

Université du Québec  
INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER (Centre de Microbiologie et Biotechnologie)

**ÉTUDE DE LA BIOTRANSFORMATION DE L'ATRAZINE CHEZ DES  
SOUCHES DE *RHIZOBIA***

Par  
Bruno Calveyrac

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

Jury d'évaluation

Président du jury  
et examinateur interne

Dr Serge Belloncik, Centre  
de Microbiologie et Biotechnologie

Examineur externe

Dr Hassan Sabik, Environnement  
Canada

Directeur de recherche

Dre Darakhshan Ahmad, Centre de  
Microbiologie et Biotechnologie

Codirecteur de recherche

Dr François Lépine, Centre de  
Microbiologie et Biotechnologie

# TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES .....	ii
LISTE DES TABLEAUX .....	vi
LISTE DES FIGURES .....	vii
SOMMAIRE .....	xii
INTRODUCTION .....	1
REVUE DE LITTÉRATURE .....	5
<b>1. L'atrazine: herbicide de la famille des s-triazines.....</b>	<b>6</b>
1.1 Caractéristiques et structures.....	6
1.2 Utilisation .....	8
<b>2. Impacts environnementaux .....</b>	<b>9</b>
2.1 Dispersion in situ.....	9
2.2 Impacts écologiques de l'atrazine et de ses produits de dégradation .....	11
2.3 Impacts toxicologiques de l'atrazine et de ses produits de dégradation.....	11
<b>3. Dégradation microbienne de l'atrazine .....</b>	<b>13</b>
3.1 La voie de <i>N</i> -déalkylation .....	14
3.1.1 La voie de <i>N</i> -déalkylation chez <i>Rhodococcus</i> TE1 .....	15
3.1.2 La <i>N</i> -déalkylation via le système du cytochrome P-450 .....	15
3.1.3 La <i>N</i> -déalkylation suivie d'une déchloration chez <i>Rhodococcus</i> sp. ....	17
3.2 La voie de déchloration .....	19
3.2.1 <i>Pseudomonas</i> YAYA6 et la déchloration de l'atrazine.....	19
3.2.2 La voie de déchloration de l'atrazine chez <i>Pseudomonas</i> ADP.....	20
3.2.2.1 La voie de déchloration : étapes de la dégradation de l'atrazine.....	21
3.2.2.2 Les amidohydrolases de la dégradation de l'atrazine.....	24
<b>4. Les <i>Rhizobia</i> et la biodégradation de l'atrazine.....</b>	<b>26</b>
4.1 Description et généralités des <i>rhizobia</i> .....	26
4.1.1 Classification des <i>rhizobia</i> .....	26
4.1.2 Les formes libres et symbiotiques (bactéroïdes) chez les <i>rhizobia</i> .....	28
4.1.3 L'interaction associative chez les <i>rhizobia</i> : la symbiose.....	29
4.1.3.1 L'interaction associative spécifique avec les légumineuses.....	29
4.1.3.2 L'interaction associative non spécifique .....	30
4.1.4 La génétique de symbiose légumineuse- <i>rhizobia</i> .....	30
4.2 Le potentiel de biodégradation de xénobiotiques chez les <i>rhizobia</i> .....	34

<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>38</b>
<b>1. Liste du matériel.....</b>	<b>39</b>
1.1 Instrumentation.....	39
1.2 Produits chimiques et biochimiques.....	39
1.3 Enzymes .....	41
1.4 ADN .....	41
1.5 Trousses de biologie moléculaire .....	41
1.6 Souches bactériennes utilisées.....	42
<b>2. Milieux de culture.....</b>	<b>42</b>
2.1 Milieu Minimal Atrazine (MMA) .....	42
2.2 Milieu TYc pour <i>rhizobia</i> .....	43
2.3 Milieu LB .....	43
<b>3. Étude de croissance des différentes souches de <i>rhizobia</i>.....</b>	<b>43</b>
3.1 Croissance des différentes souches de <i>rhizobia</i> .....	43
3.2 Effet de différentes sources de carbone sur la croissance de la souche P2 de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> . .....	44
<b>4. Étude de la biotransformation de l'atrazine par des souches de <i>rhizobia</i>.....</b>	<b>45</b>
4.1 Évaluation de la présence d'exopolysaccharides (EPS) au sein des cultures de <i>rhizobia</i> par précipitation.....	45
4.2 Filtration des échantillons avant analyse de la biotransformation de l'atrazine à l'aide de la chromatographie liquide à haute performance (CLHP). .....	46
4.3 Extraction à l'éther de l'atrazine provenant de la culture en milieu minimal atrazine de <i>rhizobia</i> . .....	46
4.4 Analyse de la biotransformation de l'atrazine et des métabolites de l'atrazine par chromatographie liquide à haute performance (CLHP). .....	47
<b>5. Test de minéralisation de l'atrazine. ....</b>	<b>48</b>
<b>6. Isolement et purification de l'ADN.....</b>	<b>49</b>
6.1 Isolement de l'ADN génomique.....	49
6.1.1 Isolement de l'ADN plasmidique.....	50
6.1.2 Isolement de l'ADN plasmidique chez des clones d' <i>E. coli</i> par midi- prep. ....	51
<b>7. Amplifications par PCR de l'ADN total et plasmidique.....</b>	<b>53</b>
7.1 Isolement de l'ADN plasmidique par la méthode modifiée d'Eckardt. ....	54
7.1.1 Amplification par PCR sur l'ADN plasmidique à l'aide des amorces spécifiques des gènes <i>atzA</i> , <i>atzB</i> et <i>atzC</i> de <i>Pseudomonas</i> ADP. ....	55
7.2 Amplifications par « semi-nested PCR » de l'ADN total. ....	56
<b>8. Procédures d'hybridation de type Southern des produits de PCR et de     semi-nested PCR et de plasmides isolés par la méthode Eckardt. ....</b>	<b>60</b>
8.1 Transfert par capillarité de l'ADN sur membrane de nylon.....	60

8.2	Préparation de fragments d'ADN par digestion enzymatique.....	61
8.3	Marquage de sondes à la digoxigénine (DIG) à l'aide de l'enzyme Klénow (« Random primed DNA labeling »).....	62
8.4	Hybridation de l'ADN à l'aide d'une sonde marquée à la DIG.....	62
8.5	Détection de l'ADN hybridé à la sonde marquée à la digoxigénine.....	63
<b>9.</b>	<b>Séquençage de l'ADN amplifié par PCR.....</b>	<b>64</b>
<b>10.</b>	<b>Analyse des séquences d'ADN par différents logiciels.....</b>	<b>64</b>
	<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>66</b>
<b>1.</b>	<b>Croissance de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> P2 et <i>Sinorhizobium meliloti</i> M8 et ATZ-025 sur différents substrats de croissance en présence d'atrazine (20 ppm) comme seule source d'azote.....</b>	<b>67</b>
<b>2.</b>	<b>Dégradation de l'atrazine par différentes souches de <i>rhizobia</i>.....</b>	<b>71</b>
2.1	Dégradation de l'atrazine.....	71
2.2	Présence d'exopolysaccharides (EPS).....	74
2.3	Biotransformation de deux métabolites chlorés de l'atrazine par CLHP.....	76
2.4	Minéralisation de l'atrazine par la souche P2.....	79
<b>3.</b>	<b>Détection par PCR d'homologues aux gènes <i>atzA</i>, <i>atzB</i> et <i>atzC</i> de <i>Pseudomonas</i> ADP chez la souche P2 de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> et chez les souches ATZ-025 et M8 de <i>S. meliloti</i>.....</b>	<b>81</b>
3.1	Amorces spécifiques utilisées pour les PCR sur l'ADN total des souches P2, ATZ-25 et M8.....	83
3.2	Amplification par PCR du gène <i>atzA</i> chez différentes souches de <i>rhizobia</i> .....	83
3.3	Amplification par PCR du gène <i>atzB</i> chez les souches P2, ATZ-025 et M8.....	85
3.4	2 <sup>e</sup> PCR à l'aide des amorces spécifiques pour le gène <i>atzB</i> sur un produit de PCR de l'ADN total de la souche P2.....	87
<b>4.</b>	<b>Détection d'homologues avec le gène <i>atzB</i> de <i>Pseudomonas</i> ADP au niveau de l'ADN total de la souche P2 par « semi-nested PCR » utilisant des amorces dégénérées et hybridation Southern.....</b>	<b>89</b>
4.1	Conception des amorces dégénérées pour les gènes <i>atzA</i> , <i>atzB</i> et <i>atzC</i> .....	89
4.2	«Semi-Nested PCR».....	92
4.3	Hybridation Southern à l'aide d'une sonde spécifique au gène <i>atzB</i> .....	92
<b>5.</b>	<b>Analyses de séquence d'ADN d'un homologue au gène <i>atzB</i> chez la souche P2 de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>.....</b>	<b>94</b>
<b>6.</b>	<b>Détection d'homologues avec les gènes <i>atzA</i>, <i>atzB</i> et <i>atzC</i> de <i>Pseudomonas</i> ADP au niveau plasmidique chez la souche P2 par PCR et par hybridation Southern.....</b>	<b>100</b>

6.1	Hybridation Southern des plasmides de la souche P2 à l'aide d'une sonde spécifique au gène <i>atzA</i> de <i>Ps. ADP</i> .....	100
6.2	Détection d'homologues avec le gène <i>atzB</i> de <i>Pseudomonas ADP</i> au niveau des plasmides satellites de la souche P2 par PCR. ....	103
6.3	Détection d'homologues avec le gène <i>atzC</i> de <i>Pseudomonas ADP</i> au niveau plasmidique chez la souche P2 par PCR à l'aide d'amorces spécifiques à une région interne du gène <i>atzC</i> . ....	103
<b>DISCUSSION .....</b>		<b>107</b>
1	<b>Croissance des <i>rhizobia</i> en présence de quelques sources de carbones et de l'atrazine.....</b>	<b>108</b>
2.	<b>Évaluation de la biotransformation de l'atrazine par les <i>rhizobia</i>. ....</b>	<b>109</b>
3.	<b>Évaluation de la minéralisation de l'atrazine par les <i>rhizobia</i> par la méthode du piégeage du <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>.....</b>	<b>112</b>
4.	<b>Détection d'homologues aux gènes <i>atzA atzB</i> et <i>atzC</i> de <i>Pseudomonas ADP</i> chez la souche P2 de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i> et chez deux souches de <i>S. meliloti</i> ATZ-025 et M8 par PCR.....</b>	<b>114</b>
4.1	Le gène <i>atzA</i> chez les souches de <i>rhizobia</i> .....	114
4.2	Le gène <i>atzB</i> chez les souches de <i>rhizobia</i> .....	115
4.2.1	Le séquençage d'un fragment interne conservé du gène <i>atzB</i> amplifié par PCR chez la souche P2.....	115
4.2.2	Hybridation d'un fragment amplifié par « semi-nested PCR » à l'aide d'une sonde du gène <i>atzB</i> . ....	117
4.3	Le gène <i>atzC</i> chez la souche P2 de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> .....	118
<b>CONCLUSION.....</b>		<b>120</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>		<b>123</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>		<b>125</b>

## LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau I : s-triazines et herbicides dégradés par les produits des gènes <i>atrA</i> et <i>trzA</i> de <i>Rhodococcus</i> TE1 et <i>R. corallinus</i> NRRL B-15444R. (Behki <i>et al.</i> , 1993, Shao <i>et al.</i> , 1995).....	18
Tableau II : Positions et régions couvertes par les amorces spécifiques aux gènes <i>atzA</i> , <i>atzB</i> et <i>atzC</i> .....	54
Tableau III : Séquence nucléotidique des amorces dégénérées ATZB:ADP:1122L et ATZB :ADP :2109R 2109R basées sur les sites actifs conservés chez les trois enzymes <i>atzABC</i> et utilisées lors de « semi-nested PCR » en présence de l'ADN total de la souche P2 de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> . ....	57
Tableau IV : Programme de PCR utilisé lors du « semi-nested PCR ». ....	59
Tableau V : Séquence nucléotidique de l'amorce non dégénérée ATZB :ADP :1611R utilisée lors du « semi-nested PCR » en présence de fragments amplifiés par un PCR primaire de l'ADN total de la souche P2.....	60
Tableau VI : Milieux minimum de culture contenant différentes sources de carbone (succinate, glucose à 0,2% ou 0,025% et 0,075% respectivement) où la présence d'exopolysaccharides (EPS) a été identifiée après mise en culture de trois souches de <i>rhizobia</i> (souches M8 et ATZ-025 de <i>S. meliloti</i> et P2 de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> ).....	75

## LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1 : Molécule de s-triazine .....	7
Figure 2 : Molécule d'atrazine .....	7
Figure 3 : Voie de dégradation de l'atrazine par N-déalkylation chez <i>Rhodococcus</i> sp. ....	16
Figure 4: Voie de dégradation de l'atrazine par <i>Pseudomonas</i> ADP (De Souza <i>et al.</i> , 1998b).....	23
Figure 5 : Composé impliqué dans le métabolisme des <i>rhizobia</i> ou biotransformé par les <i>rhizobia</i> . (A) La lutéoline est un flavone qui subit, chez les <i>rhizobia</i> , un clivage au niveau de l'anneau C (Rao et Cooper, 1994). (B) Le dibenzothiophène est un composé qui subit un clivage oxydatif de l'anneau aromatique par <i>R. meliloti</i> (Frassinetti <i>et al.</i> , 1998).....	35
Figure 6 : Région nucléotidique amplifiée par les amorces dégénérées ATZB :ADP :1122L et ATZB :ADP :2109R chez le gène <i>atzB</i> et conservée chez les gènes <i>atzA</i> , <i>atzB</i> et <i>atzC</i> de <i>Pseudomonas</i> ADP.....	58
Figure 7 : Croissance de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> P2 et <i>Sinorhizobium meliloti</i> M8 et ATZ-025 dans un milieu minimal contenant 20 ppm (20 µg.mL <sup>-1</sup> ) d'atrazine comme unique source d'azote et 0,2 % de succinate (S) ou 0,2 % de glucose (G). ....	68
Figure 8 : Croissance de la souche P2 de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> dans un milieu minimal contenant 20 ppm d'atrazine, 0.1% de glucose et différentes sources de carbone et d'énergie à 0.005% et 0.025% ou 0.1% de glucose seulement.....	70
Figure 9 : Concentration d'atrazine pendant 96 heures de culture en milieu minimal atrazine (MMA) avec la souche P2 de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> , <i>S. meliloti</i> M8 ou <i>S. meliloti</i> ATZ-025 en présence de 0,2% de glucose comme source de carbone et 20 ppm d'atrazine comme source d'azote. ....	72
Figure 10 : (A) Identification par CLHP de l'atrazine issu du surnageant d'une culture aérobie de la souche P2 de <i>R.</i>	

	<i>leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> après plus de 96 heures en milieu minimal atrazine (MMA) contenant 0,2% de glucose comme source de carbone et 20 ppm d'atrazine comme source d'azote. (B) L'atrazine présent après plus de 96 heures de culture dans le milieu minimal atrazine utilisé comme témoin abiotique contenant 0,2% de glucose et 20 ppm d'atrazine.....	73
Figure 11 :	Concentration d'atrazine après extraction à l'éther d'un contrôle abiotique (MMA) contenant 20 ppm d'atrazine et d'une culture de la souche P2 de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> dans un milieu minimal contenant du malate (0,025%) et 0,1% de glucose comme source de carbone et 20 ppm d'atrazine comme unique source d'azote.....	77
Figure 12 :	(A) Chromatogramme de l'atrazine et de 2 métabolites de l'atrazine, le désisopropylatrazine (CIAT) et le dééthylatrazine (CEAT) montrant leur temps de rétention dans le cadre de l'analyse de leur dégradation. (B) Analyse de la dégradation du CIAT et du CEAT par la souche P2 de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> dans un milieu minimal dont les sources de carbone et d'azote ont été le CIAT (25 ppm) ou le CEAT (22,5 ppm).....	78
Figure 13 :	Minéralisation de l'atrazine- <sup>14</sup> C par <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> P2 et croissance de cette souche dans des conditions de micro-aérobie et d'aérobie dans des bouteilles sérologiques et dans un milieu minimal de culture contenant 100 ppm d'atrazine comme source de carbone et d'azote.....	80
Figure 14 :	Identification et localisation des amorces spécifiques aux gènes <i>atzA</i> , <i>atzB</i> et <i>atzC</i> utilisées au cours de cette étude et des régions nucléotidiques codant dans des séquences peptidiques conservées chez les protéines AtzA, AtzB et AtzC de <i>Pseudomonas</i> ADP. ....	82
Figure 15 :	Analyses par PCR à l'aide d'amorces construites afin d'amplifier la région interne du gène <i>atzA</i> . Les ADN étudiés sont ceux de <i>Pseudomonas</i> ADP (puits 1), de la souche ATZ-025 de <i>S. meliloti</i> (puits 2), du plasmide pMD4 (puits 3), de la souche P2 de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> (puits 4) et de la souche M8 de <i>S. meliloti</i> (puits 5). Les valeurs à gauche du gel constituent les valeurs du marqueur moléculaire $\lambda$ /HindIII (en kilopaires de bases, kpb).....	84



- Figure 16 : Analyses de PCR effectuées avec des amorces construites afin d'amplifier des régions internes du gène *atzB* de *Pseudomonas* ADP présent sur le plasmide pATZB-2 :ADP (puits 3). L'ADN génomique des souches suivantes, présentant un potentiel de dégradation de l'atrazine, a été analysé : *Sinorhizobium meliloti* ATZ-025 (puits 1), *Sinorhizobium meliloti* M8 (puits 2), *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* P2 (puits 4). Les valeurs à gauche du gel de 1% d'agarose sont en kilopaires de bases (Kpb) et représentent le marqueur de poids moléculaire  $\lambda$ /HindIII..... 86
- Figure 17 : Analyses de PCR effectuées avec des amorces construites afin d'amplifier des régions internes du gène *atzB* de *Pseudomonas* ADP présent sur un produit de PCR de 500 paires de bases du plasmide pATZB-2 :ADP (puits 2). L'ADN amplifié de la souche P2 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, présentant un potentiel de dégradation de l'atrazine, a été réamplifié par un 2<sup>e</sup> PCR (puits 1). Un fragment de 0,5 kpb a été observé pour les deux produits de PCR lorsque les amplifications ont été mises sur un gel d'agarose de 0,75%. Les valeurs à gauche du gel constituent les valeurs du marqueur moléculaire  $\lambda$ /HindIII (en kilopaires de bases, kpb)..... 88
- Figure 18 : Analyses par PCR à l'aide d'amorces dégénérées construites afin d'amplifier des régions internes conservées entre les gènes *atzA*, *atzB* ou *atzC*. L'ADN étudié est l'ADN total de la souche P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* (puits 2 et 3), et du plasmide pATZB-2 :ADP (puits 4 et 5) en présence de 0,5  $\mu$ M ou 3,6  $\mu$ M d'amorces dégénérées. Le marqueur moléculaire utilisé dans ce gel de 1% d'agarose est  $\lambda$ /HindIII (puits 1)..... 91
- Figure 19 : (A) Amplification de fragments d'ADN par semi-Nested PCR à l'aide d'une amorce non-dégénérée (R) spécifique au gène *atzB* et d'une amorce dégénérée (ATZB :ADP :1122L) sur un gel d'agarose à 0,9 %. L'amplification s'est faite à partir d'un fragment d'ADN de 1 kb (puits 2) et d'un fragment d'ADN de 1,3 kb (puits 3) amplifié chez la souche P2. Le puits 4 correspond à l'amplification effectuée sur le plasmide pATZB-2 :ADP (témoin positif du semi-nested PCR) et le puits 6 contient le plasmide pATZB-2 :ADP. Le puits 1 présente le marqueur moléculaire « 1 kb ladder ». (B) Hybridation Southern des produits d'amplification du semi-nested PCR sur membrane de nylon à l'aide d'une sonde *atzB*/AvaI de 2

- kpb marquée à la digoxygénine spécifique au gène *atzB* de *Pseudomonas* ADP..... 93
- Figure 20 : Alignement du fragment d'ADN amplifié et partiellement séquencé chez la souche P2 de *R. leguminosarum* et du gène *atzB* de *Pseudomonas* ADP et emplacement de ce fragment de 449 paires de bases par rapport au gène *atzB* de 2 661 paires de bases. Le fragment d'ADN de P2 contient une région conservée (nucléotides 1120 à 1163). ..... 96
- Figure 21 : Alignement de séquences du fragment amplifié et partiellement séquencé de la souche P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* avec le gène *atzB* de *Pseudomonas* ADP et une région amplifiée du gène *atzB* présent sur le plasmide pATZB-2 :ADP. .... 97
- Figure 22: Alignement de séquences nucléotidiques des gènes *atzA*, *atzB* et *atzC* et de l'ADN amplifié de P2 pour le gène *atzB* (A) et alignement des séquences d'acides aminés N-terminales déduites (B) de AtzA (atrazine chlorohydrolase), AtzB (hydroxyatrazine ethylaminohydrolase), AtzC (N-isopropylammelide isopropylaminohydrolase) de *Pseudomonas* ADP et de la séquence d'acides aminés projetée obtenue à partir d'une région nucléotidique amplifiée par PCR chez la souche P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Les acides aminés et les séquences nucléotidiques ont été numérotés selon la région N-terminale de chaque protéine et selon la séquence des gènes rapportés dans GenBank et dans Sadowsky *et al.* (1998). Les acides aminés en gras et soulignés sont les acides aminés conservés chez les trois hydrolases de *Pseudomonas* ADP impliquées dans la dégradation de l'atrazine..... 98
- Figure 23 : Profile plasmidique de *R. leguminosarum* bv. *viciae* P2 (puits 2) obtenue par la méthode Eckardt. Le puits 1 contient l'ADN génomique de la souche Zb57 de *Rhizobium* sp. où deux plasmides cryptiques de 60 kpb (pRP4) et de 140 kpb ont été isolés (Datta *et al.*, 1971). ..... 101
- Figure 24 : Isolement de plasmides par la méthode Eckardt chez la souche P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *Pseudomonas* ADP et la souche Zb57 de *R. meliloti* et hybridation Southern des plasmides sur membrane de nylon à l'aide d'une sonde *atzA/AvaI* de 1,9 kpb marquée à la digoxygénine et spécifique au gène *atzA* de *Pseudomonas* ADP. (Les puits 2 et 6 représentent les plasmides isolés par

- la méthode Eckardt de la souche B5 de *R. leguminosarum* bv. phaseoli qui n'ont pas été décrits dans le texte)..... 102
- Figure 25 : Amplification de fragments d'ADN par PCR à l'aide des amorces spécifique au gène *atzB* sur un gel d'agarose de 1%. L'amplification s'est faite à partir de l'ADN plasmidique (plasmides satellites) de la souche P2 (puits 1). Le puits 2 correspond à l'amplification effectuée sur le plasmide pATZB-2 :ADP, le vecteur d'expression du gène *atzB* chez *E. coli* DH11S et témoin positif de l'amplification pour le gène *atzB*. À gauche du gel d'agarose, le marqueur de poids moléculaire  $\lambda$ /HindII est représenté. .... 104
- Figure 26 : Amplification de fragments d'ADN par PCR à l'aide des amorces spécifiques au gène *atzC* sur un gel d'agarose de 1%. L'amplification s'est faite à partir de l'ADN plasmidique (plasmides satellites) de la souche P2 (puits 1) et de son ADN total (puits 2). Le puits 3 correspond à l'amplification effectuée sur le plasmide pTD2.5 :ADP, le vecteur d'expression du gène *atzC* chez *E. coli* DH5 $\alpha$  et témoin positif pour l'amplification du gène *atzC*. À gauche du gel d'agarose, le marqueur de poids moléculaire  $\lambda$ /HindII est représenté. .... 105

## **SOMMAIRE**

Les *rhizobia* sont des bactéries connues pour établir des symbioses avec des plantes de la famille des Leguminosae. Ils ont été largement étudiés dans le cadre de la fixation symbiotique de l'azote moléculaire. Cependant, ces bactéries vivent aussi sous leur forme libre au niveau de la rhizosphère où elles sont exposées à de nombreux composés aromatiques, polyaromatiques et/ou hétérocycliques. Puisque les *rhizobia* sont des bactéries rhizosphériques exposés à de tels composés, ils constituent de bons candidats pour la biotransformation et la biodégradation de xénobiotiques aromatiques et hétérocycliques comme l'atrazine retrouvé dans la rhizosphère et sur les terrains agricoles.

Trois souches, à savoir les souches ATZ-025 et M8 de *S. meliloti* et *R. leguminosarum* bv. *viciae* P2, isolées de nodules de légumineuses mises en culture dans des sols contaminés par l'atrazine et capables de croître sur l'acide cyanurique, ont été étudiées pour leur capacité de transformer l'atrazine en milieu minimal. Les trois souches sont capables de croître dans un milieu contenant une source de carbone et l'atrazine comme source d'azote. Bien que la production d'EPS par ces bactéries a nuit au suivi de la disparition de l'atrazine par CLHP, un taux de minéralisation de 2,2 à 2,9% a été observé chez la souche P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*.

Dans le cadre de la dégradation de l'atrazine, des gènes codant pour des amidohydrolases, les gènes *atzA*, *atzB* et *atzC* ont été retrouvés chez plusieurs bactéries gram négatif qui dégradent l'atrazine soit complètement ou soit partiellement. Cependant aucune amplification par PCR du gène *atzA* n'a été obtenue chez les souches M8, ATZ-025 et P2. Par contre la souche P2 a présenté l'amplification d'un fragment de 2,3 kpb qui pourrait correspondre à une région amplifiée d'un gène impliqué dans une voie catabolique non spécifique à l'atrazine ou correspondre à un nouveau gène qui reste à étudier.

Quant au gène *atzB*, il a été identifié chez la souche P2 suite à une amplification par PCR, à un « semi-nested PCR » et à une hybridation Southern. Le fragment amplifié par PCR présente 98,2% d'homologie avec le gène *atzB* de *Pseudomonas* ADP. Ce gène semble être présent sur un des plasmides cryptiques de la souche P2.

L'amplification par PCR pour le gène *atzC* chez la souche P2 présente un fragment de taille inférieure à celui du gène *atzC* suggérant une perte de la moitié du gène *atzC* chez la souche P2. Il serait possible que la présence de transposons puisse être à l'origine de la perte d'une région du gène *atzC* et de l'absence du gène *atzA* chez certaines souches. L'identification seulement du gène *atzB* chez la souche P2, alors que cette souche minéralise l'atrazine suggère une perte ou une substitution des gènes *atzA* et *atzC* au cours de sous cultures. Ce résultat pourrait suggérer l'existence de voies cataboliques nouvelles de l'atrazine impliquant des enzymes ayant une large spécificité de substrats.

## **INTRODUCTION**

L'utilisation d'herbicides sélectifs en agriculture a permis d'optimiser la production des récoltes tout en réduisant ou en éliminant les plantes adventices (les mauvaises herbes) qui rivalisent avec les plantes agraires (Trotter *et al.*, 1990). Parmi ces herbicides, les inhibiteurs sélectifs de la photosynthèse, comme l'atrazine, ont rapidement montré leur efficacité et ont été largement employés dans le contrôle des plantes adventices.

Les herbicides de types s-triazines sont utilisés en agriculture depuis plus de 40 ans : l'atrazine a été introduit en Europe en 1957, et au Canada dans les années 1960 (De Souza *et al.*, 1998a; Loosli, 1995; Trotter *et al.*, 1990). La plupart des données toxicologiques disponibles, au début de leur utilisation, suggéraient que les composés s-triazines étaient inoffensifs lors de leur production et étaient recommandés en l'agriculture (Loosli, 1995). Mais, suite à une étude dans les années 1980 montrant les effets de l'atrazine sur les tumeurs mammaires chez le rat, la perception des s-triazines comme composés inoffensifs a changé (Loosli, 1995). En raison de sa longue et importante utilisation en Amérique du Nord depuis les années 60, notamment au Canada, l'atrazine est devenu un important contaminant (Trotter *et al.*, 1990).

En plus d'être un contaminant environnemental, l'atrazine présente différentes propriétés toxicologiques chez l'homme et chez les végétaux soulevant le besoin de développer des stratégies de décontamination. Les approches classiques de décontamination (traitements physico-chimiques et thermiques et l'excavation) s'avèrent inadéquates ou peu efficaces (Stucki *et al.*, 1995) pour la décontamination des sols agraires, des eaux de surfaces et des eaux souterraines avoisinant les sources de contamination par l'atrazine.

Historiquement, il s'est avéré que les traitements de biodégradation de l'atrazine et des autres s-triazines ont été inefficaces, d'autant plus qu'aucun micro-organisme capable de minéraliser efficacement l'atrazine n'avait été identifié (Nagy *et al.*, 1995b). Ce n'est que récemment qu'un nombre limité de micro-organismes capables de dégrader et de minéraliser l'atrazine ont été isolés et caractérisés. Cependant, la plupart de ces micro-organismes sont des bactéries qui appartiennent à des genres regroupant des espèces



pathogènes (Manuila *et al.*, 1981; Tighe *et al.*, 2000). Ces bactéries présentent aussi un phénotype de minéralisation très instable (Sadowsky *et al.*, 1998; Topp *et al.*, 2000).

Le développement de stratégies de bioremédiation efficaces, basées sur des micro-organismes qui dégradent et minéralisent l'atrazine dans les conditions naturelles et sans impact négatif sur l'environnement et sur les sols agricoles, passe par des micro-organismes non pathogènes et largement présents dans les zones contaminées par l'atrazine. Ces micro-organismes doivent posséder un potentiel génétique important pour la biodégradation de xénobiotiques comme l'atrazine.

Au cours de la dernière décennie, l'implication de différentes souches de *rhizobia* dans la biodégradation ou la biotransformation de différents composés aromatiques ou polyaromatiques comme les BPC (biphényles polychlorés), les HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliques), le TNT (2,4,6-trinitrotoluène) et les composés hétérocycliques, s'est avérée significative (Ahmad *et al.*, 1997; Frassinetti *et al.*, 1998; Mehmannaavaz, 1999; Labidi *et al.*, 1999; Labidi *et al.*, 2001).

Une approche basée sur la nodulation de légumineuses mises en culture dans des sols contaminés par l'atrazine a permis de discriminer et d'isoler, à partir des nodules, des *rhizobia* indigènes potentiellement intéressants (Mehmannaavaz, 1999; Labidi *et al.*, 1999). Certains *rhizobia* ainsi isolés ont fait l'objet d'une étude de la biotransformation et de la minéralisation de l'atrazine en milieu liquide. Le but principal de cette étude est d'évaluer le potentiel de certaines souches de *rhizobia* de biotransformer l'atrazine. Le premier objectif a été d'évaluer la croissance des souches dans des milieux de culture contenant de l'atrazine comme source d'azote et différentes sources de carbone. Puis, la biotransformation de l'atrazine et de certains métabolites par ces souches a été suivie en mesurant sa disparition par CHLP et en évaluant la minéralisation de l'atrazine. Le deuxième objectif a été d'identifier, au sein des *rhizobia*, certains gènes impliqués dans la biotransformation de l'atrazine chez la souche *Pseudomonas* ADP, la souche la plus étudiée pour la dégradation de l'atrazine, en utilisant différentes techniques de PCR

("Polymerase Chain Reaction" ou réaction de polymérisation en chaîne) et des hybridations Southern (De Souza *et al.*, 1998b, Seffernick *et al.*, 2000).

## **REVUE DE LITTÉRATURE**

## **1. L'ATRAZINE: HERBICIDE DE LA FAMILLE DES S-TRIAZINES**

### **1.1 Caractéristiques et structures**

L'atrazine ou le 2-chloro-4-(éthylamino)-6-(isopropylamino)-s-triazine est l'herbicide de la famille des s-triazines le plus largement utilisé et répandu dans l'environnement aussi bien aux États-Unis qu'au Canada (Shao *et al.*, 1995). Il est l'herbicide le plus utilisé aux États-Unis dans la production de maïs et de sorgho et au Québec dans la production de maïs (grain, fourrager et sucré) (United States Environmental Protection Agency (US EPA), 1996; Giroux, 1999). Les herbicides s-triazines incluent entre autre le simazine qui est un modulateur endocrinien (Giroux, 1999; Cooper *et al.*, 2000). Les s-triazines regroupent en plus des pesticides, de nombreux désinfectants (les chloroisocyanurates) et agents liants (textiles) (Hershberger, 2000).

Les pesticides s-triazines sont des molécules possédant un noyau hétérocyclique composé de trois atomes d'azote et de carbone (figure 1). Ils sont caractérisés aussi par la présence de groupements amine ou amino ( $-NH_2-R$  ou  $-NH_3$ ) sur les carbones 4 et 6 du noyau hétérocyclique et de groupes alkyles (R) à la position 2 du noyau et sur les groupements amines des carbones 4 et 6 (Cook, 1987).

Ces groupes R peuvent être des groupes chloro, méthylthio, amino, alkylamino, méthoxy, cyano-alkyl-amino (Hershberger, 2000). Leur toxicité s'avère surtout reliée à la présence de l'atome de chlore à la position 2, du noyau (Crawford *et al.*, 1998). Cependant, les groupes aminoalkyles confèrent aussi une toxicité aux molécules de s-triazines (Sabik *et al.*, 1995). De plus, dans toute la famille s-triazine, l'atrazine (figure 2) est le composé le plus intensément utilisé et le plus étudié (Hershberger, 2000; Seffernick *et al.*, 2000).

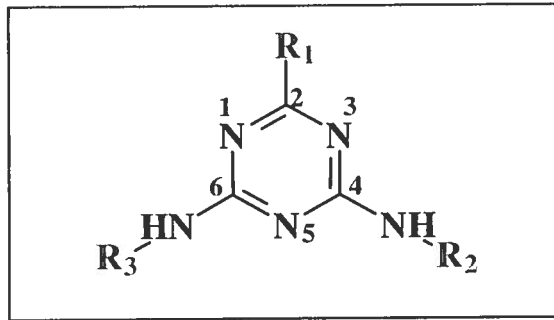


Figure 1 : Molécule de s-triazine

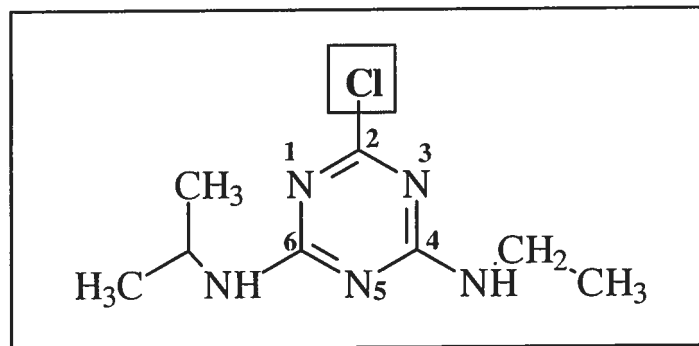


Figure 2 : Molécule d'atrazine

En tant qu'herbicide inhibiteur de la photosynthèse, l'atrazine inhibe la réaction de Hill en interagissant avec une apoprotéine du photosystème II des chloroplastes (Trotter *et al.*, 1990). L'atrazine s'associe à une protéine de 32 kDa dans le complexe B du photosystème II bloquant ainsi les transferts d'électrons entre des récepteurs quinoléiques (Caux et Kent, 1995). Cette inhibition, appelée l'effet Kautsky, crée une forte augmentation de l'émission de fluorescence, puis, à partir de certaines concentrations d'atrazine, un arrêt de toute activité photosynthétique chez la plante (Caux et Kent, 1995). L'atrazine est une molécule peu hydrophile, avec une solubilité dans l'eau de 70 mg.L<sup>-1</sup> à 25°C (Merck, 1996). Il est très soluble dans les solvants organiques comme le méthanol (solubilité de 18 000 mg.L<sup>-1</sup>) et le chloroforme (solubilité de 52 000 mg.L<sup>-1</sup>), si bien qu'il s'adsorbe facilement à la surface des particules organiques (Trotter *et al.*, 1990; Merck, 1996). L'atrazine présente un coefficient de partition contenu en carbone organique-eau dont le Log est de 2 et un coefficient de partition octanol-eau dont le Log est de 2,6 qui constituent des propriétés physico-chimiques qui affectent le transport de l'atrazine du sol à l'eau (Sabik *et al.*, 2000).

## **1.2 Utilisation**

L'atrazine est un herbicide de pré- et de post-émergence pour la culture du maïs et du canola et qui permet ainsi de contrôler les plantes adventices annuelles (Trotter *et al.*, 1990). En 1988, l'atrazine est monté au deuxième rang des pesticides les plus intensivement utilisés en Ontario avec un total de plus d'une tonne utilisée la même année (Trotter *et al.*, 1990). Au niveau des ventes au Québec, les triazines et les tétrazines représentent le deuxième groupe chimique d'herbicides le plus vendu en 1997 avec 15,8% des ventes d'herbicides dans le secteur agricole (Gorse, 1999). Ce groupe chimique comprend, l'atrazine et les triazines apparentés, le métribuzine, le cyanazine et le clofentézine (Gorse, 1999). En outre, au Québec, dans la période 1996 à 1998, l'atrazine a été l'herbicide le plus utilisé, bien que les quantités répandues étaient moindres que les années précédentes (Giroux, 1999).

## **2. IMPACTS ENVIRONNEMENTAUX**

### **2.1 Dispersion in situ**

L'atrazine est habituellement appliqué à la surface des sols cultivés sous forme d'aérosol avant l'émergence des plantules. Au Québec, cet herbicide est surtout utilisé pendant six semaines entre la dernière semaine du mois d'avril et la première semaine du mois de juin et plus occasionnellement à la fin du mois de septembre (Lemieux *et al.*, 1995). Pham et collaborateurs (2000) mentionnent et citent que l'atrazine est un des herbicides dominant au Québec avec des concentrations atteignant  $23 \mu\text{g.L}^{-1}$  au début et au milieu de l'été au niveau des petites rivières et des cours d'eau alimentant les bassins hydrographiques agraires. Suite à son application et en fonction de ses propriétés physico-chimiques et des conditions environnementales, l'atrazine se distribue dans les différentes strates du sol et de l'environnement. La distribution de l'atrazine, sa persistance et sa dégradation dans l'environnement sont liées à différents phénomènes physico-chimiques et biologiques telles que l'hydrolyse chimique, l'absorption, l'adsorption, la volatilisation, la photodégradation et la dégradation microbienne (Trotter *et al.*, 1990). Sa distribution dans le sol ainsi que sa demi-vie sont aussi affectées par le type de sol (sol riche ou pauvre en matières organiques, sableux et argileux), la température et le pH du sol (Trotter *et al.*, 1990). Cependant, cette mobilité ou ce transport de l'atrazine dans l'environnement n'est pas seulement affecté par ces facteurs (Giroux, 1999). Le transport de l'atrazine semble surtout être affecté par les quantités utilisées, les délais entre les différentes applications, les épisodes de pluie subséquentes ainsi que les caractéristiques hydrodynamiques des bassins versants (Giroux, 1999). Au Québec, le ruissellement de surface est le principal mécanisme de transport de l'atrazine vers les cours d'eau (Giroux 1999). D'autre part, la distribution de l'atrazine qui ne se limite pas aux cours d'eau, s'étend au sol et aux nappes phréatiques où sa transformation en hydroxyatrazine, dééthylatrazine et/ou déisopropylatrazine a surtout lieu (Trotter *et al.*, 1990; Giroux, 1999).

