTION PREVENTION ENVIRONMENTAL STEWARDSHIP BRANCH OF ENVIRONMENT CANADA. 2006. National Inventory of PCBs in use and PCB wastes in storage in Canada. Ottawa : Pollution Prevention Environmental Stewardship Branch of Environnement Canada.

PROGRAMME DES NATIONS UNIES SUR L'ENVIRONNEMENT (PNUE). 1999. L'inventaire des Capacités Mondiales de Destruction des PCB. Nairobi : Programme des Nations Unies sur l'Environnement.

RIBASFITO, N. et al. 2001. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and neurological development in children: a systematic review. Journal Epidemiology and Community Health, vol. 55, no. 8, p. 537-546.

SAFE, S. H. 1994. Polychlorinated biphenyls (PCBs) - environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. Critical Review in Toxicology, vol. 24, no. 2, p. 87-149.

SAITOU, N. et M., Nei. 1987. The Neighbor-joining Method : A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. Molecular Biology and Evolution, vol. 4, no. 4, p.406-425

SAMBROOK, J., E. F. Fritsch et T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

SMITH, K.E., Schwab, A.P., et M.K. Banks. 2007. Phytoremediation of polychlorinated biphenyl (PCB)-contaminated sediment: a greenhouse feasibility study. Journal of Environmental Quality, vol. 36, no. 1, p. 239-244.

SCHMIDT, C. L. et L. Shaw. 2001. A comprehensive phylogenetic analysis of Rieske and Rieske-type iron-sulfur proteins. Journal Bioenergetics and Biomembranes, vol. 33, no. 1, p. 9-26.

SEEGER, M. et al. 2003. Biotransformation of natural and synthetic isoflavonoids by two recombinant microbial enzymes. Applied and Environmental Microbiology, vol.69, no.9, p.5045-5050.

SEEGER, M., K. N. Timmis et B. Hofer. 1995. Conversion of chlorobiphenyls into phenylhexadienoates and benzoates by the enzymes of the upper pathway for polychlorobiphenyl degradation encoded by the *bph* locus of *Pseudomonas sp* strain LB400. Applied and Environmental Microbiology, vol. 61, no. 7, p. 2654-2658.

SENDA, T. et al. 2000. Crystal structure of NADH-dependent ferredoxin reductase component in biphenyl dioxygenase. Journal of Molecular Biology, vol. 304, no.3, p. 397-410.

SETO, M. et al. 1995. A novel transformation of polychlorinated biphenyls by *Rhodococcus sp* strain RHA1. Applied and Environmental Microbiology, vol. 61, no. 9, p.3353-3358.

SETO, M. et al. 1995. Multiple polychlorinated biphenyl transformation systems in the gram-positive bacterium *Rhodococcus sp* strain RHA1. Applied and Environmental Microbiology, vol. 61, no. 12, p. 4510-4513.

SIEBER, V., C. A. Martinez et F. H. Arnold. 2001. Libraries of hybrid proteins from distantly related sequences. Nature Biotechnology, vol. 19, no. 5, p.456-460.

SINGER, A.C., D.E., Crowley et I.P., Thompson. 2003. Secondary Plant Metabolites in Phytoremediation and Biotransformation. Trends in Biotechnology, vol.21, p.123-130.

SIMARD, C. 2002. « Caractérisation de dioxygénases du biphenyle produites par ingénierie génétique » Mémoire de maîtrise, Québec, INRS-Institut Armand-Frappier, 109p.

SMITH, M. R. 1990. The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. Biodegradation, vol. 1, no. 2-3, p. 191-206.

STEMMER, W. P. 1994. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *in vitro* recombination for molecular evolution. *Proceedures of National Academy of Sciences USA*, vol. 91, no.22, p.10747-10751.

STIM, K. P. 1995. A phylogenetic analysis of micro-organisms isolated from subsurface environments. *Molecular Ecology*, vol. 4, no.1, p.1-10.

STRAATHOF, A. J. J., S. Panke et A. Schmid. 2002. The production of fine chemicals by biotransformations. *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 13, no. 6, p.548-556.

SUENAGA, H., M. Goto et K. Furukawa. 2006. Active-site engineering of biphenyl dioxygenase: effect of substituted amino acids on substrate specificity and regiospecificity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol.71, no.2, p.168-176.

SUENAGA, H., M. Goto et K. Furukawa. 2001. Emergence of multifunctional oxygenase activities by random priming recombination. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no.25, p. 22500-22506.

SUENAGA, H. et al. 2001. Directed evolution of biphenyl dioxygenase: Emergence of enhanced degradation capacity for benzene, toluene, and alkylbenzenes. *Journal of Bacteriology*, vol. 183, no. 18, p.5441-5444.

SUENAGA, H. et al. 1999. Engineering a hybrid *Pseudomonas* to acquire 3,4-dioxygenase activity for polychlorinated biphenyls. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 87, no. 4, p.430-435.

SUENAGA, H. et al. 2002. Alteration of regiospecificity in biphenyl dioxygenase by active-site engineering. *Journal of Bacteriology*, vol. 184, no.13, p.3682-3688.

SUGIYAMA, K. et al. 1995. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase from *Pseudomonas* sp strain KKS102 having polychlorinated biphenyl (PCB)-degrading activity. *Proteins - Structure Function and Genetics*, vol. 22, no. 3, p.284-286.

SYLVESTRE, M. et al. 1996. Characterization of active recombinant 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphenyl dehydrogenase from *Comamonas testosteroni* B356 and sequence of the encoding gene (*bphB*). *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 62, no.8, p.2710-2715.

