BIBLIOTHÈQUE

DANIELLE DENNIE

Spectre d'activité de déshalogénation réductrice de composés organochlorés par *Desulfitobacterium frappieri* souche PCP-1

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

Jury d'évaluation :

François Lépine, Ph.D.
Michel Sylvestre, Ph.D.
Hermann Dugas, Ph.D.

Janvier 1999
INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
Université du Québec

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES iii

LISTES DES TABLEAUX vii

LISTE DES FIGURES ix

SOMMAIRE xi

INTRODUCTION 1

REVUE DE LITTÉRATURE 7

2,1 LA DÉSHALOGÉNATION RÉDUCTRICE DE COMPOSÉS ORGANOHALOGÉNÉS 9

2,1,1 LES COMPOSÉS AROMATIQUES ORGANOHALOGÉNÉS DANS L'ENVIRONNEMENT 9
2,1,2 LA DÉSHALOGÉNATION RÉDUCTRICE 9
2,1,3 LA DÉSHALOGÉNATION RÉDUCTRICE ET LA HALORESPIRATION 14

2,2 QUELQUES EXEMPLES DE DÉSHALOGÉNATION RÉDUCTRICE EN ANAÉROBIOSE 15

2,2,1 LES ACIDES 2,4-DICHLOROPHÉNOXYACÉTIQUE ET 2,4,5-TRICHLOROPHÉNOXYACÉTIQUE 15
2,2,2 LES CHLOROANILINES 18
2,2,3 LES CHLORONITROBENZÈNES 20
2,2,4 LE TÉTRACHLOROVÉRATROLE, LE TÉTRACHLOROGUAIACOL ET LE TÉTRACHLOROCATÉCHOL 21
2,2,5 LES BIPHÉNYLPOLYCHLORÉS ET LES BIPHÉNYLPOLYCHLORÉS HYDROXYLÉS 23

2,3 LES SOUCHES PURES EFFECTUANT LA DÉSHALOGÉNATION RÉDUCTRICE 27

2,3,1 DESULFOMONILE TIEDJEI SOUCHE DCB-1 28
2,3,2 SOUCHE 2CP-1 30
2,3,3 DESULFITOBACTERIUM DEHALOGENANS 31
2,3,4 DESULFITOBACTERIUM HAFNIENSE SOUCHE DCB-2 34
2,3,5 DESULFITOBACTERIUM SP. SOUCHE PCE1 34
2,3,6 DESULFITOBACTERIUM CHLORORESPIRANS SOUCHE Co23 35
2,3,7 DESULFITOBACTERIUM FRAPPIERI SOUCHE PCP-1 36

2,4 CONCLUSION 41

APPROCHE EXPÉRIMENTALE 43

3,1 PROVENANCE DE LA SOUCHE BACTÉRIENNE 45

3,2 DÉTERMINATION DU SPECTRE D'ACTIVITÉ DE DÉSHALOGÉNATION DE LA SOUCHE PCP-1 ENVERS DIFFÉRENTS COMPOSÉS AROMATIQUES 45

3,2,1 PRÉPARATION DU MILIEU MINIMAL 45
3,2,2 AJOUT DE LA SOURCE DE CARBONE, DES INDUCTEURS ET DE L'INOCULUM BACTÉRIEN 48
3,2,3 AJOUT DES COMPOSÉS XÉNOBIOTIQUES 49
3,2,4 GAMMES D'EXPÉRIENCES EFFECTUÉES AVEC CHAQUE COMPOSÉ XÉNOBIOTIQUE 51

3,3 TECHNIQUES D'ANALYSE DES COMPOSÉS XÉNOBIOTIQUES ET DE LEURS MÉTABOLITES 51

3,3,1 ANALYSE PAR TLC 51
3,3,1 ANALYSE PAR CLHP 51
3,3,2 ANALYSE PAR CG-SM 54
3,3,2,1 Extractions des composés avant l'analyse 55
3,3,2,1,1 L'extraction du 2,3,5,6-tétrachloroaniline et du pentachloroaniline et leurs produits de dégradation 55
3,3,2,1,2 L'extraction du pentachloropyridine et leurs produits de dégradation 55
3,3,2,1,3 L'extraction du pentachloronitrobenzène et ses produits de dégradation 55
3,3,2,1,4 L'extraction du tétrachlorocatéchol, du tétrachloroguaiacol, du tétrachlorovératrole et du pentachloroanisole et leurs produits de dégradation 56
3,3,2,1,5 L'extraction des hydroxybiphényles et leurs produits de dégradation 56
3,3,2,2 Identification des composés 56
3,3,2,2,1 L'identification du 2,3,6-trichloroaniline 57
3,3,2,2,2 L'identification du 3,5,6-trichloroguaiacol 58

3,4 SYNTHÈSE DE CERTAINS COMPOSÉS XÉNOBIOTIQUES 59

3,4,1 SYNTHÈSE DU PENTACHLOROANILINE 59
3,4,2 SYNTHÈSE DU 2,3,5,6-TÉTRACHLOROPYRIDINE 59
3,4,3 SYNTHÈSE DES HEXACHLORO-3-HYDROXYBIPHÉNYLES ET DU PENTACHLORO-4,4-DIHYDROXYBIPHÉNYLE 60
3,4,3,1 La synthèse 60
3,4,3,2 La purification 61
3,4,3,2,1 Les hexachloro-3-hydroxybiphényles: isomères 333J et 222F 61
3,4,3,2,2 Le pentachloro-4,4-dihydroxybiphényle 61
3,4,4 SYNTHÈSE DES MÉLANGES DE 4-HYDROXY BPC, 3-HYDROXY BPC ET 2-HDYROXY BPC 62

3,5 MÉTABOLISME DU PYRUVATE 62

RÉSULTATS 65

4,1 LE 2,4,5-TRICHLOROPHÉNOXYACÉTATE (2,4,5-T) 67

4,2 LE 2,3,6-TRICHLOROPHÉNYLACÉTATE (FENAC) 67

4,3 LES CHLOROANILINES 70

4,3,1 LE 2,3,5,6-TÉTRACHLOROANILINE 70
4,3,1,1 Mise en évidence d'une activité déshalogénative envers le 2,3,5,6-tétrachloroaniline par CLHP 70
4,3,1,2 La dégradation du 2,3,5,6-tétrachloroaniline 71
4,3,1,2,1 L'identification du 2,3,6-trichloroaniline: métabolite du 2,3,5,6-tétrachloroaniline 71
4,3,1,2,2 L'identification préliminaire des dichloroanilines 78
4,3,1,2,3 Voies de dégradation proposées du 2,3,5,6-tétrachloroaniline 78
4,3,2 LE PENTACHLOROANILINE 80
4,3,2,1 Mise en évidence d'une activité déshalogénative envers le pentachloroaniline par CLHP . 80
4,3,2,2 Dégradation du pentachloroaniline 82
4,3,2,2,1 L'identification des tétrachloroanilines par CG-SM 82
4,3,2,2,2 L'identification des trichloroanilines par CG-SM 82

4,3,2,2,3 L'identification préliminaire des dichloroanilines 83
4,3,2,2,4 Voies de dégradation proposées du pentachloroaniline 83
4,3,3 LE 3,5-DICHLOROANILINE 85

4,4 LE PENTACHLORONITROBENZÈNE 85

4,5 LE PENTACHLOROPYRIDINE 88

4,5,1 MISE EN ÉVIDENCE D'UNE ACTIVITÉ DE DÉSHALOGÉNATION ENVERS LE PENTACHLOROPYRIDINE PAR CLHP 88
4,5,2 DÉGRADATION DU PENTACHLOROPYRIDINE 92
4,5,2,1 L'identification du 2,3,5,6-tétrachloropyridine 92
4,5,2,2 Voie de dégradation proposée du pentachloropyridine 92

4,6 LES POLLUANTS D'USINES DE PÂTES ET PAPIERS 96

4,6,1 LE TÉTRACHLOROCATÉCHOL 96
4,6,2 LE TÉTRACHLOROGUAIACOL 97
4,6,2,1 L'identification du 3,5,6-trichloroguaiacol 100
4,6,2,2 Voies de dégradation proposées du tetrachloroguaiacol 103
4,6,3 LE TÉTRACHLOROVÉRATROLE 103

4,7 LE PENTACHLOROANISOLE 106

4,8 Les BPC hydroxylés 112

4,8,1 LES 2,2',5'-TRICHLORO-4- ET 2',5,5'-TRICHLORO-2-HYDROXYBIPHÉNYLE 112
4,8,2 LES DEUX ISOMÈRES DE HEXACHLORO-3-HYDROXYBIPHÉNYLE: 333J ET 222F 112
4,8,3 LE PENTACHLORO-4,4'-DIHYDROXYBIPHÉNYLE 115
4,8,4 LES MÉLANGES DE BPC HYDROXYLÉS 115

4,9 EVALUATION DE L'INTERACTION DES BOUCHONS EN BUTYLE AVEC LES PRODUITS TESTÉS 117

4,10 LE MÉTABOLISME DU PYRUVATE 119

DISCUSSION 123

5,1 LE 2,4,5-TRICHLOROPHÉNOXYACÉTATE (2,4,5-T) 125

5,2 LE 2,3,6-TRICHLOROPHÉNYLACÉTATE (FENAC) 126

5,3 LES CHLOROANILINES 127

5,3,1 LE 2,3,5,6-TÉTRACHLOROANILINE 127
5,3,2 LE PENTACHLOROANILINE 129
5,3,3 LE 3,5-DICHLOROANILINE 130

5,4 LE PENTACHLORONITROBENZÈNE 131

5,5 LE PENTACHLOROPYRIDINE 133

5,6 LES POLLUANTS D'USINES DE PÂTES ET PAPIERS 134

5,7 LE PENTACHLOROANISOLE 138

5,8 LES BIPHÉNYLPOLYCHLORÉS HYDROXYLÉS 140

5,9 INTERACTION DES BOUCHONS EN BUTYLE AVEC LES PRODUITS TESTÉS 141

5,10 LE MÉTABOLISME DU PYRUVATE 142

CONCLUSION 143

REMERCIEMENTS 149

BIBLIOGRAPHIE 151

LISTES DES TABLEAUX

TABLEAU 1 - DÉSHALOGÉNATION DES CHLOROPHÈNOLS À PARTIR DE SUSPENSIONS CELLULAIRES DE *DESULFOMONILE. TIEDJEI* 30

TABLEAU 2 - SPECTRE D'ACTIVITÉ DE LA SOUCHE 2CP-1 31

TABLEAU 3 - SPECTRE DE DÉSHALOGÉNATION CHEZ *DESULFITOBACTERIUM HAFNIENSE* 34

TABLEAU 4 - SPECTRE D'ACTIVITÉ DE LA SOUCHE PCE1 35

TABLEAU 5 - SPECTRE D'ACTIVITÉ CHEZ *DESULFITOBACTERIUM CHLORORESPIRANS* 37

TABLEAU 6 - SUBSTRATS DÉSHALOGÉNÉS PAR LES EXTRAITS MEMBRANAIRES DE *D. CHLORORESPIRANS* 37

TABLEAU 7 - SPECTRE D'ACTIVITÉ CHEZ *DESULFITOBACTERIUM FRAPPIERI* 40

TABLEAU 8 - CONCENTRATION DES DIFFÉRENTS XÉNOBIOTIQUES DANS LES CULTURES LIQUIDES 50

TABLEAU 9 - GAMME D'EXPÉRIENCES EFFECTUÉES AVEC CHAQUE COMPOSÉ XÉNOBIOTIQUE 52

TABLEAU 10 - PROGRAMME CLHP 53

TABLEAU 11 - LONGUEURS D'ONDES EMPLOYÉES AFIN DE QUANTIFIER LES COMPOSÉS AU CLHP 54

TABLEAU 12 - PROGRAMME DE TEMPÉRATURE DU CG 54

TABLEAU 13 - DONNÉES PROVENANT DU RMN-H^1 DU TRICHLOROANILINE 76

TABLEAU 14A - DONNÉES PROVENANT DU RMN-H^1 DU TRICHLOROGUAIACOL 101

TABLEAU 14B - FRÉQUENCE DES PROTONS AU RMN-H^1 (EN PPM) DE QUATRE ISOMÈRES DE TRICHLOROGUAIACOL (SMITH *ET AL.* 1994) ET DE L'INCONNU PRÉSENTÉ AU TABLEAU 14A 101