Dans le sol, le taux d'hydrolyse chimique de l'atrazine en hydroxyatrazine augmente avec la quantité adsorbée aux particules du sol (Trotter *et al.*, 1990; Lemieux *et al.*,

1995). Ce taux est le résultat de l'effet catalyseur de l'adsorption du sol (Trotter *et al.*, 1990). De ce fait, lorsque l'adsorption de l'atrazine augmente, sa demi-vie, après épandage, diminue dans le sol (Trotter *et al.*, 1990). Cet effet est dû à un processus d'adsorption réversible dans lequel un équilibre est maintenu entre la phase aqueuse, l'atrazine et l'hydroxyatrazine adsorbés. L'argile, la matière organique, la température et le pH du sol sont des facteurs qui jouent un rôle important dans le phénomène de l'adsorption (Trotter *et al.*, 1990). À des pH relativement neutres, le taux d'hydrolyse chimique de l'atrazine est faible (Trotter *et al.*, 1990). Ce taux devient important à des pH extrêmes (US EPA, 1995). D'un autre côté, l'atrazine, en terme de mobilité dans le sol (adsorption/désorption), est modérément à très mobile (Caux et Kent, 1995). Cette mobilité favorise la dispersion de l'atrazine dans les nappes phréatiques et dans les cours d'eau où des concentrations importantes d'ingrédient actif sont retrouvées (Caux et Kent, 1995; Masaphy *et al.*, 1996). L'atrazine s'adsorbe au sol et aux sédiments en suspension et peut facilement se déplacer dans la phase soluble lorsque les conditions favorables le permettent (Caux et Kent, 1995). Une faible adsorption de l'atrazine est observée lorsque la température et le pH sont élevés et lorsque le lavage du sol est important (Trotter *et al.*, 1990).

Cependant, le comportement de l'atrazine dans le sol reste très complexe. En effet, malgré tous les facteurs favorisant sa disparition, la présence d'atrazine dans le sol et les cours d'eau, aussi bien à la fin de la saison de culture qu'au printemps suivant, semble être une indication de la persistance de l'atrazine dans l'environnement, de la présence de sources continues d'atrazine telles que des sources atmosphériques ou des deux possibilités (Lemieux *et al.*, 1995). Cette persistance est favorisée par l'augmentation des concentrations en matière organique et en argile dans le sol, comme les sols agricoles (Trotter *et al.*, 1990). En plus d'être appliqué à la surface du sol, l'atrazine peut être utilisé en application foliaire en tant qu'herbicide de post-émergence. Dans un tel cas, le phénomène de volatilisation constitue la voie principale de dispersion de l'atrazine (Trotter *et al.*, 1990). La température, la vitesse de l'air, la concentration initiale de l'atrazine ainsi que la proportion d'ingrédient actif sont des facteurs qui régissent la volatilité de l'atrazine (Trotter *et al.*, 1990). Lors d'application foliaire, la volatilisation



de l'atrazine est influencée par le type formulation utilisé et par la quantité d'ingrédient actif utilisée (Trotter *et al.*, 1990). Par contre, la volatilisation de l'atrazine n'est pas une voie de dispersion importante lorsque l'ingrédient actif est appliqué au sol (Huckins *et al.*, 1986; Trotter *et al.*, 1990).

## **2.2 Impacts écologiques de l'atrazine et de ses produits de dégradation**

Bien que récemment introduit dans l'environnement, l'atrazine est devenu, en Amérique du Nord, un important contaminant du sol, des eaux souterraines et des eaux de surface. Il est devenu l'un des herbicides les plus largement utilisés au Canada au cours de la dernière décennie (Trotter *et al.*, 1990). Aux États-Unis, des concentrations de l'ordre de  $1100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $16 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  et  $1500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  ont été observées, respectivement dans le sol, les eaux de surface et les eaux souterraines, alors que les normes pour l'eau potable sont de  $3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Struthers *et al.*, 1998). Au Canada, notamment en Ontario, des concentrations de l'ordre de  $35 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  ont été mesurées dans les eaux souterraines, ainsi que des concentrations de  $74 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  dans certaines régions du sud, alors que les recommandations concernant l'eau potable sont de  $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Trotter *et al.*, 1990; Giroux, 1999). D'autre part, au Québec, des concentrations d'atrazine atteignant  $40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  ont été répertoriées sur des sites de la rivière Yamaska, dépassant non seulement les recommandations concernant l'eau potable, mais aussi les recommandations nationales pour la protection de la vie aquatique qui sont de  $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Caux et Kent, 1995).

## **2.3 Impacts toxicologiques de l'atrazine et de ses produits de dégradation**

La perception de l'innocuité des composés s-triazines a changé depuis la publication des résultats d'une étude montrant les effets de l'atrazine sur l'induction de tumeurs mammaires chez le rat (Loosli, 1995). La toxicité de l'atrazine s'étend non seulement aux plantes, mais aussi à l'homme. L'atrazine présente une légère toxicité aiguë avec une  $DL_{50}$  (dose létale médiane) orale de  $3,08 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  et induit des problèmes digestifs. Au niveau chronique, la toxicité de l'atrazine se traduit par des lésions dermiques et probablement par des tumeurs mammaires chez les animaux (Sawicki *et al.*, 1998). Il

présente un effet génotoxique chez les lymphocytes humains, en induisant des dommages chromosomiques lorsqu'il est associé à d'autres herbicides comme l'alachlor et le linuron (Sawicki *et al.*, 1998).

L'atrazine agit aussi comme modulateur endocrinien par sa fonction anti-androgène chez le rat et par l'altération de l'activité des œstrogènes chez certains mammifères (Sawicki *et al.*, 1998). Son rôle endocrinien s'étend aussi à l'homme, chez qui l'atrazine altère le ratio 16- $\alpha$ /2-hydroxyestrone, un marqueur de risque du cancer du sein chez la femme (Sawicki *et al.*, 1998). L'atrazine a tendance à augmenter, au niveau des cellules mammaires humaines, la concentration de 16- $\alpha$ -hydroxyestrone qui est une hormone stéroïdienne favorisant les risques de cancer du sein (Sawicki *et al.*, 1998). L'atrazine est un modulateur endocrinien reconnu de la fonction ovarienne. En effet, il altère les concentrations de catécholamine hypothalamique et subséquemment la régulation de la sécrétion de l'hormone lutéinisante et de la prolactine (Cooper *et al.*, 2000). De plus, Das *et al.* (2000) ont démontré que l'atrazine inhibait la synthèse intracellulaire de la dopamine et de la norépinéphrine réalisée respectivement par la tyrosine hydrolase et par la dopamine  $\beta$ -hydrolase. Cependant, l'atrazine ne présente qu'un potentiel immunotoxique limité, notamment chez la souris (Sawicki *et al.*, 1998).

D'autre part, l'atrazine en tant qu'herbicide sélectif s'attaque malgré tout à des plantes agraires et présente donc une phytotoxicité pour certaines plantes d'intérêt commercial. En effet, les jeunes plants de pois sont sensibles à l'atrazine. Ces plantes sont sévèrement endommagées ou tuées à l'intérieur de 12 jours par 1 ppm d'atrazine (Shimabukuro *et al.*, 1966). De plus, l'atrazine est aussi toxique pour les plants d'avoine (Kaufman et Blake, 1970). La phytotoxicité de l'atrazine limite beaucoup l'utilisation des sols exposés à cet herbicide pour la culture de certaines plantes agraires en raison de ses effets écotoxicologiques sur les plantes plus sensibles à l'atrazine (Shimabukuro *et al.*, 1966; Aelion et Cresci, 1999). La présence d'atrazine dans le sol et dans l'eau (fleuves et rivières) utilisée comme source d'irrigation de champs peut générer des problèmes de phytotoxicité à certaines cultures et limiterait la culture en rotation avec d'autres plantes sensibles à l'atrazine (Shimabukuro *et al.*, 1966; Giroux, 1999).

### **3. DÉGRADATION MICROBIENNE DE L'ATRAZINE**

L'utilisation massive de l'atrazine comme herbicide et sa détection dans les eaux de surface, le sol et les eaux souterraines à des concentrations dépassant les normes en vigueur ont encouragé l'étude de la dégradation de l'atrazine par des micro-organismes (Mandelbaum *et al.*, 1993; De Souza *et al.*, 1995). Jusqu'à aujourd'hui, la dégradation de l'atrazine, dans l'environnement, implique quatre mécanismes connus qui sont l'hydroxylation, la *N*-déalkylation, la déamination et le clivage aromatique (Behki et Khan, 1986; Shao *et al.*, 1995). Cependant, l'hydroxylation, qui a lieu à la position deux de l'atrazine et qui élimine la phytotoxicité de l'atrazine, était attribuée à une hydrolyse chimique, excluant toute part d'activité microbienne (Behki et Khan, 1986).

Dans les années 60 et 70, la biodégradation de l'atrazine, qui se limitait à des *N*-déalkylations, a été observée principalement chez les champignons du sol (Kaufman et Blake, 1970). Par la suite, certains champignons du sol et certains micro-organismes isolés tels que les souches 192 et 194 de *Pseudomonas* se sont avérés posséder un mécanisme métabolique permettant la transformation de l'atrazine en hydroxyatrazine (Kaufman et Blake, 1970; Behki et Khan, 1986). Les deux souches de *Pseudomonas* métabolisaient l'atrazine via un mécanisme de *N*-déalkylation avec la formation préférentielle du déisopropylatrazine au détriment du dééthylatrazine (Behki et Khan, 1986). Elles étaient, ensuite, capables d'effectuer une déhalogénéation des métabolites déalkylés de l'atrazine (Behki et Khan, 1986). Ces micro-organismes utilisaient les chaînes alkyles de l'atrazine comme source de carbone afin de soutenir leur croissance (Behki et Khan, 1986; De Souza *et al.*, 1995). Cependant, beaucoup de ces micro-organismes, essentiellement des bactéries, ne parvenaient pas à cliver le noyau s-triazine et donc à minéraliser l'atrazine et, lors de la biotransformation de ce dernier, généraient des métabolites qui possédaient toujours des propriétés phytotoxiques (Behki et Khan, 1986; Nagy *et al.*, 1995b; Boundy-Mills *et al.*, 1997).

La présence d'un halogène (l'atome de chlore en position 2 du noyau s-triazine) semblait être une caractéristique qui faisait de l'atrazine un xénobiotique récalcitrant. En effet, la présence d'halogènes ou d'autres substituants, telles que des groupes sulfonates ou

méthyles, tend à diminuer la biodégradabilité (la susceptibilité d'une substance à la décomposition par des processus biologiques) d'un composé (Bollag et Bollag, 1992). Cependant, cette biodégradabilité ne s'arrête pas à la nature et au degré de substitutions, mais inclut des facteurs tels que l'absence ou l'inaccessibilité de micro-organismes capables de transformer ce composé. À cela s'ajoutent les facteurs environnementaux comme la température, le pH, la salinité, l'osmolarité, l'activité prédatrice et la compétition parmi les populations microbiennes ainsi que la disponibilité et le type d'accepteurs d'électrons (Bollag et Bollag, 1992). La biodégradabilité de l'atrazine qui semblait se limiter à des *N*-déalkylations s'est étendue à la déchloration, puis à la minéralisation, car les populations microbiennes exposées à des composés chlorés anthropiques, comme l'atrazine, répondent souvent en produisant des enzymes qui dégradent ces molécules (De Souza *et al.*, 1998b).

Chez ces micro-organismes, l'atrazine peut être dégradé selon deux voies principales, à savoir une voie de dégradation impliquant la *N*-déalkylation (Shao *et al.*, 1995, Shao et Behki, 1995 et Nagy *et al.*, 1995b) et une autre voie qui commence par la déchloration et qui mène à la minéralisation (Shao *et al.*, 1995; Shao et Behki, 1995; Shao et Behki, 1996; Boundy-Mills *et al.*, 1997).

### **3.1 La voie de *N*-déalkylation**

La voie de *N*-déalkylation de l'atrazine se retrouve chez beaucoup de micro-organismes, notamment chez des champignons et des bactéries. La *N*-déalkylation est effectuée par une oxygénase telle que la monooxygénase du cytochrome P-450 de *Rhodococcus* sp. qui catalyse l'insertion d'un atome d'oxygène au carbone adjacent à l'azote brisant le lien carbone-azote (figure 3) (Boundy-Mills *et al.*, 1997). Cette voie métabolique permet de dégrader l'atrazine en déisopropylatrazine ou en dééthylatrazine.

La voie de *N*-déalkylation ne rend disponible dans l'environnement que les groupements éthyle et isopropyle. En raison de ce métabolisme qui est répandu chez *Rhodococcus* sp., une bactérie gram négatif, les différentes souches de ce genre bactérien ne peuvent pas

utiliser l'atrazine comme source d'azote. Elles se limitent, donc, aux atomes de carbone qui composent les deux chaînes alkyles de l'atrazine (Boundy-Mills *et al.*, 1997).

### **3.1.1 La voie de N-déalkylation chez *Rhodococcus* TE1**

La biotransformation des s-triazines chez la souche TE1 de *Rhodococcus* se fait par une déalkylation (Behki *et al.*, 1993). La souche TE1 de *Rhodococcus* peut, à l'aide de l'enzyme codée par le gène *atrA*, effectuer, dans des conditions aérobies, la déalkylation du groupe éthyle ou isopropyle de l'atrazine produisant le déisopropylatrazine (2-chloro-4-amino-6-isopropylamino-s-triazine [CIAT]) et le dééthylatrazine (2-chloro-4-éthylamino-6-amino-s-triazine [CEAT]) dans une proportion de 1:3 (Behki *et al.*, 1993; Shao et Behki, 1995; Boundy-Mills *et al.*, 1997). Ce gène (*atrA*), codant pour cette fonction catabolique, est présent sur un plasmide de 77-kb (Behki *et al.*, 1993; Shao et Behki, 1995; Boundy-Mills *et al.*, 1997). L'enzyme codée par le gène *atrA* est capable de métaboliser d'autres substrats s-triazine à savoir le propazine, le simazine et le cyanazine, ainsi que l'herbicide EPTC (s-éthyl-dipropylthiocarbamate) (Behki *et al.*, 1993).

La N-déalkylation des chaînes alkyles latérales du noyau s-triazine de l'atrazine se retrouve aussi chez d'autres souches microbiennes comme *Pseudomonas* spp.. Les métabolites sont les mêmes que ceux de la souche TE1, le CEAT, le CIAT et/ou le 2-chloro-4,6-diamino-s-triazine [CAAT] (Behki et Khan, 1986; Behki *et al.*, 1993; Boundy-Mills *et al.*, 1997; Shao *et al.*, 1995).

### **3.1.2 La N-déalkylation via le système du cytochrome P-450**

Parmi ces micro-organismes, il y a certaines souches de *Rhodococcus* où la N-déalkylation de l'atrazine s'effectue par un nouveau système de cytochrome P-450 de type II (Nagy *et al.*, 1995a; Nagy *et al.*, 1995b; Shao et Behki, 1996). Les souches *Rhodococcus* sp. TE1 et *Rhodococcus* sp. NI86/21 possèdent le groupe de gènes (*thcBCD*) qui code pour ce système de cytochrome P-450 qui dégrade l'atrazine en CEAT et en CIAT (figure 3).

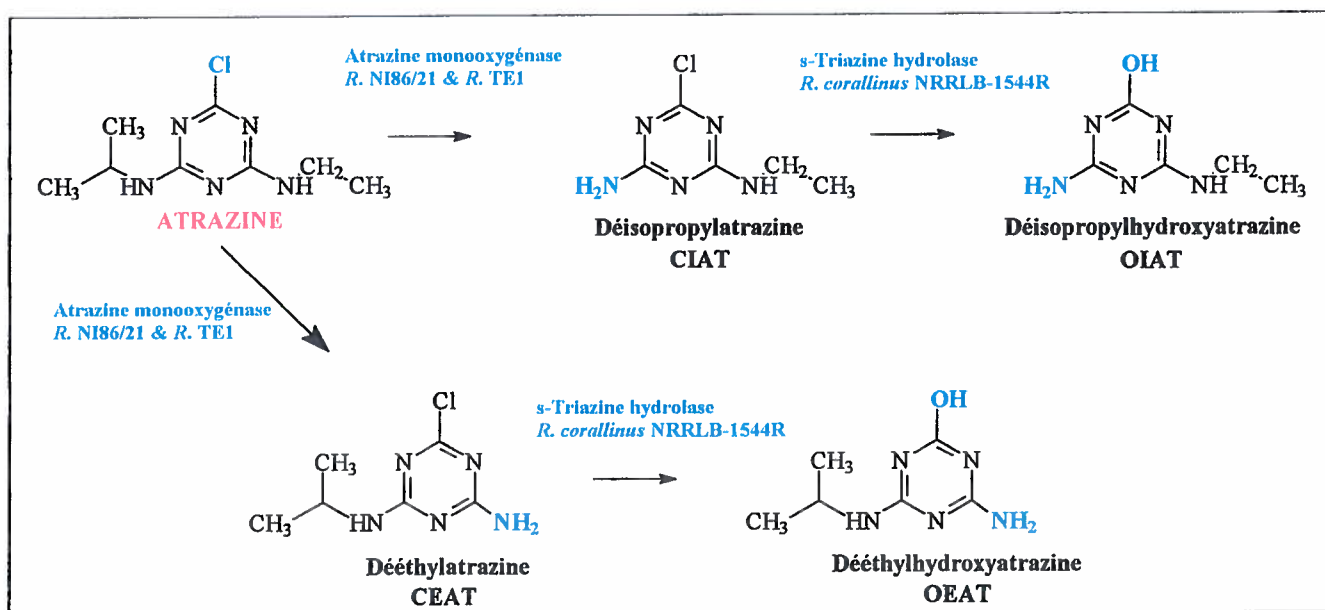


Figure 3 : Voie de dégradation de l'atrazine par N-déalkylation chez *Rhodococcus* sp.

Le gène *thcB* se retrouvant chez ces deux souches code pour la monooxygénase du cytochrome P-450 (ThcB). Ce gène est précédé des gènes *thcC* et *thcD* qui codent pour les protéines du système associé de transfert d'électrons, c'est-à-dire une ferredoxine 2Fe-2S (ThcC) et une ferredoxine réductase (ThcD) (Nagy *et al.*, 1995b). Ce groupe de gènes (*thcBCD*) est essentiel pour la dégradation de l'atrazine par ces souches, bien que la dégradation de l'atrazine par ces deux souches semble s'arrêter après la déalkylation et que les métabolites produits, le CIAT et la CEAT restent chlorés (Nagy *et al.*, 1995b).

En effet, selon Nagy *et al.* (1995b), la souche NI86/21 de *Rhodococcus* ne parvient qu'à déalkyler l'atrazine sans pouvoir, par la suite, déchlorer ou cliver l'anneau hétérocyclique s-triazine des métabolites formés. D'autre part, ce système de cytochrome P-450 est induit par l'atrazine et se retrouve soit sur un plasmide pour la souche TE1 ou soit sur le chromosome pour la souche NI86/21 de *Rhodococcus* (Nagy *et al.*, 1995b).

### **3.1.3 La N-déalkylation suivie d'une déchloration chez *Rhodococcus* sp.**

Cependant, il existe d'autres bactéries qui présentent non seulement la capacité de N-déalkyler l'atrazine, mais aussi la capacité de déchlorer les métabolites déalkylés de l'atrazine (Shao *et al.*, 1995; Struthers *et al.*, 1998).

Shao *et al.* (1995) ont cloné le gène *trzA* de *Rhodococcus corallinus* NRRL B-1544R qui permet la déchloration de certains métabolites de l'atrazine dans la souche TE1 de *Rhodococcus* qui effectue, via le produit du gène *atrA*, la N-déalkylation de l'atrazine. Le gène *trzA* code pour la s-triazine hydrolase qui effectue la déchloration du dééthylatrazine (CEAT) et du déisopropylatrazine (CIAT) et la déamination du 2-chloro-4,6-diamino-1,3,5-triazine (CAAT) et de la mélamine (2,4,6-triamino-1,3,5-triazine [AAAT]) (Mulbry, 1994; Shao *et al.*, 1995) (tableau I). Cette enzyme est un tétramère composé de quatre sous-unités identiques d'environ 54 kDa (Shao *et al.*, 1995). Par contre, cette s-triazine hydrolase ne peut pas effectuer la déchloration de l'atrazine (Mulbry, 1994). La souche recombinante de *Rhodococcus*, ainsi obtenue, portant les gènes de la N-déalkylation (gène *atrA*) et de la déchloration (gène *trzA*) apparaît moins active que certaines souches de *Pseudomonas* (Shao *et al.*, 1995).

Tableau I : s-triazines et herbicides dégradés par les produits des gènes *atrA* et *trzA* de *Rhodococcus* TE1 et *R. corallinus* NRRL B-15444R. (Behki *et al.*, 1993; Shao *et al.*, 1995).

<i>Formule des Substrats</i>	<i>Nom commun</i>	<i>Abréviation</i>
2-Chloro-4-éthylamino-6-isopropylamino-s-triazine	Atrazine	CIET
2-Chloro-4-éthylamino-6-amino-s-triazine	Déisopropylatrazine	CEAT
2-Chloro-4-amino-6-isopropylamino-s-triazine	Dééthylatrazine	CIAT
2-Chloro-diamino-s-triazine	Dééthylatéisopropylatrazine	CAAT
2,4,6-Triamino-s-triazine	Melamine	AAAT
2-[(4-Chloro-6-éthylamino-s-triazine-2-yl)amino]-2-méthyl propionitrile	Cyanazine	
2-Chloro-4,6-bis(isopropylamino)-s-triazine	Propazine	
2-Chloro-4,6-bis(éthylamino)-s-triazine	Simazine	
S-Éthyl dipropylthiocarbamate		ETPC



Plusieurs souches bactériennes appartenant au genre *Rhodococcus* déalkylent l'atrazine mais demeurent incapables de cliver le noyau s-triazine et de minéraliser l'atrazine (Shao *et al.*, 1995). Une autre voie de détoxification de l'atrazine a été élucidée dans laquelle l'atrazine est minéralisé et utilisé comme seule source de carbone et/ou d'azote pour la croissance de certaines souches bactériennes (Yanze-Kontchou et Gschwind, 1994; Shao *et al.*, 1995; Mandelbaum *et al.*, 1995).

### **3.2 La voie de déchloration**

Plus récemment, une autre voie de dégradation de l'atrazine a été mise en évidence chez certaines souches de *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Pseudaminobacter* et *Agrobacterium* (figure 4) (Mandelbaum *et al.*, 1993; Yanze-Kontchou et Gschwind, 1994; Shao *et al.*, 1995; Bouquard *et al.*, 1997; Struthers *et al.*, 1998; Topp *et al.*, 2000). Cette voie de dégradation de l'atrazine présente l'avantage de produire, dès la première étape de dégradation, des métabolites non phytotoxiques, contrairement à la voie de dégradation rencontrée chez *Rhodococcus* sp. (Boundy-Mills *et al.*, 1997).

#### **3.2.1 *Pseudomonas* YAYA6 et la déchloration de l'atrazine**

Yanze-Kontchou et Gschwind (1994) ont rapporté l'isolement et la caractérisation d'une souche de *Pseudomonas* qui minéralise l'atrazine et l'utilise comme seule source de carbone. Cette souche, *Pseudomonas* YAYA6, minéralise un peu plus de 50 % de 30 ppm d'atrazine radioactive, soit environ  $3,8 \cdot 10^{-5}$  mCi. La biodégradation de l'atrazine par la souche YAYA6 se produit suivant différentes voies métaboliques. Les premières étapes impliquent une déchloration de l'atrazine formant l'hydroxyatrazine ou une N-déalkylation avec la formation de dééthylatrazine ou de déisopropylatrazine menant à la minéralisation de l'atrazine (Yanze-Kontchou et Gschwind, 1994). Au cours de la biodégradation de l'atrazine par *Pseudomonas* YAYA6, l'acide cyanurique constitue le principal métabolite s-triazine (Yanze-Kontchou et Gschwind, 1994; Yanze-Kontchou et Gschwind, 1995). Cette souche est capable de dégrader l'atrazine dans le sol sous des conditions restreintes d'oxygène. Elle peut maintenir une population bactérienne ayant

toujours une activité de biodégradation dans un sol non stérile (Yanze-Kontchou et Gschwind, 1995).

### **3.2.2 La voie de déchloration de l'atrazine chez *Pseudomonas* ADP**

En 1995, la souche *Pseudomonas* ADP a été isolée et présente la capacité de dégrader l'atrazine et de le minéraliser à d'importantes concentrations de l'ordre de 100 ppm (Mandelbaum *et al.*, 1995). *Pseudomonas* ADP est devenue la bactérie dégradant l'atrazine dont la voie catabolique pour l'atrazine est la mieux connue et dont les gènes impliqués dans ce métabolisme sont les mieux identifiés (De Souza *et al.*, 1998a).

La dégradation de l'atrazine chez cette souche débute par une déchloration et produit de l'hydroxyatrazine (figure 4) (Mandelbaum *et al.*, 1995). Sous des conditions aérobies, *Pseudomonas* ADP utilise l'atrazine comme unique source d'azote pour sa croissance. De plus, il s'avère qu'elle minéralise complètement l'anneau s-triazine de l'atrazine (De Souza *et al.*, 1995). Or, antérieurement, la déchloration de l'atrazine ou la formation de l'hydroxyatrazine dans l'environnement était attribuée au résultat de l'hydrolyse chimique de l'atrazine se déroulant dans le sol et plus récemment, à quelques espèces bactériennes dont les mécanismes ont été peu étudiés (De Souza *et al.*, 1995). La déchloration de l'atrazine par *P.* ADP apporte un support additionnel aux études précédentes qui suggèrent que l'hydroxyatrazine, dans l'environnement, provient non seulement de réactions abiotiques mais aussi de processus biologiques (De Souza *et al.*, 1998b).

Cette voie récente de dégradation de l'atrazine implique, chez *Pseudomonas* ADP, trois gènes qui sont présents sur un même plasmide (figure 4) (De Souza *et al.*, 1995; De Souza *et al.*, 1996; Boundy-Mills *et al.*, 1997; De Souza *et al.*, 1998a; De Souza *et al.*, 1998b; De Souza *et al.*, 1998c; Sadowsky *et al.*, 1998).

Ces trois gènes *atzA*, *-B* et *-C* ne sont pas organisés en opéron, bien que présents sur un même plasmide (Sadowsky *et al.*, 1998). Les gènes *atzA* et *atzB* sont séparés par approximativement 8,6 kb et le gène *atzA* est encadré par des séquences d'éléments

d'insertion IS1071 (Sadowsky *et al.*, 1998). Ceci indiquerait que le catabolisme de l'atrazine chez *Pseudomonas* ADP proviendrait d'une évolution moléculaire récente (Sadowsky *et al.*, 1998).

### **3.2.2.1 La voie de déchloration : étapes de la dégradation de l'atrazine**

La déchloration de l'atrazine, première étape de dégradation, s'effectue par une réaction hydrolytique catalysée par l'atrazine chlorohydrolase ou AtzA. Cette enzyme est un homotétramère ou un homopentamère dont les sous-unités auraient 52 421 Da (De Souza *et al.*, 1996). Codée par le gène plasmidique *atzA*, l'atrazine chlorohydrolase aurait pour substrats des composés ayant une structure aromatique hétérocyclique s-triazine, un substituant chloré et un substituant aminoalkyle (De Souza *et al.*, 1996). Selon De Souza *et al.* (1996), l'AtzA catalyserait la déchloration de l'atrazine par une réaction hydrolytique qui utiliserait des molécules d'eau. Cette protéine présente une similitude de séquence peptidique de 41% avec la s-triazine hydrolase TrzA de *R. corallinus* NRRL B-15444R, surtout au niveau de la région C-terminale des protéines (De Souza *et al.*, 1996). Cette similitude de séquence pourrait indiquer l'appartenance de ces deux protéines à une même famille de protéines. En effet, la s-triazine hydrolase TrzA a été récemment identifiée comme un membre de la grande classe des amidohydrolases bactériennes qui inclut la dihydroorotase, la cytosine déaminase, l'uréase et l'AtzB de *Pseudomonas* ADP (Sadowsky *et al.*, 1998). La super famille des amidohydrolases regroupe des enzymes qui catalysent l'hydrolyse d'amides ou, dans quelques familles, des liaisons amines, dans plus d'une douzaine de substrats différents (Holm et Sander, 1997).

Chez *Pseudomonas* ADP, suite à la déchloration de l'atrazine produisant l'hydroxyatrazine, la deuxième étape est une déamination catalysée par l'hydroxyatrazine éthylamino-hydrolase ou AtzB. Cette enzyme, codée par le gène *atzB*, retire la chaîne latérale *N*-éthylamino de l'hydroxyatrazine, produisant le *N*-isopropylammelide (2,4-dihydroxy-6-(isopropylamino)-s-triazine) (figure 4). AtzB est une enzyme de 481 acide aminés de la famille des amidohydrolases. Cette réaction de déamination se fait en une

étape, par une réaction hydrolytique, contrairement au mécanisme rencontré chez certains micro-organismes comme *Rhodococcus* sp. et *Nocardia* sp. qui retirent seulement le groupe latéral éthyle et laissent le groupement aminé sur l'anneau s-triazine (figure 3) (Boundy-Mills *et al.*, 1997; Sadowsky *et al.*, 1998). Les gènes *atzA* et *atzB* sont présents sur un même plasmide de 96 Kb, pADP-1, chez *Pseudomonas* ADP et ils sont séparés par environ 8,7 kb sur ce plasmide (Sadowsky *et al.*, 1998).

Dans la voie de dégradation de l'atrazine par *Pseudomonas* ADP, il existe une troisième réaction faisant intervenir une autre hydrolase, la *N*-isopropylammelide isopropylaminohydrolase ou AtzC (Sadowsky *et al.*, 1998). Après déamination de l'hydroxyatrazine par l'enzyme AtzB, le *N*-isopropylammelide, qui est le produit résultant, est dégradé en acide cyanurique et en isopropylamine (De Souza *et al.*, 1998c). L'enzyme AtzC, comme les enzymes AtzA et AtzB, est une amidohydrolase de 403 acides aminés qui présente une région catalytique métallo-dépendante conservée similaire à la cytosine déaminase, une autre amidohydrolase (Sadowsky *et al.*, 1998). AtzC, contrairement à la première enzyme (AtzA) de la voie de déchloration de l'atrazine, est un monomère de 44,938 kDa. Cette enzyme est codée par le gène *atzC* présent sur le plasmide pADP-1 de 96 kb retrouvé chez *Pseudomonas* ADP (Sadowsky *et al.*, 1998). Le gène *atzC* est localisé à environ 25 kb des gènes *atzA* et *atzB* et présente, en aval de sa région codant pour l'enzyme, des éléments génétiques similaires à des séquences d'insertion (IS) de différentes micro-organismes (Sadowsky *et al.*, 1998). Ce gène, d'une taille de 1 209 nucléotides, a un contenu en pourcentage de moles de G+C de 39,5% comparativement à un contenu en pourcentage molaire de G+C de 58,3 et 64,1% pour les gènes *atzA* et *atzB*, respectivement (Sadowsky *et al.*, 1998). Chez le gène *atzC*, le pourcentage molaire de G+G est bien inférieur à celui de l'ADN total de *Pseudomonas* sp. (58 à 70%), ce qui indique une acquisition récente de ce gène par *Pseudomonas* ADP (Sadowsky *et al.*, 1998). De plus, l'analyse de la séquence de ce gène révèle la présence de séquences similaires à des éléments d'insertion tels que IS1051, IS52, ISXW5, ISXW4 et *tnpA* (Sadowsky *et al.*, 1998).

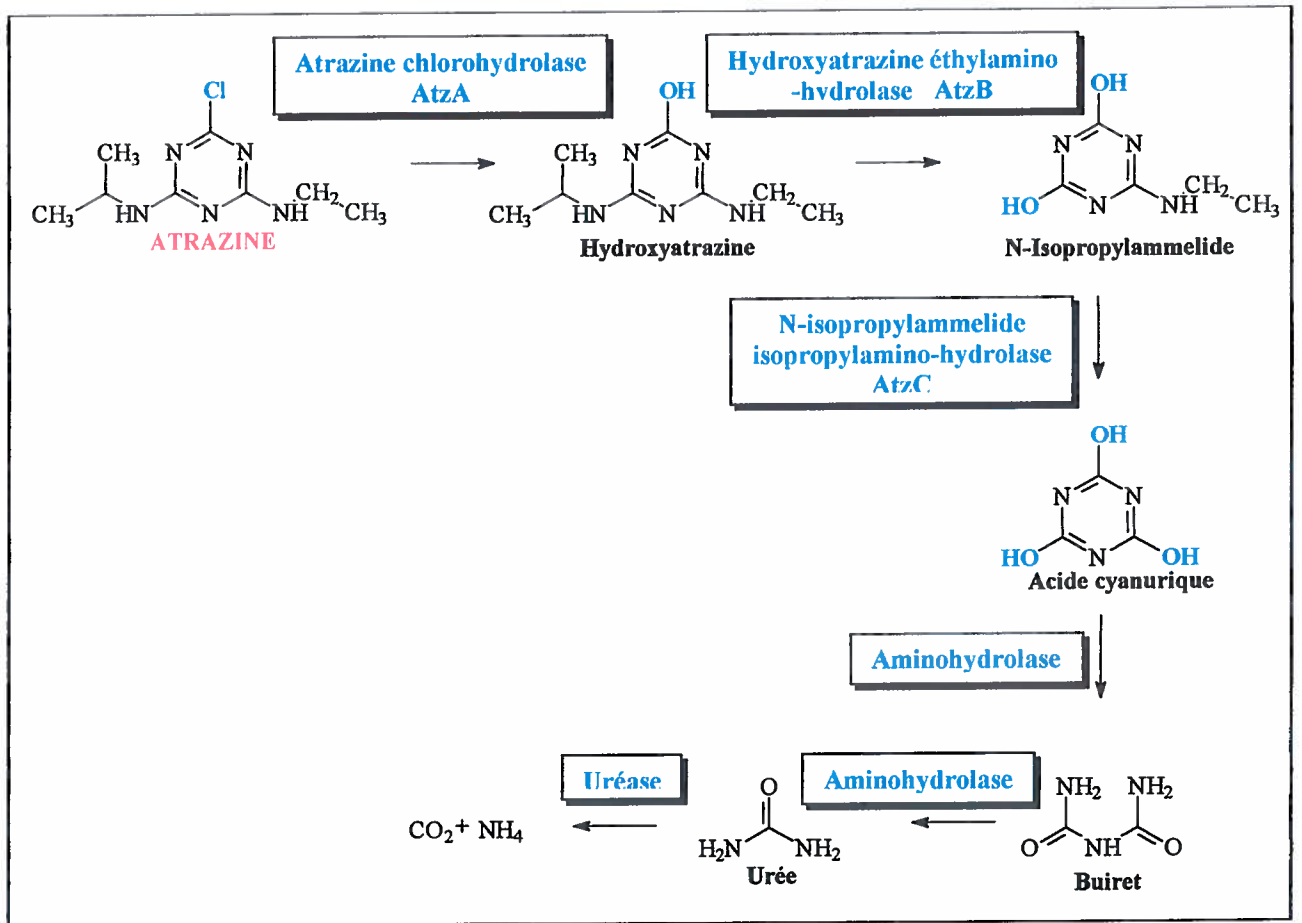


Figure 4: Voie de dégradation de l'atrazine par *Pseudomonas ADP* (De Souza *et al.*, 1998b).

Le gène *atzC* semble avoir été acquis par le biais de mécanismes moléculaires comme la transposition et dériverait d'une ancienne famille d'amidohydrolases tout comme les gènes *atzA* et *-B* (Sadowsky *et al.*, 1998).

### **3.2.2.2 Les amidohydrolases de la dégradation de l'atrazine**

Les trois enzymes de la voie de dégradation de l'atrazine par *Pseudomonas* ADP, appartiennent à une classe d'amidohydrolases qui sont présentes chez les Eubactéries, les Archaea et les Eucaryotes. Ces enzymes, tout comme la dihydroorotase (PyrC), catalysent des réactions hydrolytiques en présence de substrats à anneaux hétérocycliques (carbone-azote) tels que les s-triazines (Sadowsky *et al.*, 1998).

Chez les amidohydrolases, comme AtzA, AtzB et AtzC, l'ion métallique lié au site actif de la protéine déprotone une molécule d'eau pour effectuer une attaque nucléophile sur le substrat (Holm et Sander, 1997). Ce site métallo dépendant est composé de quatre résidus histidines et d'un résidu acide aspartique, caractérisant cette super famille d'enzymes (Holm et Sander, 1997).

Il apparaît que les membres de cette super famille de protéines utilisent des ions métalliques divalents liés à des centres métalliques mononucléaires ou binucléaires pour leur activité catalytique (Holm et Sander, 1997; Sadowsky *et al.*, 1998). Au sein de cette super famille, on retrouve la s-triazine hydrolase TrzA de *R. corallinus* NRRL B-15444R, la dihydroorotase (PyrC), l'adénine déaminase (AdeC) et l'uréase au même titre que les trois enzymes de la voie de dégradation de l'atrazine et de l'acide cyanurique chez *P. ADP* (Sadowsky *et al.*, 1998).

L'alignement des séquences protéiques entre AtzA, AtzB et AtzC ne présente que 20% d'homologie et ces enzymes ont entre 25 et 41% d'homologie avec d'autres aminohydrolases (Sadowsky *et al.*, 1998). Cependant les séquences de la région du motif conservé de la famille de la dihydrootase et de la cytosine déaminase présentent des homologies importantes avec la région N-terminale d'AtzA, AtzB et AtzC de *Pseudomonas* ADP (Sadowsky *et al.*, 1998). Ces séquences sont impliquées dans l'activité catalytique des enzymes et dans la coordination de l'ion métallique au niveau du site actif des enzymes (Sadowsky *et al.*, 1998). Ces séquences décrivent un motif conservé H-X-H qui contiendrait les résidus histidine métallo dépendants (Sadowsky *et al.*, 1998).