SYLVESTRE, M. et al. 1996. Sequencing of *Comamonas testosteroni* strain B-356-biphenyl/chlorobiphenyl dioxygenase genes: evolutionary relationships among Gram-negative bacterial biphenyl dioxygenases. *Gene*, vol.174, no.2, p.195-202.



- TAIRA, K. et al. 1992. Analysis of *bph* operon from the polychlorinated biphenyl-degrading strain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. Journal of Biological Chemistry, vol. 267, no. 7, p.4844-4853.
- TAN, H. M. et C. M. Cheong. 1994. Substitution of the ISP alpha subunit of biphenyl dioxygenase from *Pseudomonas* results in a modification of the enzyme activity. Biochemistry and Biophysic Research Communication, vol. 204, no. 2, p. 912-917.
- TARTAKOVSKY, B. et al. 2001. Degradation of aroclor 1242 in a single-stage coupled anaerobic/aerobic bioreactor. Water Research, vol. 35, no. 18, p. 4323-30.
- TAYLOR, P. M. et P. H. Janssen. 2005. Variations in the abundance and identity of class II aromatic ring-hydroxylating dioxygenase genes in groundwater at an aromatic hydrocarbon-contaminated site. Environmental Microbiology, vol. 7, no. 1, p. 140-146.
- TAYLOR, P. M. et al. 2002. Detection of known and novel genes encoding aromatic ring-hydroxylating dioxygenases in soils and in aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. FEMS Microbiology Letters, vol. 216, no. 1, p. 61-66.
- TILSON, H. A. et P. R. Kodavanti. 1997. Neurochemical effects of polychlorinated biphenyls: an overview and identification of research needs. Neurotoxicology, vol. 18, no. 3, p. 727-43.
- UNTERMAN, R. 1996. "A history of PCB degradation" In: R. L. Crawford et D.L. Crawford. Biotechnology Research Series: Bioremediation Principles and Applications. Cambridge University Press, U.K. p. 209-253.
- VAILLANCOURT, F. H. et al. 2003. Characterization of extradiol dioxygenases from a polychlorinated biphenyl-degrading strain that possess higher specificities for chlorinated métabolites. Journal of Bacteriology, vol. 185, no. 4, p. 1253-1260.
- VEZINA J, D. Barriault et M. Sylvestre. 2008. Diversity of the C-terminal portion of the biphenyl dioxygenase large subunit. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, vol. 15, no. 2-3, p. 139-151.
- VEZINA J, D. Barriault et M. Sylvestre. 2007. Family shuffling of soil DNA to change the regiospecificity of *Bulkholderia xenovorans* LB400 biphenyl dioxygenase. Journal of Bacteriology, vol. 189, no. 3, p. 799-788.
- VOIGT, C. A., S. Kauffman et Z. G. Wang. 2000. Rational evolutionary design: The theory of *in vitro* protein evolution. Advances in protein chemistry, vol. 55, p. 79-160.
- VOLKOV, A. A., Z. Shao et F. H. Arnold. 1999. Recombination and chimeragenesis by *in vitro* heteroduplex formation and *in vivo* repair. Nucleic Acids Research, vol. 27, no. 18, p. 18.

- WACKETT, L. P. 2002. Mechanism and applications of Rieske non-heme iron dioxygenases. Enzyme and Microbial Technology, vol. 31, no. 5, p. 577-587.
- WAGNERDOBLER, I. et al. 1998. Microcosm enrichment of biphenyl-degrading microbial communities from soils and sediments. Applied and Environmental Microbiology, vol. 64, no. 8, p. 3014-3022.
- WANIA, F. 2000. Environmental fate of POPs. European Journal of Lipid Science and Technology, vol. 102, no. 1, p. 54-56.
- WATANABE, T., H. Fujihara et K. Furukawa. 2003. Characterization of the second LysR-type regulator in the biphenyl-catabolic gene cluster of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. Journal of Bacteriology, vol. 185, no. 12, p. 3575-3582.
- WENDE, P., F. H. Bernhardt et K. Pflieger. 1989. Substrate-modulated reactions of putidamonooxin. The nature of the active oxygen species formed and its reaction mechanism. European Journal of Biochemistry, vol. 181, no. 1, p. 189-197.
- WERLEN, C., H. P. E. Kohler et J. R. van der Meer. 1996. The broad substrate chlorobenzene dioxygenase and *cis*-chlorobenzene dihydrodiol dehydrogenase of *Pseudomonas sp* strain P51 are linked evolutionarily to the enzymes for benzene and toluene degradation. Journal of Biological Chemistry, vol. 271, no. 8, p. 4009-4016.
- WITZIG, R. et al. 2006. Assessment of toluene/biphenyl dioxygenase gene diversity in benzene-polluted soils: links between benzene biodegradation and genes similar to those encoding isopropylbenzene dioxygenases. Applied and Environmental Microbiology, vol. 72, no. 5, p. 3504-3514.
- WOLFE, A. K. et D. J. Bjornstad. 2002. Why would anyone object? An exploration of social aspects of phytoremediation acceptability. Critical Reviews in Plant Sciences, vol. 21, no. 5, p. 429-438.
- YANISCH-PERRON, C., J. Vieira et J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene, vol. 33, no. 1, p. 103-190.
- YEATES, C., A. J. Holmes et M. R. Gillings. 2000. Novel forms of ring-hydroxylating dioxygenases are widespread in pristine and contaminated soils. Environmental Microbiology, vol. 2, no. 6, p. 644-653.
- ZLATKIN, I. V. et al. 1996. Diversity among bacteria isolated from the deep subsurface. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, vol. 17, no. 3-4, p. 219-227.