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 - RÉACTIONS CARACTÉRISANT LA DÉSHALOGÉNATION RÉDUCTRICE 12

FIGURE 2 - MÉCANISMES PROPOSÉS POUR LA RÉACTION D'HYDROGÉNOLYSE 13

FIGURE 3 - MODÈLE RESPIRATOIRE 16

FIGURE 4 - VOIES DE DÉGRADATION DU 2,4,5-T 17

FIGURE 5 - VOIES DE DÉGRADATION DU 2,3,4,5-TÉTRACHLOROANILINE ET DU 2,3,4-TRICHLOROANILINE 19

FIGURE 6 - VOIES DE DÉGRADATION DU PENTACHLORONITROBENZÈNE ET DU 2,3,4-TRICHLORONITROBENZÈNE 22

FIGURE 7 - VOIES DE DÉGRADATION DU TÉTRACHLOROVÉRATROLE ET DU 3,4-DICHLOROGUAIACOL 24

FIGURE 8 - PATRON DE DÉCHLORATION LES PLUS COMMUNS DES BIPHÉNYLPOLYCHLORÉS 26

FIGURE 9 - LA DÉSHALOGÉNATION RÉDUCTRICE CHEZ *DESULFOMONILE TIEDJEI* 29

FIGURE 10 - VOIES DE DÉGRADATION DES PHÉNOLS HALOGÉNÉS CHEZ *DESULFITOBACTERIUM DEHALOGENANS* 33

FIGURE 11 - MÉTABOLISME DU PENTACHLOROPHÉNOL CHEZ *DESULFITOBACTERIUM FRAPPIERI* 39

FIGURE 12 - STRUCTURE DES COMPOSÉS XÉNOBIOTIQUES ÉTUDIÉS 46

FIGURE 13 - MÉLANGES DES BIPHÉNYLPOLYCHLORÉS HYDROXYLÉS 47

FIGURE 14 - COURBES DE LA MÉTABOLISATION DU 2,4,5-TRICHLOROPHÉNOXYACÉTATE 68

FIGURE 15 - COURBES DE LA MÉTABOLISATION DU 2,3,6-TRICHLOROPHÉNYLACÉTATE 69

FIGURE 16 - COURBES DE LA MÉTABOLISATION DU 2,3,5,6-TÉTRACHLOROANILINE 72

FIGURE 17 - ISOMÈRES DE TRICHLOROANILINES AU CG-SM 74

FIGURE 18 - RMN-H^1 DU 2,3,6-TRICHLOROANILINE 77

FIGURE 19 - VOIES DE DÉGRADATION PROPOSÉES DU 2,3,5,6-TÉTRACHLOROANILINE 79

FIGURE 20 - COURBES DE LA MÉTABOLISATION DU PENTACHLOROANILINE 81

FIGURE 21 - VOIES DE DÉGRADATION PROPOSÉES DU PENTACHLOROANILINE 84

FIGURE 22 - COURBES DE LA MÉTABOLISATION DU 3,5-DICHLOROANILINE 86

FIGURE 23 - COURBES DE LA MÉTABOLISATION DU PENTACHLORONITROBENZÈNE 89

FIGURE 24 - VOIES DE DÉGRADATION PROPOSÉES DU PENTACHLORONITROBENZÈNE 90

FIGURE 25 - COURBES DE LA MÉTABOLISATION DU PENTACHLOROPYRIDINE 91

FIGURE 26 - SPECTRE DE MASSE D'UN TÉTRACHLOROPYRIDINE 93

FIGURE 27 - AJOUT D'AUTHENTIQUE 2,3,5,6-TÉTRACHLOROPYRIDINE 94

FIGURE 28 - VOIE DE DÉGRADATION PROPOSÉE DU PENTACHLOROPYRIDINE 95

FIGURE 29 - COURBES DE LA MÉTABOLISATION DU TÉTRACHLOROCATÉCHOL 98

FIGURE 30 - VOIES DE DÉGRADATION PROPOSÉES DU TÉTRACHLOROCATÉCHOL 99

FIGURE 31 - RMN-H^1 DU 3,5,6-TRICHLOROGUAIACOL 102

FIGURE 32 - COURBES DE LA MÉTABOLISATION DU TÉTRACHLOROGUAIACOL 104

FIGURE 33 - VOIES DE DÉGRADATION PROPOSÉES DU TÉTRACHLOROGUAIACOL 105

FIGURE 34 - COURBES DE LA MÉTABOLISATION DU TÉTRACHLOROVÉRATROLE 107

FIGURE 35 - VOIE DE DÉGRADATION PROPOSÉE DU TÉTRACHLOROVÉRATROLE 108

FIGURE 36 - COURBES DE LA MÉTABOLISATION DU PENTACHLOROANISOLE 110

FIGURE 37 - VOIES DE DÉGRADATION PROPOSÉES DU PENTACHLOROANISOLE 111

FIGURE 38 - COURBES DE LA MÉTABOLISATION DU 2,2',5'-TRICHLORO-4-HYDROXYBIPHÉNYLE ET DU 2',5,5'-TRICHLORO-2-HYDROXYBIPHÉNYLE 113

FIGURE 39 - COURBES DE LA MÉTABOLISATION DU HEXACHLORO-3-HYDROXYBIPHÉNYLE 333J ET DU HEXACHLORO-3-HYDROXYBIPHÉNYLE 222F 114

FIGURE 40 - COURBES DE LA MÉTABOLISATION DU PENTACHLORO-4,4'-DIHYDROXYBIPHÉNYLE 116

FIGURE 41 - HISTOGRAMMES DE LA MÉTABOLISATION DES MÉLANGES DE BPC HYDROXYLÉS EN POSITION 2, 3 OU 4 118

FIGURE 42 - ÉVALUATION DE L'INTERACTION DES BOUCHONS EN TEFLON AVEC LES PRODUITS TESTÉS 120

FIGURE 43 - MÉTABOLISME DU PYRUVATE CHEZ *DESULFITOBACTERIUM FRAPPIERI* 121

SOMMAIRE

Desulfitobacterium frappieri souche PCP-1 est une bactérie anaérobie qui peut déshalogéner plusieurs chlorophénols en position *ortho*, *meta* et *para*. Le spectre d'activité de la PCP-1 par rapport à une grande variété de polluants organochlorés a été étudié. La souche PCP-1 peut déchlorer le pentachloroaniline, le 2,3,5,6-tétrachloroaniline, le pentachloronitrobenzène, le pentachloropyridine, le pentachloroanisole, le tétrachlorovératrole, le tétrachloroguaiacol et le tétrachlorocatécol. Ces résultats montrent qu'en plus des composés phénolés, l'enzyme peut déshalogéner des composés portant des groupements amino ou méthoxy ainsi que des hétérocycles contenant un azote. Toutefois, seul les composés portant un groupement hydroxyle peuvent induire les enzymes effectuant la déshalogénation. Il a été démontré que le 2,4,5-trichlorophénoxyacétate, le 2,3,5-trichlorophenylacétate ainsi que le 3,5-dichloroaniline ne sont pas déshalogénés. Finalement, des tests avec des biphényles polychlorés (BPC) hydroxylés ont démontré que la souche a un potentiel restreint de déchloration de ces composés, pouvant enlever un maximum de deux atomes de chlores seulement aux congénères de BPC dont le groupement hydroxyle est en position 4.

INTRODUCTION

Un grand nombre de composés aromatiques halogénés polluent l'environnement. Plusieurs d'entre eux sont toxiques, résistent à la dégradation et s'accumulent dans les sédiments et dans les organismes vivants. Il est primordial de connaître les voies de transformation de ces polluants afin de mieux comprendre les risques associés aux sites contaminés et afin d'optimiser les procédés de traitement biologique.

La biodégradation des composés aromatiques halogénés en condition anaérobe fait l'objet de plusieurs études depuis une dizaine d'années. D'après ces études, la déshalogénation anaérobie s'effectue majoritairement via des procédés réducteurs. La déshalogénation réductrice peut dégrader de façon efficace une grande variété de composés halogénés dans les sols ainsi que dans les environnements aquatiques. La déshalogénation réductrice produit des métabolites qui sont, en général, moins toxiques, qui ont une moindre chance d'être bioaccumulés et qui sont plus susceptibles d'être biodégradés par des microorganismes aérobies.

Peu de bactéries anaérobes capables d'effectuer la déshalogénation réductrice de composés aromatiques halogénés ont été isolés en culture pure (Shelton et Tiedje 1984; Madsen et Licht 1992; Cole *et al.* 1994; Utkin *et al.* 1994; Bouchard *et al.* 1996; Gerritse *et al.* 1996; Sanford *et al.* 1996). Parmi les sept bactéries connues jusqu'à maintenant, on retrouve *Desulfitobacterium frappieri* souche PCP-1 (Bouchard *et al.* 1996). Cette souche très performante a été isolée pour sa capacité à dégrader le pentachlorophénol en position *ortho*, *meta* et *para*, jusqu'au 3-chlorophénol en passant par le 2,3,4,5-tétrachlorophénol, le 3,4,5-trichlorophénol et le 3,5-dichlorophénol (Bouchard 1995). Parmi toutes les souches capables d'effectuer la déshalogénation réductrice des composés aromatiques, *D. frappieri* est la seule bactérie pouvant éliminer les atomes de chlore des trois positions du cycle.

Lors de l'étude avec le pentachlorophénol, il a été établi que la souche PCP-1 possèdait deux déshalogénases (I et II) (Bouchard *et al.* 1996). La déshalogénase I, induit par le pentachlorophénol, enlevait les atomes de chlore en position *ortho* par rapport au groupement hydroxyle. La déshalogénase II, induit par le 3,4,5-trichlorophénol, enlevait

les atomes de chlore en position *meta* et *para*. D'autres expériences ont mis en évidence la capacité d'une série de différents chlorophénols à induire les déshalogénases (Gladu *et al.* 1997).

D'autres tests ont été effectués avec *D. frappieri* afin d'évaluer son spectre d'activité envers différents composés aromatiques halogénés (Dennie *et al.* 1998). Il a été observé que la souche peut déshalogéner plusieurs composés tels des bromophénols, un biphényle polychloré hydroxylé ainsi que le tétrachloroéthylène. Par contre, plusieurs composés ne pouvaient pas être dégradés tels des fluorophénols et des chlorobenzoates.

Afin de mieux comprendre le spectre d'activité et les voies de dégradation chez la bactérie, nous avons étudier l'activité des enzymes de déshalogénation envers différents composés xénobiotiques. Pour ce faire, plusieurs expériences ont été effectuées dans lesquelles les composés à l'étude ont été ajoutés à des cultures de la souche PCP-1 où les inducteurs des déshalogénases I et II (le 2,4,6-trichlorophénol et le 3,5-dichlorophénol respectivement) étaient présents.

L'objectif majeur de cette recherche était donc de préciser la capacité catalytique de la souche PCP-1 envers un certains nombre de composés organochlorés et de proposer des voies métaboliques en se basant sur l'identité des métabolites présents dans le milieu de culture.

Plusieurs méthodes analytiques ont été utilisées afin de déterminer la structure des intermédiaires de dégradation, telles la chromatographie liquide à haute performance (CLHP), la chromatographie gazeuse couplé à un spectromètre de masse (CG-SM) et la résonance magnétique nucléaire (RMN).

Le spectre d'activité de la souche PCP-1 a été étudié à l'aide de deux différents groupes de composés. Le premier volet incluait des analogues structurels du pentachlorophénol. Cette étude a permis de préciser les capacités catalytiques de la souche PCP-1 envers des produits ayant certaines ressemblances au pentachlorophénol.

Les produits testés étaient le pentachloroanisole, le pentachloropyridine, le pentachloroaniline, le 2,3,5,6-tétrachloroaniline, le 3,5-dichloroaniline et des biphénylpolychlorés hydroxylés. Plusieurs de ces composés sont utilisés en industrie comme précurseurs, entre autres, de pesticides, d'herbicides et de teintures.

Le deuxième groupe de composés testés était constitué de polluants retrouvés comme contaminants dans l'environnement. Quelques uns de ces composés ont des noyaux qui présentent des analogies de structure avec les composés mentionnés ci-dessus. Ces expériences ont permis d'étudier le potentiel de la souche dans la perspective d'un traitement biologique d'assainissement de sites contaminés. Les composés testés étaient le 2,3,6-trichlorophénylacétate (Fenac), le 2,4,5-trichlorophénoxyacétate, le pentachloronitrobenzène, le tétrachlorocatéchol, le tétrachloroguaiacol et le tétrachlorovératrole.

Les expériences qui ont été effectuées lors de cette étude ont permis d'établir l'action des enzymes en présence de composés dont le groupe fonctionnel n'était pas nécessairement un hydroxyle. Cette connaissance pourra permettre de mieux comprendre le mécanisme des déshalogénases et d'évaluer le potentiel de la souche à des fins de décontamination d'eaux et de sols pollués.

REVUE DE LITTÉRATURE

2,1 La déshalogénation réductrice de composés organohalogénés.

2,1,1 Les composés aromatiques organohalogénés dans l'environnement

Les composés organiques halogénés représentent l'un des plus grands groupes de polluants environnementaux compte tenu de leur utilisation en tant qu'herbicides, insecticides, fongicides, solvents, fluides hydrauliques, agents plastifiants et intermédiaires lors des synthèses chimiques (Fetzner and Lingens 1994). D'après Tiedje *et al.* (1993), au moins la moitié des polluants organiques dans l'environnement seraient des composés organochlorés. Par contre, outre l'apport anthropogénique, les composés halogénés provenant de sources biotiques naturelles dans l'environnement sont aussi communs. Plusieurs microorganismes ont la capacité de générer *de novo* jusqu'à 1500 métabolites organohalogénés (de Jong *et al.* 1994). Parmi les organismes capables de fabriquer ces composés, on retrouve des microalgues et des invertébrés des sédiments marins qui produisent surtout des composés bromés ayant des propriétés antimicrobiennes (King 1988). De plus, une production naturelle et ubiquitaire de métabolites provenant de l'anisole polychloré a été rapportée par de Jong *et al.* (1994) lors d'une étude portant sur plusieurs types de champignons, tous bien répartis dans l'environnement. Même si les composés organohalogénés peuvent dériver de source naturelle, les composés organiques halogénés sont surtout considérés comme étant des composés xénobiotiques. Cet énoncé est appuyé par l'observation que plusieurs composés halogénés anthropogènes persistent dans l'environnement (Dolfing et Tiedje 1991). Par conséquent, la présence de ces composés dans l'environnement peut promouvoir une adaptation par certains microorganismes à transfomer où même minéraliser quelques uns d'entre eux.

2,1,2 La déshalogénation réductrice

Lors des dernières décennies, plusieurs études ont permi d'élucider les stratégies biologiques par lesquelles les composés halogénés sont dégradés en condition aérobie : parmi celles-ci figurent l'hydrolyse enzymatique ou l'action des dioxygénases. Par contre, la dégradation des composés halogénés par les aérobes est souvent limitée par l'atome de chlore qui bloque le site catalytique de l'enzyme (Tiedje *et al.* 1993). De plus,

les composés organohalogénés sont très électronégatifs et en général, sont plus susceptibles d'être réduits que d'être oxydés, surtout lorsque le nombre d'atomes d'halogène sur la molécule est élevé (Susarla *et al.* 1998). Finalement, la majorité de ces composés aboutissent dans un environnement anoxique.

Un autre moyen par lequel certains microorganismes transforment les composés organochlorés est la déshalogénation réductrice, une réaction qui implique l'élimination d'un atome d'halogène et l'addition concomitante d'électrons à la molécule (Mohn et Tiedje 1992). La dégradation des composés organohalogénés via la déshalogénation réductrice est un mécanisme surtout rencontré en milieu anaérobe. Une grande variété de composés halogénés qui demeurent récalcitrants en condition aérobe, peuvent être partiellement ou même complètement déshalogénés en condition anaérobe. Dans certains cas, la déshalogénation réductrice peut diminuer la toxicité des composés xénobiotiques et diminuer le nombre d'atomes halogénés sur la molécule ce qui la rend plus susceptible d'être minéralisée, et ce surtout par les microorganismes aérobes (Townsend et Suflita 1996).