Au moins un des trois gènes *atzA*, *-B* et *-C* codant pour les enzymes AtzA, AtzB et AtzC de *Pseudomonas* ADP se retrouvent chez d'autres micro-organismes comme *Agrobacterium radiobacter* (Struthers *et al.*, 1998), *Alcaligenes* (De Souza *et al.*, 1998a) et *Rhizobium* sp. (Bouquard *et al.*, 1997), élargissant ainsi le groupe des bactéries dégradant l'atrazine et la famille des amidohydrolases (De Souza *et al.*, 1998b). En effet, les gènes *atzA*, *-B* et *-C* ou leurs homologues à plus de 99% se retrouvent chez certaines souches bactériennes comme *Agrobacterium radiobacter* J14a et *Alcaligenes* SG1 qui sont capables de dégrader l'atrazine (Struthers *et al.*, 1998; De Souza *et al.*, 1998b). Chez *Pseudomonas* ADP, bien que le génotype de la voie catabolique de l'atrazine se traduit par un taux de dégradation de l'atrazine supérieur à 80% en 48 heures, ce phénotype de dégradation peut se perdre rapidement après quelques générations en milieux complexes (Mandelbaum *et al.*, 1993; De Souza *et al.*, 1998c).

Il s'avère, par ailleurs, que l'évolution de cette super famille des amidohydrolases semble être influencée par l'adaptation d'enzymes appartenant à des populations microbiennes exposées à des composés hétérocycliques anthropiques, comme entre autre l'atrazine (Holm et Sander, 1997). Cependant, ces genres bactériens comme *Agrobacterium* sp., *Alcaligenes* sp. et *Pseudomonas* sp. comprennent quelques espèces pathogènes pour les plantes et pour l'homme et les effets de leurs utilisation dans l'écosystème agricole n'ont pas encore été évalués (Manuila *et al.*, 1981).

#### **4. LES RHIZOBIA ET LA BIODÉGRADATION DE L'ATRAZINE**

Lorsqu'il est question des *rhizobia*, ces derniers sont le plus souvent associés à la formation d'une symbiose avec les légumineuses et à la fixation de l'azote atmosphérique (Mylona *et al.*, 1995; Zahran, 1999). Ces bactéries du sol et de la rhizosphère entrent en symbiose avec les légumineuses en formant, au niveau des racines, des nodules fixateurs d'azote moléculaire (Fisher et Long, 1992). Ces bactéries et les quantités d'azote réduit qu'elles génèrent, représentent, depuis longtemps, une valeur agronomique importante en tant qu'alternative à l'utilisation excessive d'engrais chimiques riches en azote nitrique et en ammoniac (Fisher et Long, 1992). La formation de nodules par les *rhizobia* au niveau des racines des plantes représente aussi un système pour l'étude de la biologie du développement apportant ainsi des opportunités expérimentales uniques (Fisher et Long, 1992). De plus, la relation bactérie-plante qui rend possible la fixation de l'azote moléculaire (N<sub>2</sub>) par les *rhizobia* (les bactéroïdes) au profit de la plante, permet à cette dernière de fournir aux bactéries, des acides aminés et autres macromolécules (Long et Staskawicz, 1993).

Cependant, le potentiel métabolique des *rhizobia* pour la biodégradation de xénobiotiques ou de composés aromatiques, polyaromatiques ou hétérocycliques a été peu étudié, bien que démontré par certains auteurs, dont en premier lieu par notre laboratoire (Damaj et Ahmad, 1996; Ahmad *et al.*, 1997; Bouquard *et al.*, 1997; Frassinetti *et al.*, 1998).

#### **4.1 Description et généralités des *rhizobia***

##### **4.1.1 Classification des *rhizobia***

Les *rhizobia* sont des bactéries gram négatif, mobiles, qui appartiennent au sous-groupe alpha des *Protobacteria* et à la famille des *Rhizobiaceae* (Haukka *et al.*, 1998). Ils regroupent différentes espèces dont *Rhizobium meliloti* renommé *Sinorhizobium meliloti* (Nour *et al.*, 1995) nodulant les racines de la luzerne (Wei et Bauer, 1999) et *Rhizobium*



*leguminosarum* qui nodulent les racines du pois, du haricot et de la fève (van Rhijn et Vanderleyden, 1995). Les *rhizobia* sont des bactéries du sol possédant un flagelle polaire ou subpolaire ou deux à huit flagelles péritriches complexes (Elkan, 1992; Wei et Bauer, 1999). Ils sont capables d'établir une symbiose avec certaines plantes de la famille des *Leguminosae* (ou légumineuses), afin d'assurer la fixation de l'azote moléculaire à l'intérieur des nodules (Elkan, 1992; Rastogi et Watson, 1992; Fisher et Long, 1992; Wei et Bauer, 1999; Summers *et al.*, 1999). Cette symbiose se fait à travers la formation d'organes spécialisés, les nodules au niveau des racines. C'est à l'intérieur de ces racines ou structures corticales que les bactéries sont capables de fixer et réduire l'azote moléculaire en ammoniac qui sera par la suite utilisé par la plante comme source d'azote (van Rhijn et Vanderleyden, 1995).

Les *rhizobia* peuvent être caractérisés et classés selon leur polymorphisme enzymatique, leur vitesse de croissance, le polymorphisme des fragments de restriction des gènes ribosomiques 16S+IGS (espace intergénique) et le phénotype de nodulation chez les légumineuses hôtes (Nour *et al.*, 1995; van Rhijn et Vanderleyden, 1995).

Au sein de la famille des *Rhizobiaceae*, les bactéries fixatrices de l'azote moléculaire au niveau des nodules des légumineuses sont regroupées, récemment, dans cinq genres qui sont *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* et *Mesorhizobium* (Fisher et Long, 1992; Elkan, 1992; Nour *et al.*, 1994; van Rhijn et Vanderleyden, 1995; Haukka *et al.*, 1998). Les *rhizobia* de ces cinq genres peuvent être divisés en deux groupes selon leur vitesse de croissance. Les *rhizobia* à croissance rapide regroupent les souches de *rhizobia* qui ont un temps de génération inférieur à six heures en milieu de culture (Elkan, 1992; Nour *et al.*, 1994). Ce groupe comprend habituellement les *rhizobia* associés à la luzerne (alfafa), au trèfle, au haricot et au pois tels que *Sinorhizobium* spp., *Rhizobium* spp. et le genre *Mesorhizobium* (Elkan, 1992; Haukka *et al.*, 1998). L'autre groupe de *rhizobia* est celui des souches à croissance lente qui ont un temps de génération supérieur à six heures et comprend les genres *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium* (Haukka *et al.*, 1998).

L'analyse des voies métaboliques de ces deux groupes suggère l'existence d'une voie métabolique préférentielle différente chez chacun de ces groupes bien que les voies métaboliques majeures semblent être similaires (Elkan, 1992). Le groupe des *rhizobia* à croissance lente utilise uniquement des pentoses et des hexoses, contrairement au groupe à croissance rapide qui utilise aussi les mono-, di-, et trisaccharides (Elkan, 1992). D'autre part, l'analyse de l'ARN 16S, aussi bien des *rhizobia* à croissance lente qu'à croissance rapide, indique une importante diversité génétique entre les espèces et confirme la dichotomie des *rhizobia* en groupes à croissance lente et à croissance rapide (Elkan, 1992).

#### **4.1.2 Les formes libres et symbiotiques (bactéroïdes) chez les *rhizobia***

Les *rhizobia* sont des bactéries capables d'activer ou de désactiver des groupes de gènes en fonction des conditions environnementales auxquelles ils peuvent faire face et en présence des légumineuses (Michiels *et al.*, 1998). Ces bactéries se retrouvent, dans le sol, sous leur forme libre et non différenciée en conditions aérobies. Sous ces conditions de formes libres, certains gènes contrôlent la croissance des *rhizobia* en présence d'acides dicarboxyliques en C<sub>4</sub> et de différentes sources d'azote (Michiels *et al.*, 1998).

Les *rhizobia*, sous la forme libre, vivent non seulement dans des conditions aérobies, mais aussi dans des conditions de microaérobies (Encarnación *et al.*, 1995). Ces bactéries s'avèrent bien adaptées aux conditions microaérobies aussi bien sous leur forme libre que leur forme symbiotique (les bactéroïdes) au sein des nodules où la concentration d'oxygène libre est de l'ordre de 3 à 30 nM (Fisher, 1994; Encarnación *et al.*, 1995).

Les *rhizobia* peuvent aussi s'engager dans la fermentation. Encarnación *et al.* (1995) mentionnent et décrivent chez les *rhizobia* un métabolisme de fermentation qui est caractérisé par l'excrétion d'acides organiques, d'acides aminés et par l'accumulation de poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB), lorsque la concentration en O<sub>2</sub> diminue et que la densité cellulaire augmente.

### 4.1.3 L'interaction associative chez les *rhizobia* : la symbiose

#### 4.1.3.1 L'interaction associative spécifique avec les légumineuses

Les *rhizobia* présentent une spécificité d'hôte lors du processus de nodulation au niveau des racines des légumineuses (van Rhijn et Vanderleyden, 1995). Cette spécificité est reflétée dans l'appellation des *rhizobia* qui correspond, dans la plupart des cas, à la plante hôte nodulée (*Rhizobium meliloti* dont l'une des plantes hôtes est *Melilotus*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* dont la plante hôte est *Phaseolus vulgaris*). Cette spécificité est reliée à la reconnaissance mutuelle de partenaires symbiotiques à travers des interactions basées sur un échange, avant l'infection, de signaux moléculaires entre la plante et les *rhizobia* au niveau de la rhizosphère (van Rhijn et Vanderleyden, 1995; Pueppke *et al.*, 1998; Capela *et al.*, 1999).

Les signaux moléculaires sont générés suite à l'expression chez les *rhizobia* des gènes *nod*, des gènes *exo*, des gènes *lps* et des gènes *ndv* (Mylona *et al.*, 1995; van Rhijn et Vanderleyden, 1995). Ces signaux sont aussi constitués de certains composés aromatiques tels que les flavonoïdes, les chalcones, les flavanones, les flavones, les flavanols et les isoflavonoïdes produits par les plantes (Rao et Cooper, 1994).

Cependant, le degré de spécificité des *rhizobia* pour une plante hôte varie énormément au sein des *Rhizobiaceae*. Cette variation suscite un registre d'hôtes très différent d'une souche à l'autre dans un même genre de *rhizobia*, comme *R. leguminosarum* bv. *viciae* et *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, bien que leurs gènes symbiotiques présentent une importante similitude (van Rhijn et Vanderleyden, 1995). Cette variation de spécificité d'hôte est liée à certains gènes de nodulation (*nod*) qui ne sont pas fonctionnellement et structurellement conservés parmi les *rhizobia* (van Rhijn et Vanderleyden, 1995). Ces gènes *nod* sont appelés gènes *hsn* pour « host specific nod » et sont essentiels à la nodulation d'une plante hôte particulière (van Rhijn et Vanderleyden, 1995). En effet, la plupart des mutations au niveau de ces gènes a pour conséquence une altération ou un élargissement du registre d'hôte chez les *rhizobia* (van Rhijn et Vanderleyden, 1995).

Dans le processus de symbiose *rhizobia*-légumineuse, les étapes précoces de nodulation sont définies en termes de biologie du développement. Les *rhizobia* stimulent la plante afin d'induire la croissance d'un nodule. Cette induction est accompagnée de changements structuraux à l'intérieur des racines : physiologie cellulaire altérée, croissance et division cellulaire et expression génétique (Long et Staskawicz, 1993). La capacité des *rhizobia* d'induire des réponses chez des hôtes spécifiques est dépendante des gènes de nodulations (*nod* et *hns*) et des gènes déterminant la synthèse des exopolysaccharides (gènes *exo*), des lipopolysaccharides (gènes *lps*), des polysaccharides capsulaires et des  $\beta$ -1,2-glucanes (gènes *ndv*) (Schlaman *et al.*, 1992; Long et Staskawicz, 1993; van Rhijn et Vanderleyden, 1995).

#### **4.1.3.2 L'interaction associative non spécifique**

D'autre part, il apparaît aussi que certaines espèces de *rhizobia* peuvent coloniser les racines de plantes non légumineuses comme le maïs et le blé (Chabot *et al.*, 1996; Schloter *et al.*, 1997). Les *Rhizobiaceae* ont la capacité de former des interactions associatives non spécifiques avec des plantes non légumineuses sans former de nodules à l'exception du genre *Parasponia* de la famille des *Ulmaceae* (Schloter *et al.*, 1997). En effet, une variété de souches rhizobiales est capable de former chez *Parasponia* des nodules fixateurs d'azotes mimant ceux des légumineuses (van Rhijn et Vanderleyden, 1995).

#### **4.1.4 La génétique de symbiose légumineuse-*rhizobia***

L'interaction plante-*rhizobia* a mis en évidence différents gènes de régulation transcriptionnelle et de l'organogénèse (les gènes *nodD*, *nolR* et *syrM*), des gènes impliqués dans l'expression et la maturation des facteurs de nodulation : les gènes *nodABC* et les gènes *nif* et *fix* impliqués dans la fixation de l'azote moléculaire à l'intérieur des nodules de la plante (Long et Staskawick, 1993; Goldmann *et al.*, 1994; Mylona *et al.*, 1995). Cette interaction symbiotique entre les plantes légumineuses et les *rhizobia* menant à la fixation de l'azote atmosphérique par les bactéries et à l'apport de sources de carbone par la plante est un processus faisant intervenir plusieurs groupes de

gènes (van Rhijn et Vanderleyden, 1995; Fang et Hirsch, 1998; Pueppke *et al.*, 1998; Spaink, 2000).

Beaucoup de ces gènes sont localisés sur des plasmides de tailles variables appelés plasmides symbiotiques (pSyms) (Haukka *et al.*, 1998; Capela *et al.*, 1999). Chez différentes espèces de *Rhizobium*, la plupart des gènes de nodulation (*nod*) et de fixation (*fix* et *nif*) sont présents sur un plasmide, ou sur plusieurs plasmides (Hynes et McGregor, 1990; Flores *et al.*, 1998). Certaines espèces de *rhizobia*, comme *R. leguminosarum* contiennent au moins trois plasmides différents sur lesquels sont localisés les gènes nécessaires à la symbiose. Chez *R. meliloti*, les plasmides pSyms sont des mégaplasmides (1000 à 1700 kb) et contiennent au moins trois groupements de gènes impliqués dans la symbiose (Hynes et McGregor, 1990; Capela *et al.*, 1999). Cette espèce présente aussi des gènes requis pour la formation de nodules sur un deuxième mégaplasmide et sur son chromosome (Hynes et McGregor, 1990). Par contre, chez les espèces de *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* et *Mesorhizobium* l'information symbiotique semble être présente sur le chromosome (Flores *et al.*, 1998).

Afin d'établir une symbiose efficace, un échange continu de signaux moléculaires doit s'établir entre la légumineuse hôte et les *rhizobia*. Cet échange de signaux débute, avant l'infection de la plante, par l'expression des gènes de nodulation (*nod*) en réponse à différents flavonoïdes (composés hétérocycliques), à des bétaines ou à des acides aldoniques sécrétés par les racines des plantes ou par les graines (Fang et Hirsch, 1998; Spaink, 2000). L'expression des gènes *nod* est due, à la fois, à la présence d'un signal moléculaire de la plante, généralement des flavonoïdes, et à la présence de la protéine membranaire NodD, protéine membre de famille des activateurs transcriptionnels LysR (van Rhijn et Vanderleyden, 1995). En présence des flavonoïdes appropriés, la protéine NodD agit comme un activateur transcriptionnel en allant se lier aux régions nucléotidiques conservées, les « *nod box* » en amont des opérons inductibles *nod* (van Rhijn et Vanderleyden, 1995; Fang et Hirsch, 1998).

Les produits de la transcription des gènes *nod*<sup>1</sup> synthétisent et sécrètent les molécules de nodulation appelées facteurs de nodulation ou facteurs Nod qui sont des molécules modifiées de lipo-chitin oligosaccharides (van Rhijn et Vanderleyden, 1995; Fang et Hirsch, 1998; Spaink, 2000). Les facteurs Nod sont des signaux morphogéniques primaires pour la nodulation et jouent un rôle majeur dans la détermination de la spécificité d'hôte (Fang et Hirsch, 1998; Spaink, 2000). Ils déclenchent les premières étapes du développement nodulaire qui incluent la déformation et le recourbement des racines ainsi que les divisions mitotiques des cellules corticales qui donnent naissance, par la suite, au primordium nodulaire (Mylona *et al.*, 1995; Fang et Hirsch, 1998).

Ces modifications physiologiques chez la plante hôte se font alors que les *rhizobia* s'attachent aux racines de la légumineuse. Puis, l'infection des racines par les *rhizobia* se fait au travers de cordons d'infection dans le primordium (Mylona *et al.*, 1995). Les *rhizobia* se retrouvent libérés dans le cytoplasme des cellules hôtes, entourés par une membrane péribactéroïdienne (Mylona *et al.*, 1995). Le primordium nodulaire se développe en nodule mature dès que les bactéries se différencient en bactéroïdes, la forme endosymbiotique active des *rhizobia* (Mylona *et al.*, 1995).

Toutes les étapes de développement du nodule, impliquent l'expression de gènes de la plante hôte spécifiques au nodule, appelés les gènes nodulin (Mylona *et al.*, 1995; Fang et Hirsch, 1998). Les facteurs Nod induisent les gènes nodulin précoces dont les produits de transcription sont exprimés avant le début de la fixation de l'azote et sont impliqués dans l'infection et le développement du nodule (Mylona *et al.*, 1995; Fang et Hirsch, 1998). Les produits des gènes nodulin tardifs sont impliqués dans l'interaction entre les bactéroïdes et la plante hôte et dans le métabolisme du nodule (Mylona *et al.*, 1995).

Au cours de l'interaction légumineuse-*rhizobia* avant une infection des racines de la plante hôte jusqu'à la différenciation des *rhizobia* en bactéroïdes et à la fixation de l'azote

---

<sup>1</sup> Les gènes de nodulation (gènes *nod*) sont répartis en deux groupes, les gènes *nod* communs (gènes structurellement conservés et fonctionnellement interchangeables entre les espèces) et les gènes « host-specific *nod* » (*hsn*) (van Rhijn et Vanderleyden, 1995).

moléculaires par les bactéroïdes, différents composés aromatiques et polyaromatiques jouent un rôle majeur dans la croissance des *rhizobia* sous leur forme libre, dans l'expression ou l'activation de certains gènes des *rhizobia* (Hartwig *et al.*, 1991). Par exemple, les flavones (la lutéoline) (figure 5A) produits par alfalfa (*Medicago sativa L.*), induisent les gènes *nod* chez *Sinorhizobium meliloti* (Hartwig *et al.*, 1991). D'autres composés comme les flavonoïdes (la quercétine), composés polyphénoliques, sont à la fois chimiotactiques et des précurseurs des puissants inducteurs des gènes *nod* (Rao et Cooper, 1994). Ces composés subissent des déméthylations ou des clivages et ouvertures au niveau de certains de leurs noyaux afin de rentrer dans le métabolisme des *rhizobia* (Rao et Cooper, 1994). Ces activités enzymatiques constituent des propriétés intéressantes pour la biodégradation de polluants aromatiques.

D'autres métabolites secondaires des légumineuses constituent des médiateurs nutritionnels, stimulant la croissance de certaines bactéries de la rhizosphère comme les *rhizobia* qui possèdent des gènes pour le catabolisme de ces métabolites (Goldmann *et al.*, 1994). Parmi ces métabolites secondaires, il y a les acides dicarboxyliques en C<sub>4</sub> (succinate, malate et fumarate) qui constituent des sources majeures de carbone et d'énergie pour la forme libre des *rhizobia* et la forme bactéroïdale en association avec la plante hôte (Ronson *et al.*, 1987; Robinson et Bauer, 1993; Scholl et Nixon, 1996). L'utilisation des acides dicarboxyliques en C<sub>4</sub> par les *rhizobia* (*S. meliloti* et *R. leguminosarum*) emploie le système de transport des acides dicarboxyliques Dct codé par les gènes *dctA*, *dctB* et *dctC* présents sur un mégaplasmide (Ronson *et al.*, 1987; Rastogi et Watson, 1992; Scholl et Nixon, 1996). La présence de fonctions cataboliques comme la déméthylation et le clivage de flavonoïdes et le transport des acides dicarboxyliques en C<sub>4</sub> sur des plasmides chez les *rhizobia* peut suggérer, d'une part, une acquisition récente de ces gènes et d'autre part, une inter-relation entre des gènes impliqués dans le catabolisme de composés aromatiques et les gènes impliqués dans la nodulation et la fixation de l'azote moléculaire (Goldmann *et al.*, 1994; De Souza *et al.*, 1998b). Ces fonctions métaboliques sont plasmidiques pour la plupart des *rhizobia*. De plus, les gènes impliqués dans la nodulation et la fixation de l'azote moléculaire sont présents sur le mégaplasmide pSym-a de 1400 kb (Fisher, 1994). D'autre part, chez *S. meliloti* les

gènes impliqués dans la dégradation de certaines bêtaïnes produites par l'alfalfa, par exemple, sont confondus avec les fonctions de nodulation et de fixation de l'azote présentes sur le plasmide pSym-a (Goldmann *et al.*, 1994; Fisher, 1994). La présence de différents systèmes génétiques, décrits précédemment, sur des plasmides chez les *rhizobia* augmenterait la possibilité d'une forme de transfert de fonctions cataboliques au sein de ces bactéries. Par ailleurs, certains de ces systèmes cataboliques pourraient être liés aux fonctions de nodulation et de fixation de l'azote atmosphérique (Goldmann *et al.*, 1994).

#### **4.2 Le potentiel de biodégradation de xénobiotiques chez les *rhizobia***

Plusieurs souches de *rhizobia* possèdent un potentiel de biodégradation de xénobiotiques (Ahmad *et al.*, 1997; Bouquard *et al.*, 1997; Labidi *et al.*, 2001; Mehmannavaz *et al.*, 2001). Frassinetti *et al.* (1998) ont isolé une souche de *Rhizobium meliloti* capable de dégrader le dibenzothiophène (DBT) (figure 5B). Cette dégradation se ferait, probablement, par clivage oxydatif de l'anneau aromatique selon un mécanisme analogue à celui décrit pour la dégradation de la naphthalène (Frassinetti *et al.*, 1998). La biotransformation d'un composé hétérocyclique sulfuré par *R. meliloti* confirme que les membres de la famille des *Rhizobiaceae* sont capables d'utiliser et de dégrader des composés aromatiques anthropiques (Frassinetti *et al.*, 1998).



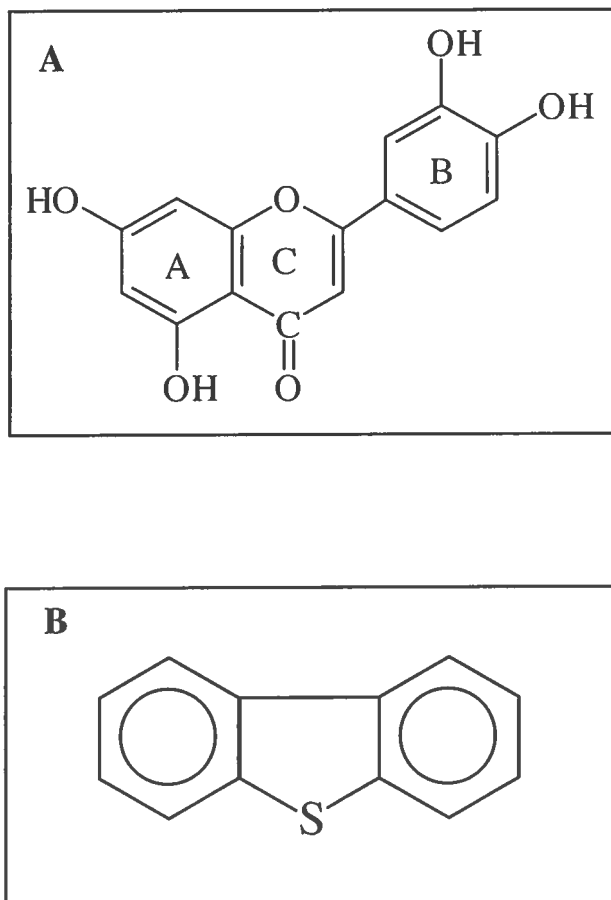


Figure 5 : Composé impliqué dans le métabolisme des *rhizobia* ou biotransformé par les *rhizobia*. (A) La lutéoline est un flavone qui subit, chez les *rhizobia*, un clivage au niveau de l'anneau C (Rao et Cooper, 1994). (B) Le dibenzothiophène est un composé qui subit un clivage oxydatif de l'anneau aromatique par *R. meliloti* (Frassinetti *et al.*, 1998).

Récemment, plusieurs souches bactériennes appartenant à la famille des *Rhizobiaceae* tels que la souche *Pseudaminobacter* C147 s'avèrent capables non seulement de dégrader l'atrazine, mais aussi de le minéraliser (Topp *et al.*, 2000). Cette minéralisation de l'atrazine s'effectue par une déchloration suivant des réactions amidohydrolytiques identiques à la voie de dégradation de l'atrazine présente chez *Pseudomonas* ADP (Topp *et al.*, 2000). Les souches isolées par Topp *et al.* (2000) dégradent l'atrazine en présence ou en absence d'oxygène à des taux comparables. Chez toutes ces souches du genre *Pseudaminobacter*, les gènes *atzA*, *atzB* et *atzC* ne se retrouvent pas sur un même plasmide, comme chez *Pseudomonas* ADP, mais ils sont sur différents plasmides de taille variable (Topp *et al.*, 2000). Cependant, tout comme *Pseudomonas* ADP, le phénotype de biodégradation de l'atrazine chez ces souches est très instable après quelques générations en milieu de culture complexe. Cette instabilité est liée, en partie, à la présence de l'élément d'insertion transposable *IS1071* associé aux gènes *atzB* et *atzC* (Topp *et al.*, 2000). Or, une séquence nucléotidique, ayant plus de 95% d'homologie avec l'élément d'insertion *IS1071*, se trouve liée au gène *atzA* chez *P. ADP* (Sadowsky *et al.*, 1998).

D'autre part, la souche PATR de *Rhizobium* sp. dégrade l'atrazine en hydroxyatrazine dans des conditions aérobies (Bouquard *et al.*, 1997). L'hydrolase impliquée dans la déchloration de l'atrazine chez cette souche présente 92% d'homologie avec un fragment de 24 acides aminés de l'atrazine chlorohydrolase (*AtzA*) de *P. ADP* (Bouquard *et al.*, 1997).

Le potentiel de dégradation de xénobiotiques, comme l'atrazine, par les *rhizobia* est d'autant plus présent que certaines espèces se retrouvent aussi dans des zones contaminées par des polluants récalcitrants et que ces bactéries ne sont pas pathogènes pour les plantes (Ahmad *et al.*, 1997; Zahran, 1999; Tighe *et al.*, 2000).

Contrairement à certaines espèces bactériennes appartenant aux genres *Pseudomonas* sp. et *Agrobacterium* sp., les genres *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Allorhizobium* et *Azorhizobium* ne sont pas phytophagènes et sont capables de noduler les racines des légumineuses, faisant en sorte que ces associations symbiotiques sont responsables, annuellement, de la réduction d'au moins 120 millions de tonnes d'azote atmosphérique (Freiberg *et al.*, 1997; Zahran, 1999; Tighe *et al.*, 2000). L'association symbiotique légumineuse-*rhizobia* permet de développer une indépendance des engrais azotés minimisant ainsi la pollution des eaux souterraines, des lacs et des rivières (Freiberg *et al.*, 1997).

De plus, des études récentes sur la biotransformation de l'atrazine, du TNT (2,4,6-trinitrotoluène) et du DBT par des *rhizobia* sous leur forme libre sont très encourageantes. La biotransformation de ces composés ne serait peut-être pas aussi rapide que la biodégradation de l'atrazine par *Pseudomonas* ADP, mais elle demeure avantageuse lorsque ces produits et leurs métabolites présentent une certaine écotoxicité. Il apparaît donc qu'un potentiel génétique et enzymatique de biodégradation de xénobiotiques tel que l'atrazine est présent chez les *rhizobia*. Ces bactéries de la rhizosphère laissent entrevoir une bioremédiation *in situ* possible des sites, des sols et des eaux souterraines contaminés par l'atrazine.

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## 1. LISTE DU MATÉRIEL

### 1.1 Instrumentation

Agitateur vortex	: Fisher Scientific, É.-U.
Centrifugeuse de table «junior orbit shaker» modèle GS-6R	: Beckman, É.-U.
Bloc chauffant Pierce reacti-therm	: Pierce Chemical Company. É.-U.
Agitateur d'Erlenmeyers Lab-Line	: Lab-Line Instruments Inc. É.-U.
Agitateur d'Erlenmeyers Psycrotherm	: New brunswick Scientific. Canada
Centrifugeuse à Eppendorf modèle Eppendorf 5415C	: Brinkmann Instruments Ltd. Canada
Spectrophotomètre LKB Biochrome	: Biochrom Ltd. R.-U.
UltrospecII modèle 4050	
Centrifugeuse Sorvall Instruments, modèle RC5C	: Mandel Scientific Co. Ltd. Canada
CLHP (modèle 600),	: Waters. Mississauga
Injecteur automatique (modèle 717 Plus) et Spectrophotomètre (modèle 486)	
pHmètre modèle 240	: Corning Scientific
Plaque agitatrice modèle PC 353	: Corning Scientific
Plaque chauffante agitatrice, modèle PC 351	: Corning Scientific
Bac à gel d'électrophorèse pour 8 puits	: BioRad
Bac à gel d'électrophorèse pour 22 puits	: BioRad
Bloc d'alimentation ECPS 3000/150	: Pharmacia Fine Chemicals AB. Suède
Four rotatif à hybridation	: Robbins Scientific Corp. É.-U.
Four à vide Precision	: Precision Scientific Inc. É.-U.
Balance analytique Mettler AE166	: Mettler Instrument Corp. É.-U.
PCR «DNA thermal cycler» modèle 480	: Perkin Elmer. É.-U.
Plaque agitatrice Lab-Line	: Lab-Line Instruments Inc. É.-U.
Système d'eau Milli-Q	: Millipore. É.-U.

### 1.2 Produits chimiques et biochimiques

Acétate de potassium	: Sigma Chemical Co. St-Louis
Acétate de sodium Analar	: BDH
Acétonitrile grade HPLC	: Fisher Scientific. New Jersey
Acide acétique glacial	: Anachemia. Montréal
Acide borique	: J. T. Baker chemical Co. New Jersey
Acide chlorhydrique	: J. T. Baker chemical Co. New Jersey
Acide citrique	: Fisher Scientific. New Jersey

Acide éthylènediaminetétraacétique (sel disodique dihydrate d'EDTA) : Fisher Scientific.  
New Jersey

Acide humique: Aldrich chemical Co. Milwaukee  
 Acide DL-malique : Sigma Chemical Co. St-Louis  
 Acide formique : Sigma Chemical Co. St-Louis  
 Acide L-glutamique : Sigma Chemical Co. St-Louis  
 Acide D-pantothénique: Sigma Chemical Co. St-Louis  
 Acide maléique : Sigma Chemical Co. St-Louis  
 Agar : Difco Laboratories. Michigan  
 Agarose : Boehringer-Mannheim. Canada  
 Alcool Isoamylique : Sigma Chemical Co. St-Louis  
 Alcool Isopropylique : Sigma Chemical Co. St-Louis  
 Ampiciline : Sigma Chemical Co. St-Louis  
 Biotine : Sigma Chemical Co. St-Louis  
 Bleu de bromophénol : Sigma Chemical Co. St-Louis  
 Bromophénol rouge : Sigma Chemical Co. St-Louis  
 Bromure d'éthidium : Sigma Chemical Co. St-Louis  
 Chloramphénicol : Sigma Chemical Co. St-Louis  
 2-chloro-4-(éthylamino)-6-(isopropylamino)-s-triazine (atrazine) : Novartis Inc.  
 Chloroforme : Fisher Scientific. New Jersey  
 Chlorure de calcium : J. T. Baker chemical Co. New Jersey  
 Chlorure de cobalt hexahydrate : Mallinckrodt Inc. Kentucky  
 Chlorure de lithium : Fisher Scientific. New Jersey  
 Chlorure de Sodium : Fisher Scientific. New Jersey  
 Citrate de fer : Sigma Chemical Co. St-Louis  
 Citrate de Sodium : Sigma Chemical Co. St-Louis  
 D-Glucose : BDH  
 d-NTP :Amersham Pharmacia Biotech. Baie d'Urfée (Québec)  
 Éthanol (Alcool éthylique) absolu : Les Alcools de commerce Inc. Brampton  
 Éther éthylique : Fisher Scientific. New Jersey  
 Extrait de levure : Quelab laboratories. Québec  
 Ficoll (Mr 400 000) : Pharmacia Fine Chemicals  
 Glycérol : Fisher Scientific. New Jersey  
 Hélium : Médigas, St-Laurent  
 Huile de paraffine : Fisher Scientific. New Jersey  
 Hydrochlorure de thiamine (vitamine B<sub>1</sub>) : Sigma Chemical Co. St-Louis  
 Hydroxyde de sodium : Fisher Scientific. New Jersey  
 Kanamycine : Fisher Scientific. New Jersey  
 Membranes de nylon : Boehringer Mannheim Corporation  
 Méthanol (Alcool méthylique) grade HPLC : Sigma Chemical Co. St-Louis  
 MOPS : Sigma Chemical Co. St-Louis  
 N-lauryl sarcosinate de sodium (sel disodique d'acide succinique): Sigma Chemical Co.  
St-Louis  
 Phénol : Sigma Chemical Co. St-Louis  
 Phosphate de potassium dibasique : Sigma Chemical Co. St-Louis  
 Phosphate de potassium monobasique : Fisher Scientific. New Jersey

Phosphate de sodium dibasique : Fisher Scientific. New Jersey  
 Phosphate de sodium monobasique : Fisher Scientific. New Jersey  
 Sel sodique d'acide pantothénique : Sigma Chemical Co. St-Louis  
 Sucrose : Fisher Scientific. New Jersey  
 Sulfate d'ammonium : Anachemia. Montréal  
 Sulfate de cuivre pentahydrate : J. T. Baker chemical Co. New Jersey  
 Sulfate de fer(III) (hepta)hydrate : Baker & Adamson Products. New Jersey  
 Sulfate de magnésium (hepta)hydrate : Fisher Scientific. New Jersey  
 Sulfate de sodium anhydre: Fisher Scientific. New Jersey  
 Sulfate de zinc heptahydrate : Sigma Chemical Co. St-Louis  
 Sulfate dodécyl de sodium (SDS) : Aldrich chemical Co. New Jersey  
 Tampon Taq 10X : Amersham-Pharmacia Biotech. Baie d'Urfé (Québec)  
 Tétraborate de sodium décahydrate : Aldrich chemical Co. New Jersey  
 Tris base : Fisher Scientific. New Jersey  
 Tryptone : Difco Laboratories. Michigan  
 Tween<sup>®</sup> 20 : Fisher Scientific. New Jersey  
 Xylène cyanole FF : Sigma Chemical Co. St-Louis

### **1.3 Enzymes**

Lysozyme : Sigma Chemical Co. St-Louis  
 RNAase : Amersham-Pharmacia Biotech. Baie d'Urfé (Québec)  
 Taq ADN polymérase : Amersham-Pharmacia Biotech. Baie d'Urfé (Québec)  
 Enzyme de restriction *Ava*I : : Amersham-Pharmacia Biotech. Baie d'Urfé (Québec)  
 Enzyme de restriction *Cla*I : : Amersham-Pharmacia Biotech. Baie d'Urfé (Québec)  
 Enzyme de restriction *Eco*RI : : Amersham-Pharmacia Biotech. Baie d'Urfé (Québec)

### **1.4 ADN**

Marqueur moléculaire  $\lambda$ /HindIII : Boehringer-Mannheim  
 Marqueur moléculaire 1 kb ladder : Amersham-Pharmacia Biotech. Baie d'Urfé (Québec)

### **1.5 Trousses de biologie moléculaire**

Trousse GFX PCR de purification de l'ADN et de fragments d'ADN à partir d'un gel d'agarose : Amersham Pharmacia Biotech  
 Trousse de fabrication de sondes moléculaires marquées à la digoxygénine : Boehringer Mannheim GmbH.

## 1.6 Souches bactériennes utilisées

<i>Pseudomonas</i> ADP	: M. Sadowsky.	Université du Minnesota
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> P2	: Notre laboratoire.	INRS-Institut Armand- Frappier
<i>Rhizobium meliloti</i> Zb57	: D. P. S. Verma (Ohio State Biotechnology Center, Ohio State University, É.-U.)	
<i>Sinorhizobium meliloti</i> M8	: Notre laboratoire.	INRS-Institut Armand- Frappier
<i>Sinorhizobium meliloti</i> ATZ-025	: Notre laboratoire.	INRS-Institut Armand- Frappier
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ (pMD4) chloramphénicol (30 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ )	: M. Sadowsky	Université du Minnesota
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ (pATZB-2) chloramphénicol (30 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ )	: M. Sadowsky	Université du Minnesota
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ (pTD2.5) ampicilline (40 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ )	: M. Sadowsky.	Université du Minnesota
<i>Escherichia coli</i> DH11S (pMD4) chloramphénicol (30 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ )	: Notre laboratoire.	INRS-Institut Armand-Frappier
<i>Escherichia coli</i> DH11S (pTD2.5) ampicilline (40 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ )	: Notre laboratoire.	INRS-Institut Armand-Frappier
<i>Escherichia coli</i> DH1/RP4 kanamycine (25 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ )	: Notre laboratoire.	INRS-Institut Armand-Frappier

Toutes les souches bactériennes ont été conservées à  $-70^{\circ}\text{C}$  dans 15% de glycérol.

## 2. MILIEUX DE CULTURE

### 2.1 Milieu Minimal Atrazine (MMA)

Le milieu MMA constitue le milieu minimal utilisé afin d'évaluer le potentiel de dégradation de l'atrazine par des souches de *Rhizobium* sp. Le milieu MMA est composé, pour un litre de milieu, de 20 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10 g de NaCl, 6 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , de 0.5 g de citrate de fer (III) ( $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ), 50 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  et 40 g de



$\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Le milieu minimal MMA contient 20 mg d'atrazine en poudre par litre comme source d'azote (ou plus selon les expériences effectuées), 2 g de glucose comme source de carbone, sauf indication contraire concernant la source de carbone, et 1 mL d'éléments traces. La solution d'éléments traces 1000X est composée pour un litre de 2.86 g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 1.81 g de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.22 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.08 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,133 g de  $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , et 0.04 g de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .

## **2.2 Milieu TYc pour *rhizobia*.**

Le milieu riche TYc est composé, pour un litre, de 5.0 g de tryptone, 3.0 g d'extrait de levure, 0.84 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  avec un pH de 6.9. Le milieu TYc est utilisé comme milieu enrichissement liquide et comme milieu solide avec 1.5% d'agar.

## **2.3 Milieu LB**

Le milieu de culture LB est composé, pour un litre, de 10 g de tryptone, de 5 g d'extrait de levure, de 5 g de NaCl ajusté à un pH de 7.0 (Sambrook *et al.*, 1989). Lorsque le milieu LB est utilisé comme milieu d'isolement de colonies, 15 g d'agar sont ajoutés à un litre de LB liquide avant la stérilisation. Le milieu LB a été utilisé pour la mise en culture de différents clones d'*Escherichia coli* en présence de l'antibiotique adéquat.

# **3. ÉTUDE DE CROISSANCE DES DIFFÉRENTES SOUCHES DE RHIZOBIA.**

## **3.1 Croissance des différentes souches de *rhizobia***

Les souches de *rhizobia* issues de cultures en milieu solide TYc, ont été mise en culture dans un milieu liquide riche TYc en présence de 500 ppm ( $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) d'atrazine en suspension durant 5 jours. Au cours de cet enrichissement, les souches ont été repiquées trois fois afin d'atteindre une densité de population importante. Une colonie de chaque

souche a été mise dans 5 mL de TYc liquide contenant 200 ppm ou 500 ppm d'atrazine en suspension et la culture a été placée à 29°C sous agitation pendant 48 heures. Chaque souche de *rhizobia* (5 mL de culture) a été transférée dans 75 mL de TYc en présence de 100 à 500 ppm d'atrazine en suspension et mise sous agitation à 29°C pendant 48 heures. Les cultures ont été centrifugées à 7500 rpm à 4°C pendant 10 minutes afin de récupérer les cellules bactériennes, puis les culots ont été lavés deux fois avec du tampon phosphate 100 mM (31,6 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et 68,4 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.1). Le culot bactérien de chaque souche a été resuspendu dans 50 mL de milieu minimal atrazine MMA contenant 50 ppm d'atrazine et 0,2% de glucose et incubé pendant 48 heures à 29°C. Par la suite, les cellules bactériennes ont été centrifugées à 7500 rpm pendant 10 minutes, à 4°C et lavées dans du tampon phosphate 100 mM. Chaque culot a été resuspendu dans 60 à 90 mL de milieu minimal atrazine MMA contenant 20 ppm d'atrazine et 0,2% de glucose ou 0,2% de succinate afin d'évaluer la croissance de chacune des souches rhizobiales étudiées en présence de sources de carbone différentes. Pour chacune des cultures, 1 µg.mL<sup>-1</sup> de thiamine, 0.5 µg.mL<sup>-1</sup> de biotine et 2 µg.mL<sup>-1</sup> d'acide pantothenique ont été ajoutés comme vitamines. Des échantillons de 2 mL ont été prélevés, en triplicata ou en duplicata, aux 24 heures et la densité optique à 600 nm a été mesurée par spectrophotométrie.

### **3.2 Effet de différentes sources de carbone sur la croissance de la souche P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*.**

L'enrichissement et la préparation des cellules se sont effectués comme mentionné à la section 3.1 de ce chapitre. Le fumarate, le malate, le glutamate, l'acide humique et le glucose ont été les quatre sources de carbones utilisées pour la croissance bactérienne. Le culot de cellules a été resuspendu dans du milieu minimal atrazine (MMA) contenant 0.1% de glucose et 0,025% de glutamate, de fumarate, de malate ou d'acide humique. Les milieux de cultures contiennent 1 µg.mL<sup>-1</sup> de thiamine, 0.5 µg.mL<sup>-1</sup> de biotine et 2 µg.mL<sup>-1</sup> d'acide pantothenique. Un échantillonnage de 4 mL s'est effectuée sur 7 jours en triplicata. La croissance bactérienne s'est effectuée à 29°C, sous agitation et en conditions aérobies, et a été suivie par spectrophotométrie à 600 nm. Les cultures ont été

faites dans des Erlenmeyers de 250 mL afin d'avoir une grande surface de contact entre le milieu de culture et l'oxygène.

#### **4. ÉTUDE DE LA BIOTRANSFORMATION DE L'ATRAZINE PAR DES SOUCHES DE RHIZOBIA.**

##### **4.1 Évaluation de la présence d'exopolysaccharides (EPS) au sein des cultures de rhizobia par précipitation.**

La présence d'EPS a été évaluée chez différentes souches de *rhizobia* lors de cultures en milieu minimal atrazine (MMA) contenant 0.2% de glucose, 0.2% de succinate ou 0.075% de glucose et 0.025% de succinate. Les souches ont été mise en culture dans un milieu riche TYc avec 100 ppm d'atrazine en suspension pendant 72 heures à 29°C et sous agitation, afin d'augmenter la biomasse des cellules. La préparation des cellules pour l'évaluation de la présence des EPS s'est effectuée comme mentionné à la section 3.1. Après les lavages dans le tampon phosphate 100 mM, les cellules ont été resuspendues dans du milieu minimal atrazine (20 ppm d'atrazine) contenant 0.2% de glucose, 0.2% de succinate ou 0.075% de glucose et 0.025% de succinate afin d'avoir une densité optique d'environ 0.3 à 600 nm. Les cellules ont été incubées à 29°C pendant 72 heures au cours desquelles 1 mL de culture a été prélevé, puis centrifugé pendant 5 minutes à 14000 rpm. La présence des EPS est rapidement détectable par précipitation à l'éthanol d'après le protocole modifié de van den Berg *et al.* (1995). Un volume de 970 µL de surnageant a été prélevé et trois volumes d'éthanol (trois fois 970 µL) sont ajoutés à l'échantillon de culture dans des tubes de verre de 8 mL. Le mélange a été agité à l'aide d'un vortex à température de la pièce pendant 1 minute et un précipité blanchâtre apparaît dans le tube, ce qui correspond à l'agrégation des EPS.

#### **4.2 Filtration des échantillons avant analyse de la biotransformation de l'atrazine à l'aide de la chromatographie liquide à haute performance (CLHP).**

La filtration des échantillons a été initialement utilisée afin d'éliminer les EPS des surnageants de culture de la souche P2. Après la préparation des cellules bactériennes pour une culture en milieu minimal atrazine (MMA) contenant différentes sources de carbone, comme mentionné à la section 3.1, les cellules sont incubées à 29° C sous agitation pendant 7 jours. Un échantillon de 2 mL a été prélevé après 12 heures et après 168 heures de culture et a été passé sur une mini-colonne de 1 cm de terre diatomée. Puis le filtrat est passé dans un filtre de 0.45 µm. Un volume de 600 µL du filtrat obtenu est ajouté à 400 µL d'acétonitrile (0.25% d'acide acétique glacial) et le mélange est agité à l'aide d'un vortex. Par la suite, un volume de 100 µL est injecté dans un CLHP afin de suivre la biotransformation de l'atrazine.

#### **4.3 Extraction à l'éther de l'atrazine provenant de la culture en milieu minimal atrazine de *rhizobia*.**

L'extraction à l'éther de l'atrazine a été effectuée afin de séparer l'atrazine présent dans la phase aqueuse (milieu minimal) des EPS produits dans un milieu minimal atrazine contenant différentes sources de carbone. Un volume de 2 mL d'échantillon est prélevé et transféré dans un tube de verre de 8 mL. Deux à 3 gouttes d'une solution de NaOH 0.03 N sont ajoutées à l'échantillon à l'aide d'une pipette pasteur. Puis, un volume de 2 mL d'éther est ajouté au tube de verre. Les deux phases sont mélangées jusqu'à l'obtention d'une bonne émulsion. Puis la phase organique est prélevée. L'extraction à l'éther est répétée deux autres fois et avant le troisième prélèvement de la phase organique, l'émulsion est centrifugée pendant 5 minutes à 2500 rpm à 4°C. La phase organique est ensuite prélevée et l'éther est évaporé sous un jet d'azote. L'atrazine est resuspendu dans 2 mL de milieu minimal.

#### **4.4 Analyse de la biotransformation de l'atrazine et des métabolites de l'atrazine par chromatographie liquide à haute performance (CLHP).**

Le système chromatographique utilisé est de marque Waters. Il est composé de l'appareil CLHP (modèle 600), d'un système de pompes (modèle 600), d'un spectrophotomètre (modèle 486) et d'un injecteur automatique (Waters, modèle 717 Plus). Le système chromatographique était relié à un ordinateur Digital Celeris (modèle 590) et géré par le logiciel Millennium Software Chromatography Manager, version 2.15.01. La colonne chromatographique est une colonne hydrophobe phase-inverse NovaPak C<sub>18</sub> (3.9 x 150 mm). Le programme d'élution utilisé a été constitué de deux phases mobiles. La phase mobile A était composée d'eau déionisée et d'acide acétique glacial à 0.1% (v/v) et la phase mobile B était composée d'acétonitrile et d'acide acétique glacial 0.1% (v/v). Les deux phases ont été préparées séparément et ont barboté avec de l'hélium pendant 20 minutes.

La séparation et la quantification de l'atrazine et de métabolites s-triazines se sont effectuées à l'aide d'un programme d'élution qui utilisait les phases mobiles A et B. Lorsqu'il s'agissait de l'analyse de l'atrazine, la colonne phase inverse C<sub>18</sub> a été équilibrée avec un mélange de 60% de phase A (eau déionisée) et 40% d'acétonitrile (phase B), à un débit de 2 mL/min. Le programme d'élution a été le suivant : au cours des quatre premières minutes, la concentration de la phase B (acétonitrile, 0.1% acide acétique) augmente jusqu'à 80% de façon linéaire, alors que le pourcentage de la phase A diminue jusqu'à 20%. Ces conditions sont maintenues pendant deux minutes, puis 100% de la phase mobile B sont utilisées pour l'élution jusqu'au rétablissement des conditions initiales à l'intérieur de trois minutes. La colonne est ainsi rééquilibrée. La détection de l'atrazine s'est faite à une longueur d'onde de 220 nm.

Les métabolites s-triazines étudiés au cours de cette étude sont le déisopropylatrazine (2-chloro-4-amino-6-isopropylamino-s-triazine, CIAT) et le dééthylatrazine (2-chloro-4-éthylamino-6-amino-s-triazine, CEAT). Le CIAT et le CEAT présentent des propriétés physico-chimiques telles que la solubilité dans l'eau qui est de 3200 mg.L<sup>-1</sup> pour le CEAT et de 670 mg.L<sup>-1</sup> pour le CIAT, le coefficient de partition de partition contenu en carbone organique-eau (K<sub>oc</sub>) dont le Log est, respectivement pour le CIAT et le CEAT, de 1.7 et 1.8, ainsi qu'un coefficient de partition octanol-eau (K<sub>ow</sub>) dont le Log est,

respectivement, de 1.1 et 1.4 (Sabik *et al.*, 2000). Le programme d'élution utilisé afin de séparer et de quantifier ces deux métabolites est le suivant : la colonne phase-inverse a été équilibrée avec un mélange de 90% de phase mobile A (eau déionisée) et 10% de phase mobile B (acétonitrile, 0.1% d'acide acétique). Au cours des 12 premières minutes du programme d'élution, la concentration de la phase B augmente de manière linéaire jusqu'à 65% et la concentration de la phase A diminue jusqu'à 35%. Par la suite, au bout d'une minute, la concentration de la phase B atteint 100%. Une élution de la colonne s'effectue à 100% de la phase B pendant 1 minute, puis la colonne a été rééquilibrée dans ses conditions initiales. L'analyse des métabolites s-triazine a été effectuée à une longueur d'onde de 220 nm.

##### **5. TEST DE MINÉRALISATION DE L'ATRAZINE.**

Les cellules ont été préparées comme suit : La souche bactérienne issue d'une culture en milieu solide TYc et contenant 200 ppm d'atrazine en suspension a été mise en culture dans 5 mL de milieu liquide TYc en présence d'une suspension de 200 ppm d'atrazine durant 48 heures à 29°C sous agitation pour une D.O. à 600 nm de 0.6 à 0.8. Un volume de 5 mL de culture a été transféré dans 75 mL de TYc en présence de 100 ppm d'atrazine et mise sous agitation à 29°C pendant 48 heures. La culture a été centrifugée à 7500 rpm à 4°C pendant 10 minutes afin de récupérer les cellules bactériennes, puis les culots ont été lavés deux fois avec du tampon phosphate 100 mM (31,6 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et 68,4 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.1). Le culot bactérien a été resuspendu dans 50 mL de milieu minimal atrazine MA contenant 50 ppm d'atrazine et 0,2% de citrate et incubé pendant 48 heures à 29°C. Par la suite, les cellules ont été lavées deux fois en les centrifugeant à 6000 rpm pendant 10 minutes, à 4°C et en les resuspendant dans 10 mL, puis 40 mL de tampon phosphate 100 mM, pH 7.1. La resuspension a été centrifugée pendant 5 minutes et le culot a été resuspendu dans 60 mL de milieu minimal atrazine contenant 100 ppm d'atrazine et aucune source de carbone. Deux volumes de 10 mL de culture cellulaire ont été prélevés transférés dans des tubes de 50 mL et placés dans de l'eau en ébullition pendant 10 minutes afin de tuer les cellules bactériennes et de les utiliser comme témoin négatif. Les tubes ont été conservés sur de la glace.

Des bouteilles sérologiques de 50 mL ont été utilisées comme contenant pour l'évaluation de la minéralisation de l'atrazine. À 10 mL de milieu minimal atrazine, contenant 100 ppm d'atrazine dans des bouteilles de sérum contenant un tube de verre de 5 mL ont été ajoutés 65  $\mu\text{L}$  d'une solution d'atrazine- $^{14}\text{C}$  ( $3,83 \mu\text{Ci.mL}^{-1}$ ) et 10 mL de culture cellulaire. Les bouteilles ont été fermées hermétiquement à l'aide de bouchons recouverts de téflon. Un volume de 0.5 mL de NaOH 1 N a été ajouté à l'aide d'une seringue dans le tube de verre se trouvant dans la bouteille de sérum. Avant l'incubation des cultures à 29°C, 60 mL d'oxygène (99.9%) filtré ont été ajoutés à certaines bouteilles (culture en présence d'oxygène) qui ont été incubées sous agitation. Les bouteilles auxquelles l'oxygène n'a pas été ajouté, ont été incubées à 29°C sans agitation. Les cultures ont été incubées pendant 72 heures et des prélèvements du NaOH 1N ont été effectués aux 12 heures. Suite au prélèvement du NaOH 1N, 0.5 mL de NaOH 1 N frais a été ajouté. Le NaOH 1N prélevé (500  $\mu\text{L}$ ) a été ajouté à une bouteille à scintillation contenant 5.5 mL de cocktail à scintillation. Les bouteilles à scintillation ont été placées dans un compteur à scintillation afin de mesurer la radioactivité émise par le  $^{14}\text{CO}_2$  produit par la minéralisation de l'atrazine.

## **6. ISOLEMENT ET PURIFICATION DE L'ADN**

### **6.1 Isolement de l'ADN génomique.**

L'extraction de l'ADN génomique s'est effectuée selon le protocole modifié de Laberge *et al.* (1989). L'ADN génomique provient d'une culture incubée toute la nuit et contenant de 500 mL de milieu TYc contenant  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  (ppm) d'atrazine en suspension. Cette extraction a permis d'obtenir plus de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  d'ADN génomique.

La suspension bactérienne a été centrifugée et resuspendue dans 90 mL de TEN (0.05 M de Tris base (pH 8.0), 0.01 M d'EDTA, 1.0 M de NaCl). Après la resuspension, une centrifugation a permis d'obtenir un culot auquel 45 mL de STE (0.05 M de Tris base, 0.05 M d'EDTA et 10% (p/v) de sucrose, pH 8.0) ont été ajoutés. La resuspension a été refroidie pendant 10 minutes sur de la glace. Par la suite, 4.5 mL d'une solution de STE

contenant  $0.04 \text{ g.mL}^{-1}$  de lysozyme ont été ajoutés et l'échantillon a été mélangé doucement par inversion et maintenu sur la glace pendant 30 minutes. Un volume de 5.4 mL d'une solution de 6% de n-Lauryl sarcosinate de sodium a été ajouté afin d'obtenir une suspension visqueuse et transparente après légère agitation. Le lysat a subi deux extractions au phénol équilibré au tampon TE (10 mM de Tris base, 1 mM d'EDTA pH 8.0) au cours desquelles le mélange a été agité à l'aide d'un vortex et centrifugé pendant vingt minutes à 7500 rpm, à  $4^{\circ}\text{C}$ . Après chaque centrifugation, la phase supérieure a été récupérée. À ces dernières, un volume de 55 mL d'une solution de chloroforme:alcool isoamylique (24:1) a été ajouté. L'émulsion a été centrifugée pendant 15 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$  et la phase supérieure a été récupérée. Un volume de 55 mL d'éther éthylique a été ajouté à la phase supérieure récupérée et les deux phases ont été mélangées puis centrifugées pendant 15 minutes. La phase supérieure a été jetée et les traces d'éther éthylique ont été évaporées. L'ADN génomique a été précipité en ajoutant un volume (55 mL) d'alcool isopropylique, en mélangeant légèrement puis en plaçant la suspension à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour la nuit. L'ADN a été centrifugé pendant 30 minutes à 12000 rpm, à  $4^{\circ}\text{C}$ . Le culot a été lavé avec un volume d'éthanol 95% froid et centrifugé 10 minutes afin d'obtenir de l'ADN purifié, puis le culot a été séché. L'ADN génomique a été resuspendu dans 16,5 mL de tampon TE et conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **6.1.1 Isolement de l'ADN plasmidique.**

L'isolement de l'ADN plasmidique, qui est constitué de mégaplasmides et de plasmides cryptiques ou satellites, s'est fait selon le protocole modifié d'Eckhardt (1978) permettant d'isoler et de prélever des plasmides de tailles importantes à partir de gels d'agarose. La souche bactérienne a été mise en culture dans 10 mL de TYc contenant  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  d'atrazine afin d'obtenir une densité optique à 600 nm de 0.2. Après centrifugation de 1.0 mL de culture à 14 000 rpm pendant 5 minutes, le culot a été resuspendu dans 0.5 mL d' $\text{H}_2\text{O}$  milli-Q froide stérilisée. La resuspension cellulaire a été ajoutée à 1.0 mL de sarcosinate de sodium (0.3%) maintenu préalablement sur glace. Après centrifugation à 13 000 rpm à  $4^{\circ}\text{C}$ , le culot a été resuspendu dans 40  $\mu\text{L}$  d'une solution contenant 10 mM de Tris, 10 mM d'EDTA et 20% (p/v) de Ficoll (Mr 4000 000). Un gel d'agarose à



0.75% a été placé dans un bac d'électrophorèse de sorte que le tampon TBE 1X (89 mM de Tris, 2.5 mM d'EDTA et 89 mM d'acide borique) ne dépasse pas le gel (ou de sorte que les puits du gel restent vides). Dans chaque puits du gel, 25  $\mu\text{L}$  d'une solution contenant 10 % (p/v) de SDS et  $1\text{mg.mL}^{-1}$  de xylène cyanole FF ont été déposés. Le gel d'agarose a été soumis à un courant de 100 volts inversé pendant 15 minutes. Puis le gel a été complètement immergé avec du tampon TBE 1X. La suspension cellulaire a été lysée en ajoutant 10  $\mu\text{L}$  d'une solution de lyse (10 mM de Tris, 10 mM d'EDTA, 0.4  $\text{mg.mL}^{-1}$  de RNase A, 8  $\text{mg.mL}^{-1}$  de lysozyme et 1.0  $\text{mg.mL}^{-1}$  de rouge de bromophénol), puis 25  $\mu\text{L}$  de lysat ont été ajoutés dans chaque puits. La migration s'est effectuée à 4°C à 40 volts pendant 30 minutes, puis à 60 volts pendant 14 heures. Le gel d'agarose est coloré au bromure d'éthidium ( $0.5\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) pendant 10 minutes et décoloré pendant 60 minutes dans de l'eau distillée. Après visualisation des bandes aux U.V., les bandes (plasmides satellites) ont été prélevées du gel et purifiées à l'aide d'une trousse de purification d'ADN et des bandes obtenues par électrophorèse. L'ADN purifié a été resuspendu dans 20  $\mu\text{L}$  de tampon TE.

### **6.1.2 Isolement de l'ADN plasmidique chez des clones d'*E. coli* par midi-prep.**

L'extraction de formes répliquatives de plasmides à partir de petits (1.5 mL) et grands volumes (25 mL) de culture d'*E. coli* a été effectuée en utilisant le protocole de midi-prep par la méthode de la lyse alcaline.

Une colonie issue d'une culture fraîche d'une souche d'*E. coli* sur milieu LB solide a été prélevée à l'aide d'un cure-dent stérile etensemencée dans un tube contenant 5 mL de LB et un antibiotique approprié. Après une culture de huit heures à 37°C (jusqu'à saturation de la culture), 1,5 mL de la pré-culture ontensemencé 25 mL de LB contenant l'antibiotique adéquat (ampiciline  $60\ \mu\text{g.mL}^{-1}$  ou kanamycine  $50\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). La culture a été incubée à 37°C, sous agitation, pendant 16 heures (toute la nuit). La culture a été transférée dans deux tubes de 30 mL et centrifugée à 9000 rpm pendant 10 minutes, à 4°C. Le culot a été dispersé en ajoutant 2 mL de solution I (50 mM de glucose, 10 mM d'EDTA, 25 mM de Tris, pH 8.0) préalablement refroidie sur la glace et 4 mL de la

solution II fraîchement préparée (0.2 N de NaOH, 1 % de SDS) afin de lyser les cellules. Le mélange s'est effectué par inversion. La resuspension a été laissée sur la glace pendant 5 minutes. Par la suite, 3 mL de la solution III (3 M d'acétate de potassium, 1,8 M d'acide formique) refroidie sur la glace ont été ajoutés au lysat. Après une légère homogénéisation, la suspension a été laissée sur la glace pendant 5 minutes et centrifugée pendant 8 minutes à 7500 rpm, à 4°C. Le surnageant a été prélevé et un volume (environ 9 mL) d'une solution de NaOAc (acétate de sodium) 3 M pH 7.0 correspondant à 10% du volume du surnageant a été ajouté, ainsi que deux volumes d'éthanol 100 %. La solution a été agitée à l'aide d'un vortex pendant deux minutes, puis placée à -20°C toute la nuit. La solution a été par la suite centrifugée pendant 15 minutes à 16 000 rpm et à 4°C. Les culots ont été lavés avec de l'éthanol à 70% refroidi sur la glace, puis séchés. Ils ont été resuspendus dans 1 mL de tampon TE et de la RNase A (20 µg.mL<sup>-1</sup>).

Par la suite, une extraction au phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25 :24 :1) a été effectuée en ajoutant 1 mL à la resuspension d'ADN. Après homogénéisation, l'émulsion a été centrifugée 8 minutes à 13000 rpm et à 4°C. La phase supérieure a été récupérée et une extraction au phénol équilibré au tampon TE a été effectuée. Puis l'émulsion a été centrifugée 8 minutes à 13000 rpm et à 4°C. Après centrifugation, une extraction au chloroforme :alcool isoamylique (24 :1) a été réalisée sur le surnageant, puis le mélange a été centrifugé 10 minutes, à 13000 rpm et à 4°C. L'ADN présent dans la phase supérieure récupérée a été précipité en ajoutant un volume d'alcool isopropylique. Après avoir mélangé légèrement, la solution a été mise à -70°C pendant 30 minutes, puis centrifugée 15 minutes à 13000 rpm et à 4°C. Les culots ont été lavés avec un volume d'éthanol 95 %, puis centrifugés 5 minutes à 13000 rpm et à 4°C. L'éthanol a été éliminé et les culots d'ADN plasmidique ont été resuspendus dans 515 µL de tampon TE et de la RNase A (20 µg.mL<sup>-1</sup>) et conservés à -20°C.

## **7. AMPLIFICATIONS PAR PCR DE L'ADN TOTAL ET PLASMIDIQUE.**

Les échantillons d'ADN pour amplification par PCR proviennent de l'ADN total (1 µg) de *rhizobia*. Les fragments d'ADN générés par PCR ont été amplifiés à l'aide de la *Taq* DNA polymérase. Les amorces utilisées afin d'amplifier ces fragments sont pour le gène *atzA* (5'-CCATGTGAACCAGATCCT-3' et 5'-TGAAGCGTCCACATTACC-3'), le gène *atzB* (5'-GTTGAGGTGGTGAAGT-3' et 5'-AGACTCGACGAAGGTT-3') (De Souza *et al.*, 1998a) et le gène *atzC* (5'-GCTCACATGCAGGTACTCCA-3' et 5'-GTACCATATCACCGTTTGCCA-3') (De Souza *et al.*, 1998b). Il s'agit d'amorces spécifiques à des régions internes et conservées chez les trois gènes *atzA*, *atzB* et *atzC* (De Souza *et al.*, 1998b). Les amorces de chaque gène sont différentes et ciblent des régions spécifiques de ces gènes (De Souza *et al.*, 1998b, Sadowsky *et al.*, 1998). De plus le contenu en G+C% entre les gènes *atzA*, *atzB* et *atzC* (Sadowsky *et al.*, 1998) sont différents les uns des autres si bien que des programmes différents de PCR ont été utilisés. Concernant le gène *atzA*, le programme utilisé afin d'amplifier le fragment interne a été le suivant : une dénaturation pendant 5 minutes à 94°C; 35 cycles d'une dénaturation à 94°C pendant une minute, suivie d'une hybridation à 45°C pendant une minute et d'une élongation à 72°C pendant deux minutes. Le programme suivant a été utilisé afin d'amplifier des fragments d'ADN à l'aide des amorces spécifiques au gène *atzB* : une dénaturation pendant 5 minutes à 94°C; 5 cycles d'une dénaturation à 94°C pendant une minute, suivie d'une hybridation à 63° C pendant une minute et d'une élongation à 72°C pendant deux minutes. Par la suite, 30 cycles d'une dénaturation à 94°C pendant une minute, suivie d'une hybridation à 63°C pendant une minute et d'une élongation à 72°C pendant deux minutes ont été effectués. De même, le programme utilisé afin d'amplifier un fragment interne du gène *atzC* a été le suivant : une dénaturation pendant 5 minutes à 94°C; puis 35 cycles d'une dénaturation à 94°C pendant une minute, suivie d'une hybridation à 57°C pendant une minute et d'une élongation à 72°C pendant deux minutes ont été effectuées. Chaque programme d'amplification utilisé s'est terminé par une élongation à 72°C pendant 10 minutes.

Les amorces utilisées couvraient pour les gènes *atzA* et *atzB*, des régions de 0,5 kpb et pour le gène *atzC*, une région de 0,6 kpb (tableau II).

Tableau II : Positions et régions couvertes par les amorces spécifiques aux gènes *atzA*, *atzB* et *atzC*.

Amorces	Régions couvertes par les amorces sur les gènes <i>atzA</i> , <i>atzB</i> et <i>atzC</i>		
	<i>atzA</i> : ADP	<i>atzB</i> : ADP	<i>atzC</i> : ADP
Amorce L (gauche)	436 → 453	973 → 992	768 → 787
Amorce R (droite)	946 → 963	1476 → 1495	1392 → 1373

Les fragments d'amplification ont été séparés sur des gels d'agarose de 0,9 et de 1%, puis purifiés du gel à l'aide de la trousse de purification d'ADN (Pharmacia). Les fragments d'ADN purifiés ont soit été utilisés comme échantillons d'ADN pour des « semi-nested » PCR ou soit comme échantillons pour le séquençage.

### **7.1 Isolement de l'ADN plasmidique par la méthode modifiée d'Eckardt.**

Les *rhizobia* sont des bactéries qui possèdent, en plus de leur chromosome, d'autres éléments réplicatifs de taille importante de l'ordre de 70 à 1700 kpb appelés des plasmides satellites et des mégaplasmides pour les plus gros (Capela *et al.*, 1999).

Chez les différentes souches de *rhizobia*, les plasmides satellites et les mégaplasmides ont été isolés par la méthode modifiée d'Eckardt (1978).

Une culture de 5 mL a été effectuée dans un milieu riche TYc contenant 100 ppm ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) d'atrazine. Cette culture s'est effectuée toute la nuit afin d'obtenir une densité optique à 600 nm de 0,210. Un volume de 1,0 mL de cette culture a été prélevé et centrifugé à 14 000 rpm pendant 5 minutes. Le culot cellulaire a été resuspendu dans 0,5 mL d'eau milliQ stérilisée et refroidie à 4°C. La resuspension cellulaire est ajoutée à 1,0 mL de sarcosinate de sodium (0,3%) maintenue préalablement sur glace. Le mélange est homogénéisé à l'aide d'un vortex. Par la suite, la suspension est centrifugée de nouveau à 13 000 rpm, à 4°C et le surnageant est éliminé. Le culot est resuspendu dans 40  $\mu\text{L}$  d'une solution de 10 mM de Tris, de 10 mM d'EDTA et de 20% (p/v) de Ficoll (Mr 400 000) (solution de TEF).

Dans chaque puits d'un gel d'agarose de 0,75% immergé partiellement avec du tampon TBE 1X de sorte que les puits restent vides, 25  $\mu\text{L}$  d'une solution contenant 10% de SDS (p/v) et 1  $\text{mg.mL}^{-1}$  de xylène cyanole FF ont été déposés. Un courant inverse de 100 volts est appliqué au gel d'agarose contenant la solution de xylène cyanole FF pendant 15 minutes. Par la suite, le gel est immergé complètement dans du tampon TBE. Un volume de 10  $\mu\text{L}$  d'agent lytique (10 mM de Tris, 10 mM d'EDTA, 0,4  $\text{mg.mL}^{-1}$  de RNase A, 1,0  $\text{mg.mL}^{-1}$  de lysozyme et 1,0  $\text{mg.mL}^{-1}$  de rouge de bromophénol) a été ajouté aux cellules resuspendues dans la solution de TEF. Un volume de 25  $\mu\text{L}$  de lysat a été immédiatement déposé dans chaque puits du gel d'agarose où la lyse s'est achevée. Une migration à 40 volts a été effectuée pendant une heure et 45 minutes, à 4°C, suivie d'une migration à 100 volts pendant six heures, à 4°C.

Par la suite, le gel a été coloré au bromure d'éthidium (0,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) pendant 10 minutes et décoloré dans l'eau distillée pendant une heure. Les plasmides ont été visualisés aux U.V. et ensuite purifiés du gel à l'aide de la trousse de purification d'ADN (Pharmacia) et resuspendus dans 20  $\mu\text{L}$  de tampon TE. L'ADN plasmidique purifié a été utilisé comme échantillon d'ADN pour des amplifications par PCR en présence des amorces des gènes *atzA*, *atzB* et *atzC* de *Pseudomonas ADP*.

### **7.1.1 Amplification par PCR sur l'ADN plasmidique à l'aide des amorces spécifiques des gènes *atzA*, *atzB* et *atzC* de *Pseudomonas ADP*.**

Une analyse par PCR a été effectuée sur l'ADN plasmidique de la souche P2 isolé et prélevé par la méthode du gel Eckardt. Les amplifications par PCR se sont effectuées dans 50  $\mu\text{L}$  d'un milieu contenant 10 mM de Tris-HCl, pH 9.0, 1.5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM de KCl (tampon de PCR), 0,2 mM de dNTP, 0,05% de Tween et 2,5  $\mu\text{M}$  d'amorces standards spécifiques à une région interne du gène *atzA*, *atzB* ou *atzC*. Les amplifications se sont faites à l'aide de 2 unités (U) de l'ADN polymérase *Taq* et les programmes d'amplification ont été les mêmes que ceux utilisés avec l'ADN total. Les produits d'amplification ont été mis sur des gels d'agarose de 0,75% ou 1,2%.

## **7.2 Amplifications par « semi-nested PCR » de l'ADN total.**

Les amplifications par « semi-nested PCR » nécessitent des PCR primaires qui utilisent des amorces dites externes. Suite à ces amplifications, les fragments d'ADN amplifiés sont mis sur un gel d'agarose afin de les séparer puis de les purifier des gels. Une deuxième PCR est effectuée à l'aide d'amorces spécifiques à des régions internes des séquences amplifiées par le PCR primaire. Ces amorces sont dites internes et les fragments d'ADN amplifiés par le PCR primaire constituent l'échantillon d'ADN pour la deuxième PCR. Dans le cadre des « semi-nested PCR », une amorce externe et une amorce interne sont utilisées lors de la deuxième PCR.

Deux amorces dégénérées ont été construites afin d'amplifier des régions internes et conservées au sein des trois gènes *atzA*, *atzB* et *atzC*. Ces amorces ont été construites en fonction de la région peptidique conservée chez les trois enzymes AtzA, AtzB et AtzC, de la séquence nucléotidique du gène *atzB* et des codons d'usage chez *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Les séquences peptidiques utilisées pour construire les amorces dégénérées sont issues de l'enzyme AtzB et sont les suivantes pour la région N-terminale <sup>63</sup>-GLTAYPG-<sup>69</sup> et pour la région C-terminale <sup>396</sup>-DAARG-<sup>392</sup> (Sadowsky *et al.*, 1998). La première amorce, ATZB:ADP:1122L (1122-1141), présente un degré de dégénérescence de 96 pour une séquence de 20 nucléotides et l'amorce inverse ATZB :ADP :2109R (2109-2123) présente un degré de dégénérescence de 144 pour une séquence de 15 nucléotides (tableau III et figure 6).

Tableau III : Séquence nucléotidique des amorces dégénérées ATZB:ADP:1122L et ATZB :ADP :2109R basées sur les sites actifs conservés chez les trois enzymes *atzABC* et utilisées lors de « semi-nested PCR » en présence de l'ADN total de la souche P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*.

<i>Amorces Dégénérées</i>	<i>Séquences des amorces</i>
ATZB:ADP:1122L (1122-1141)	5' <b>GGCCTG</b> ACC GCC TAT <b>CCG GG</b> <sup>3'</sup> ----T ----C ---G ----G ----C ----C ----T
ATZB :ADP :2109R (2109-2123)	5' <b>GTC GGC</b> GGC GCG <b>GCC</b> <sup>3'</sup> A---- C---- C---- C---- A---- T---- A---- C---T

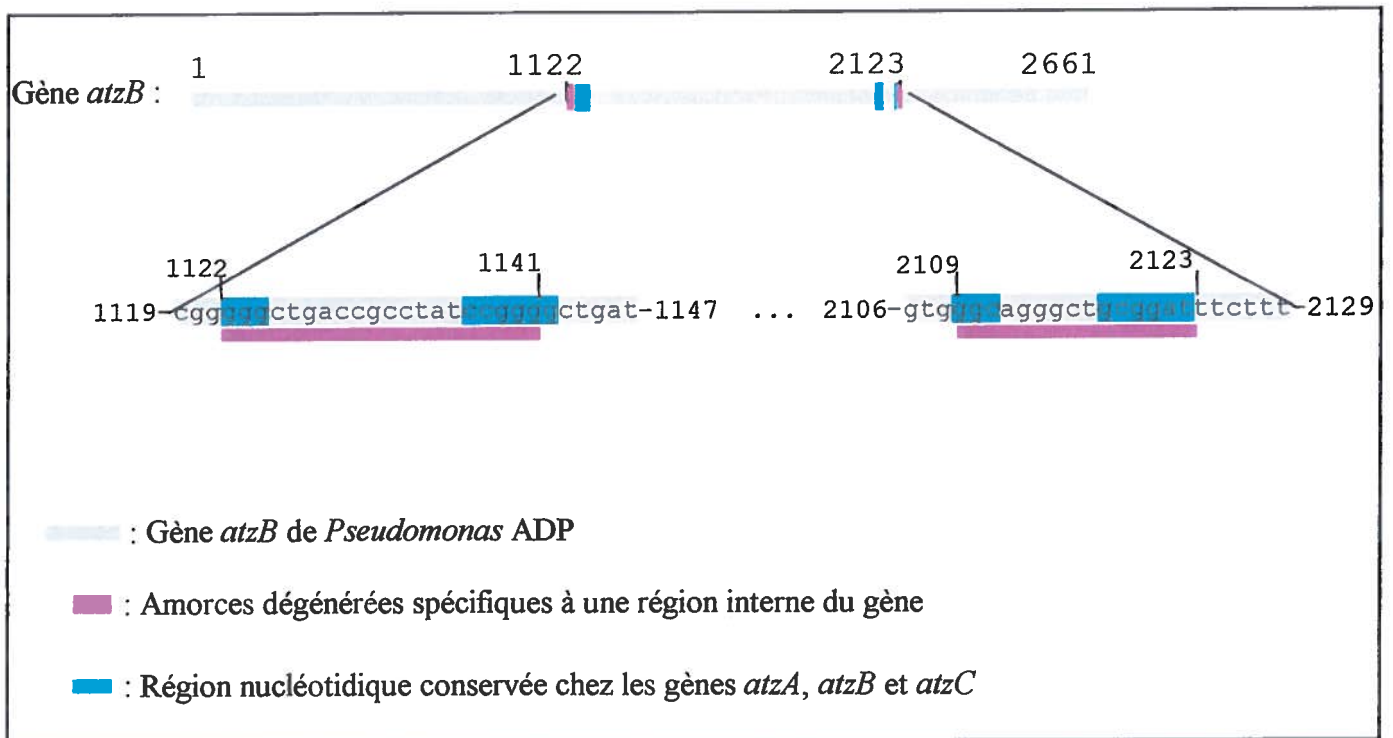


Figure 6 : Région nucléotidique amplifiée par les amorces dégénérées ATZB:ADP:1122L et ATZB:ADP:2109R chez le gène *atzB* et conservée chez les gènes *atzA*, *atzB* et *atzC* de *Pseudomonas* ADP.



Le premier PCR a utilisé 1 µg d'ADN total de la souche P2 en présence de 3,6 µM ou 0,5 µM d'amorces dégénérées ATZB:ADP:1122L et ATZB :ADP :2109R dans 50 µL d'un milieu contenant 10 mM de Tris-HCl, pH 9.0, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de KCl (tampon de PCR), 0,2 mM de dNTP et 0,05% de Tween. Le programme suivant de PCR a été utilisé pour le « semi-nested PCR »:

Tableau IV : Programme de PCR utilisé lors du « semi-nested PCR ».