La déshalogénation réductrice est un mécanisme important de dégradation de plusieurs composés halogénés. À date, des travaux ont démontré que plus de 50 composés organochlorés subissent une déshalogénation réductrice tels les pesticides organochlorés (le DDT, l'heptachlor, l'alaclor et le 2,4-D), les solvents chlorés (le PCE, le TCE et le chloroforme) et autres composés aromatiques halogénés (les BPC, les chlorobenzènes, les chloroguaiacols, les chloroanilines et les chlorophénols) (Mohn et Kennedy 1992; Mohn et Tiedje 1992; Tiedje *et al.* 1993). De plus, cette réaction est la première étape lors de la dégradation anaérobe des hydrocarbures chlorés (Christiansen et Ahring 1996).

D'après Tiedje *et al.* (1993), plusieurs généralisations concernant la déshalogénation réductrice peuvent être établies. En premier, les microorganismes (surtout anaérobes) capables d'effectuer la déshalogénation réductrice sont ubiquitaires dans l'environnement. Deuxièment, presque tous les cas de déshalogénation réductrice observés jusqu'à présent requiert des conditions anaérobes. Troisièment, la déshalogénation réductrice en anaérobiose est un procédé relativement lent, ayant une unité de mesure temporelle en jours ou même en semaines. Quatrièmement, il semble y avoir une spécificité entre les populations effectuant une déchloration particulière et des composés particuliers. À date, les études n'ont pas permis l'isolement de

microorganismes ayant un large spectre d'activité. Finalement, la majorité des cultures ayant une capacité de déshalogénation sont des consortiums, et peu de souches pures capables d'effectuer cette réaction ont pu être isolées.

Il existe deux types de réactions qui sont observées lors de la déshalogénation réductrice: soit l'hydrogénolyse ou la réduction vicinale (figure 1). L'hydrogénolyse est le remplacement d'un atome d'halogène par un atome d'hydrogène. Cette réaction peut transformer les composés halogénés aliphatiques et aromatiques. La réduction vicinale est l'enlèvement de deux halogènes situés sur des atomes de carbone adjacents suivit de la formation d'une double liaison entre ces deux atomes de carbone. Cette réaction transforme seulement les substituents halogénés aliphatiques (Mohn et Tiedje 1992).

Le mécanisme précis de la déshalogénation réductrice reste encore inconnu. Par contre, quelques hypothèses ont été émises. Lors d'une première étude, Nies et Vogel (1991) ont constaté que le proton remplaçant un des atomes de chlore sur le 2,3,4,5,6-pentachlorobiphényle venait de l'eau. De plus, en travaillant avec de l'eau deutérée, Griffith et al. (1992) ont aussi constaté que l'atome d'hydrogène qui remplace l'atome de chlore lors de l'hydrogénolyse du 3-chlorobenzoate provient de l'eau. Ces derniers ont donc proposé trois mécanismes possibles pour la réaction d'hydrogénolyse (figure 2). La première implique la formation d'un intermédiaire radicalaire avant l'ajout de l'atome d'hydrogène. La deuxième possibilité serait la formation d'un intermédiaire de type carbanion avant l'ajout de de l'atome d'hydrogène. Finalement, il est aussi possible que la réaction procède via un attaque nucléophilique où un hydrure remplacerait directement l'atome de chlore sur la molécule sans formation d'un intermédiaire. Au niveau enzymatique, plusieurs complexes enzymatiques ayant des atomes métalliques, tels les porphyrines contenant du fer, du cobalt ou du nickel, peuvent catalyser la déshalogénation de composés aromatiques et aliphatiques (Mohn et Tiedje 1992). Ces enzymes portent le nom de déshalogénases. Griffith *et al.* (1992) suggèrent que la réaction procède via le transfert d'un électron de la molécule à l'atome métallique du complexe enzymatique, ce qui a pour effet de produire un composé radicalaire. L'hydrogénolyse a lieu si le radical capture un atome d'hydrogène du milieu. Par contre, si l'atome de carbone adjacent à l'atome radicalaire porte un halogène, il peut aussi perdre son atome de chlore sous forme de radical et les deux atomes de carbone vont former un nouveau lien entre eux et la réduction vicinale aura lieu.

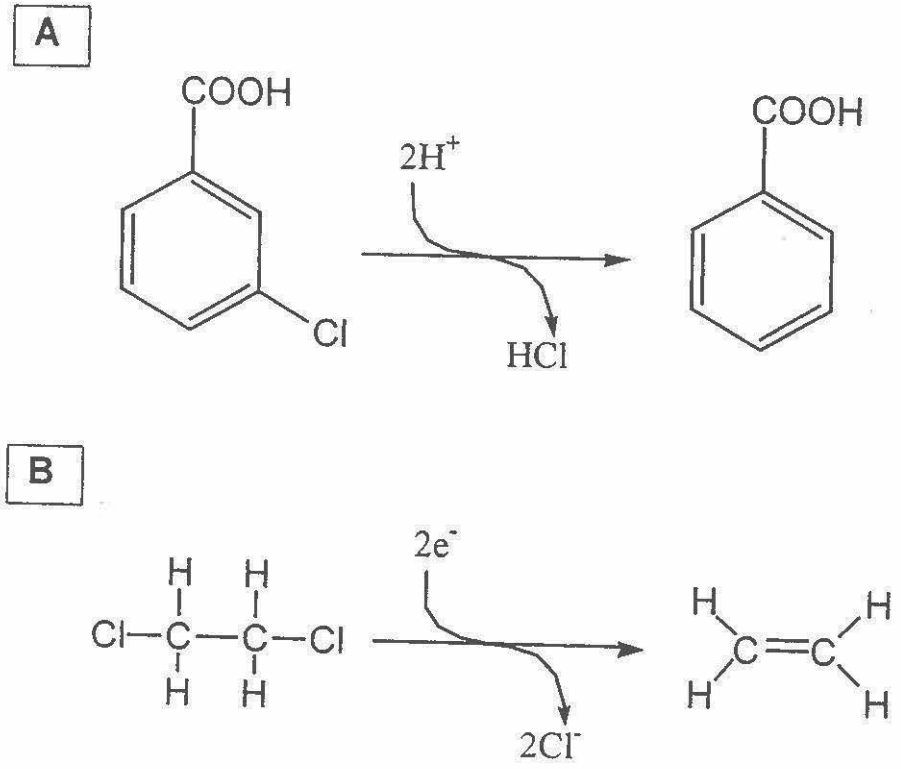


Figure 1 - Réactions caractérisant la déshalogénation réductrice:
(A) l'hydrogénolyse et (B) la réduction vicinale.

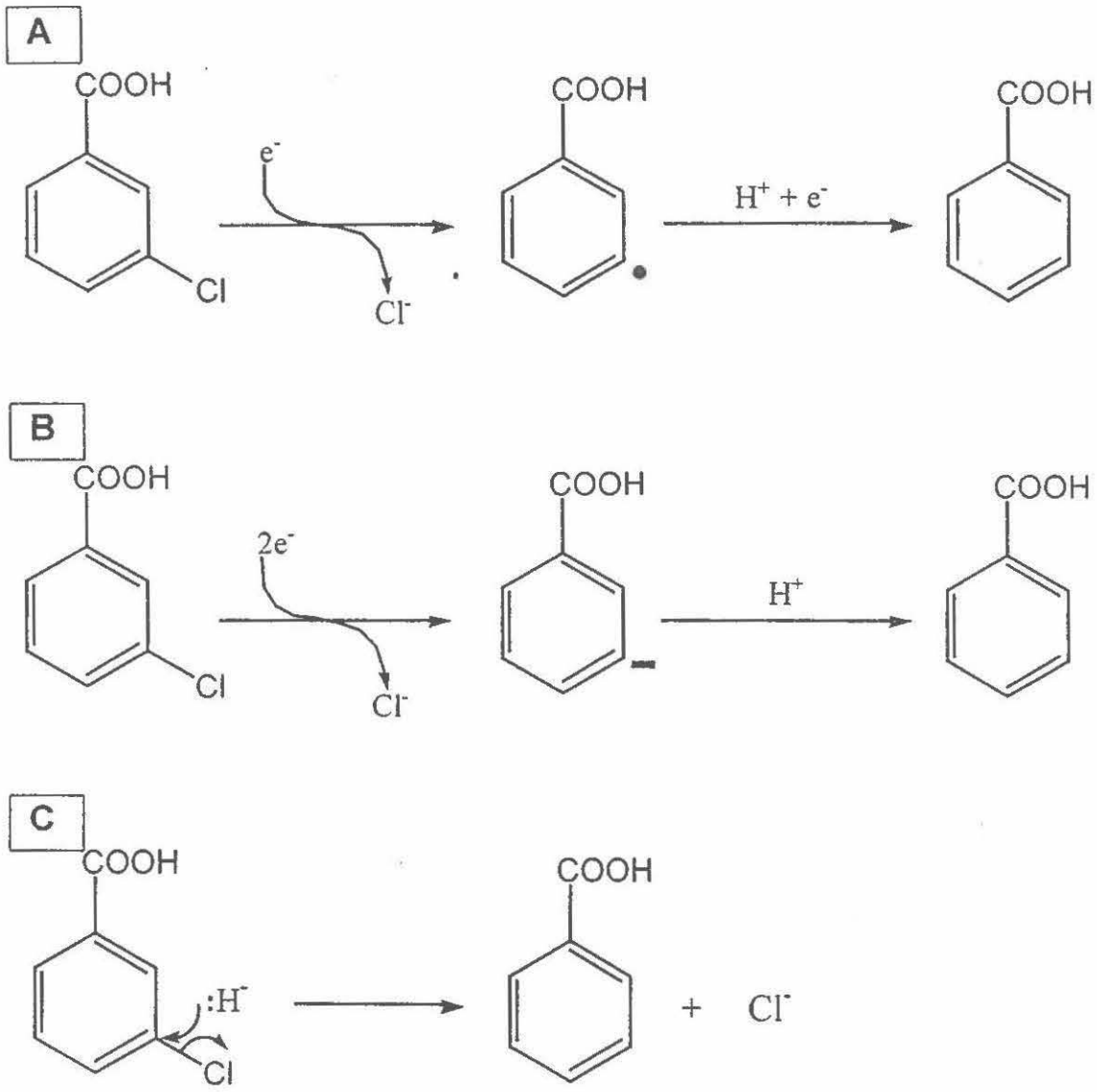


Figure 2 - Mécanismes proposés pour la réaction d'hydrogénolyse

(A) transfert d'un électron avec un intermédiaire radicalaire, (B) transfert de deux électrons avec un intermédiaire carbanion, (C) attaque nucléophilique. Tiré de Mohn et Tiedje (1992).

À ce jour, la déshalogénation réductrice de composés aromatiques à partir d'extraits cellulaires provenant de microorganismes anaérobes a été démontrée seulement chez quatre espèces: souche DSL-1, un organisme capable de déshalogéner le 2,4,6-tribromophénol (Steward *et al.* 1995), *Desulfomonile tiedjei* souche DCB-1 dont la déshalogénase peut s'attaquer au 3-chlorobenzoate ainsi qu'au tétrachloroéthylène (Ni *et al.* 1995; Townsend et Suflita 1996), *Desulfitobacterium chlororespirans* souche Co23 dont l'enzyme en question peut déshalogéner le 3-chloro-4-hydroxyphénylacétate (Löffler *et al.* 1996) et *Desulfitobacterium frappieri* souche PCP-1 dont la déshalogénase I peut déchlorer le 2,4,6-trichlorophénol et la déshalogénase II peut déchlorer le 3,5-dichlorophénol (Beaudet, communication personnelle). La déshalogénase est présente au niveau des membranes chez ces trois dernières espèces.

2,1,3 La déshalogénation réductrice et la halorespiration

Parmi les bactéries anaérobies effectuant la déshalogénation réductrice, cette réaction peut soit être un processus co-métabolique ou un processus respiratoire. Lors du processus co-métabolique, la déshalogénation ne serait pas couplée à la conservation de l'énergie. La réaction serait plutôt effectuée par un système catalytique non-spécifique avec un large spectre d'activité. Par contre, quelques cultures bactériennes qui utilisent l'hydrogène moléculaire, le formate et l'acétate comme donneurs d'électrons et un composé halogéné comme le seul accepteur terminal d'électrons peuvent coupler la déshalogénation réductrice à la conservation de l'énergie (Fetzner et Lingens 1994; Holliger et Schumacher 1994; Mohn et Tiedje 1992), un procédé respiratoire qui peut être nommé la halorespiration (Sanford *et al.* 1996). Jusqu'à présent, six microorganismes pouvant effectuer la halorespiration à partir de composés aromatiques halogénés ont été isolés (Christiansen et Ahring 1996; Cole *et al.* 1994; Gerritse *et al.* 1996; MacKiewicz et Wiegel 1998; Mohn et Tiedje 1990; Sanford *et al.* 1996; Utkin *et al.* 1994). Par contre, le microorganisme le plus étudié à date et qui peut tirer de l'énergie à partir de la déshalogénation réductrice est *Desulfomonile tiedjei* souche DCB-1, isolé par Shelton et Tiedje (1984). D'après les études de Mohn et Tiedje (1990), DCB-1 couple la déshalogénation réductrice du 3-chlorobenzoate au métabolisme de l'énergie. En effet, les chercheurs proposent que la déshalogénase est la réductase terminale d'une chaîne de transport d'électrons jusqu'à date inconnue. Cette chaîne de transport d'électrons crée une force protomotrice qui permet la synthèse de l'ATP lors de la déshalogénation réductrice (Mohn et Tiedje 1992; Ni *et al.* 1995). Un modèle a été proposé dans lequel il

y aurait un couplage chimioosmotique entre la déchloration et la synthèse d'ATP (figure 3) (Mohn et Tiedje 1992) .

2,2 Quelques exemples de déshalogénation réductrice en anaérobiose

La connaissance des voies de dégradation des contaminants environnementaux est essentielle afin de déterminer le risque environnemental de certains sites contaminés, afin de procéder à un traitement biologique ou afin de déterminer des stratégies de biorestauration efficaces (Nicholson *et al.* 1992). La prochaine section résume les voies de dégradation de certains polluants aromatiques dans l'environnement.

2,2,1 Les acides 2,4-dichlorophénoxyacétique et 2,4,5-trichlorophénoxyacétique

Les herbicides 2,4-D (2,4-dichlorophénoxyacétate) et 2,4,5-T (2,4,5-trichlorophénoxyacétate) contaminent les environnements aquatiques puisqu'ils sont solubles dans l'eau. Leur biodégradation en milieu anaérobe a fait l'objet de très peu d'études. D'après la littérature, la déchloration s'effectue via une déshalogénation réductrice. La dégradation anaérobie du 2,4-D ainsi que du 2,4,5-T, par des cultures mixtes de bactéries, a été observée dans des boues d'eaux usées (Suflita *et al.* 1984; Mikesell et Boyd 1985; Gibson et Suflita 1986), dans les sédiments d'un étang (Gibson et Suflita 1986; Bryant 1992) et dans un aquifère méthanogène (Gibson et Suflita 1986, 1990) mais n'a pu être achevée dans un aquifère sulfato-réducteur (Kuhlmann et Kaczmarzcyk 1995). Dans la majorité des cas, les chercheurs ont aussi observé l'élimination du groupe oxyacétique durant la biodégradation du 2,4-D et du 2,4,5-T. Jusqu'à présent, aucune souche pure capable de dégrader ces deux herbicides en anaérobiose n'a été isolée.

Il ne semble pas y avoir de voie générale de dégradation caractérisant ces deux herbicides. Par exemple, la figure 4 démontre la grande quantité de voies de dégradation observées par des microorganismes provenant d'un aquifère méthanogène (Gibson et Suflita 1990). La déshalogénation réductrice ou le clivage de la liaison aryl-éther peuvent être la première étape de dégradation autant pour le 2,4,5-T que pour le 2,4-D (Bryant 1992).

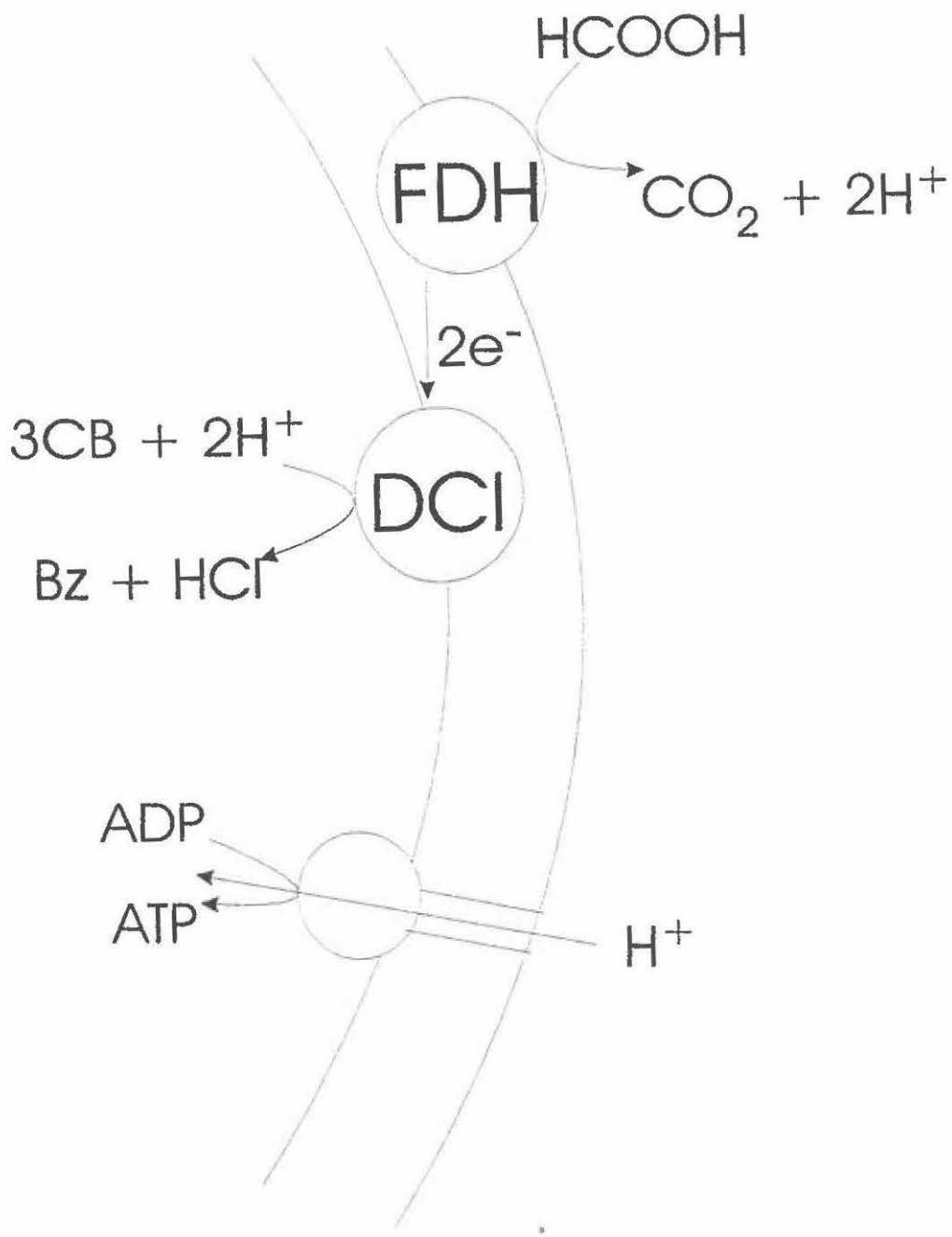


Figure 3 - Modèle respiratoire

Une force protomotrice couple la déshalogénation réductrice et la synthèse d'ATP. 3CB = 3-chlorobenzoate, Bz = benzoate, DCl = enzyme de déchloration, FDH = formate déshydrogénase. Tiré de Mohn et Tiedje (1992)

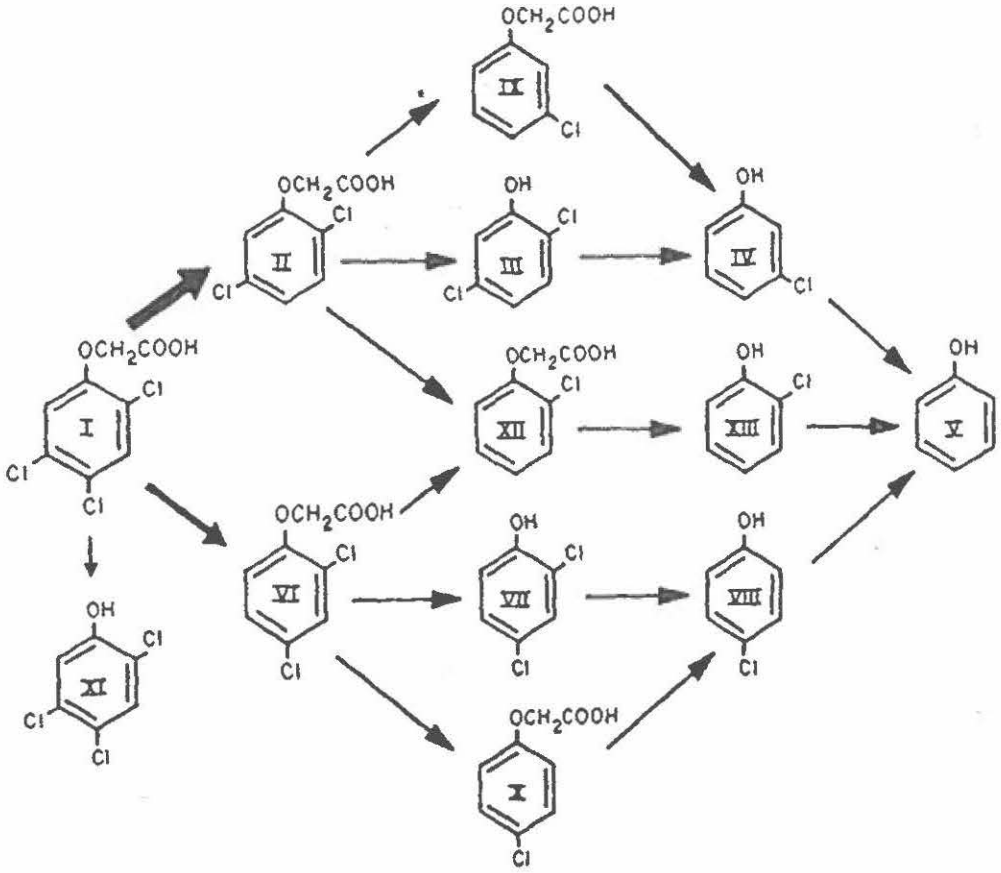


Figure 4 - Voies de dégradation du 2,4,5-T

Tiré de Gibson et Suflita (1990)

En ce qui concerne la déshalogénation, celle-ci est observée à toutes les positions (*ortho*, *para* ou *meta*), mais la déshalogénation aux positions *ortho* et *para* semble être la plus fréquente (Mikesell and Boyd 1985; Suflita *et al.* 1984; Gibson et Suflita 1990; Bryant 1992). La spécificité ainsi que la vitesse de la déshalogénation dépend aussi du composé utilisé lors de l'adaptation des microorganismes à la biotransformation (Bryant 1992).

2,2,2 Les chloroanilines

Les chloroanilines sont utilisés à grande échelle en tant que précurseurs des pesticides, des plastiques et des teintures (Struijs et Roger 1989). Ces composés peuvent s'infiltrer dans l'environnement via la dégradation de certains pesticides, tels les phénylcarbamates (Kearny et Kaufman, 1965). De plus, la réduction chimique ou biologique des teintures de type azo, des herbicides nitroaromatiques, des explosifs et des nitropyrènes peuvent provoquer la formation des chloroanilines (Weber et Wolfe, 1987; Kuhn et Suflita 1989).

La dégradation anaérobie de cette classe de composé, par des microorganismes, est presque inconnue (Kuhn et Suflita 1989). La première étude réalisée à cet égard était en 1989 par l'équipe de Kuhn et Suflita. À l'aide d'un consortium méthanogène provenant d'un aquifère pollué, ils ont pu étudier la dégradation du 2,3,4,5-tétrachloroaniline. La voie de dégradation présentée à la figure 5 indique une déshalogénation séquentielle qui débute par une déchloration en *para* et qui est suivie d'une déchloration en *ortho*. Dans une étude approfondie, Kuhn et collaborateurs (1990) ont découvert une voie mineure de dégradation du 2,3,4,5-tétrachloroaniline (figure 5). Celle-ci implique la déshalogénation du tétrachloroaniline en position *meta*. Les auteurs ne pouvaient pas expliquer cette nouvelle voie de dégradation mineure stimulée par l'addition du butyrate. Soit que le butyrate a permis l'enrichissement d'un différent groupe de microorganismes capables d'une déshalogénation en *meta* ou soit que le butyrate a permis l'induction d'un système catalytique différent. Lors d'une expérience similaire, ces mêmes auteurs ont observé l'élimination majoritaire d'un chlore en position *meta* du 2,3,4-trichloroaniline dans une expérience où le butyrate n'avait pas été ajouté (figure 5). Ils n'ont pas tenté d'expliquer la différence entre les voies de dégradation pour le 2,3,4-trichloroaniline et le 2,3,4,5-tétrachloroaniline.

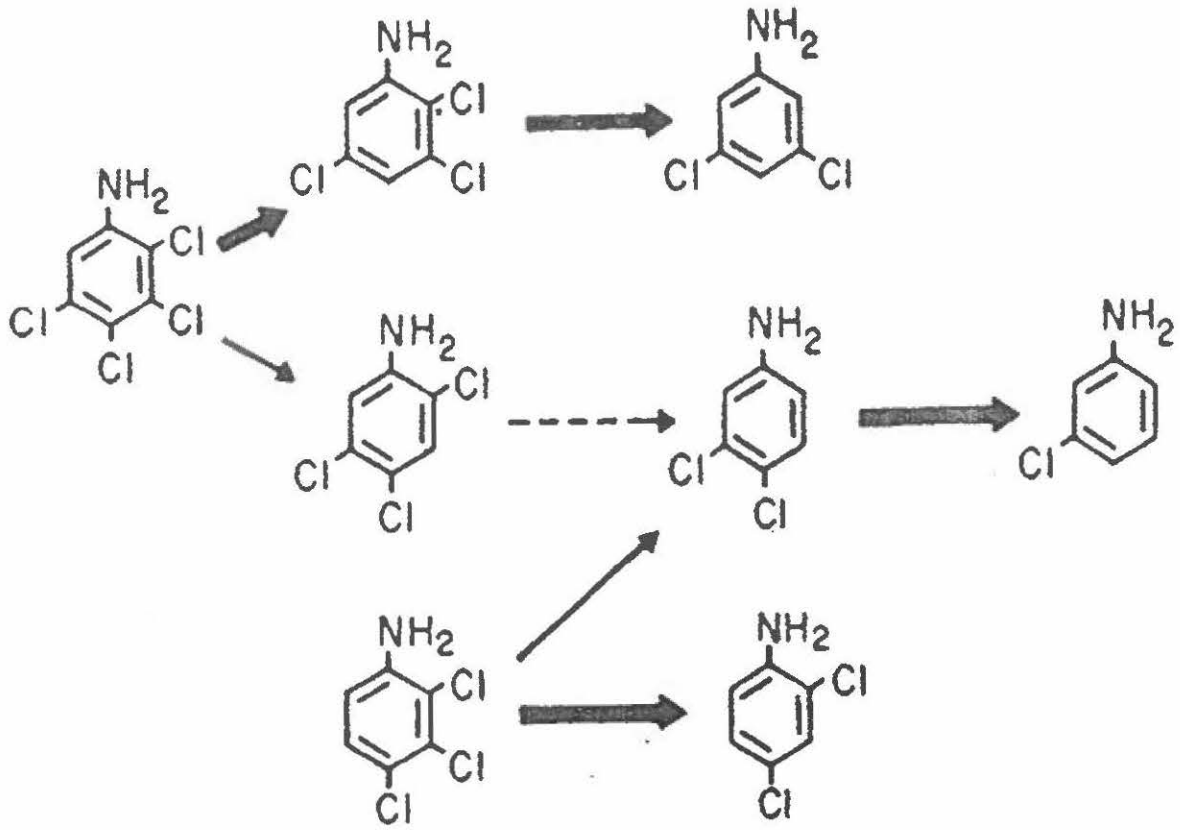


Figure 5 - Voies de dégradation du 2,3,4,5-tétrachloroaniline et du 2,3,4-trichloroaniline

Les flèches épaisses indiquent les voies de dégradation majeures. Tiré de Kuhn *et al.* (1990).