<i>Programme de PCR</i>		
Températures	Durée	Nombre de cycles
94°C	5 minutes	1 cycle
94°C	1 minute	} 5 cycles
37°C	1 minute	
72°C	2 minutes	
94°C	1 minute	} 30 cycles
55°C	1 minute	
72°C	2 minutes	
72°C	10 minutes	1 cycle

Les amplifications par PCR se sont effectuées en présence de 2 U d'ADN polymérase *Taq* qui ont été ajoutées après 4 minutes de dénaturation à 94° C. Suite au PCR primaire, les produits d'amplification (25 µL) ont été mis sur un gel d'agarose de 0,9 % et ont subi une migration sur gel de 45 minutes à 100 volts. En utilisant les deux amorces dégénérées ATZB:ADP:1122L et ATZB :ADP :2109R, le PCR primaire devrait générer des fragments d'ADN d'environ 1000 pb. Les fragments d'intérêt ont été prélevés du gel d'agarose puis purifiés à l'aide de la trousse de purification de l'ADN contenu dans des gels d'agarose afin d'effectuer un « semi-nested PCR ».

Les fragments amplifiés par le PCR primaire ont été utilisés comme échantillon d'ADN pour le « semi-nested PCR ». Une quantité de 11 à 22 ng de produit d'amplification obtenu du PCR primaire a été ajoutée, comme échantillon d'ADN, à 50 µL d'un milieu d'amplification contenant 10 mM de Tris-HCl, pH 9.0, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de

KCl (tampon de PCR), 0.2 mM de dNTP, 0.05% de Tween et 3,6  $\mu$ M d'amorces ATZ:ADP:1100L (amorce dégénérée) et ATZ:ADP:1611R (amorce non dégénérée couvrant la région de 1611 à 1628 chez le gène *atzB*) (tableau V).

Tableau V : Séquence nucléotidique de l'amorce non dégénérée ATZB:ADP:1611R utilisée lors du « semi-nested PCR » en présence de fragments amplifiés par un PCR primaire de l'ADN total de la souche P2.

<i>Amorce</i>	<i>Séquence de l'amorce</i>
ATZB:ADP:1611R	5'-GAAACCTTCGTCGAGTCT-3'

Une quantité de 100 ng de l'ADN plasmidique pATZB-2 a été utilisée comme témoin positif pour le gène *atzB*. Cet ADN a constitué l'échantillon d'ADN positif pour le gène *atzB*, lors du « semi-nested PCR ». Le produit d'amplification attendu est un fragment d'environ 528 pb. Suite au « semi-nested PCR », 20  $\mu$ L de l'amplification sont mis sur un gel d'agarose de 0,9 % et la migration des produits d'amplification a été effectuée pendant 40 minutes à 100 volts afin de séparer les différents fragments d'amplification possibles.

## **8. PROCÉDURES D'HYBRIDATION DE TYPE SOUTHERN DES PRODUITS DE PCR ET DE SEMI-NESTED PCR ET DE PLASMIDES ISOLÉS PAR LA MÉTHODE ECKARDT.**

### **8.1 Transfert par capillarité de l'ADN sur membrane de nylon.**

L'ADN présent dans les gels d'agarose a été transféré sur des membranes de nylon par la méthode de capillarité selon le protocole modifié de Sambrook *et al.* (1989) et de Boehringer Mannheim Corporation (1995). L'ADN au sein du gel d'agarose a été dénaturé en traitant le gel d'agarose dans plusieurs volumes d'une solution de dénaturation (1,5 M de NaCl et 0,5 N de NaOH) pendant 30 à 45 minutes. Par la suite, le gel a été rincé dans de l'eau puis neutralisé dans plusieurs volumes d'une solution de

neutralisation (0,5 M de Tris, 3 M de NaCl pH 7.5) pendant 45 minutes. Le gel d'agarose a été retiré de la solution de neutralisation et placé sur du papier Whatman 3MM mouillé afin d'effectuer le transfert par capillarité de l'ADN sur une membrane de nylon. Le transfert par capillarité s'est effectué en utilisant une solution de transfert 20X SSC (3 M de NaCl, 300 mM de citrate de sodium pH 7) qui se déplaçait par capillarité d'un réservoir contenant la solution à quelques feuilles de papier buvard entraînant l'ADN présent dans le gel d'agarose. Cet ADN qui s'est ainsi transféré, s'est absorbé à une membrane de nylon recouvrant le gel d'agarose. Après le transfert, la membrane de nylon a été lavée dans une solution de SSC à 5X (750 mM de NaCl et 75 mM de sodium citrate, pH 7) pendant 5 minutes puis égoutté pendant 30 minutes à température pièce. L'ADN transféré a été fixé sur la membrane de nylon en la plaçant dans un four à 120°C pendant 30 minutes.

## **8.2 Préparation de fragments d'ADN par digestion enzymatique.**

L'ADN de différents plasmides a été utilisé afin de préparer des sondes pour des hybridations de type Southern. Des sondes pour les gènes *atzA* et *atzB* ont été préparées, respectivement, à partir des plasmides pMD4 et pATZB-2. Les plasmides purifiés ont été digérés à l'aide d'enzymes de restriction : le plasmide pMD4 et le plasmide pATZB-2 ont été digérés par l'enzyme de restriction *AvaI*. L'obtention de fragments d'ADN digérés par ces enzymes de restriction selon la procédure décrite par Sambrook *et al.* (1989) a été utilisée. Une quantité de 2 µg d'ADN plasmidique a été digérée par 5 à 10 unités d'enzyme de restriction dans un milieu de digestion contenant 10 mM de Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de dithiothreitol et 50 mM de NaCl dans du tampon TE. La digestion a été effectuée à 37°C pendant 30 à 140 minutes. Un volume d'EDTA 0,5 M a été ajouté jusqu'à l'obtention d'une concentration finale de 10 mM, afin d'inhiber l'activité des enzymes de restriction. L'ADN digéré est placé sur un gel d'agarose de 0,7% ou 0,9% afin d'isoler le fragment d'intérêt par électrophorèse avec une migration à 100 volts pendant 45 minutes. Après la séparation électrophorétique, un fragment de 1,9 kpb du gène *atzA* et un fragment interne de 2,0 kpb du gène *atzB* ont été isolés et purifiés

du gel d'agarose à l'aide d'une trousse de purification d'ADN d'un gel d'agarose, puis resuspendu dans du tampon TE.

### **8.3 Marquage de sondes à la digoxigénine (DIG) à l'aide de l'enzyme Klénow (« Random primed DNA labeling »).**

Les fragments d'ADN digérés et purifiés ont été marqués avec la digoxigénine par insertion aléatoire à l'aide de l'enzyme Klénow. Une quantité de 1 µg d'ADN matrice (l'ADN digéré par *AvaI*) a été diluée dans l'eau milliQ stérilisée pour un volume final de 15 µL. L'ADN est dénaturé pendant 10 minutes dans de l'eau bouillante et immédiatement refroidi sur la glace. Un volume de 2 µL d'un mélange d'hexanucléotides 10X (1,56 mg.mL<sup>-1</sup> de « random hexanucléotides », 500 mM de Tris-HCl, 100 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de dithioérythritol (DTE) et 2 mg.mL<sup>-1</sup> de BSA, pH 7,2) a été ajouté, ainsi que 2 µL de dNTP de marquage 10X (1 mM de dATP, 1 mM de dCTP, 1 mM dGTP, 0,65 mM de dTTP et 0,35 mM de digoxigénine-11-dUTP, pH 6.5). Le marquage à la digoxigénine de l'ADN a été effectué avec 100 U.mL<sup>-1</sup> d'enzyme Klénow durant 20 heures à 37°C.

### **8.4 Hybridation de l'ADN à l'aide d'une sonde marquée à la DIG.**

Suite au transfert de l'ADN par capillarité sur une membrane de nylon, une hybridation de l'ADN a été effectuée à l'aide d'une sonde marquée à la digoxigénine. La membrane de nylon sur laquelle est fixée l'ADN est placée dans un tube d'hybridation contenant 20 mL de solution de pré-hybridation (tampon 5X SSC : 750 mM de NaCl, 75 mM de citrate de sodium, pH 7; 0.1% de N-laurylsarcosine (p/v), 0.02% de SDS (p/v) et 1% d'agent bloquant) et est mise à incubation à 68°C pendant 30 minutes dans un four rotatif à hybridation (Robbins Scientific Corp.). Au cours de la pré-hybridation, la sonde d'ADN marquée à la digoxigénine a été dénaturée pendant 10 minutes dans de l'eau bouillante, puis ajoutée à 5 mL d'une solution de pré-hybridation pour une concentration finale de 0,1 ng.mL<sup>-1</sup>. L'hybridation s'est effectuée à 68°C en exposant la membrane de nylon à la

solution de pré-hybridation contenant la sonde pendant 16 heures. Après l'hybridation la solution contenant la sonde d'ADN a été récupérée et conservée à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour d'autres hybridations. Au terme de l'étape d'hybridation, la membrane a été lavée deux fois dans une solution de lavage 2X de SSC (300 mM de NaCl et 30 mM de sodium citrate, pH 7) pendant cinq minutes. Afin d'éliminer toute trace d'hybridation non spécifique, la membrane a été lavée deux autres fois avec une solution de lavage 0,5X (0.01% de N-laurylsarcosine, 0.1% d'agent bloquant et 0.1% de SDS) à  $68^{\circ}\text{C}$  pendant 15 minutes et sous agitation constante.

### **8.5 Détection de l'ADN hybridé à la sonde marquée à la digoxigénine.**

Après l'hybridation, la détection des sondes s'est effectuée par chimioluminescence en utilisant le protocole de la trousse de marquage et de détection de l'ADN DIG de la compagnie Boehringer Mannheim. La détection de la sonde DIG hybridée à l'ADN cible s'est effectuée à l'aide de l'anticorps spécifique à la digoxigénine et couplé à la phosphatase alcaline et à l'aide du substrat CSPD.

Suite à l'hybridation, la membrane a été rincée dans du tampon de lavage (100 mM d'acide maléique, 150 mM de NaCl et 0.3% de Tween 20 (v/v) pH 7.5) pendant 1 à 5 minutes. Ensuite, la membrane a été incubée pendant 30 minutes dans 100 mL de solution de blocage (100 mM d'acide maléique, 150 mM de NaCl et 1% d'agent bloquant pH 7.5). Un volume de 4  $\mu\text{L}$  de l'anticorps anti-DIG conjugué à la phosphatase alcaline ( $750 \text{ U.mL}^{-1}$ ) a été, par la suite, dilué dans 20 mL de solution de blocage. La membrane de nylon a été incubée à température de la pièce en présence de la solution d'anticorps ( $150 \text{ mM.mL}^{-1}$ ) pendant 30 minutes. Après cette incubation, la membrane a été lavée deux fois pendant 15 minutes dans 100 mL de tampon de lavage, puis équilibrée pendant 5 minutes dans 20 mL de tampon de détection (100 mM de Tris-HCl, 100 mM de NaCl, pH 9.5). La membrane de nylon a été retirée du tampon de détection et placée dans un récipient pour hybridation. Un volume de 1 mL de tampon de détection contenant 10 mL de CSPD a été appliqué uniformément sur la membrane de nylon et la membrane est

restée 5 minutes à la température de la pièce. Tout excès de solution de CSPD a été retiré et la membrane a été placée à 37°C pendant 10 minutes afin d'augmenter la réaction de luminescence. Par la suite la membrane a été placée sur un film RX de Fuji pendant deux heures, à la température de la pièce, de sorte que la sonde hybridée à l'ADN cible soit exposée au film.

## **9. SÉQUENÇAGE DE L'ADN AMPLIFIÉ PAR PCR.**

Le séquençage de certains fragments d'ADN amplifiés par PCR a été effectuée par le service de séquençage de l'INRS-Institut Armand-Frappier. Les fragments d'ADN d'intérêt ont été purifiés à l'aide de la trousse de purification d'ADN de gel d'agarose (Amersham-Pharmacia Biotech). Une quantité de 800 ng d'ADN a été utilisée pour le séquençage selon la réaction de Sanger *et al.* (1977), ainsi que des didésoxynucléotides de terminaison marqués par des fluorochromes. La réaction de séquençage a été effectuée à l'aide de la trousse BigDye™ Terminator cycle (ABI), de la polymérase AmpliTaqR et des amorces ATZB :ADP :973L ou ATZB :ADP :1611R qui sont des amorces s'hybridant aux extrémités 3' et 5' des fragments d'ADN d'intérêts. La fragmentation des réactions de séquençage a été réalisée sur un séquenceur à électrophorèse capillaire Perkin-Elmer (ABI).

## **10. ANALYSE DES SÉQUENCES D'ADN PAR DIFFÉRENTS LOGICIELS.**

Les séquences d'une région du gène *atzB* présentes sur le plasmide pATZB-2 et au sein du génome de la souche P2 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* ont subi une analyse d'homologie de séquence, à l'aide du logiciel DNA BLAST, avec les différentes séquences de gènes disponibles sur le site Internet du Centre National de l'Information en Biotechnologie (NCBI : « National Center for Biotechnology Information »).

Le logiciel align version 2.0 a été utilisé afin d'effectuer l'alignement de séquence entre les différentes séquences nucléotidiques obtenues du séquençage et le gène *atzB* de

*Pseudomonas* ADP et la projection des séquences nucléotidiques en séquences peptidiques pour chacun des produits de séquençage.

## **RÉSULTATS**



**1. CROISSANCE DE RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM BV. VICIAE P2 ET SINORHIZOBIUM MELILOTI M8 ET ATZ-025 SUR DIFFÉRENTES SUBSTRATS DE CROISSANCE EN PRÉSENCE D'ATRAZINE (20 PPM) COMME SEULE SOURCE D'AZOTE.**

Les *rhizobia* ont, sur les milieux adaptés, un temps de dédoublement de l'ordre de trois heures, pour les plus rapides, de sorte que l'analyse de la biotransformation de l'atrazine a débuté par une évaluation du milieu de culture minimal contenant de l'atrazine comme unique source d'azote et différentes sources de carbone permettant la meilleure croissance chez les *rhizobia* (Elkan, 1992).

Les souches P2 et M8 de *R. leguminosarum* et de *S. meliloti* présentent une meilleure croissance en présence de 0,2 % de glucose qu'en présence de 0,2 % de succinate. À l'intérieur de 24 heures les souches présentent une augmentation importante de leur biomasse, cependant la population diminue après 24 heures (figure 7).

La souche M8 de *S. meliloti* atteint des densités optiques plus élevées, après 24 heures, que la souche P2 et la souche ATZ-025 de *R. leguminosarum* et *S. meliloti* respectivement. De plus, la souche P2 semble plus difficilement croître sur le succinate comme source de carbone comparativement aux deux autres souches de *rhizobia* (figure 7).

En présence de glucose, la souche P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* croît mieux que la souche ATZ-025 et aussi bien que la souche M8 lorsque le glucose est utilisé comme source de carbone (figure 7). Nous avons choisi d'étudier la croissance de la souche P2 sur d'autres sources de carbone et en présence de glucose

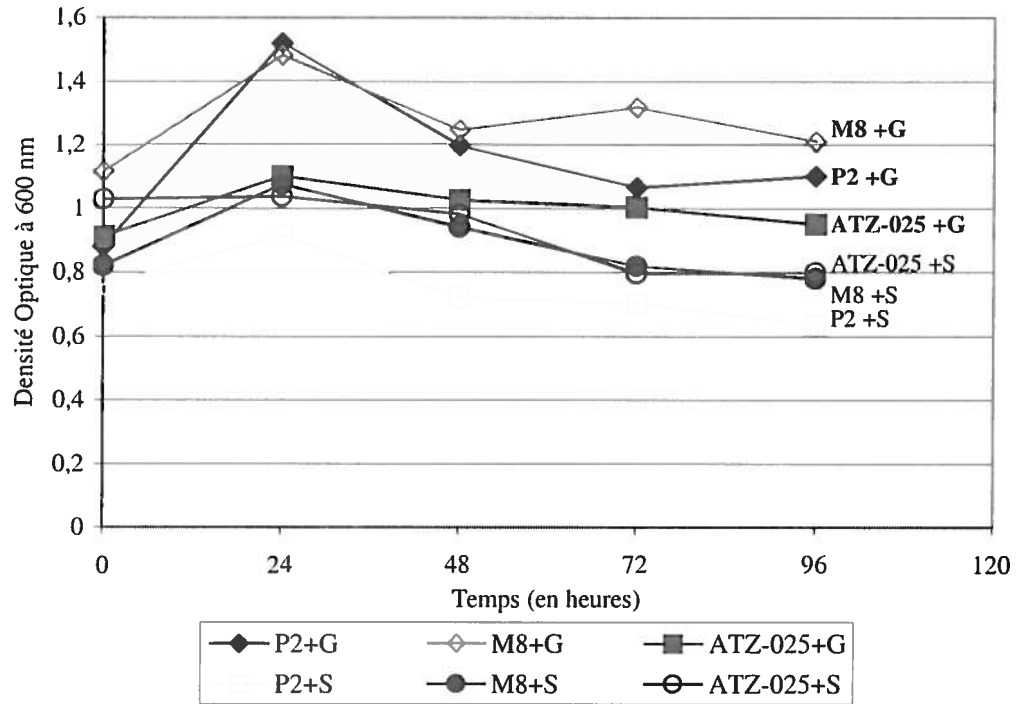


Figure 7 : Croissance de *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae P2 et *Sinorhizobium meliloti* M8 et ATZ-025 dans un milieu minimal contenant 20 ppm ( $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) d'atrazine comme unique source d'azote et 0,2 % de succinate (S) ou 0,2 % de glucose (G).

L'influence de différentes sources additionnelles de carbone comme le glutamate, le fumarate, le malate et l'acide humique, sur la dynamique de croissance chez la souche P2, a été étudiée davantage en présence de 0,1% de glucose.

Le glutamate constitue une bonne source de carbone et d'azote permettant une croissance importante de la souche P2 de *R. leguminosarum* à l'intérieur de 48 heures (figure 8). Cependant la population diminue énormément par la suite. L'ajout d'acides carboxyliques en C<sub>4</sub> ou d'acide humique à une culture contenant 0,1% de glucose permet une augmentation de la population bactérienne (figure 8). De plus, l'ajout d'une source de carbone comme les acides carboxyliques en C<sub>4</sub>, au glucose présent dans le milieu de culture, améliore l'augmentation de la biomasse de la souche P2. Cependant une nuance est observée avec le glutamate où une perte cellulaire est observée après 24 heures de culture, alors que la concentration molaire en carbone, dans ces conditions, est plus importante que celle d'un milieu de culture contenant uniquement du glucose<sup>2</sup> (figure 8). Il apparaît donc que l'ajout d'acides carboxyliques en C<sub>4</sub>, comme le malate et le fumarate, favorisent la croissance de façon comparable à une croissance en présence de glucose seul. Cet ajout permet aussi une meilleure augmentation de la population bactérienne que celle générée par le glutamate chez la souche P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* (figure 8).

---

<sup>2</sup> Dans cette expérience sur la croissance de la souche P2, la concentration molaire du glucose est de 5.55 mM, soit 2.22 mM de carbone alors que la culture contenant du glucose et du glutamate présente une concentration molaire de carbone de 2.75mM.

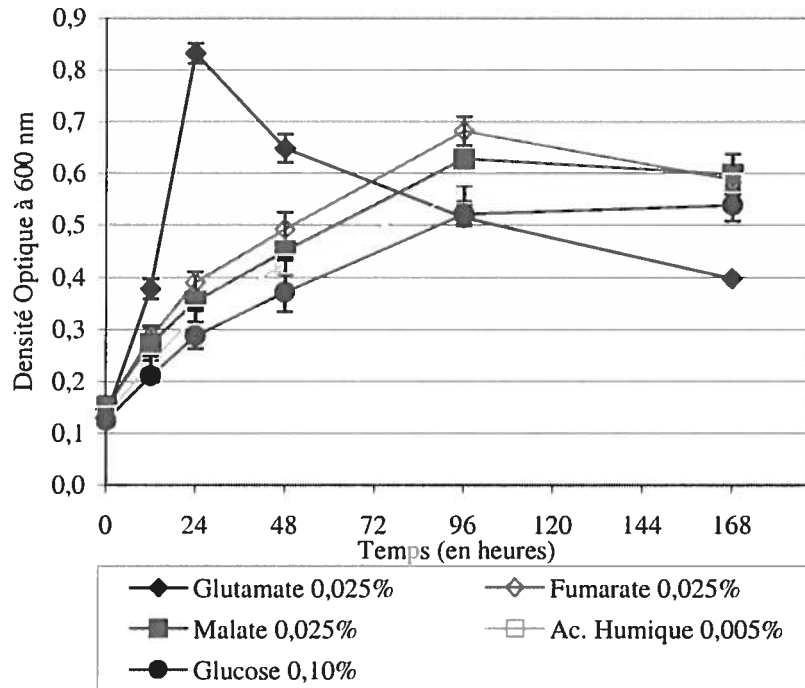


Figure 8 : Croissance de la souche P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* dans un milieu minimal contenant 20 ppm d'atrazine, 0.1% de glucose et différentes sources de carbone et d'énergie à 0.005% et 0.025% ou 0.1% de glucose seulement.

## **2. DÉGRADATION DE L'ATRAZINE PAR DIFFÉRENTES SOUCHES DE RHIZOBIA.**

### **2.1 Dégradation de l'atrazine.**

Bien qu'une croissance soit observée chez les souches P2 et M8 ou ATZ-025 lorsque ces dernières sont mises en culture en présence d'atrazine comme source d'azote et de différentes sources de carbone, la dégradation de l'atrazine mesurée par CLHP est beaucoup moins évidente (figure 9). En fait, l'aire des pics chromatographiques de l'atrazine augmente avec le temps (Figure 10). Cet artéfact peut être dû à la production d'un composé par les *rhizobia* lequel coéluerait avec l'atrazine. Cependant, après extraction à l'éther de l'atrazine, la souche P2 ne semble pas utiliser l'atrazine comme une source d'azote en présence de 0,1% de glucose et de 0,025% de malate (figure 10).

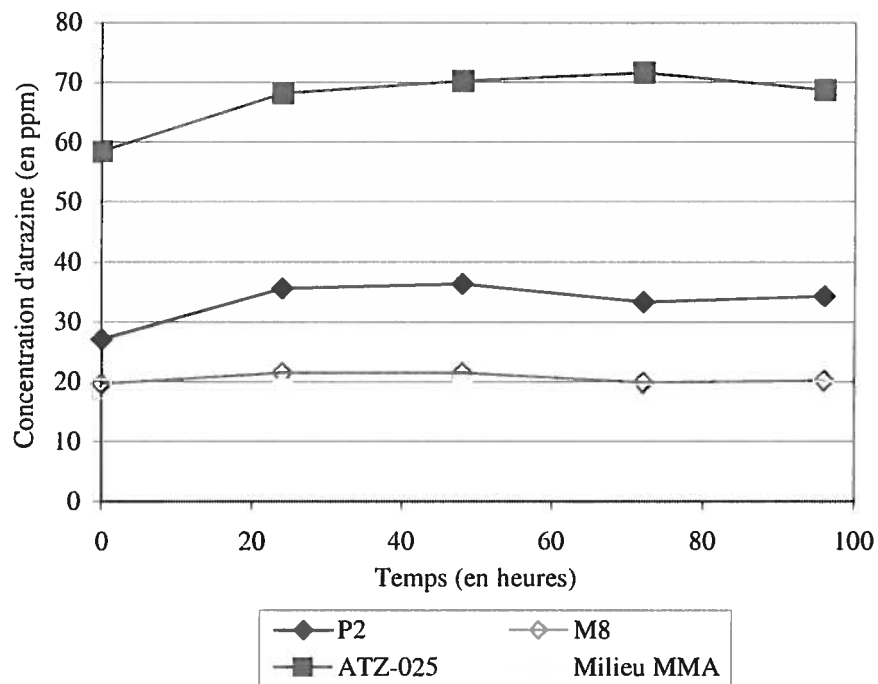


Figure 9 : Concentration d'atrazine pendant 96 heures de culture en milieu minimal atrazine (MMA) avec la souche P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *S. meliloti* M8 ou *S. meliloti* ATZ-025 en présence de 0,2% de glucose comme source de carbone et 20 ppm d'atrazine comme source d'azote.

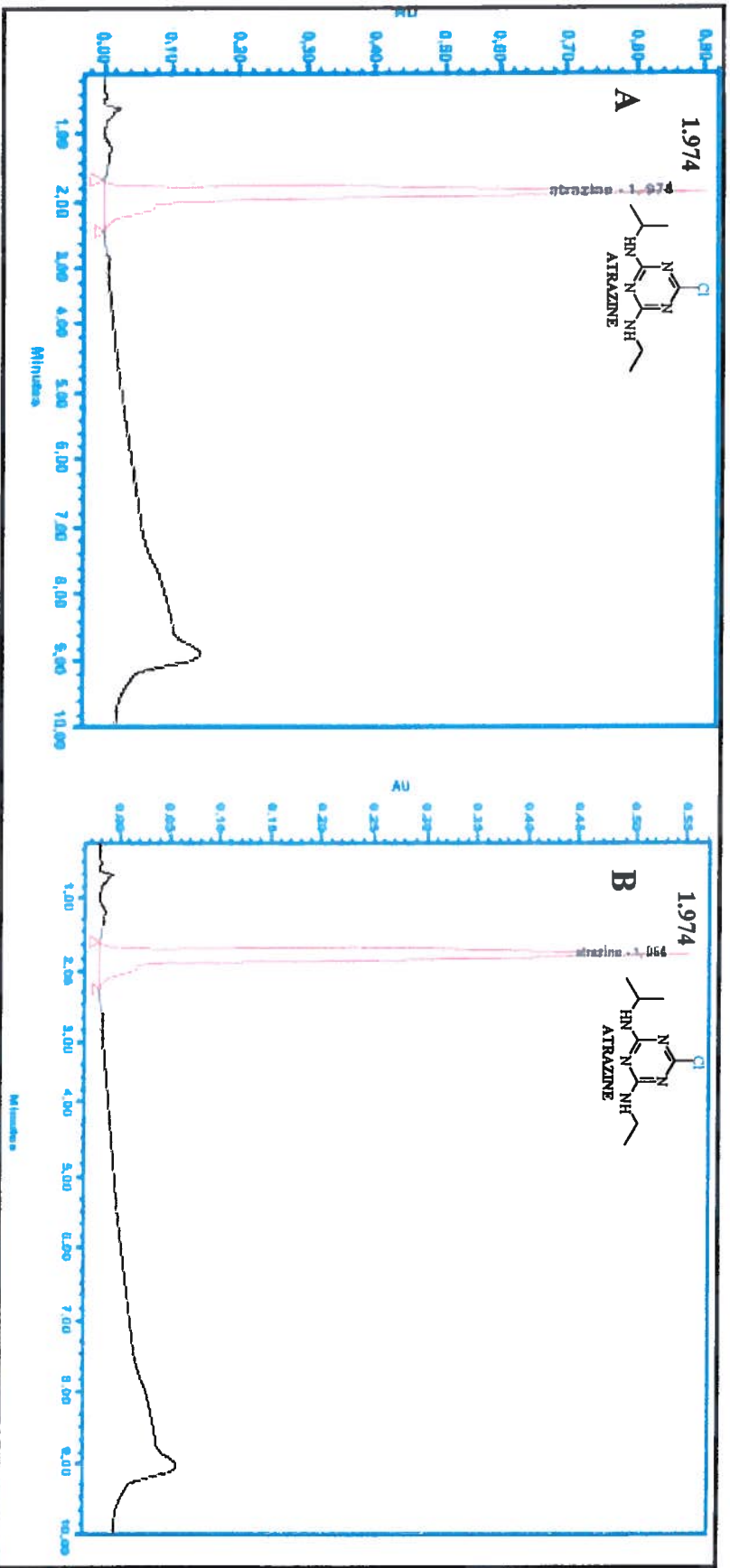


Figure 10 : (A) Identification par CLHP de l'atrazine issu du surageant d'une culture aérobie de la souche P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* après plus de 96 heures en milieu minimal atrazine (MMA) contenant 0,2% de glucose comme source de carbone et 20 ppm d'atrazine comme source d'azote. (B) L'atrazine présent après plus de 96 heures de culture dans le milieu minimal atrazine utilisé comme témoin abiotique contenant 0,2% de glucose et 20 ppm d'atrazine.

## **2.2 Présence d'exopolysaccharides (EPS).**

Lors des tests de dégradation de l'atrazine en présence de glucose, des exopolysaccharides ont été identifiés par précipitation à l'éthanol selon la méthode modifiée de van den Berg *et al.* (1995), comme étant des contaminants qui nuisaient à l'analyse de la dégradation de l'atrazine par les différentes souches de *rhizobia* (tableau VI). En effet, avant une extraction à l'éther de l'atrazine, la présence d'exopolysaccharides dans les cultures de *rhizobia* pourrait être à l'origine de différentes problématiques telles qu'une surestimation de la concentration d'atrazine (figure 9) et une occlusion des colonnes de CLHP. L'analyse au CLHP de la dégradation de l'atrazine dans un milieu minimal contenant 0,2 % de glucose comme source de carbone et 20 ppm (20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) d'atrazine comme source d'azote a révélé une augmentation de la concentration de l'atrazine dans les échantillons issus des cultures rhizobiales. Cette surestimation se traduisait par une augmentation de l'aire du pic chromatographique de l'atrazine au cours du temps alors qu'après l'extraction à l'éther, l'aire du pic de l'atrazine correspondait à environ 20 ppm d'atrazine (figure 11).

La diminution de la concentration du glucose ou le changement de la source de carbone a été envisagée afin d'éliminer la production d'EPS par les souches de *rhizobia* (tableau VI). Les souches M8 et ATZ-025 de *Rhizobium meliloti* et la souche P2 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* ont été mises en présence de 0,2 % de glucose (11 mM), de 0,2% de succinate (13 mM) ou, pour la souche P2, de 0,075% de glucose (4,2 mM) et 0,025% de succinate (1,7 mM) et 20 ppm d'atrazine (tableau VI). Il s'avère qu'une diminution de la concentration de glucose ou de succinate ne semble pas réprimer la synthèse d'EPS chez les souches de *rhizobia* (tableau VI).

D'autre part, la filtration des échantillons de surnageant de culture avant analyse et l'extraction à l'éther de l'atrazine ont constitué des techniques alternatives afin de pouvoir suivre la biodégradation de l'atrazine par les souches de *rhizobia*. La filtration, dès le début, a présenté des limites dans la récupération de l'atrazine.



Tableau VI : Milieux minimum de culture contenant différentes sources de carbone (succinate, glucose à 0,2% ou 0,025% et 0,075% respectivement) où la présence d'exopolysaccharides (EPS) a été identifiée après mise en culture de trois souches de *rhizobia* (souches M8 et ATZ-025 de *S. meliloti* et P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*).

<b>Souches de <i>rhizobia</i></b>	<i>0,2% de Glucose</i>	<i>0,2% de Succinate</i>	<i>0,075% de Glucose 0,025% de Succinate</i>
<b>M8</b>	EPS	EPS	EPS
<b>ATZ-025</b>	EPS	EPS	N.D. <sup>3</sup>
<b>P2</b>	EPS	EPS	EPS

<sup>3</sup> N.D. : non déterminé. Il n'y a pas eu de culture de la souche ATZ-025 dans un milieu minimal contenant à la fois du glucose et du succinate comme source de carbone.

Cependant, l'extraction à l'éther a été la seule technique précise et reproductible permettant d'évaluer une biodégradation de l'atrazine, tout en éliminant les EPS. Suite à l'extraction à l'éther, la quantification de l'atrazine présent dans des cultures de la souche P2 démontre une absence de dégradation de l'atrazine (figure 11).

### **2.3 Biotransformation de deux métabolites chlorés de l'atrazine par CLHP.**

La biotransformation de deux métabolites chlorés de l'atrazine a été évaluée. Ces métabolites chlorés, qui proviennent d'une déalkylation de l'atrazine par certaines bactéries (Boundy-Mills *et al.*, 1997; Shao *et al.*, 1995; Shao et Behki, 1996), à savoir le déisopropylatrazine (Amino-2-chloro-6-ethylamino-s-triazine, CIAT) et le dééthylatrazine (2-Amino-4-isopropylamino-6-chloro-s-triazine, CEAT) présentent respectivement un temps de rétention de 2,415 et 5,455 minutes (figure 12A). Un programme d'analyse au CLHP différent de celui utilisé pour le suivi de l'atrazine a été employé avec ces deux métabolites parce que ces derniers sont plus polaires que l'atrazine. Il apparaît qu'en présence de la souche P2 le déisopropylatrazine et le dééthylatrazine ne subissent pas de biotransformation dans des conditions aérobies (figure 12B). En effet, lorsque le dééthylatrazine et le déisopropylatrazine sont utilisés comme source de carbone et d'azote aucune diminution significative de leur concentration n'est observée au bout de 9 jours de culture aérobie (figure 12B).

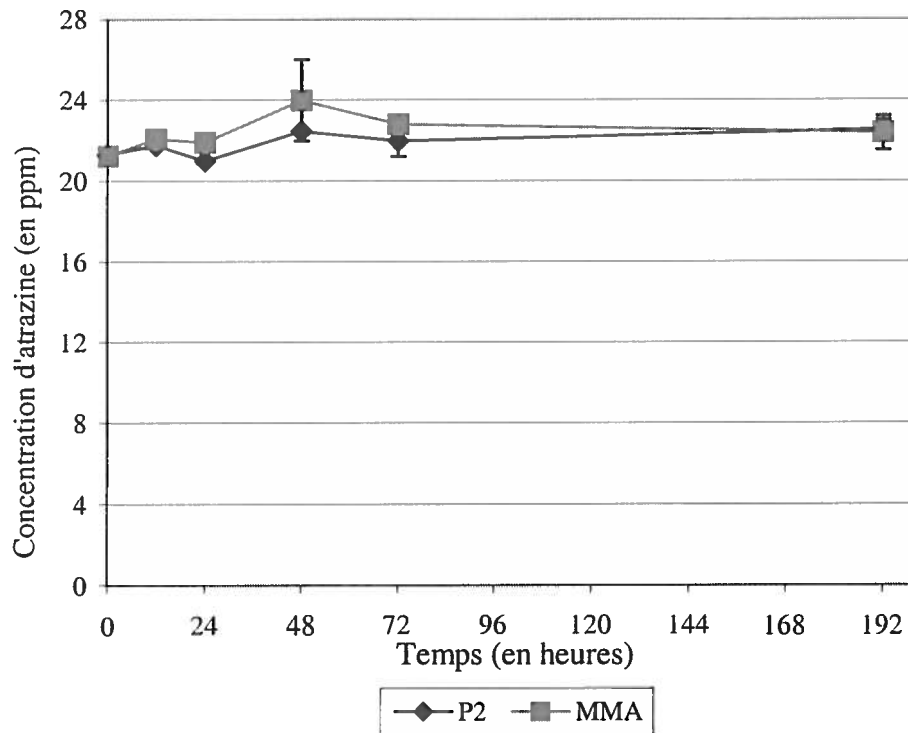


Figure 11 : Concentration d'atrazine après extraction à l'éther d'un contrôle abiotique (MMA) contenant 20 ppm d'atrazine et d'une culture de la souche P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* dans un milieu minimal contenant du malate (0,025%) et 0,1% de glucose comme source de carbone et 20 ppm d'atrazine comme unique source d'azote.

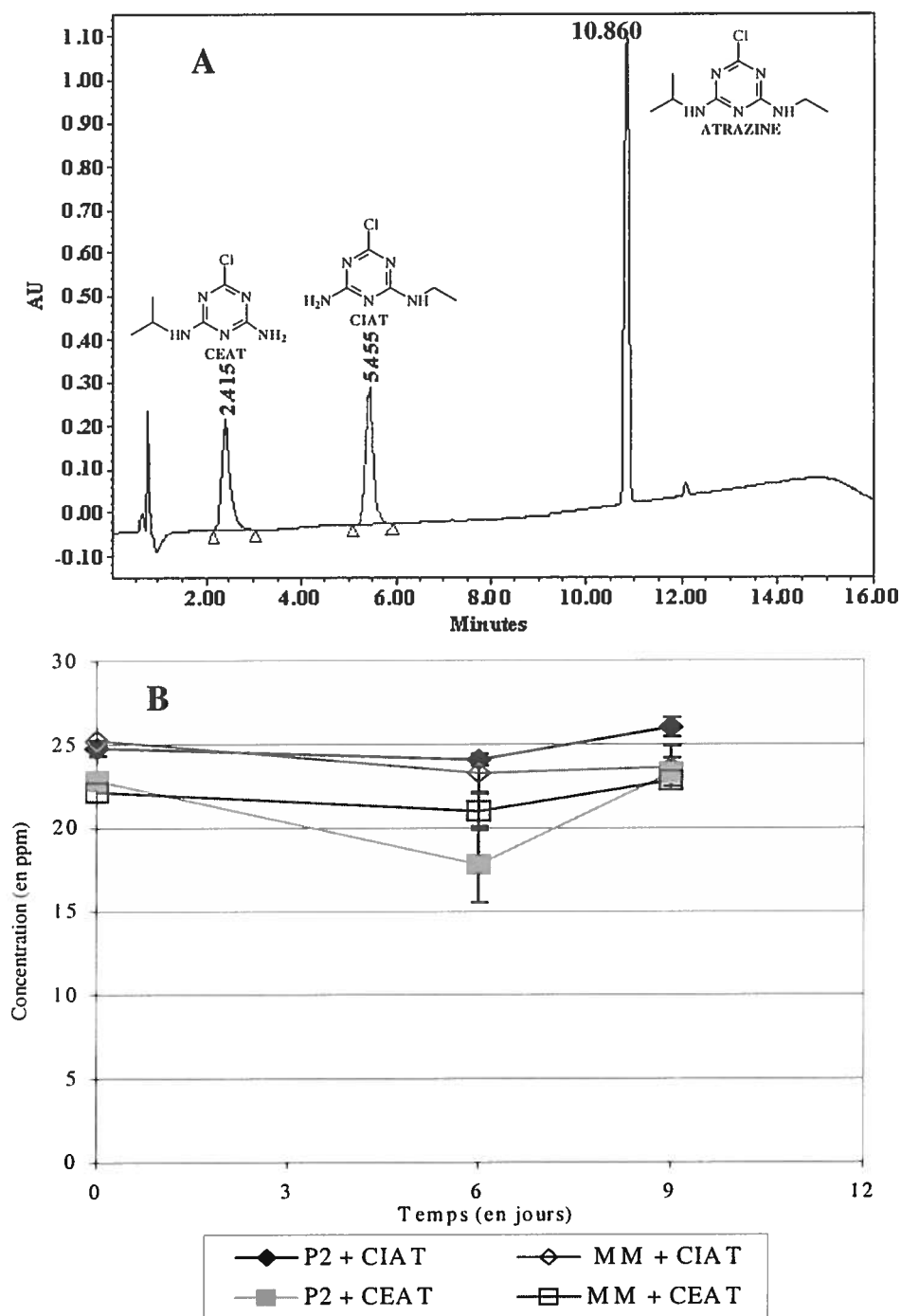


Figure 12 : (A) Chromatogramme de l'atrazine et de 2 métabolites de l'atrazine, le déisopropylatrazine (CIAT) et le dééthylatrazine (CEAT) montrant leur temps de rétention dans le cadre de l'analyse de leur dégradation. (B) Analyse de la dégradation du CIAT et du CEAT par la souche P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* dans un milieu minimal dont les sources de carbone et d'azote ont été le CIAT (25 ppm) ou le CEAT (22,5 ppm).

#### **2.4 Minéralisation de l'atrazine par la souche P2.**

Suite à plusieurs efforts de suivre la dégradation de l'atrazine par CLHP, seule l'extraction à l'éther a permis une évaluation reproductible et précise de la concentration de l'atrazine.

Une autre approche permettant d'évaluer la capacité de certaines souches de *rhizobia* de dégrader l'atrazine, a été la mesure de la production de CO<sub>2</sub> radioactif (<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>) au cours de la minéralisation de l'atrazine. La souche P2 a été mise en culture dans un milieu minimal contenant 100 ppm d'atrazine comme source de carbone et d'azote en suivant le méthode décrite par Struthers *et al.* (1998) pour *Agrobacterium radiobacter* J14a.

Au bout de 72 heures de culture, 2,2 % à 2,9% de la radioactivité totale de l'atrazine est transformée en <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> (figure 13). Cette minéralisation s'accompagne d'une croissance de la souche P2 (figure 13). D'autre part, la minéralisation de l'atrazine apparaît plus efficace dans des conditions de micro-aérobie que dans des conditions d'aérobie (figure 13). La présence de CO<sub>2</sub> radioactif indique que l'atrazine est métabolisé par la souche P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* jusqu'à sa minéralisation (figure 13). La minéralisation de l'atrazine par la souche P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* met en évidence la présence d'une voie métabolique de l'atrazine chez les *rhizobia* qui mène à la production de CO<sub>2</sub> aussi bien dans des conditions d'aérobie que de micro-aérobie (figure 13).

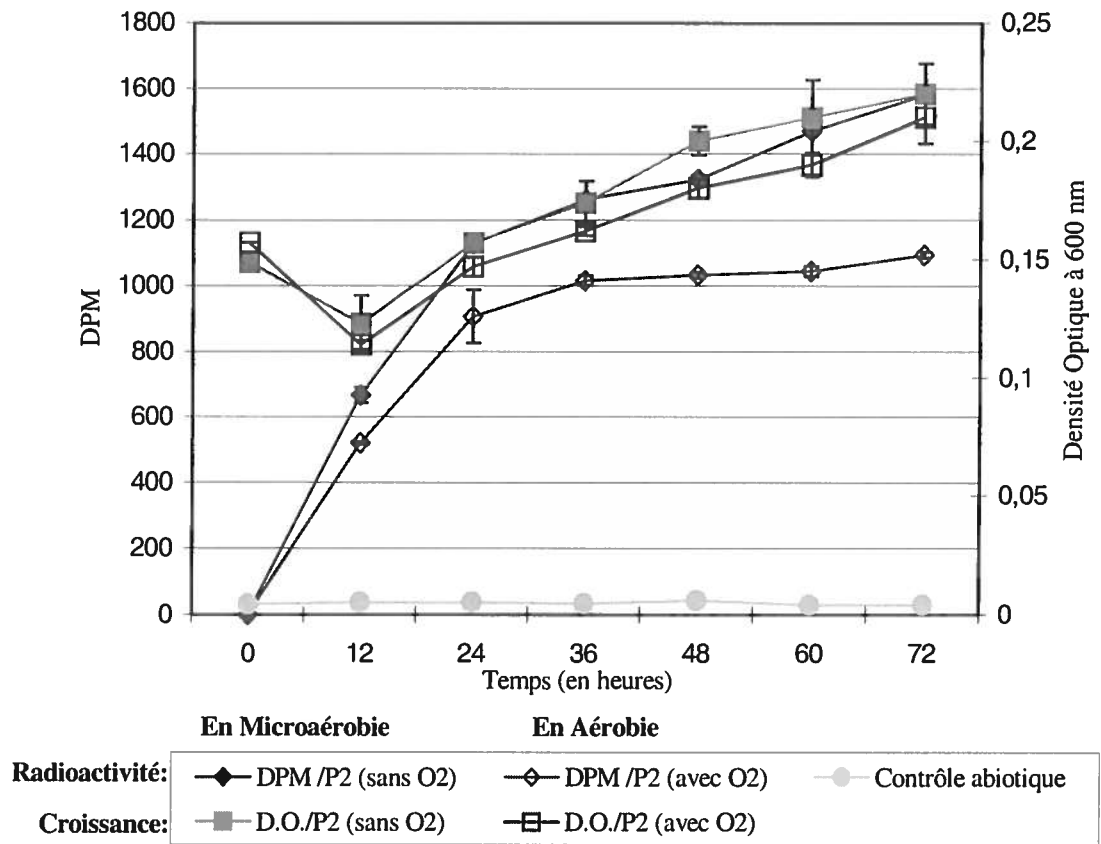


Figure 13 : Minéralisation de l'atrazine-<sup>14</sup>C par *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* P2 et croissance de cette souche dans des conditions de micro-aérobie et d'aérobie dans des bouteilles sérologiques et dans un milieu minimal de culture contenant 100 ppm d'atrazine comme source de carbone et d'azote.

L'évidence de la minéralisation de l'atrazine dans les cultures soulèvent la nécessité d'évaluer le potentiel génétique de biotransformation de l'atrazine chez certaines de nos souches de *rhizobia*. En effet, la minéralisation de l'atrazine par la souche P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* et l'absence de transformation des deux métabolites chlorés par cette souche suggèrent la présence d'une voie métabolique complète qui pourrait être comparable à la voie métabolique de certaines souches de *Rhodococcus* utilisant des monooxygénases ou à celle plus étudiée de *Pseudomonas* ADP qui est codée par les gènes *atzA*, *atzB* et *atzC* et qui débute par une étape de déchloration. La présence de ces gènes pourrait aussi se retrouver chez certaines souches de *rhizobia*, ce qui a été évalué dans les étapes suivantes de cette étude.

### **3. DÉTECTION PAR PCR D'HOMOLOGUES AUX GÈNES *atzA atzB ET atzC* DE *PSEUDOMONAS* ADP CHEZ LA SOUCHE P2 DE *R. LEGUMINOSARUM* BV. *VICEAE* ET CHEZ LES SOUCHES ATZ-025 ET M8 DE *S. MELILOTI*.**

Différentes souches de *rhizobia* utilisées dans cette étude ont été isolées de nodules de légumineuses mises en culture dans des sols contaminés par l'atrazine (Labidi *et al.*, 1999, Mehmannaavaz *et al.*, 2001). L'ADN génomique total de certaines de ces souches telles que la souche P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* a été isolé et étudié afin d'identifier des gènes homologues aux gènes *atzA*, *atzB* et *atzC* de *Pseudomonas* ADP. De même, l'ADN total des souches ATZ-025 et M8 de *S. meliloti* et l'ADN plasmidique a été isolé et la technique de PCR a été utilisée afin d'amplifier les séquences internes des gènes *atzA*, *atzB* et *atzC* qui seraient potentiellement présentes soit au niveau de l'ADN génomique soit au niveau de l'ADN plasmidique.

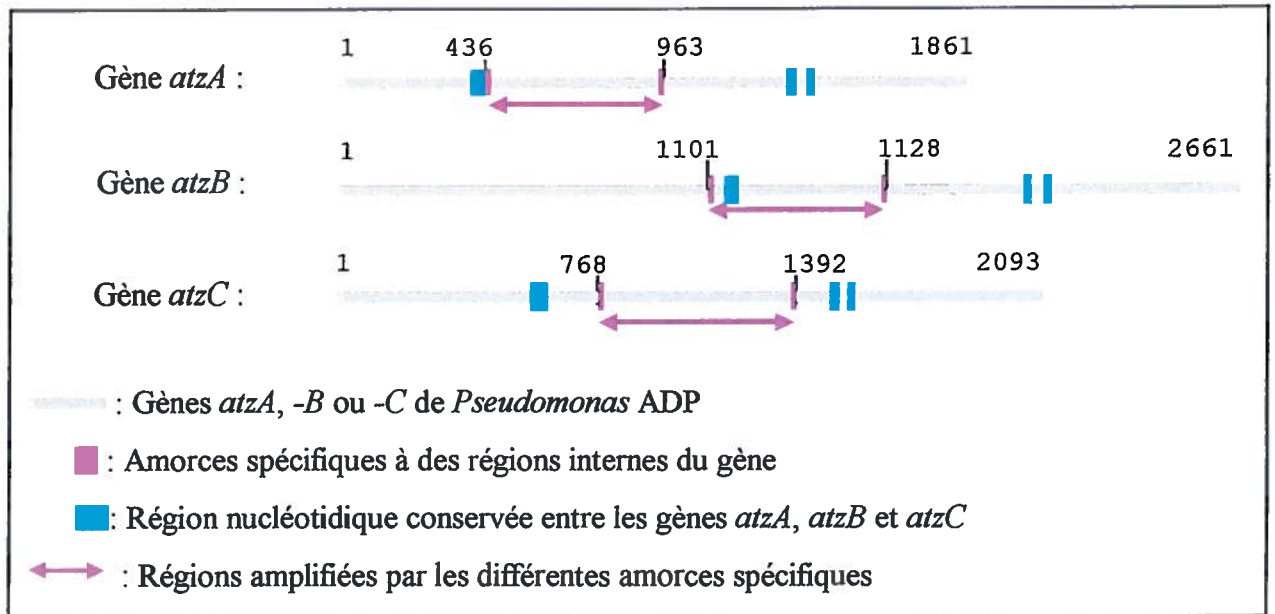


Figure 14 : Identification et localisation des amorces spécifiques aux gènes *atzA*, *atzB* et *atzC* utilisées au cours de cette étude et des régions nucléotidiques codant dans des séquences peptidiques conservées chez les protéines AtzA, AtzB et AtzC de *Pseudomonas* ADP.



### **3.1 Amorces spécifiques utilisées pour les PCR sur l'ADN total des souches P2, ATZ-25 et M8.**

Les amplifications par PCR au niveau de l'ADN total des souches de *rhizobia* ont été effectuées afin d'identifier la présence des gènes *atzA*, *atzB* et *atzC* de *Pseudomonas* ADP chez ces souches. En utilisant des amorces spécifiques à ces gènes, comme le décrit De Souza *et al.* (1998a et 1998b), il a été possible de déterminer la présence d'un de ces gènes chez différentes souches de *rhizobia*. Les amorces utilisées ont été construites afin d'être spécifiques à des régions internes des gènes *atzA* (5'-CCATGTGAACCAGATCCT-3' et 5'-TGAAGCGTCCACATTACC-3'), *atzB* (5'-GTTGAGGTGGTGAAGT-3' et 5'-AGACTCGACGAAGGTT-3') et *atzC* (5'-GCTCACATGCAGGTACTION-3' et 5'-GTACCATATCACCGTTTGCCA-3') (De Souza *et al.*, 1998a) (figure 14).

Ces amorces qui ont un pourcentage en G + C entre 50 et 70 % se rapprochant du contenu en G + C de *R. leguminosarum* (60 %) et *S. meliloti* (62 %), ont été utilisées dans des conditions rigoureuses d'hybridation pendant les PCR.

### **3.2 Amplification par PCR du gène *atzA* chez différentes souches de *rhizobia*.**

Il existe une région hautement conservée du gène *atzA* d'environ 500 pb qui se retrouve chez plusieurs bactéries qui dégradent l'atrazine par une réaction hydrolytique (De Souza *et al.*, 1998b). Cette région est amplifiée par les amorces spécifiques au gène *atzA* mentionnées précédemment, couvrant les régions 436 à 963, et permet d'identifier ainsi des bactéries potentiellement capables de biotransformer l'atrazine. Cependant, chez les souches ATZ-025 et M8 de *S. meliloti* aucune amplification de 0,5 kpb n'a été observée à partir de produits de PCR utilisant ces amorces et mis sur un gel d'agarose de 0,75%, contrairement au plasmide pMD4, porteur du gène *atzA* et à l'ADN total de *Pseudomonas* ADP, qui constituaient les témoins positifs (figure 15). Par contre, une amplification de 2,3 kpb est observée chez la souche P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* (figure 15).

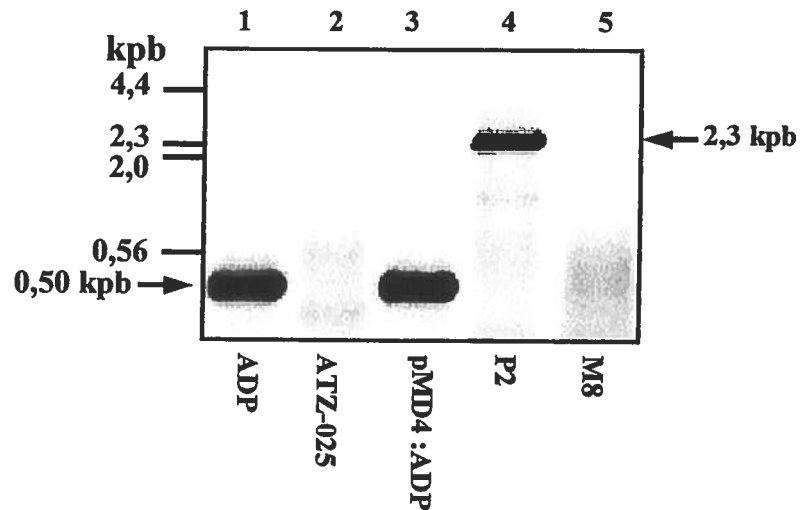


Figure 15 : Analyses par PCR à l'aide d'amorces construites afin d'amplifier la région interne du gène *atzA*. Les ADN étudiés sont ceux de *Pseudomonas* ADP (puits 1), de la souche ATZ-025 de *S. meliloti* (puits 2), du plasmide pMD4 (puits 3), de la souche P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* (puits 4) et de la souche M8 de *S. meliloti* (puits 5). Les valeurs à gauche du gel constituent les valeurs du marqueur moléculaire  $\lambda$ /HindIII (en kilopaires de bases, kpb).

### **3.3 Amplification par PCR du gène *atzB* chez les souches P2, ATZ-025 et M8.**

L'ADN génomique total de trois souches, à savoir *Sinorhizobium meliloti* ATZ-025, *Sinorhizobium meliloti* M8 et *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* P2 a été amplifié à l'aide des amorces couvrant les régions nucléotidiques 1101 à 1628 du gène *atzB* de *Pseudomonas* ADP (De Souza *et al.*, 1998a). Ces amorces permettent d'amplifier une région du gène *atzB* conservée au sein de bactéries dégradant l'atrazine, au sein d'autres amidohydrolases et à l'intérieur des gènes *atzA*, *atzB* et *atzC* de *Pseudomonas* ADP (De Souza *et al.*, 1998b; Sadowsky *et al.*, 1998).

Un fragment amplifié de 0,5 kb a été observé, après la mise sur gel d'agarose de 1%, chez toutes les souches (figure 16). La taille du fragment amplifié correspond à la taille attendue de 0,522 kb du produit d'amplification obtenu à l'aide des deux amorces du gène *atzB*. La présence d'une seconde bande a été observée pour l'ADN total de M8 et ATZ-025.

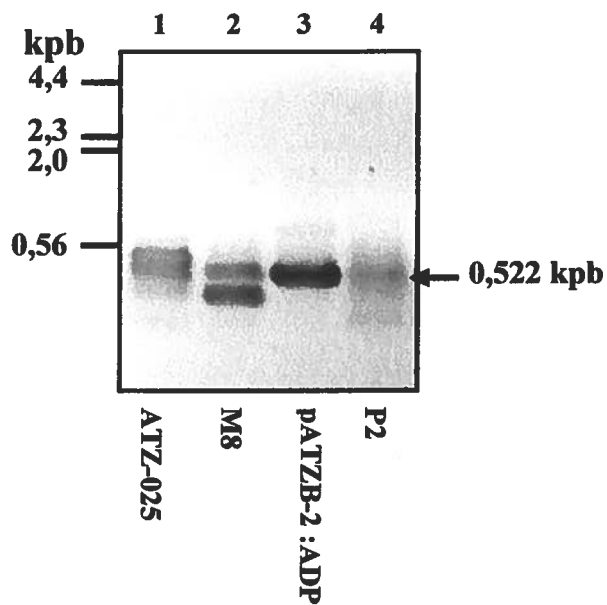


Figure 16 : Analyses de PCR effectué avec des amorces construites afin d'amplifier des régions interne du gène *atzB* de *Pseudomonas* ADP présent sur le plasmide pATZB-2:ADP (puits 3). L'ADN génomique des souches suivantes, présentant un potentiel de dégradation de l'atrazine, a été analysé : *Sinorhizobium meliloti* ATZ-025 (puits 1), *Sinorhizobium meliloti* M8 (puits 2), *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* P2 (puits 4). Les valeurs à gauche du gel de 1% d'agarose sont en kilopaires de bases (Kpb) et représentent le marqueur de poids moléculaire  $\lambda$ /HindIII.

Au cours de l'étude de la biotransformation de l'atrazine par certaines souches de *rhizobia*, le phénotype de minéralisation de l'atrazine s'est avéré instable chez les souches ATZ-025, M8 et P2 si bien que l'étude génétique de la biotransformation de l'atrazine s'est poursuivie sur une seule souche, à savoir la souche P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*.

#### **3.4 2<sup>e</sup> PCR à l'aide des amorces spécifiques pour le gène *atzB* sur un produit de PCR de l'ADN total de la souche P2.**

Une réamplification du produit de PCR de l'ADN génomique total de la souche P2 de *Rhizobium leguminosarum* a été effectuée en diminuant la concentration des amorces. Une concentration de 2  $\mu$ M et 2,2  $\mu$ M respectivement pour les amorces R et L a été utilisée au lieu de 3,7  $\mu$ M, ce qui a diminué les hybridations non spécifiques (figure 17). Le produit de PCR de 522 pb (figure 16) a servi de matrice ou d'échantillon d'ADN pour un deuxième PCR qui s'est effectué dans les mêmes conditions que le PCR de la figure 16. Ce 2<sup>e</sup> PCR a donné une meilleure amplification, avec 2,8  $\mu$ g d'ADN pour le fragment amplifié de 0,5 kb chez P2 (figure 17). Ce fragment a la même taille que le produit de PCR obtenu du plasmide pATZB-2:ADP qui constituait un témoin d'amplification positive (figure 17).

Le produit obtenu dans ce 2<sup>e</sup> PCR pour la souche P2 de *R. leguminosarum* a été séquencé afin d'évaluer si ce fragment présentait une homologie de séquence avec le gène *atzB* de *Pseudomonas* ADP (Boundy-Mills *et al.*, 1997).

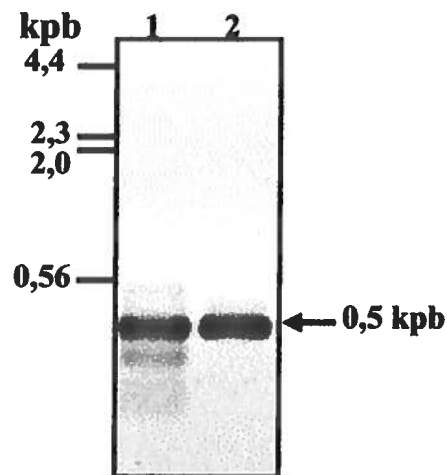


Figure 17 : Analyses de PCR effectuées avec des amorces construites afin d'amplifier des régions internes du gène *atzB* de *Pseudomonas* ADP présent sur un produit de PCR de 500 paires de bases du plasmide pATZB-2 :ADP (puits 2). L'ADN amplifié de la souche P2 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, présentant un potentiel de dégradation de l'atrazine, a été réamplifié par un 2<sup>e</sup> PCR (puits 1). Un fragment de 0,5 kpb a été observé pour les deux produits de PCR lorsque les amplifications ont été mises sur un gel d'agarose de 0,75%. Les valeurs à gauche du gel constituent les valeurs du marqueur moléculaire  $\lambda$ /HindIII (en kilopaires de bases, kpb).

#### **4. DÉTECTION D'HOMOLOGUES AVEC LE GÈNE *atzB* DE *PSEUDOMONAS ADP* AU NIVEAU DE L'ADN TOTAL DE LA SOUCHE P2 PAR « SEMI-NESTED PCR » UTILISANT DES AMORCES DÉGÉNÉRÉES ET HYBRIDATION SOUTHERN.**

Bien qu'il y ait eu une amplification par PCR du gène *atzB* et que l'amplicon corresponde à la bonne taille (figure 17), une amplification par « nested PCR » a été effectuée afin de confirmer ce résultat. L'ADN total de la souche P2 a été utilisé afin d'effectuer le criblage du gène *atzB* de *Pseudomonas ADP* par « semi-nested PCR » en utilisant des amorces dégénérées spécifiques aux trois gènes cibles et des amorces non dégénérées spécifiques au gène *atzB*. En utilisant le « semi-nested PCR », il a été possible d'augmenter la sensibilité des amplifications de fragments chez la souche P2.

Dans un « semi-nested PCR », les produits d'amplifications d'un PCR primaire qui sont obtenus avec des amorces externes, ici des amorces dégénérées, servent d'échantillons d'ADN pour une autre étape de PCR dans lequel une amorce dite interne est utilisée en présence d'une des amorces dites externes, afin de s'hybrider avec des séquences à l'intérieur du produit d'ADN (Lee *et al.*, 1999). Au cours de ce « semi-nested PCR », la seconde étape de PCR a utilisé une amorce dite externe, l'une des amorces dégénérées, et une amorce dite interne c'est-à-dire une amorce standard spécifique au gène *atzB*.

##### **4.1 Conception des amorces dégénérées pour les gènes *atzA*, *atzB* et *atzC*.**

Les amorces dégénérées utilisées au cours de cette étude sont les amorces ATZB :ADP :2109R et ATZB :ADP :1122L. Ces amorces couvrent 1010 paires de bases (pb) chez le gène *atzA*, couvrent 1001 bp chez le gène *atzB* et couvrent 953 bp chez le gène *atzC*. Un PCR effectué en présence de 0,5  $\mu$ M et de 3,6  $\mu$ M d'amorces dégénérées (ATZB :ADP :2109R et ATZB :ADP :1122L) construites en fonction des régions conservées et homologues des trois gènes *atzA*, *atzB* et *atzC* et en fonction des codons d'usages chez *R. leguminosarum* bv. *viciae* a mis en évidence l'amplification de trois bandes de 1,0, 1,3 et 1,6 kpb chez la souche P2 (figure 18).

Lors de ce PCR, l'ADN total de la souche P2 a subi une amplification de 35 cycles au cours desquels cinq cycles ont été effectués avec une température d'hybridation de 37°C

pendant une minute par cycle, suivi de 30 cycles avec une température d'hybridation de 55°C durant une minute par cycle. Ces amorces ont amplifié au niveau de l'ADN total de P2 plusieurs amplicons donnant lieu à la possibilité de la présence de gènes homologues aux gènes *atzA*, *atzB* et *atzC* (figure 18).



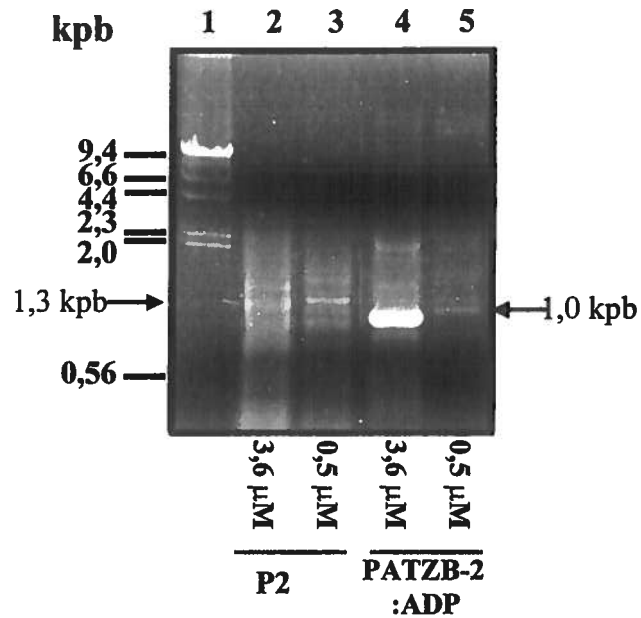


Figure 18 : Analyses par PCR à l'aide d'amorces dégénérées construites afin d'amplifier des régions internes conservées entre les gènes *atzA*, *atzB* ou *atzC*. L'ADN étudié est l'ADN total de la souche P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* (puits 2 et 3), et du plasmide pATZB-2 :ADP (puits 4 et 5) en présence de 0,5 μM ou 3,6 μM d'amorces dégénérées. Le marqueur moléculaire utilisé dans ce gel de 1% d'agarose est λ/HindIII (puits 1).

#### **4.2 «Semi-Nested PCR».**

Les bandes à 1 et 1,3 kpb, qui constituent des produits de PCR (figure 18, puits 3), ont été prélevées et purifiées afin d'effectuer un «semi-nested PCR» à l'aide de l'amorce non dégénérée (R) du gène *atzB* (couvrant la région 1611 à 1628 du gène *atzB* et dont la séquence est : 5'-GAAACCTTCGTCGAGTCT-3') et de l'amorce dégénérée (ATZB :ADP :1122L, section matériel et méthodes) (figure 18). En utilisant ces deux amorces, le produit d'amplification attendu de ce «semi-nested PCR» est un fragment nucléotidique d'environ 506 paires de bases.

Il apparaît que le «semi-nested PCR» a permis l'amplification de quatre bandes de 0,25 à 1 kpb (figure 19A, puits 2), lorsque le fragment amplifié de 1 kpb est utilisé comme échantillon d'ADN et de trois bandes de 0,25 à 1,1 kpb (figure 19A, puits 3) lorsque le fragment amplifié de 1,3 kpb est utilisé (figure 18). Une bande de 500 pb est obtenue pour tous les fragments amplifiés d'ADN (figure 19A).

#### **4.3 Hybridation Southern à l'aide d'une sonde spécifique au gène *atzB*.**

Des analyses par hybridation Southern ont été effectuées sur les produits d'amplification obtenus par «semi-nested PCR», afin d'évaluer la présence, chez la souche P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, de régions homologues au gène *atzB* et afin de confirmer si le fragment de 500 bp est bien le fragment attendu. Un fragment *Ava*I de 2,0 kpb du gène *atzB* présent sur le plasmide pATZB-2 (De Souza *et al.*, 1998b) a été utilisé comme sonde. Ce fragment couvre la majorité du gène *atzB* (Boundy-Mills *et al.*, 1997; Topp *et al.*, 2000) et a été marqué à la digoxygénine.

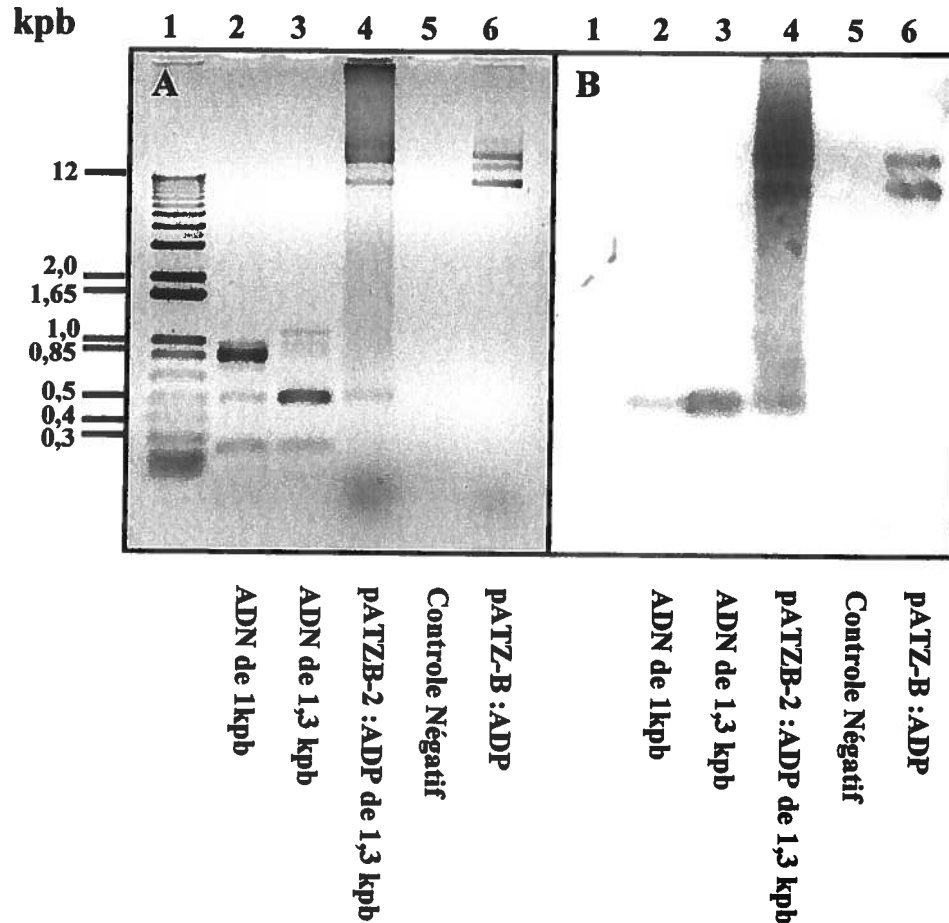


Figure 19 : (A) Amplification de fragments d'ADN par semi-Nested PCR à l'aide d'une amorce non-dégénérée (R) spécifique au gène *atzB* et d'une amorce dégénérée (ATZB :ADP :1122L) sur un gel d'agarose à 0,9 %. L'amplification s'est faite à partir d'un fragment d'ADN de 1 kb (puits 2) et d'un fragment d'ADN de 1,3 kb (puits 3) amplifié chez la souche P2. Le puits 4 correspond à l'amplification effectuée sur le plasmide pATZB-2 :ADP (témoin positif du semi-nested PCR) et le puits 6 contient le plasmide pATZB-2 :ADP. Le puits 1 présente le marqueur moléculaire « 1 kb ladder ». (B) Hybridation Southern des produits d'amplification du semi-nested PCR sur membrane de nylon à l'aide d'une sonde *atzB/AvaI* de 2 kpb marquée à la digoxygénine spécifique au gène *atzB* de *Pseudomonas ADP*.

Après un transfert sur membrane de nylon des fragments d'ADN amplifiés par semi-nested PCR, une hybridation Southern à l'aide de la sonde *atzB/AvaI* marquée à la digoxygénine a été effectuée. La sonde *atzB/AvaI* spécifique au gène *atzB* s'est hybridée au fragment de 0,5 kpb (figure 19B, puits 2 et 3). Ce fragment de 0,5 kpb a été amplifié à partir des fragments de 1 et 1,3 kpb obtenus au cours du premier PCR (figure 18, puits 3). L'hybridation confirme que la souche P2 contient de l'ADN homologue au gène *atzB*, d'autant plus qu'un fragment de la même taille (0,5 kpb) obtenu à partir de l'amplification du plasmide pATZB-2 :ADP hybride aussi avec la sonde (figure 19B, puits 4). Le plasmide pATZB-2 porteur du gène *atzB* hybride aussi avec la sonde (figure 19B, puits 5). Cette hybridation effectuée à 68°C a permis l'identification d'un fragment d'ADN homologue au gène *atzB* chez la souche P2. Ce gène, cependant, serait présent soit sur le chromosome ou sur un des plasmides satellites (figure 23) de la souche P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*.

##### **5. ANALYSES DE SÉQUENCE D'ADN D'UN HOMOLOGUE AU GÈNE *atzB* CHEZ LA SOUCHE P2 DE *R. LEGUMINOSARUM* BV. *VICIAE*.**

Le produit d'amplification de 0,5 kb obtenu par un 2<sup>e</sup> PCR pour la souche P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* a été séquencé afin d'évaluer le pourcentage d'homologie de séquence avec la séquence connue du gène *atzB* de *Pseudomonas* ADP (Boundy-Mills *et al.*, 1997). La séquence amplifiée du plasmide pATZB-2 :ADP correspondant à une région interne conservée du gène *atzB* a constitué le témoin positif pour le 2<sup>e</sup> PCR et ce produit d'amplification a aussi été séquencé. Ce second PCR a utilisé les mêmes amorces pour une région interne de 522 pb du gène *atzB*.

L'ADN de la souche P2 a subi une amplification par PCR de 35 cycles au cours desquels cinq cycles ont été effectués avec une température d'hybridation de 63°C pendant une minute par cycle, suivi de 30 cycles avec une température d'hybridation de 55°C durant une minute par cycle. Après purification de la bande d'intérêt du gel de 0,75% d'agarose, l'ADN amplifié a été séquencé d'un côté. Le fragment d'ADN analysé chez la souche P2 présente une séquence partielle de 449 paires de bases ayant 98,2 % d'homologie avec

une région interne hautement conservée du gène *atzB* (figures 20 et 21). Cette homologie de séquence est comparable aux résultats obtenus par de Souza *et al.* (1998b) avec *Agrobacterium* J14a, *Alcaligenes* SG1 et *Ralstonia* M91-3. La souche P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* contiendrait donc comme ces souches le gène *atzB* impliqué dans la deuxième étape de biodégradation de l'atrazine où l'hydroxyatrazine est transformé en N-isopropylammelide.

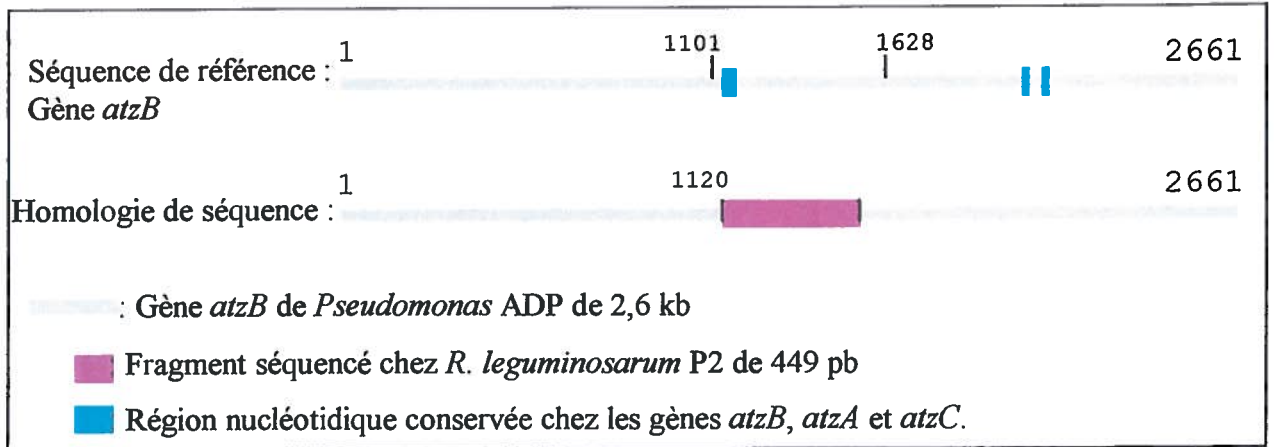


Figure 20 : Alignement du fragment d'ADN amplifié et partiellement séquencé chez la souche P2 de *R. leguminosarum* et du gène *atzB* de *Pseudomonas* ADP et emplacement de ce fragment de 449 paires de bases par rapport au gène *atzB* de 2 661 paires de bases. Le fragment d'ADN de P2 contient une région conservée (nucléotides 1120 à 1163).

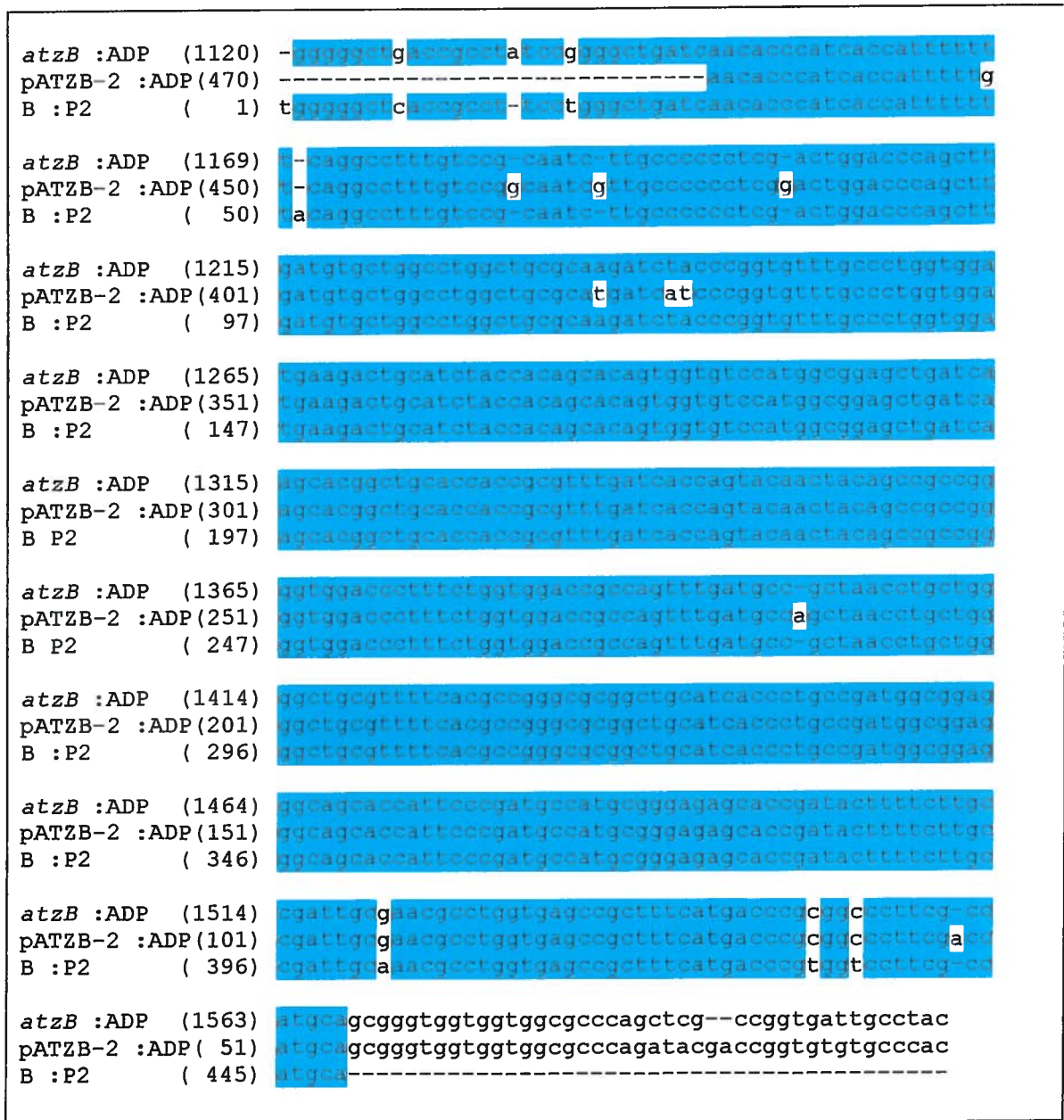


Figure 21 : Aligement de séquences du fragment amplifié et partiellement séquencé de la souche P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* avec le gène *atzB* de *Pseudomonas* ADP et une région amplifiée du gène *atzB* présent sur le plasmide pATZB-2 :ADP.