Dans une expérience parallèle, Struijs et Rogers (1989) ont pu effectuer la déchloration de plusieurs types de dichloroanilines en utilisant des sédiments anoxique provenant d'un lac. La déchloration en *ortho* et en *para* était immédiate si les sédiments étaient préalablement acclimatés à des dichlorophénols. Tous les monochloroanilines étaient récalcitrants comme dans les expériences de Kuhn *et al.* (1990) et Kuhn et Suflita (1989). Les auteurs attribuent la similarité entre les réactivités des chlorophénols et des chloroanilines à leurs caractéristiques chimiques. Par exemple, les groupements hydroxyle et amino sont tous les deux des groupes activants qui orientent en *ortho* ou *para*, les deux groupes forment des ponts hydrogène et les deux groupes ont un rayon de Van der Waals comparable. Il est donc probable que ces deux composés puissent occuper le même site catalytique.

Finalement, une étude très récente concernant la dégradation des chloroanilines a été effectuée par Susarla *et al.* 1998. Les auteurs ont examiné la transformation de plusieurs classes de composés organohalogénés ajoutés à des sédiments anoxiques estuariens en condition sulfato-réductrice. Les chloroanilines suivants ont été testés: 2-chloroaniline, 3-chloroaniline, 4- chloroaniline, 2,3-dichloroaniline, 3,4-dichloroaniline, 3,5-dichloroaniline, 3,4,5-trichloroaniline, 2,3,4,5-tétrachloroaniline, pentachloroaniline. La dégradation des composés de départ était immédiate et leur demi-vie étaient de 41 à 230 jours. La majorité des produits étaient déchlorés dans l'ordre suivant: *ortho* > *para* > *meta*. Les produits finaux de la dégradation étaient soit le 3-chloroaniline ou l'aniline. Par exemple, le pentachloroaniline était dégradé de la façon suivante: pentachloroaniline → 2,3,4,5-tétrachloroaniline → 2,3,5-trichloroaniline → 2,3-dichloroaniline + 3,5-dichloroaniline → 3-chloroaniline.

2,2,3 Les chloronitrobenzènes

Les composés nitroaromatiques sont couramment utilisés pour la synthèse de plusieurs types de composés chimiques industriels tels les pesticides, les herbicides et les teintures (Susarla *et al.* 1996). Entre autres, le pentachloronitrobenzene (PCNB) a souvent été utilisé en tant que fongicide, surtout pour le contrôle de maladies causées par *Plasmodiophora brassicae* et *Rhizoctonia solani* (Tamura *et al.* 1995). D'après Macalady et ses collaborateurs (1986), la première étape lors de la transformation ou la minéralisation de composés nitroaromatiques en milieu anaérobe serait la réduction du groupe nitro. Cette transformation peut être très rapide, comme le démontre Heijman *et*

al. (1993), lorsque le 4-chloronitrobenzène a été réduit en 4-chloroaniline en quelques minutes dans une culture d'enrichissement réduite par le Fe(III).

Peu d'études ont été réalisées qui mettent en évidence la réduction du groupement nitro ainsi que celle des atomes d'halogène sur une molécule nitroaromatique halogénée. Les deux seules études à ce sujet ont été effectuées par Susarla *et al.* (1996; 1998). A partir de sédiments anoxiques estuariens japonais, ils ont démontré la transformation de quatre chloronitrobenzènes, incluant le pentachloronitrobenzène. Ces chercheurs ont conclu que les sédiments, provenant d'un environnement sulfato-réducteur, transformaient les chloronitrobenzènes en chloroanilines en quelques jours. En effet, le temps de demi-vie des chloronitrobenzènes étaient entre 0,8 et 3,2 jours. Les chloroanilines étaient produits par une nitroréduction, le processus dominant de la transformation des chloronitrobenzènes. Subséquemment, les chloroanilines subissaient une déshalogénation réductrice en position *ortho* et *para* de façon préférentielle. La figure 6 indique la voie de dégradation du pentachloronitrobenzène et du 2,3,4-trichloronitrobenzène dans ces sédiments anaérobes.

2,2,4 Le tétrachlorovératrole, le tétrachloroguaiacol et le tétrachlorocatéchol

Les chlorovératroles, les chloroguaiacols ainsi que les chlorocatéchols se retrouvent dans les effluents provenant des usines de pâtes et papiers qui utilisent des méthodes conventionnelles de blanchissage du papier, c'est à dire avec le chlore moléculaire (Neilson *et al.* 1991). Très peu de recherches ont été effectuées au sujet de la dégradation anaérobie de ces composés.

D'après les études effectuées par des équipes de recherches suédoises (Remberger, *et al.* 1986; Neilson *et al.* 1987), le tétrachlorovératrole ainsi que le tétrachloroguaiacol étaient biotransformés à l'aide d'une flore indigène de bactéries isolées dans des sédiments anaérobes récoltés à proximité d'une usine de blanchissement. La flore transformait rapidement ces deux contaminants en tétrachlorocatéchol par l'entremise d'une O-déméthylation anaérobe, une réaction bien connue affectant une gamme de composés méthoxy aromatiques non chlorés. Par la suite, le tétrachlorocatéchol était transformé en 3,4,6-trichlorocatéchol. Des expériences avec divers chlorocatéchols en présence de différents consortiums provenant de sédiments anaérobes récoltés à proximité d'une usine de blanchissement (Neilson et al. 1987; Allard et al. 1991), indiquent que le

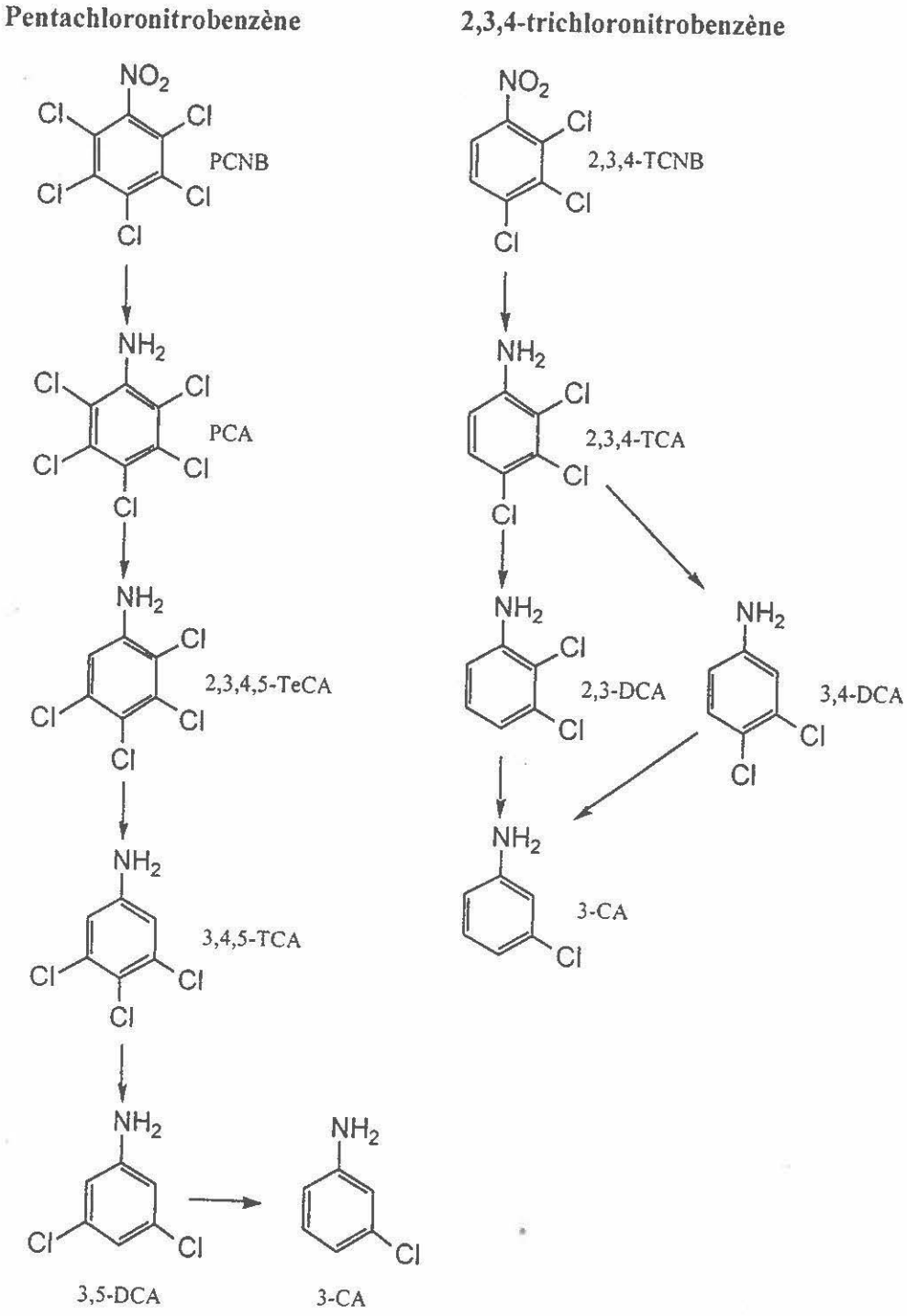


Figure 6 - Voie de dégradation du pentachloronitrobenzène et du 2,3,4-trichloronitrobenzène

Tiré de Susarla *et al.* (1996).

tétrachlorocatéchol, les trichlorocatéchols ainsi que les dichlorocatéchols sont déshalogénés lentement avec la perte de seulement un atome de chlore en position *meta* ou *para* par rapport aux groupements hydroxyles.

Une autre étude, réalisée par un groupe américain, présente des résultats très différents. À l'aide d'un réacteur UASB fonctionnant à flux continu, Woods et collaborateurs (1989) ont obtenu une déchloration importante du tétrachlorovératrole, du tétrachloroguaiacol ainsi que du tétrachlorocatéchol. Le réacteur, alimenté par un influent d'eaux usées, contenait un inoculum provenant d'un digesteur de boues d'une usine de traitement des eaux usées. Avant l'inoculation, les microorganismes étaient maintenus dans un milieu approvisionné, entre autre, par un extrait d'un effluent d'une usine de pâtes et papiers. La voie de dégradation du tétrachlorovératrole ainsi que du tétrachloroguaiacol obtenue par les microorganismes inoculés dans le réacteur est présentée à la figure 7. La transformation initiale du tétrachlorovératrole est identique à celle observée par l'équipe de Remberger *et al.*(1986): c'est-à-dire qu'après l'ajout de ce composé, il y avait une déméthylation séquentielle et rapide produisant le tétrachloroguaiacol et finalement le tétrachlorocatéchol. Suivant la déméthylation, les auteurs ont observé des intermédiaires correspondant à la déchloration séquentielle du chlorocatéchol. Le chlore en position *ortho* était éliminé en premier, suivit par la déchloration en *meta* engendrant le 4-chlorocatéchol comme produit final et récalcitrant. Il n'y avait aucune trace de catéchol comme produit de dégradation. Les microorganismes du réacteur pouvaient aussi dégrader le pentachlorophénol suivant le patron de déshalogénation du tétrachlorocatéchol, soit la déchloration en *ortho* suivit par la déchloration en *meta*, ce qui produisait le 4-chlorophénol qui était récalcitrant.

2,2,5 Les biphénylpolychlorés et les biphénylpolychlorés hydroxylés

Les biphénylpolychlorés (BPC) sont des hydrocarbures chlorés utilisés en industrie depuis le début du siècle. Ils ont des propriétés physiques avantageuses qui ont permi leur utilisation en tant qu'isolant électrique, lubrifiant, scellant liquide et retardant de flammes (Ott *et al.* 1996). Malheureusement, ces composés très stables sont toxiques et résistent à la dégradation. La production des BPC a cessé vers la fin des années 1970. Par contre, les BPC s'accumulent dans l'environnement et ont un effet néfaste sur les écosystèmes naturels. L'utilisation des microorganismes est un moyen prometteur pour éliminer ces composés qui polluent un grand nombre de sédiments terrestres et

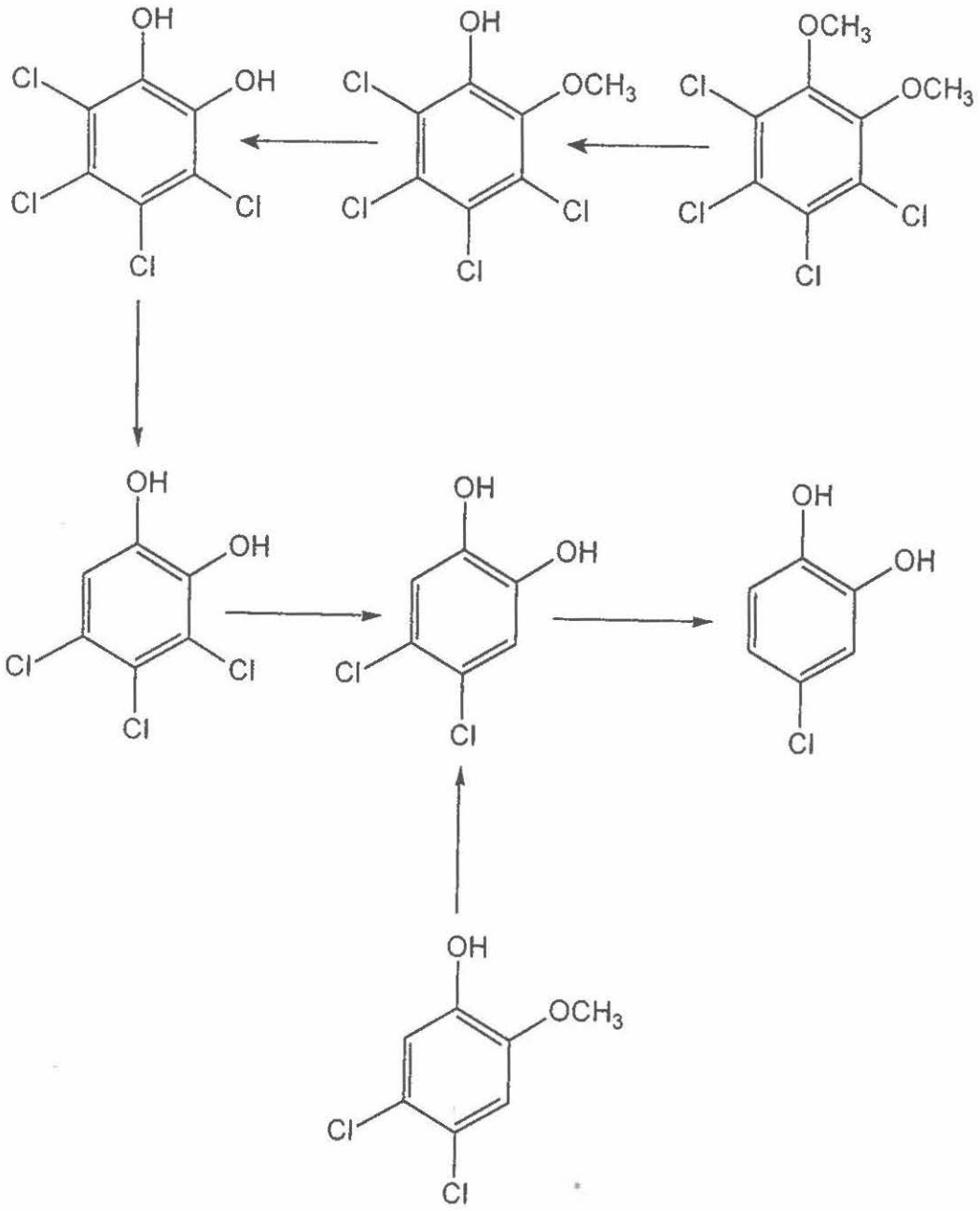


Figure 7 - Voie de dégradation du tétrachlorovératrole et du 3,4-dichloroguaiacol
Tiré de Woods *et al.* (1989)

aquatiques. Cette stratégie de biorestauration est très complexe étant donné que les BPC sont des mélanges de différents isomères. La majorité des microorganismes ont seulement la capacité de dégrader certains isomères de BPC. Plusieurs études ont mis en évidence la capacité de certaines cultures mixtes de microorganismes aérobies ainsi que certaines souches pures aérobies à dégrader des BPC. Par contre, ces microorganismes peuvent seulement s'attaquer de façon efficace à certains congénères de BPC ayant de un à quatre atomes de chlore. Les mélanges de BPC industriels ayant plus de quatre atomes de chlore demeurent récalcitrants dû à l'empêchement stérique des atomes de chlore vis à vis la 2,3-dioxygénase du biphényle qu'initie le processus oxydatif de dégradation (Aronstein *et al.* 1995).

Quelques chercheurs ont remarqué que les BPC très chlorés, ayant de six à neuf atomes de chlore, peuvent être déshalogénés en conditions anaérobies (Brown *et al.* 1987, Quensen *et al.* 1990, Wu *et al.* 1997b). Par contre, il y a des différences flagrantes dans l'étendue de la déchloration aux différents sites contaminés par les BPC. En effet, au moins six différents processus de déchloration microbiens existent. Ces processus ont été classés selon la sélectivité des catalyseurs envers les différents isomères de BPC. Cette sélectivité génère une grande gamme de produits de déchloration qui ont été observés *in situ* ainsi qu'en laboratoire (Wu *et al.* 1997a, Brown *et al.* 1987, Tiedje *et al.* 1993). La figure 8 démontre les patrons de déchloration les plus communs. Plusieurs microorganismes sont nécessaires afin d'accomplir une déshalogénation maximale des BPC. Malheureusement, aucune souche pure anaérobie ayant la capacité de déshalogéner les BPC n'a été isolée à date.

Un moyen d'accomplir non seulement une déshalogénation des BPC mais leur minéralisation complète serait de coupler un procédé anaérobie à un procédé aérobie. Cette méthode permettrait d'éliminer les BPC très chlorés et ensuite les BPC faiblement chlorés. Par contre, les produits formés par la déchloration des BPC très chlorés en anaérobiose ne sont pas toujours accessibles ou biodégradables par les microorganismes aérobies. Un autre moyen d'augmenter la biodisponibilité des BPC très chlorés aux bactéries aérobies serait d'oxyder ces composés. L'oxydation chimique des BPC permettrait d'ajouter des groupement hydroxyles à certains congénères résistants à l'attaque des oxygénases. Les oxygénases sont les premières enzymes à s'attaquer aux BPC chez les bactéries aérobies. Une telle expérience a déjà été tentée. Afin d'augmenter la biodisponibilité ainsi que le potentiel des BPC à être biodégradés,

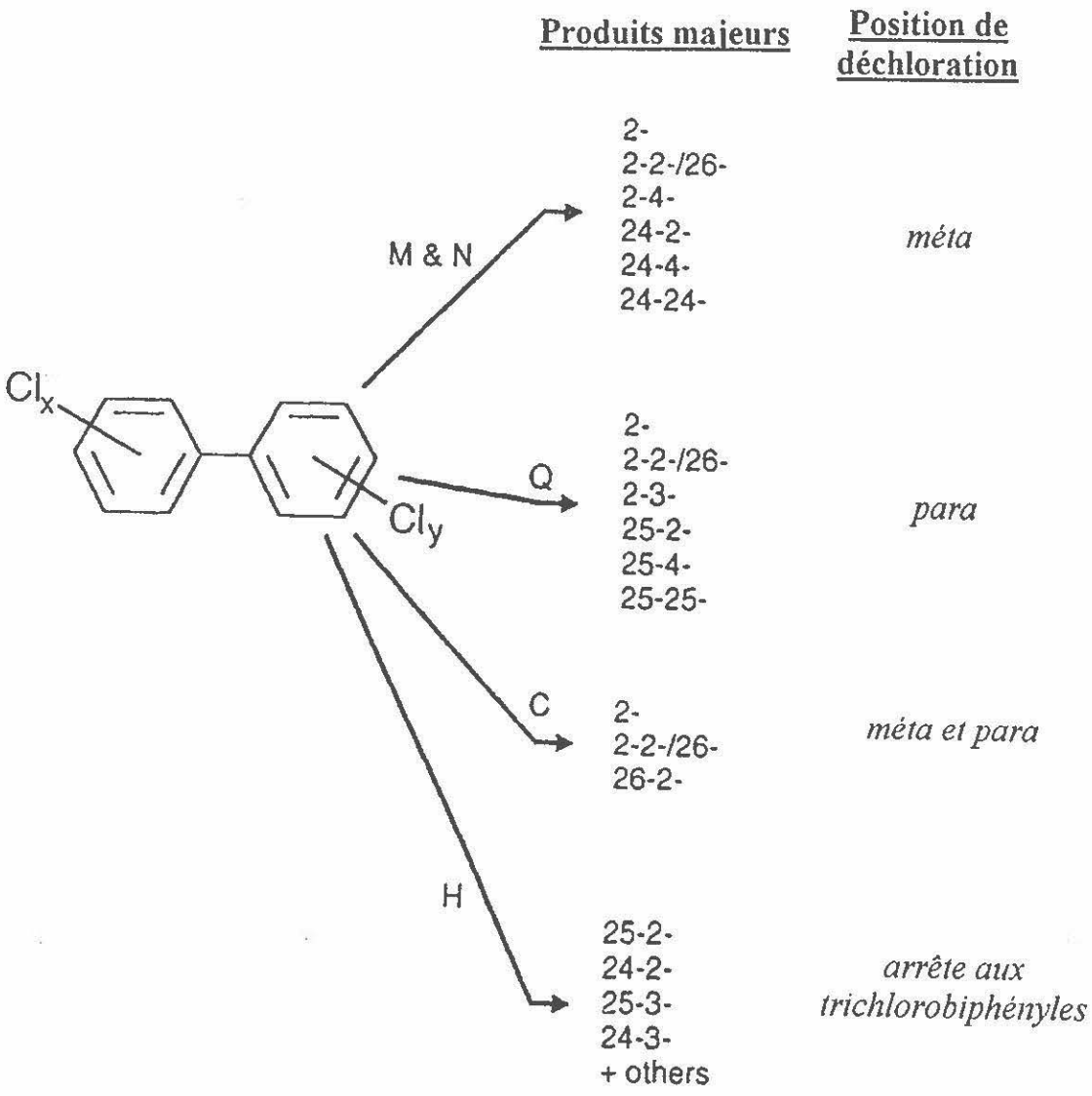


Figure 8 - Patrons de déchloration les plus communs des biphénylpolychlorés
Tiré de Tiedje *et al.* (1993)

Aronstein *et al.* (1995) présument avoir ajoutés des groupements hydroxyles à un tétrachlorobiphényle via le réactif de Fenton. En oxidant le 2,2',4,4',-tétrachlorobiphényle et ensuite en ajoutant ce produit transformé à des cultures aérobies de *Pseudomonas* souche LB400 et *Alcaligenes eutrophus* souche H850, 50% du carbone contenu dans les BPC transformés a été récolté sous forme de $^{14}CO_2$, indiquant une minéralisation partielle du polluant.

2,3 Les souches pures effectuant la déshalogénation réductrice

Les composés halogénés aromatiques sont des polluants importants. Afin de mieux comprendre le destin de ces molécules dans l'environnement et afin de développer des techniques efficaces de biorestauration qui peuvent nettoyer les sols et les cours d'eau pollués, l'information concernant la physiologie et la biologie des organismes qui peuvent dégrader ces polluants est d'importance primordiale (Townsend et Suflita 1996).

La déshalogénation réductrice vis à vis une grande gamme de composés ayant un noyau benzénique a été démontrée dans plusieurs sols et sédiments anoxiques. Par contre, peu d'études ont été consacrées à la biologie des bactéries responsables de la catalyse de ces transformations. Il est très difficile d'obtenir et de faire croître les bactéries anaérobies en culture pure. Jusqu'à présent, seulement sept bactéries ont été identifiées et six de ces sept bactéries ont été identifiées seulement depuis 1992. L'organisme qui a reçu le plus d'attention est la souche DCB-1 qui a été isolée en 1984 par l'équipe de Shelton et Tiedje et nommé *Desulfomonile tiedjei* par DeWeerd et collaborateurs en 1990. Une deuxième bactérie isolée, la souche 2CP-1, est fortement apparentée à *D. tiedjei* et est un membre de la classe *proteobacteria*, tout comme cette dernière (Cole *et al.* 1994). Les cinq autres bactéries isolées font partie d'un nouveau genre bactérien, soit *Desulfitobacterium* sp., et chaque espèce a été isolée par un différent groupe de chercheurs: la souche DCB-2 dénommée *Desulfitobacterium hafniense* (Madsen et Licht 1992; Christiansen et Ahring 1996), *Desulfitobacterium dehalogenans* (Utkin *et al.* 1994), *Desulfitobacterium* sp. souche PCE1 (Gerritse *et al.* 1996), *Desulfitobacterium chlororespirans* (Sanford *et al.* 1996) et *Desulfitobacterium frappieri* souche PCP-1 (Bouchard *et al.* 1996).

2,3,1 *Desulfomonile tiedjei* souche DCB-1

Desufomonile tiedjei est un bâtonnet sulfato-réducteur, Gram négatif, anaérobie strict, non-sporulant et qui n'est pas mobile (DeWeerd *et al.* 1990; Shelton et Tiedje 1984). Par l'entremise d'une déshalogénation réductrice, la bactérie peut utiliser le 3-chlorobenzoate, en tant qu'accepteur d'électrons, comme seule source de carbone et d'énergie (Shelton et Tiedje 1984). En effet, *D. tiedjei* couple la dégradation du 3-chlorobenzoate en benzoate à la production d'ATP pour subvenir à ses besoins énergétiques (Dolfing 1990; Mohn et Tiedje 1990; Mohn et Tiedje 1991). Le spectre d'activité de la bactérie envers les substrats halogénés est large mais tous les substrats qui sont réduits ne peuvent mener à la formation d'ATP (Mohn et Kennedy 1992).

Le spectre d'activité de *D. tiedjei* a été élucidé (DeWeerd *et al.* 1986; DeWeerd et Suflita 1990; Griffith *et al.* 1992; Linkfield et Tiedje 1990; Mohn et Kennedy 1992). La revue par Mohn et Tiedje (1992) résume ces résultats. La figure 9a illustre la variété de substrats aromatiques auxquels la bactérie peut s'attaquer. Plusieurs substrats nécessitent la présence de 3-chlorobenzoate en tant qu'inducteur. Par contre, plusieurs autres composés peuvent induire la déshalogénation réductrice (figure 9b). L'inducteur doit avoir un substituent en position *meta* mais la déshalogénation peut avoir lieu sur les substituents en position *meta* ainsi qu'en position *ortho* et *para* (Mohn et Tiedje 1992). Mohn et Kennedy (1992) ont aussi testé l'activité de la bactérie envers différents chlorophénols (tableau 1). *D. tiedjei* peut seulement effectuer une déshalogénation en postion *meta* et en présence d'un inducteur. Par contre, la bactérie ne peut agir sur le 3-chlorophénol même si la structure de celui-ci est analogue à celle de 3-chlorobenzoate.