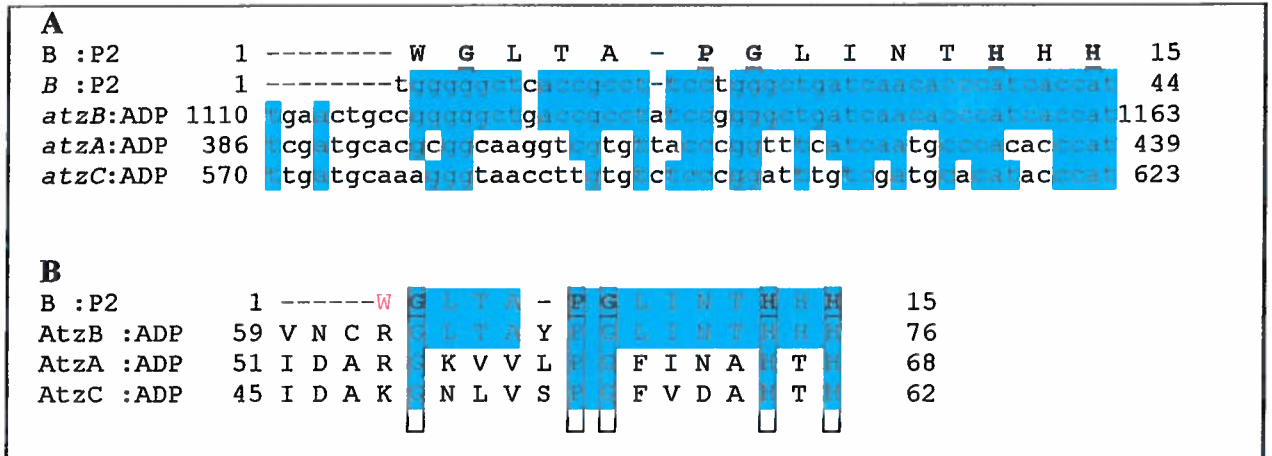


Figure 22: Alignement de séquences nucléotidiques des gènes *atzA*, *atzB* et *atzC* et de l'ADN amplifié de P2 pour le gène *atzB* (A) et alignement des séquences d'acides aminés N-terminales déduites (B) de AtzA (atrazine chlorohydrolase), AtzB (hydroxyatrazine ethylaminohydrolase), AtzC (N-isopropylammelide isopropylaminohydrolase) de *Pseudomonas* ADP et de la séquence d'acides aminés projetée obtenue à partir d'une région nucléotidique amplifiée par PCR chez la souche P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Les acides aminés et les séquences nucléotidiques ont été numérotés selon la région N-terminale de chaque protéine et selon la séquence des gènes rapportés dans GenBank et dans Sadowsky *et al.* (1998). Les acides aminés en gras et soulignés sont les acides aminés conservés chez les trois hydrolases de *Pseudomonas* ADP impliquées dans la dégradation de l'atrazine.



L'alignement de séquences entre le gène *atzB* de *Pseudomonas ADP* et une partie du fragment d'ADN de 522 pb amplifié de la souche P2 montre une homologie de séquence dans la région 1120 à 1567 du gène *atzB* de *Pseudomonas ADP* (figure 20). Cette région pour laquelle l'ADN amplifié de la souche P2 est homologue, contient une séquence nucléotidique codant pour des acides aminés qui sont relativement bien conservée chez les trois hydrolases (AtzA, AtzB et AtzC) impliquées dans la biodégradation de l'atrazine par *Pseudomonas ADP* (Sadowsky *et al.*, 1998) (figure 22B). Ces acides aminés conservés dans la région N-terminale H-X-H des amidohydrolases contiendraient des résidus histidines métallo dépendant de coordination caractéristiques de la famille de ces enzymes (Sadowsky *et al.*, 1998) (figure 22).

Il apparaît aussi que la séquence protéique projetée du fragment d'ADN amplifié chez la souche P2 contient, dans la région conservée des hydrolases de *P. ADP*, le même motif d'acides aminés conservés que ces dernières (figure 22).

D'autre part, l'alignement des séquences d'acides aminés N-terminales avec la séquence d'acides aminés projetée de P2 s'effectue dans une région conservée des hydrolases AtzA, AtzB et AtzC de *Pseudomonas ADP* (figure 22). Cette région conservée présente cinq acides aminés conservés qui se retrouvent dans les quatre séquences étudiées (figure 22B). Bien que certains codons de la région conservée soient différents chez la souche P2 de *R. leguminosarum*, les acides aminés conservés présents chez les enzymes AtzA, AtzB et AtzC se retrouvent aussi dans la séquence peptidique déduite de P2 (figure 22). Le patron peptidique ainsi obtenu présente la structure H-X-H rencontrée dans les régions métallo-dépendantes des amidohydrolases (Sadowsky *et al.*, 1998).

L'amplification, l'hybridation et le séquençage d'une région conservée de 449 pb du gène *atzB* chez la souche P2 et son pourcentage d'homologie de 98,2% avec une région du gène *atzB* révèlent la présence d'un gène *atzB* homologue chez P2 (figure 21). Cependant, la localisation génomique d'un gène homologue à *atzB* n'est pas encore précise. Chez les *rhizobia*, les éléments génomiques sont composés de l'ADN chromosomique et d'éléments de répllication extra-chromosomiques, les mégaplasmides et les plasmides dont la taille peut varier de 150 kpb à 1700 kpb (Capela *et al.*, 1999; Brom *et al.*, 1992). L'isolement des plasmides de la souche P2 par la méthode Eckardt a

permis, au niveau plasmidique, d'évaluer la présence d'homologues au gène *atzB* (Eckhardt 1978).

## **6. DÉTECTION D'HOMOLOGUES AVEC LES GÈNES *atzA*, *atzB* ET *atzC* DE *PSEUDOMONAS* ADP AU NIVEAU PLASMIDIQUE CHEZ LA SOUCHE P2 PAR PCR ET PAR HYBRIDATION SOUTHERN.**

### **6.1 Hybridation Southern des plasmides de la souche P2 à l'aide d'une sonde spécifique au gène *atzA* de *Ps. ADP*.**

Le profile plasmidique de *R. leguminosarum* bv. *viciae* P2 est composé de cinq plasmides satellites (30 à 100 kpb) et de deux mégaplasmides (> à 1000 kpb) (figure 23).

Les plasmides de la souche P2 ont subi une hybridation Southern à l'aide d'une sonde de 1,9 kpb spécifique au gène *atzA* de *Pseudomonas* ADP (figure 24). Cette hybridation qui s'est faite dans des conditions rigoureuses a révélé un marquage des plasmides de 53 et 96 kpb de *Pseudomonas* ADP, mais aucun des plasmides de la souche P2 n'a hybridé avec la sonde *atzA*/AvaI (figure 24). Ce résultat d'hybridation indique que les plasmides de la souche P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* ne présentent pas de séquences homologues au gène *atzA* (figure 24). Ces plasmides satellites ou cryptiques de la souche P2 ont été purifiés afin d'effectuer un criblage des gènes *atzA*, *atzB* et *atzC* de *Pseudomonas* ADP par PCR.

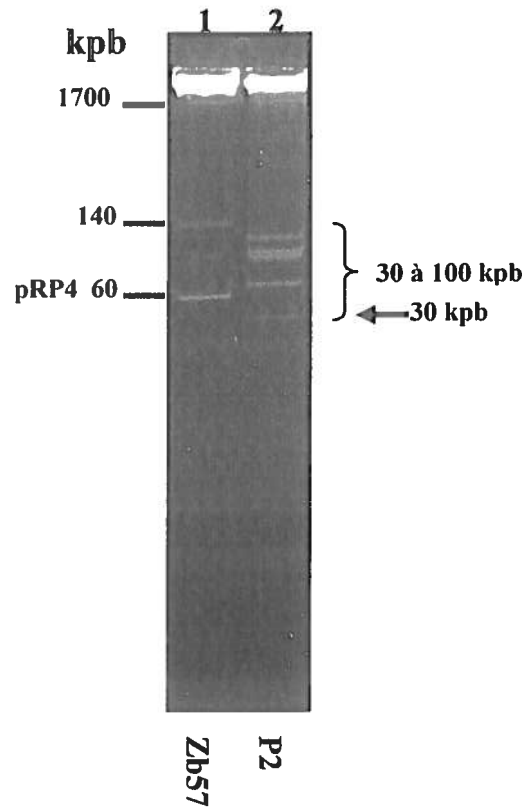


Figure 23 : Profile plasmidique de *R. leguminosarum* bv. *viciae* P2 (puits 2) obtenue par la méthode Eckardt. Le puits 1 contient l'ADN génomique de la souche Zb57 de *Rhizobium* sp. où deux plasmides cryptiques de 60 kpb (pRP4) et de 140 kpb ont été isolés (Datta *et al.*, 1971).

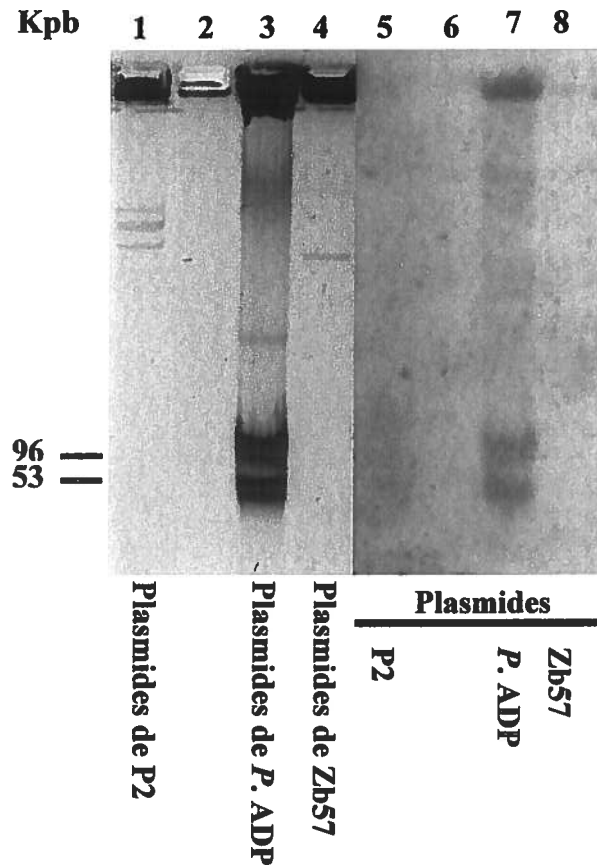


Figure 24 : Isolement de plasmides par la méthode Eckardt chez la souche P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *Pseudomonas* ADP et la souche Zb57 de *R. meliloti* et hybridation Southern des plasmides sur membrane de nylon à l'aide d'une sonde *atzA/AvaI* de 1,9 kpb marquée à la digoxigénine et spécifique au gène *atzA* de *Pseudomonas* ADP. (Les puits 2 et 6 représentent les plasmides isolés par la méthode Eckardt de la souche B5 de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* qui n'ont pas été décrits dans le texte).

### **6.2 Détection d'homologues avec le gène *atzB* de *Pseudomonas* ADP au niveau des plasmides satellites de la souche P2 par PCR.**

Au niveau de l'ADN total, la présence d'un fragment homologue au gène *atzB* a été identifiée, par «semi-nested PCR», par hybridation Southern et par séquençage. Par la suite, l'origine génomique ou plasmidique de ce fragment homologue a été évaluée. Les amorces spécifiques à une région interne du gène *atzB* et couvrant une région de 522 nucléotides ont été utilisées avec une température d'hybridation de 63°C pendant 5 cycles et 57°C pendant 30 cycles d'amplification.

Le PCR effectué sur les plasmides satellites a amplifié un fragment de 0,5 kilopaires de bases de la même taille que le fragment amplifié chez le plasmide pATZB-2 porteur du gène *atzB* (figure 25). Au niveau de l'ADN plasmidique de la souche P2 un deuxième fragment de plus petite taille a été amplifié (figure 25).

### **6.3 Détection d'homologues avec le gène *atzC* de *Pseudomonas* ADP au niveau plasmidique chez la souche P2 par PCR à l'aide d'amorces spécifiques à une région interne du gène *atzC*.**

Lorsque l'amplification par PCR du gène *atzC* de *Pseudomonas* ADP a été effectuée, les résultats ont été beaucoup plus mitigés. L'utilisation des amorces spécifiques au gène *atzC*, permet d'amplifier un fragment de 0,6 kpb. Les amorces du gène *atzC* couvrent la région nucléotidique de 768 à 1392 du gène *atzC* (figure 14) et ont les séquences suivantes 5'-GCTCACATGCAGGTACTIONCA-3' et 5'-GTACCATATCACCGTTTGCCA-3'.

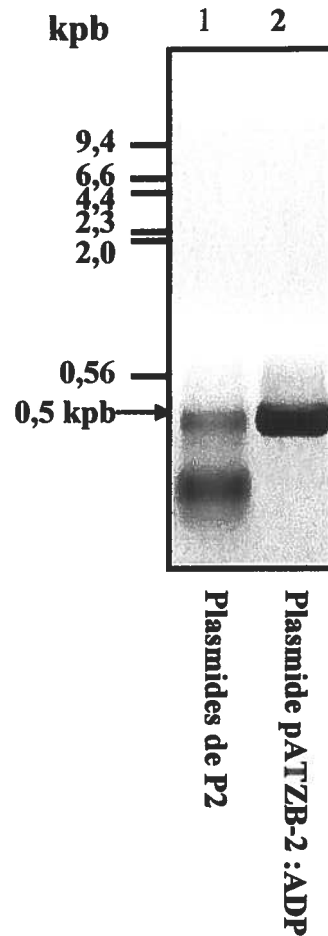


Figure 25 : Amplification de fragments d'ADN par PCR à l'aide des amorces spécifique au gène *atzB* sur un gel d'agarose de 1%. L'amplification s'est faite à partir de l'ADN plasmidique (plasmides satellites) de la souche P2 (puits 1). Le puits 2 correspond à l'amplification effectuée sur le plasmide pATZB-2 :ADP, le vecteur d'expression du gène *atzB* chez *E. coli* DH11S et témoin positif de l'amplification pour le gène *atzB*. À gauche du gel d'agarose, le marqueur de poids moléculaire  $\lambda$ /HindII est représenté.

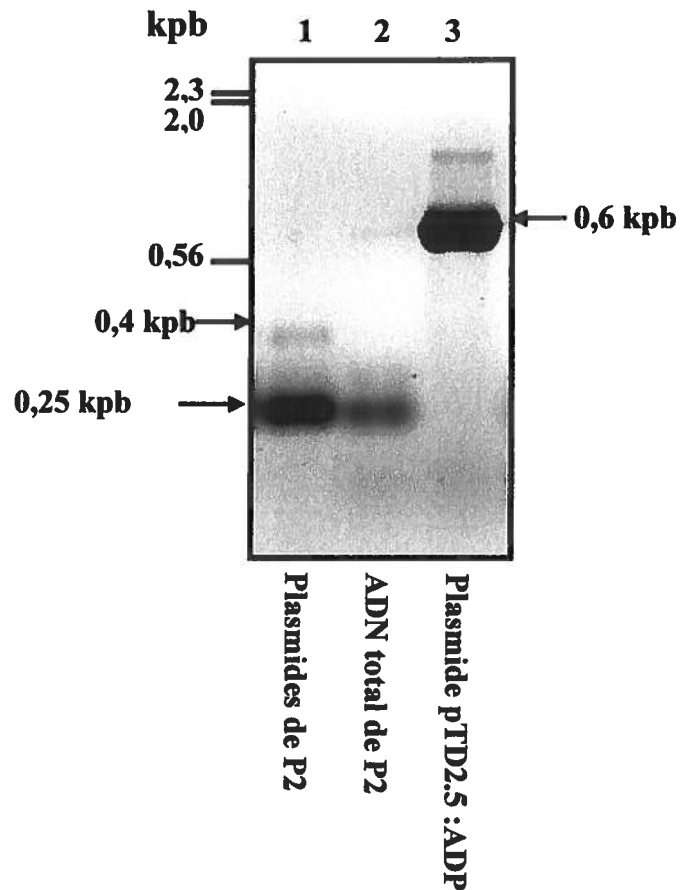


Figure 26 : Amplification de fragments d'ADN par PCR à l'aide des amorces spécifiques au gène *atzC* sur un gel d'agarose de 1%. L'amplification s'est faite à partir de l'ADN plasmidique (plasmides satellites) de la souche P2 (puits 1) et de son ADN total (puits 2). Le puits 3 correspond à l'amplification effectuée sur le plasmide pTD2.5:ADP, le vecteur d'expression du gène *atzC* chez *E. coli* DH5 $\alpha$  et témoin positif pour l'amplification du gène *atzC*. À gauche du gel d'agarose, le marqueur de poids moléculaire  $\lambda$ /HindII est représenté.

L'amplification par PCR s'est effectuée au cours de 35 cycles avec une température d'hybridation de 57°C et en présence de 2,5 µM d'amorces. Cependant, au niveau de l'ADN total et de l'ADN plasmidique de la souche P2, aucun fragment d'amplification de 0,6 kpb n'est observé contrairement au plasmide pTD2.5:ADP qui est le vecteur d'expression du gène *atzC* chez *E. coli* DH5α. D'autre part, chez les deux formes d'ADN, total et plasmidique, de la souche P2, une amplification de l'ordre de 250 pb (presque la moitié de la taille attendue) est observée tout comme chez *Clavibacter michiganese* ATZ1 (De Souza *et al.*, 1998a). Au niveau de l'ADN plasmidique un deuxième fragment de 400 bp est faiblement amplifié (figure 26).



## **DISCUSSION**

## **1 CROISSANCE DES RHIZOBIA EN PRÉSENCE DE QUELQUES SOURCES DE CARBONES ET DE L'ATRAZINE.**

Les *rhizobia*, qui sont connus pour être des bactéries symbiotiques, se retrouvent aussi sous leur forme libre dans la rhizosphère où elles sont en présence de composés aromatiques sécrétés par les plantes comme les flavonoïdes et les bêtaïnes (Goldmann *et al.*, 1994; Spaink, 2000). Ces bactéries sont porteuses de gènes du catabolisme de ces composés aromatiques et substitués (Goldmann *et al.*, 1994).

Chez les souches ATZ-025 et M8 de *S. meliloti* et la souche P2 de *R. leguminosarum*, le succinate a suscité une croissance moins importante que le glucose alors que leur concentration molaire en carbone est comparable, avec 4 mM pour le succinate et 4.4 mM pour le glucose. Cette croissance qui est plus importante en présence du glucose pourrait s'expliquer par une utilisation préférentielle chez ces souches de *rhizobia* de la voie catabolique Entner-Doudoroff (ED) impliquant le glucose au détriment de la voie métabolique du succinate (Finan *et al.*, 1988). Stowers (1985) mentionne que chez les *rhizobia* à croissance rapide comme *Sinorhizobium meliloti* et *Rhizobium leguminosarum*, le succinate constitue une source de carbone qui stimule la croissance bactérienne. Et même plus, le métabolisme du succinate est impliqué dans la régulation de plusieurs activités métaboliques chez les *rhizobia* (Finan *et al.*, 1988). Cependant, la souche P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* semble croître plus difficilement en présence de succinate que les souches de *S. meliloti* (figure 7). Lorsque la souche P2 est mise en présence d'acides carboxyliques et de glucose, sa croissance est stimulée et est plus rapide que lorsque le milieu de culture ne contient que du glucose. En effet, les acides carboxyliques en C<sub>4</sub> stimulent la croissance des *rhizobia* et permettent de maintenir de meilleurs taux de croissance en laboratoire (Robinson et Bauer, 1993). Finan *et al.* (1988) indiquent que pour certaines souches de *rhizobia* l'apport du glucose semble nécessaire afin d'obtenir une meilleure croissance en laboratoire. Nous avons observé, chez la souche P2, que l'apport de glucose permet une meilleure croissance, lorsque ces bactéries se retrouvent dans un milieu minimal contenant des acides carboxyliques en C<sub>4</sub> et une source d'azote comme l'atrazine, comparativement à une culture contenant du glutamate (figure 7). En effet, la croissance des *rhizobia* est non seulement stimulée par

des composés aromatiques, mais aussi par les acides carboxyliques en C<sub>4</sub> comme le succinate, le malate et le fumarate. Ces acides carboxyliques en C<sub>4</sub> sont considérés comme des sources majeures de carbones utilisées par les formes libres des *rhizobia* (Robinson et Bauer, 1993).

Lorsque le glutamate (une source de carbone et d'azote) est utilisé comme source de carbone en présence de 20 ppm d'atrazine, la croissance de la souche P2 de *R. leguminosarum* connaît une importante phase de croissance suivie d'une décroissance importante de la densité optique des cellules. Cette décroissance au niveau de la densité cellulaire ne semble pas être due à un manque de carbone puisque la concentration molaire en carbone était comparable aux autres cultures contenant du glucose et un acide carboxylique en C<sub>4</sub>. La diminution de la densité cellulaire chez la souche P2 pourrait être liée à une éventuelle accumulation de substances toxiques qui n'ont pas été identifiées ou pourrait être liée à un manque de vitamines et de substances inorganiques (Breedveld *et al.*, 1990), et non d'un manque d'azote, puisque le glutamate constitue aussi une source d'azote en plus de l'atrazine.

## **2. ÉVALUATION DE LA BIOTRANSFORMATION DE L'ATRAZINE PAR LES RHIZOBIA.**

Il a été mis en évidence que certaines souches de *rhizobia* du laboratoire du docteur Ahmad (Mehmannavaz, 1999) sont capables de dégrader ou de biotransformer l'atrazine dans des colonnes de sol et d'effectuer la biotransformation du TNT, si bien que la biotransformation, en laboratoire, de cet herbicide par différentes souches de *rhizobia* a été évaluée en suivant sa disparition au CLHP (Mehmannavaz, 1999; Mehmannavaz *et al.*, 2001; Labidi *et al.*, 2001).

Cependant, au cours de l'évaluation de la biotransformation de l'atrazine, des EPS de hauts poids moléculaires ont été détectés dans les cultures des différentes souches de *rhizobia* et ont été à l'origine d'une surévaluation de la concentration d'atrazine par le système de CLHP. Ces polysaccharides anioniques et de hauts poids moléculaires ont

nuit au suivi de la disparition de l'atrazine et de certains de ses métabolites utilisés comme substrats potentiels pour les *rhizobia*. Il apparaît que la production des EPS chez les *rhizobia* est influencée par les conditions de culture des bactéries, leur phase de croissance et la source de carbone utilisée (Breedveld *et al.*, 1990). Alors que Breedveld *et al.* (1990) mentionnent que la concentration de la source de carbone influence la sécrétion des  $\beta$ -(1,2)-glucannes cycliques (un polysaccharide), l'utilisation de différentes sources de carbone comme le glucose ou le succinate à des concentrations de 0,2 %, soit environ 12 mM, n'a pas permis de restreindre la sécrétion d'EPS. En effet la précipitation à l'éthanol a mis en évidence la présence d'EPS de hauts poids moléculaires dans des milieux contenant 12 mM de carbone, car les EPS subissent une agglutination dans un milieu contenant de l'éthanol (Lloret *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999). Ces EPS de hauts poids moléculaires s'avèrent être l'un des principaux polysaccharides sécrétés par les *rhizobia* à croissance rapide comme *R. leguminosarum* (Breedveld *et al.*, 1990). Ils sont particulièrement sécrétés chez les *rhizobia* dans des conditions de stress (manque de phosphate, d'azote) (Spaink, 2000).

Tandis que l'utilisation de différentes sources de carbone, en laboratoire, ne semble pas diminuer la production d'EPS, Lloret *et al.* (1998) mentionnent que la présence de NaCl à une concentration de 300 mM dans le milieu de culture permet de diminuer la sécrétion des EPS chez les *rhizobia*. Or, le milieu minimal ne contenait que 1,7 mM de NaCl, favorisant ainsi la sécrétion des EPS par les *rhizobia*. Une augmentation de la concentration de NaCl aurait probablement permis une diminution de la production des EPS chez les différentes souches de *rhizobia* et un meilleur suivi de l'atrazine par CLHP. Cependant, l'utilisation d'une importante concentration de NaCl nécessiterait que les souches de *rhizobia*, utilisées dans cette étude, soient halotolérantes, ce qui n'a pas été évalué. D'autre part, les EPS coélueraient avec l'atrazine, générant un artéfact dans l'estimation de la concentration d'atrazine présent dans les cultures des *rhizobia* (figure 9). L'extraction à l'éther de l'atrazine a permis de résoudre la problématique de la production d'EPS et d'éliminer la coélution avec l'atrazine (figure 11). La présence d'EPS peut être révélateur d'une condition de stress chez les souches de *rhizobia* au niveau de l'apport d'éléments azotés.

Toutefois, aucune dégradation de l'atrazine n'a été observée, alors que la souche P2 a été mise en culture en présence d'une source de carbone, à savoir, le glucose et un acide carboxylique en C<sub>4</sub> et de l'atrazine comme unique source d'azote (figure 11).

Cette absence de dégradation chez les *rhizobia*, notamment, la souche P2 pourrait être due à une forme de répression catabolique générée par certaines sources de carbone utilisées. En effet, Frassinetti *et al.* (1998) ont mentionné que des sources de carbone supplémentaires, comme le succinate et le glucose, pouvaient être utilisées comme co-substrats par une souche de *R. meliloti* dans la biodégradation du dibenzothiophène (DBT) et que leur assimilation pourrait se faire par un mécanisme compétitif qui réduirait l'oxydation du DBT et donc la biotransformation de ce sulfure hétérocyclique et polyaromatique. Le glucose, utilisée dans le cadre de la biodégradation de l'atrazine par les *rhizobia* pourrait, aussi, affecter la biotransformation de l'atrazine en raison d'un mécanisme de répression catabolique. Ce mécanisme par lequel le glucose inhibe l'oxydation du DBT par la souche Orange 1 (Frassinetti *et al.*, 1998) pourrait être présent chez les souches ATZ-025, M8 et P2 inhibant, par le fait même, la biotransformation de l'atrazine chez ces souches de *rhizobia*.

Il s'avère que dans des colonnes de sol, la dégradation de l'atrazine par la souche A-025 de *R. meliloti* est possible et nécessite des conditions aérobies et anaérobies, ainsi que la présence de nitrate (Mehmannavaz *et al.*, 2001), alors qu'il n'y a pas de biotransformation de l'atrazine dans des conditions uniquement anaérobies (Mehmannavaz *et al.*, 2001). La souche A-025 est une souche parentale de la souche ATZ-025. Le fait que la souche A-025 ait besoin de conditions aérobies et anaérobies afin de dégrader l'atrazine, soulève la possibilité que les souches de *rhizobia* pourraient utiliser des voies métaboliques aérobies et anaérobies comme certains microorganismes décrits par Stucki et collaborateurs (1995). La présence de plus d'une voie métabolique impliquée dans différentes étapes de biotransformation de l'atrazine chez les *rhizobia* serait d'autant plus possible que la plupart des gènes impliqués dans la dégradation de l'atrazine chez d'autres microorganismes sont portés par des plasmides (Behki *et al.*, 1993; De Souza *et al.*, 1998c) et qu'ils peuvent pour certains être transmis chez différents microorganismes (De Souza *et al.*, 1998b; De Souza *et al.*, 1998c).

### 3. ÉVALUATION DE LA MINÉRALISATION DE L'ATRAZINE PAR LES RHIZOBIA PAR LA MÉTHODE DU PIÉGEAGE DU $^{14}\text{CO}_2$ .

Chez *Pseudomonas* ADP, qui constitue le modèle le mieux étudié pour la dégradation de l'atrazine, ce dernier connaît une dégradation qui va jusqu'à la minéralisation (Mandelbaum *et al.*, 1995). Lorsque la souche P2 de *R. leguminosarum* est mise en culture en présence de 100 ppm d'atrazine marqué au C-14 au niveau de l'anneau hétérocyclique (3,83  $\mu\text{Ci/mL}$ ) et utilisé comme source de carbone et d'azote, 2,2 à 2,9% de la radioactivité initiale se retrouve sous forme de  $^{14}\text{CO}_2$  en 72 heures. Il apparaît, de plus, qu'une croissance de la souche P2 est soutenue au cours des 72 heures de culture durant lesquelles l'atrazine est minéralisée. La minéralisation de l'atrazine a lieu, à des taux comparables, aussi bien en aérobie qu'en microaérobie. Il s'avère que l'atrazine est utilisée non seulement comme une source d'azote, mais aussi comme une source de carbone. Cette minéralisation soulève le fait que la présence d'une source de carbone autre que l'atrazine pourrait, effectivement, nuire à sa biotransformation par un mécanisme compétitif d'assimilation intracellulaire. Cependant, le taux de minéralisation de l'atrazine par la souche P2 demeure faible par rapport à *Pseudomonas* ADP et *Pseudomonas* YAYA6 qui présentent un taux de 80% et 50% respectivement, soit 80 et 15 ppm. Ces souches métabolisent l'atrazine soit comme une source d'azote pour la souche ADP ou soit comme une source de carbone et d'azote pour la souche YAYA6 (Mandelbaum *et al.*, 1995; Yanze-Kontchou et Gschwind 1994; Mandelbaum *et al.*, 1993). Cependant, le taux de minéralisation observé chez la souche YAYA6 s'obtient après 49 jours de culture (Yanze-Kontchou et Gschwind 1994). La présence d'autres accepteurs d'électrons comme le nitrate pourrait augmenter le taux de minéralisation de l'atrazine par la souche P2.

Il semble, d'une part, que la faible densité optique initiale à 600 nm des cellules bactériennes (0,16) pourrait être un des facteurs responsables d'un taux de minéralisation plus faible chez la souche P2 comparativement à la souche *Pseudomonas* ADP qui présente une D.O.<sub>600</sub> initiale de 0,5 et un taux de minéralisation de 80% (Mandelbaum *et al.*, 1995). Cependant, au niveau du sol, une minéralisation moins rapide de l'atrazine par la souche P2 pourrait être plus avantageuse dans un milieu *in situ*, puisqu'une

disparition presque immédiate de l'atrazine accessible ou disponible dans le sol pourrait initier une désorption de molécules d'atrazine liées aux particules solides du sol et une micro-pénurie des facteurs de croissance et des substances nutritives inorganiques nécessaires à la croissance des micro-organismes dégradant l'atrazine (Alexander 1994). De plus, la désorption de molécules d'atrazine non dégradées pourrait générer un effet phytotoxique pour l'environnement.

Les capacités de dégradation des xénobiotiques aromatiques par des membres du genre *Rhizobium* ont été démontrées par différents auteurs (Muthukuymar *et al.*, 1982; Parke et Ornston, 1984; Bouquard *et al.*, 1997; Mehmannaavaz *et al.*, 2001; Labidi *et al.*, 2001) et permettent, comme Frassinetti *et al.* (1998) l'ont mentionné, de reconsidérer l'importance écologique de ces micro-organismes au niveau de leur implication dans la biotransformation de composés aromatiques toxiques. Au niveau de la souche *R. leguminosarum* bv. *viciae* P2, qui minéralise l'atrazine à un taux de 2,2 à 2,9%, une voie métabolique de l'atrazine semble avoir été acquise. La souche P2 ne métabolise pas le déisopropylatrazine (CIAT) et le dééthylatrazine (CEAT), lorsqu'elle est mise en culture dans des conditions aérobies et sans aucune autre source de carbone et d'azote que ces métabolites déalkylés de l'atrazine. Or, la biotransformation du CIAT et du CEAT s'effectue par une déchloration, en aérobic, à l'aide de la s-triazine hydrolase de *Rhodococcus corallinus* NRRLB-1544R codée par le gène *trzA* (Shao *et al.*, 1995). Puisqu'il n'a pas eu de biotransformation de ces métabolites dans des conditions aérobies, le gène *trzA* ne serait probablement pas exprimé ou présent dans le génome de *R. leguminosarum* bv. *viciae* P2. D'autre part, la voie catabolique de l'atrazine chez *Pseudomonas* ADP semble avoir été acquise récemment et elle se retrouve chez d'autres micro-organismes dégradant l'atrazine (De Souza *et al.*, 1998b), si bien qu'une voie catabolique comparable pourrait se retrouver chez la souche P2 de *R. leguminosarum* et pourrait être codée par des gènes homologues aux gènes *atzA*, *atzB* et *atzC* de *Pseudomonas* ADP (De Souza *et al.*, 1998b).

#### **4. DÉTECTION D'HOMOLOGUES AUX GÈNES *atzA atzB* ET *atzC* DE *PSEUDOMONAS ADP* CHEZ LA SOUCHE P2 DE *R. LEGUMINOSARUM* BV. VICEAE ET CHEZ DEUX SOUCHES DE *S. MELILOTI* ATZ-025 ET M8 PAR PCR.**

Le catabolisme de l'atrazine chez *Pseudomonas ADP* se retrouve partiellement ou entièrement chez d'autres microorganismes, à savoir *Alcaligenes*, *Ralstonia* (De Souza *et al.*, 1998b), *Rhizobium* (Bouquard *et al.*, 1997) et *Agrobacterium* (Struthers *et al.*, 1998) et plus récemment *Pseudaminobacter* (Topp *et al.*, 2000), de sorte que les gènes *atzA*, *atzB* et *atzC* codant pour ce catabolisme ont fait l'objet de recherche chez les souches ATZ-025, M8 et P2.

##### **4.1 Le gène *atzA* chez les souches de *rhizobia*.**

Les trois souches de *rhizobia*, M8, ATZ-025 et P2, qui sont capables de croître sur un milieu minimal contenant 20 ppm d'atrazine comme unique source d'azote ne présentent pas d'amplification par PCR pour le gène *atzA*, lorsque les amorces spécifiques à une région interne et conservée de 0,5 kpb du gène sont utilisées dans des conditions rigoureuses de PCR (De Souza *et al.*, 1998b; Topp *et al.*, 2000). Cependant, la souche P2 présente une amplification de 2,3 kpb (figure 15). Cette amplification pourrait correspondre soit à un artefact ou soit à une séquence d'une région d'un gène homologue au gène *atzA*. En effet, une atrazine chlorohydrolase a été identifiée chez *Rhizobium PATR* et présente 92% d'homologie avec l'atrazine chlorohydrolase (AtzA) de *Pseudomonas ADP* (Bouquard *et al.*, 1997). Cette différence d'homologie en acides aminés s'avère suffisante pour que la spécificité de substrat chez la souche PATR ne soit pas la même que chez la souche *Pseudomonas ADP* (Bouquard *et al.*, 1997), ce qui suggère la présence d'une séquence génomique différente chez la souche PATR. De plus, l'atrazine chlorohydrolase chez *Rhizobium PATR* a un poids moléculaire différent de celui d'AtzA de *Pseudomonas ADP* (De Souza *et al.*, 1996; Bouquard *et al.*, 1997), si bien que la séquence du gène *atzA* chez la souche PATR pourrait être aussi différente. Le fragment amplifié de 2,3 kpb pourrait présenter une différence d'homologie avec le gène



*atzA* comparable à la souche PATR ou plus importante que seul le séquençage pourrait élucider.

L'amplification obtenue pour la souche P2 pourrait correspondre aussi à une région homologue à un gène codant pour une hydrolase comme la s-triazine hydrolase TrzA de *Rhodococcus corallinus* NRRL B-15444R, puisqu'il existe une homologie de séquence de 41% entre AtzA et TrzA. Cependant, l'absence de séquence au niveau du fragment amplifié de 2,3 kpb ne permet pas de confirmer cette hypothèse (figure 15) (De Souza *et al.*, 1996). La s-triazine hydrolase TrzA qui effectue une déchloration est codée par le gène *trzA* (Shao *et al.*, 1995; Struthers *et al.*, 1998). Cependant, la déchloration par cette s-triazine hydrolase qui a lieu au niveau des métabolites déalkylés de l'atrazine, le dééthylatrazine (CEAT) et le déisopropylatrazine (CIAT) n'a pas été observée chez la souche P2, si bien que cette activité métabolique semble absente chez la souche P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* (figure 13).

#### **4.2 Le gène *atzB* chez les souches de *rhizobia*.**

Lorsqu'il est question du gène *atzB* chez les trois souches de *rhizobia*, l'amplification par PCR au niveau de l'ADN total révèle la présence d'un fragment de 0,522 kpb correspondant à la région interne du gène *atzB* amplifiée par des amorces spécifiques. Puisque ces amorces ont déjà été utilisées afin d'identifier le gène *atzB* chez des bactéries dégradant l'atrazine comme *Clavibacter michiganese* ATZ1 (De Souza *et al.*, 1998a), l'amplification obtenue suggère que le fragment 0,522 kpb correspond à la région conservée des nucléotides 1101 à 1628 du gène *atzB*.

##### **4.2.1 Le séquençage d'un fragment interne conservé du gène *atzB* amplifié par PCR chez la souche P2.**

De plus, la présence du gène *atzB* a été confirmé chez la souche P2 par séquençage du fragment amplifié par PCR. De toute évidence, l'étape de déalkylation, réalisée par le produit du gène *atzB*, dans la voie catabolique de l'atrazine décrit par Sadowsky *et al.*

(1998) et par De Souza et *et al.* (1998c) se retrouverait chez la souche P2 de *R. leguminosarum*. En effet, la séquence du fragment amplifié à partir de l'ADN total de la souche P2 et à l'aide des amorces spécifiques au gène *atzB* révèle 98,2% d'homologie avec une région conservée du gène *atzB* de *Pseudomonas* ADP. Le haut niveau d'homologie de séquence observé chez la souche P2 dans une région de 449 pb conservée du gène *atzB* (figures 20 et 21) est comparable à celui présent chez d'autres bactéries Gram négatif dégradant l'atrazine comme *Agrobacterium* J14a et *Alcaligenes* SG1 (De Souza *et al.*, 1998b). Cette homologie de séquence suggère une acquisition du gène *atzB* par la souche P2, dont l'origine serait similaire à celle de *Pseudomonas* ADP et *Pseudaminobacter* C147 ou suggère l'acquisition de ce gène par des mécanismes génétiques similaires à ceux de ces deux bactéries, comme, par exemple, la transposition (De Souza *et al.*, 1998b; Topp *et al.*, 2000).

D'autre part, le motif H-X-H au niveau de la région N-terminale de l'enzyme AtzB a été identifiée chez la séquence d'acides aminés déduite du fragment séquencé du gène *atzB* chez la souche P2. Ce motif est présent chez les protéines AtzA et AtzC au niveau N-terminal et serait représentatif de la famille des aminohydrolases (Sadowsky *et al.*, 1998). Cette région H-X-H chez ces protéines contiendrait des résidus histidines métallo-dépendants caractéristiques de la famille des amidohydrolases (Sadowsky *et al.*, 1998). Or, Labidi *et al.* (1999) mentionnent qu'au sein d'extraits cellulaires de souches de *rhizobia* la dégradation de l'atrazine diminue en présence d'un chélateur d'ions, l'EDTA. Cette observation semble appuyer l'implication, dans la dégradation de l'atrazine, d'enzymes metallo-dépendantes ayant au sein de leur site actif une séquence H-X-H et par le fait même, la présence de gènes codant pour des amidohydrolases (Labidi *et al.*, 1999).

Le gène *atzB*, malgré son homologie de séquence de 98,2%, peut coder pour une enzyme ayant une spécificité différente pour l'hydroxyatrazine comparativement à l'enzyme AtzB de *Pseudomonas* ADP. Cette différence peut être assez importante pour qu'il n'y ait pas de métabolisation de l'hydroxyatrazine. En effet, chez la souche *C. michiganese* ATZ1, l'enzyme AtzB présente un changement de spécificité pour l'hydroxyatrazine, premier métabolite de l'atrazine, en raison de petites différences de séquences

nucléotidiques, de sorte qu'elle catalyse une réaction de déalkylation de la chaîne latérale *N*-isopropylamine au lieu de la chaîne *N*-éthylamine de l'hydroxyatrazine (De Souza *et al.*, 1998a). Bien qu'une faible minéralisation de l'atrazine ait été observée (figure 13), il s'avère nécessaire de vérifier la spécificité de substrat chez AtzB de la souche P2 et d'évaluer la présence du *N*-isopropylammelide, le produit de l'activité enzymatique de AtzB.

#### **4.2.2 Hybridation d'un fragment amplifié par « semi-nested PCR » à l'aide d'une sonde du gène *atzB*.**

En utilisant le « semi-nested PCR » au niveau de l'ADN total de la souche P2, la sensibilité du PCR a été augmentée et l'hybridation Southern des produits de ce « semi-nested PCR » avec la sonde du gène *atzB* a confirmé la présence d'ADN homologue au gène *atzB* chez P2. La présence du gène *atzB* chez *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae P2 permettrait l'utilisation de l'azote et du carbone présents au niveau de la chaîne latérale *N*-éthylamine de l'hydroxyatrazine afin de soutenir, à cette étape de déalkylation, une croissance au cours de la biotransformation de l'atrazine. Comme De Souza *et al.* (1998a) et Topp *et al.* (2000) le mentionnent, l'acquisition ou la perte de la voie catabolique de l'atrazine se ferait par un transfert indépendant des gènes *atzA*, *atzB* et *atzC* ou d'au moins du gène *atzA* et des gènes *atzBC*. Ce transfert génétique serait possible parce que ces gènes sont, pour la plupart des bactéries ayant cette voie métabolique, localisés sur un plasmide. De plus, un tel transfert serait possible en raison de la présence de séquences de répétition *IS1071* liées aux gènes *atzB* et *atzC* chez certaines souches de *Pseudaminobacter* et chez *Pseudomonas* ADP (Topp *et al.*, 2000; De Souza *et al.*, 1998a). Le gène *atzB* est associé à l'élément d'insertion *IS1071* chez des bactéries Gram négatif dégradant l'atrazine comme la souche C195 de *Pseudaminobacter* sp. (Topp *et al.*, 2000). Cette association entre des gènes cataboliques tels que le gène *atzB* et des éléments d'insertion semble responsable de la mobilité des gènes *atz* et de l'instabilité du phénotype de métabolisation de l'atrazine observée chez *Pseudomonas* ADP et *Pseudaminobacter* C195 (Di Gioia *et al.*, 1998; Sadowsky *et al.*, 1998; Topp *et al.*, 2000). L'identification de l'élément d'insertion *IS1071* s'avère nécessaire chez la

souche P2 afin de vérifier l'hypothèse de la présence d'un transposon catabolique contenant un élément *IS1071* et associé à des gènes dégradant l'atrazine.

#### **4.3 Le gène *atzC* chez la souche P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae*.**

En ce qui concerne le gène *atzC*, l'amplification par PCR effectuée sur l'ADN plasmidique de la souche P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* révèle un fragment de 250 paires de bases, soit un peu moins de la moitié de la taille du fragment attendue pour cette amplification à l'aide des amorces spécifiques du gène *atzC* (De Souza *et al.*, 1998b). Or, chez *Clavibacter michiganese* ATZ1 une amplification comparable est obtenue pour le gène *atzC* alors que cette souche ne parvient pas à minéraliser l'atrazine (De Souza *et al.*, 1998a). *C. michiganese* ATZ1 s'arrête aux deux premières étapes de la voie catabolique de l'atrazine décrite chez *Pseudomonas* ADP et accumule un métabolite de l'atrazine, le N-éthylammelide (De Souza *et al.*, 1998a; Sadowsky *et al.*, 1998). L'obtention par PCR d'un fragment d'ADN ayant un peu moins de la moitié de la taille du fragment interne amplifié par des amorces spécifiques du gène *atzC* soulève la possibilité que le gène *atzC* chez la souche P2 ait été tronqué tout comme chez la souche *C. michiganese* ATZ1 (De Souza *et al.*, 1998a). Cependant, la souche P2 s'avère capable de minéraliser l'atrazine même à un faible taux contrairement à la souche *C. michiganese* ATZ1 (De Souza *et al.*, 1998a). Cette différence entre ces deux souches indiquerait que la souche P2 posséderait une voie catabolique de l'atrazine qui n'inclurait peut-être pas l'étape de déamination hydrolytique transformant le N-isopropylammelide en acide cyanurique et effectuée par AtzC (Sadowsky *et al.*, 1998).

Une autre hypothèse pour la souche P2 serait l'existence au sein de cette souche d'une instabilité génétique qui se traduirait par des réarrangements (des délétions) génomiques ou des transpositions entraînant la perte partielle ou totale de gènes impliqués dans le catabolisme de l'atrazine (Van der Meer *et al.*, 1992; Sadowsky *et al.*, 1998). Le fait que certains auteurs, notamment Sadowsky *et al.* (1998) et De Souza *et al.*, (1998b) rapportent, d'une part, que la capacité de microorganismes de dégrader l'atrazine aie été acquise récemment et d'autre part, que les gènes *atzA*, *atzB* et *atzC* pourraient être associés à un transposon catabolique formé par deux copies de séquences de répétitions

IS1071 au sein d'un plasmide (Sadowsky *et al.*, 1998; Topp *et al.*, 2000), émet la possibilité que l'acquisition du phénotype de minéralisation de l'atrazine et la présence du gène *atzB* chez la souche P2 se seraient effectuées par des mécanismes de transfert de plasmides ou de transposition.

L'hypothèse du transfert de plasmides ou de gènes plasmidiques et de la transposition pourrait expliquer l'instabilité du phénotype de biotransformation de l'atrazine observée chez les souches de *rhizobia*, d'autant plus que les transposons cataboliques interviennent particulièrement dans les mécanismes d'adaptation génétiques des microorganismes face aux xénobiotiques (Van der Meer *et al.*, 1992). Les séquences de répétition IS1071 sont des éléments transposables de la classe II (famille Tn3) transportant un gène *tnpA* lié aux gènes de la transposase (Di Gioia *et al.*, 1998) et ils sont impliqués dans la mobilité d'un nombre impressionnant de gènes cataboliques et d'opérons, comme les gènes du 3-chlorobenzoate et les gènes cataboliques de composés aromatiques chlorés, à l'intérieur de transposons sur des plasmides (Di Gioia *et al.*, 1998; Van der Meer *et al.*, 1992). Cette hypothèse reste à être démontrée chez la souche P2 de *Rhizobium leguminosarum*.

## **CONCLUSION**

Les trois souches de *rhizobia*, à savoir ATZ-025 et M8 de *Sinorhizobium meliloti* et P2 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* sont capables d'utiliser l'atrazine comme seule source d'azote afin de soutenir leur croissance et la souche P2 peut croître sur cet herbicide en l'utilisant comme unique source de carbone et d'azote comme l'a démontré l'étude de la minéralisation de l'atrazine radioactive.

L'absence de dégradation de l'atrazine dans un milieu de culture contenant une source de carbone et l'observation de sa minéralisation à un taux de 2,2 à 2,9% en absence de source de carbone, laissent envisager que les *rhizobia* sont capables de biotransformer l'atrazine. Cependant, l'absence de conditions identiques au niveau des milieux de culture utilisés pour le suivi de la biotransformation et de la minéralisation de l'atrazine ne permet que de spéculer sur l'existence d'un mécanisme de répression catabolique ou d'une assimilation compétitive avec le glucose. Il apparaît nécessaire de reproduire des conditions similaires à la minéralisation afin d'évaluer la quantité d'atrazine biotransformée et d'identifier les métabolites intermédiaires de l'atrazine menant à sa minéralisation.

La présence d'EPS a été l'obstacle majeur lors du suivi de la biotransformation de l'atrazine, ce qui a requis une extraction à l'éther afin de mesurer convenablement la concentration de l'atrazine dans les milieux de culture. L'expérience ainsi acquise au niveau de la production d'EPS chez les *rhizobia* permettra de mieux suivre la biotransformation de l'atrazine. Par contre, les résultats obtenus avec les deux métabolites chlorés de l'atrazine suggèrent une absence du gène *trzA* codant pour la s-triazine hydrolase de *R. corallinus* NRRL B-15444R ou une absence d'activité enzymatique chez la souche P2. Ces résultats permettent d'envisager que, dans des conditions aérobies, les *rhizobia* utilisent d'autres gènes lors de la déchloration de l'atrazine.

Par contre, les trois souches M8 et ATZ-025 de *S. meliloti* et P2 de *R. leguminosarum* bv. *viciae* sont porteuses d'au moins un des gènes de la voie catabolique de l'atrazine chez *Pseudomonas* ADP, qui est le gène *atzB*. Puisque ce gène a été aussi amplifié par PCR

au niveau de l'ADN plasmidique de la souche P2, il pourrait se trouver au niveau des plasmides satellites, d'autant plus que, chez *Pseudomonas* ADP et *Pseudaminobacter* C147, ce gène se trouve sur un plasmide au même titre que les gènes *atzA* et *atzC* (De Souza *et al.*, 1998 et Topp *et al.*, 2000).

Par ailleurs, l'identification du gène *atzB* au détriment du gène *atzA* et son homologie de séquence pour la région amplifiée par PCR avec le gène *atzB* de *Pseudomonas* ADP permettent d'orienter l'étude génétique vers la voie métabolique impliquant les gènes *atzA*, *atzB* et *atzC* de *Pseudomonas* ADP et vers les éléments de transposition cataboliques comme IS1071 ou comme les éléments de transposition de la famille Tn3.

L'évaluation de la présence de transposons cataboliques au niveau du génome de P2 constitue une étape importante à effectuer dans le cadre de l'étude de la biotransformation de l'atrazine par des souches de *rhizobia*, car l'acquisition et l'instabilité des gènes impliqués dans la dégradation de ce xénobiotique semblent dépendre de tels éléments génétiques (De Souza *et al.*, 1998c; Topp *et al.*, 2000). De plus, les éléments IS jouent un important rôle dans l'activation ou l'inactivation de gènes dont des gènes silencieux (van der Meer *et al.*, 1992). La compréhension que le laboratoire du docteur Ahmad pourra avoir au niveau de l'implication de ces éléments dans la biotransformation de l'atrazine permettra de développer une meilleure approche dans l'étude et l'utilisation des *rhizobia* dans la biotransformation de xénobiotiques polluants comme l'atrazine et une meilleure compréhension de l'importance écotoxicologique de ces bactéries.



## **REMERCIEMENTS**

J'aimerais remercier en tout premier lieu, ma directrice de maîtrise, le Dre Darakhshan Ahmad, pour sa confiance en me confiant ce projet de maîtrise, ses nombreux conseils, sa patience et son soutien financier. Elle a su m'encadrer et son expérience dans le milieu de la recherche a permis que je ne me perde pas dans les dédales de la recherche.

Je voudrais remercier aussi le Dr François Lépine pour sa codirection et pour la qualité de son esprit critique et scientifique tout au long de ma maîtrise.

Je me souviens de ce qu'un homme avait dit au début de ce programme de maîtrise: « La recherche est comme un long couloir avec de nombreuses portes où l'étudiant ou le chercheur frappe à chacune d'entre elles et tente d'en ouvrir une avec une clef jusqu'à ce qu'il arrive à celle qui va s'ouvrir avec la bonne clef. La recherche demande beaucoup de patience et de détermination. Bienvenue en maîtrise. » Cette maîtrise a déposé chez moi plus que je n'espérais, en me permettant de travailler avec plusieurs personnes qui méritent d'être remerciés.

Je tiens donc à remercier particulièrement le Dr Mohamed Labidi pour ses nombreux conseils, son expertise en biologie moléculaire et en rhizobiologie et pour son aide précieuse dans certaines expériences. Je veux remercier madame Rita Alary, pour ses conseils, son aide technique en chimie analytique, alors que je lui donnais « du fil à retordre » avec le CLHP et monsieur Sylvain Milot pour son aide et sa disponibilité. Je veux aussi remercier madame Diane Barriault pour ses conseils en biologie moléculaire et le Dr Michel Sylvestre pour l'accessibilité à son laboratoire.

Je tiens à souligner l'apport financier offert par l'INRS-Institut Armand-Frappier et la Fondation Armand-Frappier et l'aide matériel de la compagnie Novartis Inc.

Je veux remercier certains amis, à savoir Israël, Freddy, Karl et Valérie pour leur précieux soutien, et tout particulièrement mon père et ma mère pour leurs encouragements constants et leur soutien moral et financier, merci beaucoup à vous deux! En tant que chrétien, je désire terminer en remerciant mon Dieu, Jésus-Christ, en qui j'ai mis ma foi et ma confiance. Je crois qu'Il a su arranger beaucoup de choses au cours de cette maîtrise. Il a toujours eu le dernier mot et a été fidèle en toute chose, alors je ne l'ai pas toujours été.

## **BIBLIOGRAPHIE**

AELION C. M. et D. C. Cresci. 1999. «Biodegradation and bioremediation». Journal of Environmental Quality, vol. 28, p. 683-691.

AHMAD D., R. Mehmannaavaz et M. Damaj. 1997. «Isolation and characterization of symbiotic N<sub>2</sub>-fixing *Rhizobium meliloti* from soils contaminated with aromatic and chloroaromatic hydrocarbons: PAHs and PCBs». International Biodeterioration and Biodegradation, vol. 39, p. 33-43.

ALEXANDER, M. 1994. Biodegradation and bioremediation. San Diego: Academic Press.

BEHKI R. M. et S. U. Khan. 1986. «Degradation of atrazine by *Pseudomonas*: N-dealkylation and dehalogenation of atrazine and its metabolites». Journal of Agriculture and Food Chemistry, vol. 34, p. 746-749.

BEHKI R. M., E. Topp, W. Dick et P. Germon. 1993. «Metabolism of the herbicide atrazine by *Rhodococcus* strains». Applied and Environmental Microbiology, vol. 59, p. 1955-1959.

BOLLAG W. B. et J. M. Bollag. 1992. «Biodegradation». In Encyclopedia of Microbiology, Academic Press, vol. 1.

BOEHRINGER MANNHEIM CORPORATION (éd.). 1995. The DIG system user's guide for filter hybridization. Indianapolis: Boehringer Mannheim Corporation, 100 p.

BOUNDY-MILLS K. L., M. L. De Souza, R. T. Mandelbaum, L. P. Wackett et M. J. Sadowsky. 1997. «The *atzB* gene of *Pseudomonas* sp. strain ADP encodes the second enzyme of a novel atrazine degradation pathway». Applied and Environmental Microbiology, vol. 63, p. 916-923.

BOUQUARD C., J. Ouazzani, J.-C. Prome, Y. Michel-Briand et P. Plesiat 1997. «Dechlorination of atrazine by *Rhizobium* sp. isolate». Applied and Environmental Microbiology, vol. 63, p. 862-866.

BREEDVELD M. W., L. P. T. M. Zevenhuizen et A. J. B. Zehnder. 1990. «Excessive excretion of cyclic  $\beta$ -(1,2)-glucan by *Rhizobium trifolii* TA-1». Applied and Environmental Microbiology, vol. 56, p. 2080-2086.

BROM S., A. G. De Los Santos, T. Stepkowsky, M. Flores, G. Dávila, D. Romero et R. Palacios. 1992. «Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli are required for optimal symbiotic performance». Journal of Bacteriology, vol. 174, p. 5183-5189.

- CAPELA D., F. Barloy-Hubler, M. T. Gatus, J. Gouzy et F. Galibert. 1999. «A high-density physical map of *Sinorhizobium meliloti* 1021 chromosome derived from bacterial artificial chromosome library.» Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 96, p. 9357-9362.
- CAUX P. Y. et R. A. Kent. 1995. «Towards the development of a site-specific water quality objective for atrazine in the Yamaska river, Quebec, for the protection of aquatic life.» Water Quality Research Journal of Canada, vol. 30, p. 157-178.
- CHABOT R., Antoun H., J. W. Kloepper et C. J. Beauchamp. 1996. «Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli.» Applied and Environmental Microbiology, vol. 62, p. 2767-2772.
- COOK A. M. 1987. «Biodegradation of s-triazine xenobiotics.» FEMS Microbiology Reviews, vol. 46, p. 93-116.
- COOPER R. L., T. E. Stoker, L. Tyrey, J. M. Goldman et W. K. McElroy. 2000. «Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary-ovarian function.» Toxicological sciences, vol. 53, p. 297-307.
- CRAWFORD J. J., G. K. Sims, R. L. Mulvaney et M. Radosevich. 1998. «Biodegradation of atrazine under denitrifying conditions.» Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 49, p. 618-623.
- DAMAJ M. et D. Ahmad. 1996. «Biodegradation of polychlorinated biphenyls by *Rhizobia*: a novel finding.» Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 218, p. 908-915.
- DAS P. C., W. C. McElroy et R. L. Cooper. 2000. «Differential modulation of catecholamines by chlorotriazine herbicides in pheochromocytoma (PC12) cells in vitro.» Toxicological Sciences, vol. 56, p. 324-331.
- DATTA N., R. W. Hedges, E. J. Shaw, R. B. Sykes et M. H. Richmond. 1971. «Properties of an R factor from *Pseudomonas aeruginosa*.» Journal of Bacteriology, vol. 108, p. 1244-1249.
- De SOUZA M. L., M. J. Sadowsky et L. P. Wackett. 1996. «Atrazine chlorohydrolase from *Pseudomonas* sp. strain ADP: gene sequence, enzyme purification, and protein characterization.» Journal of Bacteriology, vol. 178, p. 4894-4900.

De SOUZA M. L., J. Sepfernick, B. Martinez, M. J. Sadowsky et L.P. Wackett. 1998b. «The atrazine catabolism genes *atzABC* are widespread and highly conserved». Journal of Bacteriology, vol. 180, p. 1951–1954.

De SOUZA M. L., D. Newcombe, S. Alvey, D. E. Crowley, A. HAY, M. J. Sadowsky et L. P. Wackett. 1998a. «Molecular basis of a bacterial consortium: interspecies catabolism of atrazine». Applied and Environmental Microbiology, vol. 64, p. 178-184.

De SOUZA M. L., L. P. Wackett, K. L. Boundy-Mills, R. T. Mandelbaum et M. J. Sadowsky. 1995. «Cloning, characterization, and expression of a gene region from *Pseudomonas* sp. strain ADP involved in the dechlorination of atrazine». Applied and Environmental Microbiology, vol. 61, p. 3373-3378.

De SOUZA M. L., L. P. Wackett et M. J. Sadowsky. 1998c. «The *atzABC* genes encoding atrazine catabolism are located on a self-transmissible plasmid in *Pseudomonas* sp. strain ADP». Applied and Environmental Microbiology, vol. 64, p. 2323-2326.

Di GIOIA D., M. Peel, F. Fava et R. C. Wyndham. 1998. «Structures of homologous composites transposons carrying *cbaABC* genes from Europe and North America». Applied and Environmental Microbiology, vol. 64, p. 1940-1946.

ECKHARDT T. 1978. «A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria». Plasmid, vol. 1, p. 584-588.

ENCARNACIÓN S., M. Dunn, K. Willms et J. Mora. 1995. «Fermentative and aerobic metabolism in *Rhizobium elti*». Journal of Bacteriology, vol. 177, p. 3058-3066.

ELKAN G. H. «Biological nitrogen fixation». In Encyclopedia of Microbiology, vol. 1, Academic Press. 1992.

FANG Y. et A. M. Hirsch. 1998. «Studying early nodulin gene *ENOD40* expression and induction by nodulation factor and cytokinin in transgenic alfalfa». Plant Physiology, vol.116, p. 53-68.

FINAN T. M., I. Oresnik et A. Bottacin. 1988. «Mutants of *rhizobium meliloti* defective in succinate metabolism». Journal of Bacteriology, vol. 170, p. 3396-3403.

FISHER H. M. 1994. «Genetic regulation of nitrogen fixation in *Rhizobia*». Microbiological Reviews, vol. 58 p. 352-386.

FISHER R. F. et S. R., Long. 1992. «*Rhizobium*-plant signal exchange». Nature, vol. 357, p. 655-659.

FLORES M., P. Mavingui, L. Girard, X. Perret, W. J. Broughton, E. Martínez-Romero, G. Dávila et R. Palacios. 1998. «Three replicons of *Rhizobium* sp. strain NGR234 harbor symbiotic gene sequences». Journal of Bacteriology, vol. 180, p. 6052-6053.

FRASSINETTI S., L. Setti, A. Corti, P. Farrinelli, P. Montevecchi et G. Vallini. 1998. «Biodegradation of dibenzothiophene by a nodulating isolate of *Rhizobium meliloti*». Canadian Journal of Microbiology, vol. 44, p. 289-297.

FREIBERG C., R. Fellay, A. Bairoch, W. J. Broughton, A. Rosenthal et X. Perret. 1997. «Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes». Nature, vol. 387, p. 394-401.

GIROUX I. 1999. «Contamination de l'eau par les pesticides dans les régions de culture de maïs et de soya au Québec. Campagnes d'échantillonnage de 1996, 1997 et 1998.». Ministère de l'Environnement, Direction des écosystèmes aquatiques.

GOLDMANN A., L. Lecoeur, B. Message, M. Delarue, E. Schoonejeans et D. Tepfer. 1994. «Symbiotic plasmid genes essential to the catabolism of proline betaine, or stachydrine, are also required for efficient nodulation by *Rhizobium meliloti*». FEMS Microbiology Letters, vol. 115, p. 305-312.

GORSE I. 1999. «Bilan des ventes de pesticides au Québec en 1997». Direction des politiques du secteur agricole, Division des Pesticides, Ministère de l'Environnement du Québec.

HARTWIG U., C. M. Joseph et D. A. Phillips. 1991. «Flavonoids released naturally from alfalfa seeds enhance growth rate of *Rhizobium meliloti*». Plant Physiology, vol. 95, p. 797-803.

HAUKKA K., K. Lindström et J. P. W. Young. 1998. «Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and latin America». Applied and Environmental Microbiology, vol. 64, p. 419-426.

HERSHBERGER, D. 2000. «s-triazine metabolism metapathway map». University of Minnesota. ([http:// umbbd.ahc.umn.edu/tria/tria\\_map.html](http://umbbd.ahc.umn.edu/tria/tria_map.html))

HOLM L. et C. Sander. 1997. «An evolutionary treasure : unification of a broad set of amidohydrolases related to urease». Proteins, vol. 28, p. 72-82.

HUCKINS J. N., J. D. Petty et D. C. England. 1986. «Distribution and impact of trifluralin, atrazine, and fonofos residues in microcosms simulating a northern prairie wetland». Chemosphere, vol. 15, p. 563-588.

HYNES M. F. et N. F. McGregor. 1990. «Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*». Molecular Microbiology, vol. 4, p. 567-574.

KAUFMAN D.D. et J. BLAKE. 1970. «Degradation of atrazine by soil fungi». Soil Biology and Biochemistry, vol. 2, p. 73-80.

LABERGE S., Y. Gagnon, L. M. Bordeleau et J. Lapointe. 1989. «Cloning and sequencing of *gltX* gene, encoding the glutamyl-tRNA synthase of *Rhizobium meliloti* A2». Journal of Bacteriology, vol. 171, p. 3926-3932.

LABIDI M., B. Calveyrac, R. Mehmannaev, S. Chakir et D. Ahmad. 1999. «Des microbes fixateurs d'azote (*Rhizobium* sp.) sont aussi des biodégradants efficaces des pesticides agricoles les plus redoutables pour l'environnement (atrazine)». In 67<sup>e</sup> congrès de l'Acfas, (Ottawa 10 au 14 mai 1999).

LABIDI M., D. Ahmad, A. Halasz et J. Hawari. 2001. «Biotransformation and partial mineralization of explosive 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by *rhizobia*». Canadian Journal of Microbiology, vol. 47, p. 559-566.

LEE J. Y., Y. B. Bang, J. H. Rhee et S. H. Choi. 1999. «Two-stage nested PCR effectiveness for direct detection of *Vibrio vulnificus* in natural samples». Journal of Food Science, vol. 64, p. 158-162.

LEMIEUX C., B. Quémerais et K. R. Lum. 1995. «Seasonal patterns of atrazine loading for the St Lawrence river (Canada) and its tributaries». Water Research, vol. 29, p. 1491-1504.

LLORET J., B. B. H. Wulff, J. M. Rubio, J. M. Downie, I. Bonilla et R. Rivilla. 1998. «Exopolysaccharide II production is regulated by salt in the halotolerant strain *Rhizobium meliloti* EFB1 ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 64, p. 1024-1028.

LONG S. R. et B. J. Staskawicz. 1993. «Prokaryotic plant parasites». Cell, vol. 73, p. 921-935.



LOOSLI R. 1995. «Epidemiology of atrazine». Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, vol. 143, p. 47-57.

MANDELBAUM R. T., D. L. Allan et L. P. Wackett. 1993. «Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine». Applied and Environmental Microbiology, vol. 61, p. 1451-1457.

MANDELBAUM R. T., L. P. Wackett et D. L. Allan. 1995. «Mineralization of the striazine ring of atrazine by stable bacterial mixed cultures». Applied and Environmental Microbiology, vol 59, p. 1695-1701.

MANUILA A., L. Manuila, M. Nicole et H. Lambert. Dictionnaire français de médecine et de biologie, Masson. 1981.

MASAPHY S., Y. Henis et D. Levanon. 1996. «Manganese-enhanced biotransformation of atrazine by the white rot fungus *Pleurotus pulmonarius* and its correlation with oxidation activity». Applied and Environmental Microbiology, vol. 62, p. 3587-3593.

MEHMANNAVAZ, R. 1999. «A laboratory study on the development and testing of a bioaugmentation system for contaminated soils». Thèse de doctorat, Québec, Université McGill, p. 148.

MEHMANNAVAZ, R., S. O. Prasher, N. Markarian et D. Ahmad. 2001. «Biofiltration of residual fertilizer nitrate and atrazine by *Rhizobium meliloti* in saturated and unsaturated sterile soil columns». Environmental science and Technology, vol. 35, p. 1610-1615.

MERCK AND COMPANY (éd.). 1996. Merck Index. New Jersey: Merck and Company

MICHIELS J., M. Moris, B. Dombrecht, C. Verreth et J. Vanderleyden. 1998. «Differential regulation of *Rhizobium etli* *rpoN2* gene expression during symbiosis and free-living growth». Journal of Bacteriology, vol. 180, p. 3620-3628.

MULBRY W. W. 1994. «Purification and characterization of an inductible s-triazine hydrolase from *Rhodococcus corallinus* NRRL B-15444 R». Applied and Environmental Microbiology, vol. 60, p. 613-618.

MUTHUKUMAR G., A. Arunakumari et A. Mahadevan. 1982. «Degradation of aromatic compounds by *Rhizobium* spp.». Plant and Soil, vol. 69, p. 163-169.

MYLONA P., K. Pawlowski et T. Bisseling. 1995. «Symbiotic nitrogen fixation». Plant Cell, vol. 7, p. 869-885.

NAGY I., G. Schoofs, F. Compennolle, P. Proost, J. Vanderleyden et R. De Mot. 1995a. «Degradation of the thiocarbamate herbicide EPTC (S-EthylDipropylthiocarbothioate) and biosafening by *Rhodococcus* sp. strain NI86/21 involve an inducible cytochrome P-450 system and aldehyde dehydrogenase». Journal of Bacteriology, vol. 177, p. 676-687.

NAGY, I., F. Compennolle, K. Ghys, J. Vanderleyden et R. De Mot. 1995b. «A single cytochrome P-450 system is involved in degradation of the herbicide EPTC (S-Ethyl Dipropylthiocarbamate) and atrazine by *Rhodococcus* sp. strain NI86/21». Applied and Environmental Microbiology, vol. 61, p. 2056-2060.

NOUR S. M., J. C. Cleyet-Marel, P. Normand et M. P. Fernandez. 1995. «Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov.». International Journal of Systematic Bacteriology, vol. 45, p. 640-648.

PARKE D. et L. N. Ornston. 1984. «Nutritional diversity of *Rhizobiaceae* revealed by auxanography». Journal of General Microbiology, vol. 130, p.1743-1750.

PHAM T. T., B. Rondeau, H. Sabik, S. Proulx et D. Cossa. 2000. «Lake Ontario: the predominant source of triazine herbicides in the St. Lawrence River». Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, vol. 57, p.78-85.

PUEPPKE S. G., M. C. Bolaños-Vásquez, D. Werner, M. P. Bec-Ferté, J. C. Promé et H. B. Krishnan. 1998. «Release of flavonoids by the soybean cultivars McCall and Peking and Their perception as signals by the nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium fredii*». Plant Physiology, vol. 117, p. 599-608.

RAO J. R. et J. E. Cooper. 1994. «*Rhizobia* catabolize nod gene-inducing flavonoids via C-ring fission mechanisms». Journal of Bacteriology, vol. 176, p. 5409-5413.

RASTOGI V. et R. Watson. 1992. «Overexpression of the *dctA* gene in *Rhizobium meliloti*: effect on transport of C4 dicarboxylates and symbiotic nitrogen fixation». Canadian Journal of Microbiology, vol. 38, p. 555-562.

ROBINSON J.B. et W.D. Bauer. 1993. «Relationships between C<sub>4</sub> dicarboxylic acid transport and chemotaxis in *Rhizobium meliloti*». Journal of Bacteriology, vol. 175, p. 2284-2291.

RONSON C. W., P.M. Astwood, B.T. Nixon et F.M. Ausubel. 1987. «Deduced products of C<sub>4</sub>-dicarboxylate transport regulatory genes of *Rhizobium leguminosarum* are homologous to nitrogen regulatory gene products». Nucleic Acids Research, vol. 15, p. 7921-7934.

SABIK H., S. Cooper, P. Lafrance et J. Fournier. 1995. «Determination of atrazine, its degradation products and metolachlor in runoff water and sediments using solid-phase extraction». Talanta, vol. 42, p. 717-724.

SABIK H., R. Jeannot et B. Rondeau. 2000. «Multiresidue methods using solid-phase extraction techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products, in ground and surface waters». Journal of Chromatography A, vol. 885, p. 217-236.

SADOWSKY M. J., Z. Tong, M. L. De Souza et L. P. Wackett. 1998. «AtzC is a new member of the amidohydrolase protein superfamily and is homologous to other atrazine-metabolizing enzymes». Journal of Bacteriology, vol. 180, p. 152-158.

SAMBROOK J., E. F. Fritsch et T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2e edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SANGER F., S., Nicklen et A.R., Coulsen. 1977. «DNA sequencing with chain-terminating inhibitors ». Proceeding of the National Academy of Sciences, vol. 74, p. 5463-5467.

SAWICKI B., G. Durand, J.D. Dewitte, D. Ratanasavanh, C. Riché et M. C. Léglise. 1998. «Myelosuppressive activity of two herbicides, atrazine and dinoterb, on human haematopoietic progenitor cells: an in vitro assay to evaluate the effects of intermediate or long-term exposure». Toxicology in Vitro, vol. 12, p. 183-190.

SCHLAMMAN H.R.M., R.J.H. Okker et B.J.J. Lugtenberg. 1992. «Regulation of nodulation gene expression by NodD in *Rhizobia*». Journal of Bacteriology, vol. 174, p. 5177-5182.

SCHLOTTER M., W. Wiehe, B. Assmus, H. Steindl, H. Becke, G. Höflich et A. Hartmann. 1997. «Root colonization of different plants by plant-growth-promoting *Rhizobium leguminosarum* bv. Trifolii R39 studied with monospecific polyclonal antisera». Applied and Environmental Microbiology, vol. 63, p. 2038-2046.

SCHOLL D. et B. T. Nixon. 1996. «Cooperative binding of DctD to the *dctA* upstream activation sequence of *Rhizobium meliloti* is enhanced in a constitutively active truncated mutant». Journal of Biological Chemistry, vol. 42, p. 26435-26435.

SEFFERNICK J. L., G. Johnson, M. J. Sadowsky et L. P. Wackett. 2000. «Substrate specificity of atrazine chlorohydrolase and atrazine-catabolizing bacteria». Applied and Environmental Microbiology, vol. 66, p. 4247-4252.

SHAO Z.Q. et R. Behki. 1995. «Cloning of the genes for degradation of the herbicides EPTC (S-Ethyl Dipropylthiocarbamate) and atrazine from *Rhodococcus* sp. strain TE1». Applied and Environmental Microbiology, vol. 61, p. 2061-2065.

SHAO Z.Q. et R. Behki. 1996. «Characterization of the expression of the *thcB* gene, coding for a pesticide-degrading cytochrome P-450 in *Rhodococcus* strains. Applied and Environmental Microbiology, vol. 62, p. 403-407.

SHAO Z.Q., W. Seffens, W. Mulbry et R. M. Behki. 1995. «Cloning and expression of the s-triazine hydrolase gene (*trzA*) from *Rhodococcus corallinus* and development of *Rhodococcus* recombinant strains capable of dealkylating and dechlorinating the herbicide atrazine». Journal of Bacteriology, vol. 177, p. 5748-5755.

SHIMABUKURO R.H., R. E. Kadunce et D. S. Frear. 1966. «Dealkylation of atrazine in mature pea plants». Journal of Agriculture and Food Chemistry, vol. 14, p. 392-395.

SPAINK, H. P. 2000. «Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria». Annual Reviews of Microbiology, vol. 54, p. 257-288.

STOWERS M. D. 1985. «Carbon metabolism in *rhizobium* species». Annual Reviews of Microbiology, vol. 39, p. 89-108.

STRUTHERS J.K., K. Jayachandran et T. B. Moorman. 1998. «Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated soil». Applied and Environmental Microbiology, vol. 64, p. 3368-3375.

STUCKI G., C. W. Yu, T. Baumgartner et J. F. Gonzalez-Valero. 1995. «Microbial atrazine mineralisation under carbon limited and denitrifying conditions». Water Research, vol. 29, p. 291-296.

SUMMERS M.L., M.C. Denton, et T. R. McDermott. 1999. «Genes coding for phosphotransacetylase and acetate kinase in *Sinorhizobium meliloti* are in an operon that

is inducible by phosphate stress and controlled by PhoB». Journal of Bacteriology, vol. 181, p. 2217-2224.

TIGHE S. W., P. de Lajudie, K. Diepietro, K. Lindström, G. Nick et B. D. W. Jarvis. 2000. «Analysis of cellular fatty acids and phenotypic relationships of *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* species using the Sherlock microbial identification system». International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol. 50, p. 787-801.

TOPP E., H. Zhu, S. M. Nour, S. Houot, M. Lewis et D. Cuppels. 2000. «Characterization of an atrazine-degrading *Pseudaminobacter* sp. isolated from Canadian and French agricultural soils». Applied and Environmental Microbiology, vol. 66, p. 2773-2782.

TROTTER D. M., A. Baril, M. P. Wong et R. A. Kent. 1990. «Canadian water quality guidelines for atrazine». Environnement Canada, vol. 168, p. 1-15.

US EPA. 1995. «Drinking water and health». Chap. In National primary drinking water regulations,. United States Environmental Protection Agency. Washington, DC.

US EPA. 1996. Lake Michigan Mass Balance : Pollutants of Interest. United States Environmental Protection Agency. Washington, DC.

VAN DEN BERG D. J. C., G. W. Robijn, A. C. Janssen, M. L. F. Giuseppin, R. Vreeker, J. P. Kamerling, J. F. G. Vliegenthart, A. M. Ledebøer et C. T. Verrips. 1995. «Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide». Applied and Environmental Microbiology, col. 61, p. 2840-2844.

VAN DER MEER J. R. W., M. De Vos, S. Harayama et A. J. B. Zehnder. 1992. «Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds». Microbiological Reviews, vol. 56, p. 677-694.

VAN RHIJN P. et Vanderleyden J. 1995. «The *Rhizobium*-plant symbiosis». Microbiological Reviews, vol. 59, p. 124-142.

WANG L. X, Y. Wang, B. Pellock et G. C. Walker. 1999. «Structural characterization of the symbiotically important low-molecular-weight succinoglycan of *Sinorhizobium meliloti*». Journal of Bacteriology, vol. 181, p. 6788-6796.

WEI X. et W. D. Bauer. 1999. «Tn5-induced and spontaneous switching of *Sinorhizobium meliloti* to faster-swarming behavior». Applied and Environmental Microbiology, vol. 65, p. 1228-1235.

YANZE-KONTCHOU C. et N. Gschwind. 1994. «Mineralisation of the herbicide atrazine as a carbon source by a *Pseudomonas* strain». Applied and environmental Microbiology, vol. 60, p. 4297-4302.

YANZE-KONTCHOU C. et N. Gschwind. 1995. «Mineralisation of the herbicide atrazine in soil inoculated with a *Pseudomonas* strain». Journal of Agriculture and Food Chemistry, vol. 43, p. 2291-2294.

ZAHARAN H. H. 1999. «*Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate». Microbiology and Molecular Biology Reviews, vol. 63, p. 968-989.