Finalement, l'enzyme qui catalyse la déshalogénation réductrice du 3-chlorobenzoate, soit une déshalogénase aromatique (Shuisong *et al.* 1995), peut effectuer une déshalogénation réductrice aliphatique du perchloroéthylène (PCE) (Townsend et Suflita 1996). Des tests avec des extraits cellulaires de *D. tiedjei* démontrent que le PCE est déchloré et produit le trichloroéthylène et le dichloroéthylène. De plus, des expériences avec le trichloroéthylène ont démontré que la bactérie peut déchlorer ce composé en *cis*-dichloroéthylène de façon majoritaire. Par contre, des traces de *trans*-dichloroéthylène et de 1,1-dichloroéthylène étaient aussi présents dans le milieu de culture.

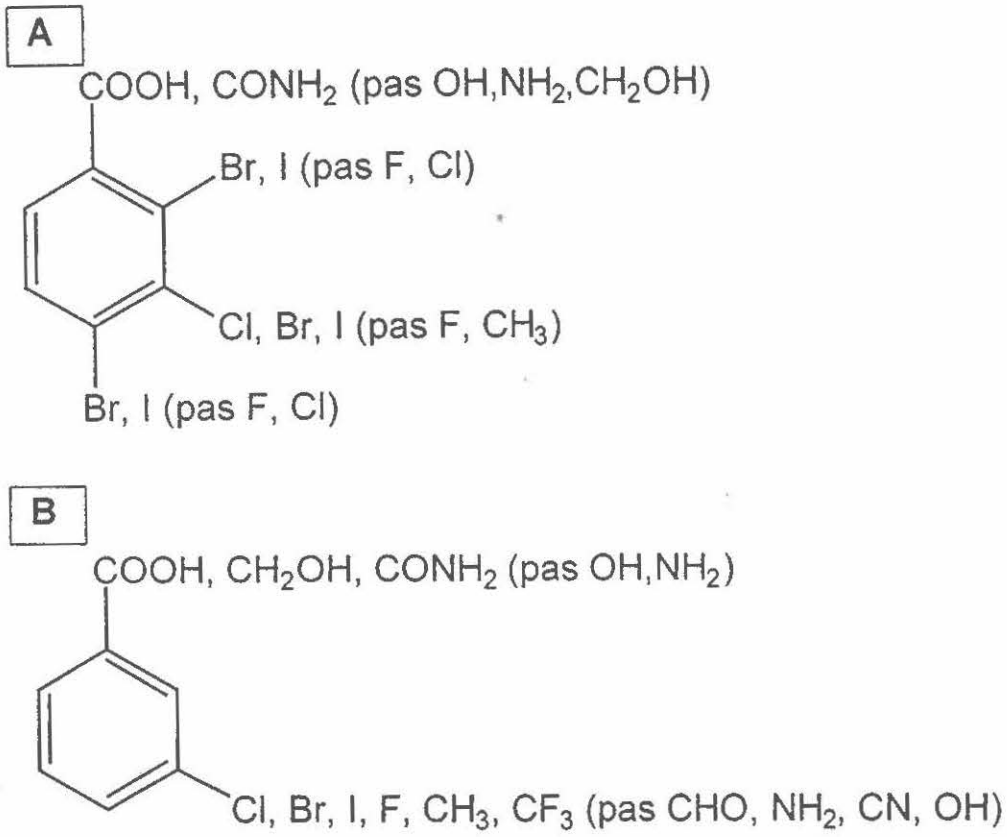


Figure 9 - La déshalogénation réductrice chez *Desulfomonile tiedjei*

(A) les substrats monohalogénés pouvant subir une déshalogénation réductrice (un des substituents à la position C1 doit être présent pour que la déshalogénation ait lieu), (B) les inducteurs de la déshalogénation réductrice (un des substituent présent à la position C1 et à la position C3 est nécessaire pour que l'induction ait lieu). Tiré de Mohn et Tiedje (1992).

Tableau 1 - Déshalogénation des chlorophénols à partir de suspensions cellulaires de *D. tiedjei*

Substrats	Produits
pentachlorophénol	2,4,6-trichlorophénol
2,3,4,6-tétrachlorophénol	2,4,6-trichlorophénol
2,3,5,6-tétrachlorophénol	2,3,6-trichlorophénol, 2,6-dichlorophénol
2,3,4-trichlorophénol	2,4-dichlorophénol
2,3,5-trichlorophénol	2,3-dichlorophénol, 2-chlorophénol
2,3,6-trichlorophénol	2,6-dichlorophénol
2,4,5-trichlorophénol	2,4-dichlorophénol
2,4,6-trichlorophénol	-
2,3-dichlorophénol	2-chlorophénol
2,4-dichlorophénol	-
2,5-dichlorophénol	2-chlorophénol
2,6-dichlorophénol	-
3,4-dichlorophénol	4-chlorophénol
3,5-dichlorophénol	3-chlorophénol
2-chlorophénol	-
3-chlorophénol	-
4-chlorophénol	-

Une étude importante effectuée par Dolfing et Tiedje (1991) a tentée d'établir une relation entre la structure et l'activité en mesurant l'effet de différents substituents sur la vitesse de déshalogénation des analogues du 3-chlorobenzoate. Ils ont constaté que différents substituents (amino, hydroxyle, chloro et méthyle) affectaient la déshalogénation mais que les résultats ne suivaient pas le modèle général de la structure et de l'activité tel que prédit par l'équation d'Hammett. Les auteurs ont conclu que les substituents affectent non seulement la réactivité du substrat, mais aussi leur transport dans la cellule et leur capacité de s'intégrer dans le site catalytique de l'enzyme. Il est donc très difficile de prédire la réactivité du substrat et de l'enzyme envers un substrat lors d'une déshalogénation réductrice en considérant seulement la structure chimique.

2,3,2 Souche *2CP-1*

La souche 2CP-1 a fait l'objet d'une étude par Cole et collaborateurs (1994). La souche 2CP-1 comme est un bâtonnet Gram négatif, anaérobie facultatif, non-motile et non-sporulant. La bactérie appartient à la classe des *Proteobacteria* tout comme *D. tiedjei* mais appartient plutôt à l'embranchement des myxobactéries alors que *D. tiedjei* appartient au groupe de bactéries sulfato-réductrices.

Tout comme *D. tiedjei*, la souche 2CP-1 semble pouvoir retirer de l'énergie à partir de la déchloration du 2-chlorophénol (2-CP) en utilisant ce dernier comme accepteur d'électrons. En effet, la bactérie peut déchlorer 100 µM de 2-CP en 6 heures. Par contre, son spectre d'activité est très limité. Le tableau 2 indique le spectre d'activité de cette souche. Elle peut catalyser la déshalogénation en position *ortho* seulement. La présence de chlores en position *meta* et *para* diminue ou inhibe la déchloration en *ortho*. Finalement, la réaction de déchloration en *ortho* est inductible.

Tableau 2 - Spectre d'activité de la souche 2CP-1

Substrats	Produits
2-chlorophénol	phénol
3-chlorophénol	-
4-chlorophénol	-
2,3-dichlorophénol	-
2,4-dichlorophénol	-
2,5-dichlorophénol	3-chlorophénol
2,6-dichlorophénol	2-chlorophénol, phénol
pentachlorophénol	-

2,3,3 *Desulfitobacterium dehalogenans*

En 1994, Utkin et collaborateurs ont isolé et caractérisé une bactérie appartenant à un nouveau genre bactérien. Ce genre, *Desulfitobacterium*, appartient au sous-phylum des *Desulfotomaculum - Clostridium*. La bactérie est très apparentée à l'espèce *Desulfotomaculum orientis* mais ne fait pas partie de ce genre puisqu'elle ne peut pas réduire le soufre. Utkin *et al.* (1994) ont nommé l'espèce isolée *Desulfitobacterium dehalogenans*. Cette bactérie est un bâtonnet de type Gram positif, anaérobie stricte, mobile et thermostable mais qui ne produit pas de spores. La bactérie est caractérisée par le fait qu'elle ne peut croître sur un milieu solide contenant 1,0 à 1,5% d'agar. La croissance est observée seulement si le milieu est constitué de 0,6 à 0,9% d'agar mou. En étudiant les accepteurs d'électrons utilisés par *D. dehalogenans*, MacKiewicz et Wiegel (1998) ont démontré qu'il y avait une augmentation de la biomasse lorsque le le formate sert de donneur d'électrons et que le 3-chloro-4-hydroxyphénylacétate (3-Cl-4-OHPA) sert d'accepteur final d'électrons. La souche tire donc de l'énergie à partir de la déshalogénation réductrice du 3-Cl-4-OHPA. Des expériences de compétitions où différents accepteurs d'électrons étaient présents dans une seule culture ont indiqué que *D. dehalogenans* peut utiliser le nitrate et le 3-Cl-4-OHPA simultanément pour croître.

Le fumarate ainsi que le sulfite ont aussi été réduits mais seulement lorsque la concentration du 3-Cl-4-OHPA était suffisamment diminuée.

Utkin et collaborateurs (1994, 1995) ont aussi étudié le spectre d'activité de la bactérie envers des analogues du 3-Cl-4-OHPA. Les résultats présentés à la figure 10a et b montrent qu'en présence de l'inducteur 3-Cl-4-OHPA, *D. dehalogenans* peut une déshalogéner une grande gamme de composés chlorés et bromés mais ce, seulement en position *ortho*. Par exemple, la bactérie peut s'attaquer à une gamme de chlorophénols, tel qu'indiqué à la figure 10a, seulement si ceux-ci possèdent un atome de chlore en position *ortho*. De plus, seuls les composés portant un substituants en position *para* peuvent subir une déshalogénation de la position *ortho*. La déchloration d'analogues du 2-chlorophénol substitués en position 4 (figure 10b) peut s'effectuer indépendamment de l'hydrophobicité, de la grosseur ou de l'effet électroattracteur ou électrodonneur du subsituent en position 4.

Utkin et collaborateurs (1995) ont donc tenté d'établir une relation quantitative entre la structure du substrat et son activité. Ils ont testé la corrélation entre la constante de vitesse de déchloration et différents substituents en position 4 d'analogues du 2-chlorophénol. Ils ont étudié le descripteur électronique (Hammet σ_m), le descripteur hydrophobique (π) et le descripteur stérique (E_s). Les chercheurs ont seulement observé des tendances pour les descripteurs stérique et électronique. Ceux-ci indiquent qu'il y aurait une faible corrélation entre la vitesse de déshalogénation et la grosseur et la disposition électronique du substituent. Il semblerait que plus le substituent est gros et électroaccepteur, plus la vitesse de déshalogénation du chlore en position *ortho* sera lente. Utkin *et al.* (1995) affirment que ce type d'étude peut aider à prédire la vitesse de déchloration de divers analogues des composés phénolés chlorés mais ne permet pas d'élucider le mécanisme de la déshalogénation. Celui-ci peut dépendre, entre autre, de la diffusion du substrat ainsi que de la présence d'isoenzyme, facteurs qui peuvent affecter les vitesses de déshalogénation observées lors de cette étude. Cette conclusion a aussi été émise par Dolfing et Tiedje (1991) lors d'expériences similaires avec *Desulfomonile tiedjei*. Les deux groupes de chercheurs suggèrent que les relations entre la structure et l'activité d'un substrat doivent être évalués à l'aide d'une déshalogénase purifiée.

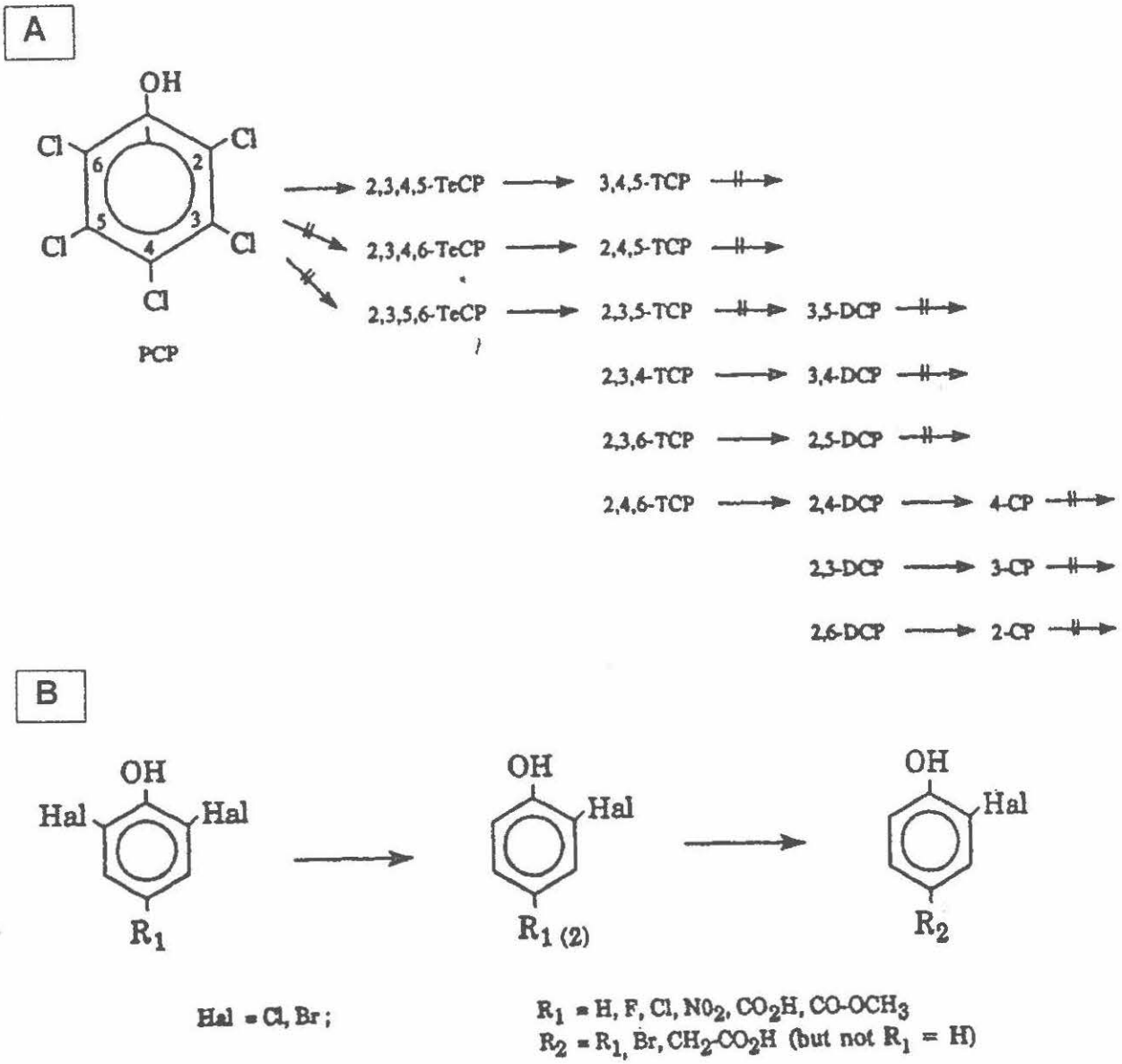


Figure 10 - Voies de dégradation des phénols halogénés chez *Desulfitobacterium dehalogenans*

(A) déshalogénation des chlorophénols et (B) déshalogénation des analogues du 2,6-dihalogénophénol et du 2-halogénophénol. Tiré de Utkin *et al.* (1995).

2,3,4 *Desulfitobacterium hafniense* souche DCB-2

En 1992, Madsen et Licht ont isolé une bactérie, qu'ils ont nommé la souche DCB-2, dotée d'une capacité de déshalogénation réductrice de quelques chlorophénols. Christiansen et Ahring (1996) ont identifié cette bactérie et l'ont nommé *Desulfitobacterium hafniense*. La souche DCB-2 est un bâtonnet de type Gram positif, qui est anaérobie stricte, mobile et sporulant. Ces chercheurs ont démontré clairement que la bactérie peut croître et donc produire de l'énergie en utilisant le 3-chloro-4-hydroxyphénylacétate comme accepteur final d'électrons. Le spectre d'activité de la bactérie (tableau 3) est assez limité. *D. hafniense* peut déchlorer les composés portant un atome de chlore en position *ortho* et peut aussi déchlorer quelques molécules en position *meta*. Par contre, aucune élimination en *para* a pu être observée.

Tableau 3 - Spectre de déshalogénation chez *Desulfitobacterium hafniense*

Substrats	Produits
3-chloro-4-hydroxyphénylacétate	4-hydroxyphénylacétate
pentachlorophénol	2,3,4,5-tétrachlorophénol, 3,4,5-trichlorophénol
2,4,5-trichlorophénol	3,4-dichlorophénol
2,4,6-trichlorophénol	2,4-dichlorophénol, 4-chlorophénol
3,4,5-trichlorophénol	-
2,4-dichlorophénol	4-chlorophénol
3,5-dichlorophénol	3-chlorophénol
2-chlorophénol	-
3-chlorophénol	-
4-chlorophénol	-

2,3,5 *Desulfitobacterium* sp. souche PCE1

Gerritse *et al.* (1996) a isolé, à partir d'un inoculum provenant d'un sol contaminé en chloroéthylènes, une nouvelle espèce bactérienne fortement apparenté à *Desulfitobacterium dehalogenans*. Ils l'ont nommé *Desulfitobacterium* sp. souche PCE1 à cause de son pouvoir à dégrader le tétrachloroéthylène (PCE). La bactérie est un bâtonnet de type Gram positif, anaérobie stricte, mobile mais non-sporulant. Lorsque le lactate sert de source de carbone et de donneur d'électrons, le PCE agit comme accepteur d'électrons et permet la croissance du microorganisme. Le déshalogénation réductrice du PCE donne le trichloroéthylène (TCE) comme produit de dégradation, ainsi que des

quantités minimes du *cis* -1,2-dichloroéthylène et le *trans* -1,2-dichloroéthylène. La souche PCE1 est la seule espèce dans le genre *Desulfitobacterium* qui peut retirer de l'énergie en effectuant une déshalogénation réductrice du PCE. Par contre, il existe deux autres bactéries qui possèdent cette caractéristique: soit *Dehalospirillum multivorans* (Schotz-Maramatsu *et al.* 1995) et *Dehalobacter restrictus* (Holliger et Schumacher 1994).

Les chercheurs ont analysé la capacité de la souche PCE-1 à utiliser d'autres composés chlorés aromatiques et aliphatiques comme accepteurs d'électrons (tableau 4). Ils ont constaté que la déchloration s'effectuait toujours en position *ortho*. Les composés transformés étaient des chlorophénols divers ainsi que le 3-Cl-4-OHPA. Par contre, la souche PCE1 ne pouvait pas s'attaquer aux différents chlorobenzoates, au pentachlorophénol et à plusieurs autres composés chlorés. Les chercheurs n'ont pas testé la dégradation de ces substrats par co-métabolisme.

Tableau 4 - Spectre d'activité de la souche PCE1

Accepteur d'électron	Produits de dégradation
tétrachloroéthylène	trichloroéthylène
2,4,6-trichlorophénol	2,4-dichlorophénol, 4-chlorophénol
2-chlorophénol	phénol
3-chloro-4-hydroxyphénylacétate	4-hydroxyphénylacétate
2,5-dichlorobenzoate	-
3,4-dichlorobenzoate	-
2,3,6-trichlorobenzoate	-
trichloroacétate	-
trichloroéthylène	-
trans -1,2-dichloroéthylène	-
cis- 1,2-dichloroéthylène	-
trichlorométhane	-
dichlorométhane	-
hexachloroéthane	-
pentachlorophénol	-
4-chlorophénylacétate	-

2,3,6 *Desulfitobacterium chlororespirans* souche Co23

Desulfitobacterium chlororespirans est un microorganisme très similaire à tous les autres bactéries de ce genre. Isolé et caractérisé par Sanford *et al.* (1996), ce bâtonnet de type Gram positif est un anaérobie stricte, motile et sporulant. La bactérie est surtout caractérisée par la grande variété de substrats qu'elle peut utiliser comme accepteur

d'électrons afin de permettre la halorespiration (tableau 5). Le microorganisme effectue la déchloration seulement en position *ortho*.

Des expériences effectuées avec des extraits cellulaires (Löffler *et al.* 1996) indiquent que l'enzyme de déshalogénation de *D. chlororespirans* a un spectre d'activité assez large et peut enlever, en position *ortho*, les chlores présents sur plusieurs chlorophénols (tableau 6).

2,3,7 *Desulfitobacterium frappieri* souche PCP-1

En utilisant un consortium anaérobe obtenu à partir de sols contaminés en pentachlorophénol, Juteau et collaborateurs (1995a) ont étudié la dégradation, par fermentation méthanogène, de ce polluant. L'enrichissement du consortium a été effectué dans un bioréacteur à alimentation continue. Celui-ci pouvait dégrader jusqu'à 99% du pentachlorophénol lors de l'ajout de 16 mg de pentachlorophénol/L/jour et un temps de rétention hydraulique de 0,7 jour. Dans le bioréacteur, le consortium méthanogène pouvait complètement minéraliser le pentachlorophénol. Les métabolites principaux étaient le 2,3,5,6-tétrachlorophénol, le 2,3,5-trichlorophénol, le 3,5 dichlorophénol, le 3-chlorophénol et finalement le phénol. Les acétogènes et les méthanogènes complétaient la réaction en produisant le CO_2 et le CH_4.

Des études ultérieures (Juteau *et al.* 1995b) ont démontré que suite à un traitement à la chaleur, seule la dégradation du pentachlorophénol au 3-chlorophénol a pu être observée. De plus, l'ajout de l'acide bromoéthane sulfonique (BESA), un inhibiteur de bactéries méthanogènes, avait inhibé la dégradation du 3-chlorophénol mais la dégradation du pentachlorophénol au 3-chlorophénol n'était nullement affectée. Ces résultats indiquaient que les bactéries s'attaquant au pentachlorophénol étaient sporulantes et non-syntrophes. Par contre, les bactéries effectuant la minéralisation du 3-chlorophénol étaient probablement des acétogènes syntrophes ainsi que des méthanogènes.

Tableau 5 - Spectre d'activité chez *Desulfitobacterium chlororespirans*

Accepteur d'électron testé	Produits de déchloration	Croissance
2-chlorophénol		-
3-chlorophénol		-
4-chlorophénol		-
2-fluorophénol		-
2-bromophénol		-
2-iodophénol		-
2,3-dichlorophénol	3-chlorophénol	+
2,4-dichlorophénol		-
2,5-dichlorophénol		-
2,6-dichlorophénol	2-chlorophénol	+
2,4,6-trichlorophénol	4-chlorophénol	+
2,4,5-tribromophénol	4-bromophénol	+
2,3,5-trichlorophénol		-
pentachlorophénol		-
3-chloro-4-hydroxybenzoate	4-hydroxybenzoate	+
3-chlorobenzoate		-
3-chloro-4-hydroxyphénylacétate	4-hydroxyphénylacétate	+
3-chloro-L-tyrosine		-
3-chloroanisaldehyde		-

Tableau 6 - Substrats déshalogénés par les extraits membranaires de *D. chlororespirans**

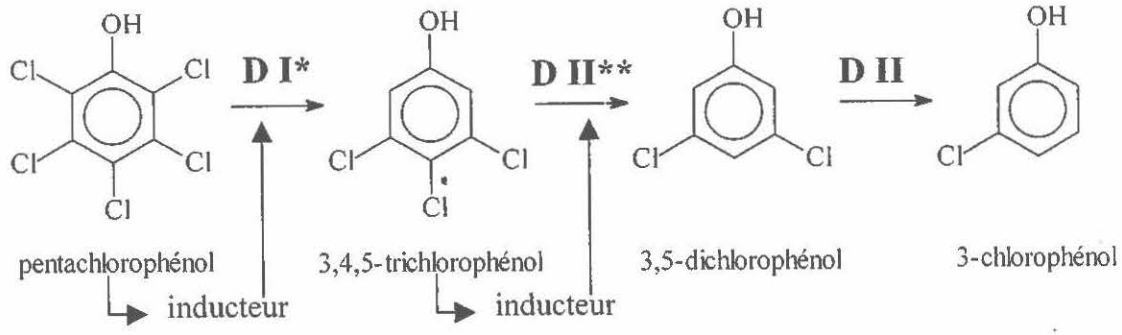
Substrats	Produits
3-chloro-4-hydroxybenzoate	4-hydroxybenzoate
3,5-dichloro-4-hydroxybenzoate	3-chloro-4-hydroxybenzoate, 4-hydroxybenzoate
3-chloro-4-hydroxyphénylacétate	4-hydroxyphénylacétate
2,3-dichlorophénol	3-chlorophénol
2,4-dichlorophénol	4-chlorophénol
2,6-dichlorophénol	2-chlorophénol
2,3,4-trichlorophénol	3,4-dichlorophénol
2,3,5-trichlorophénol	3,5-dichlorophénol
2,4,6-trichlorophénol	2,4-dichlorophénol, 4-chlorophénol
2,3,4,5-tétrachlorophénol	3,4,5-trichlorophénol
2,3,4,6-tétrachlorophénol	2,4,5-trichlorophénol
2,3,5,6-tétrachlorophénol	2,3,5-trichlorophénol, 3,5-dichlorophénol
pentachlorophénol	2,3,4,5-tétrachlorophénol, 3,4,5-trichlorophénol

* reproduit à partir de Löffler *et al.* (1996)

Finalement, en 1996, Bouchard *et al.* ont isolé la bactérie responsable de l'activité de déshalogénation dans le consortium méthanogène décrit ci-dessus. En appliquant un traitement à la chaleur, en effectuant des dilutions séquentielles en présence de pentachlorophénol et en récoltant la fraction la plus diluée qui présentait encore une activité de déchloration, ils ont isolé une souche bactérienne pouvant croître sur l'agar Columbia, un milieu solide anaérobie. D'autres expériences ont démontré que le pH et la température optimal pour la croissance étaient de 7,2 et 38°C, respectivement. L'organisme était anaérobie stricte, mobile et sporulant. À l'aide de l'analyse génétique du gène ribosomal 16S, les chercheurs ont démontré que cette nouvelle bactérie appartenait au genre *Desulfitobacterium* et possédait un niveau de similarité de 96,8% avec la souche *Desulfitobacterium dehalogenans*. Ces résultats ont suggéré que la bactérie, jusqu'alors nommée la souche PCP-1, était une nouvelle espèce bactérienne qu'ils ont nommé *Desulfitobacterium frappieri*.

L'analyse de l'activité de déchloration était très intéressante. La voie de déchloration de la souche PCP-1 est présentée à la figure 11a. L'analyse de la cinétique de la déchloration du pentachlorophénol a révélé la présence de deux systèmes enzymatiques (figure 11b). Le premier système enzymatique, que l'on nomma déshalogénase I, pouvait effectuer la déchloration en position *ortho* et transformait rapidement le pentachlorophénol en 3,4,5-trichlorophénol. Après une période de latence de 36 heures, ce trichlorophénol était transformée en 3,5-chlorophénol et finalement en 3-chlorophénol. Le 3,4,5-trichlorophénol induisait le deuxième système de déshalogénase (II), qui dégrade en *para* et en *meta* pour produire le 3-chlorophénol comme métabolite final. Il reste encore à définir si cette bactérie peut tirer de l'énergie, c'est-à-dire, produire de l'ATP à partir de la déshalogénation réductrice du pentachlorophénol.

La souche PCP-1 est la première bactérie anaérobie qui peut effectuer une déshalogénation réductrice en position *ortho, meta* et *para* et qui peut dégrader le pentachlorophénol jusqu'au 3-chlorophénol. Par contre, la déshalogénation en position *para* ne peut seulement s'effectuer que si il y a des atomes de chlore aux deux positions *meta*. Bouchard *et al.* (1996) et Gladu (1997) ont démontré que la souche PCP-1 a un spectre d'activité très large (tableau 7). Par contre, tous les composés testés ne peuvent induire les enzymes nécessaires à la déshalogénation.



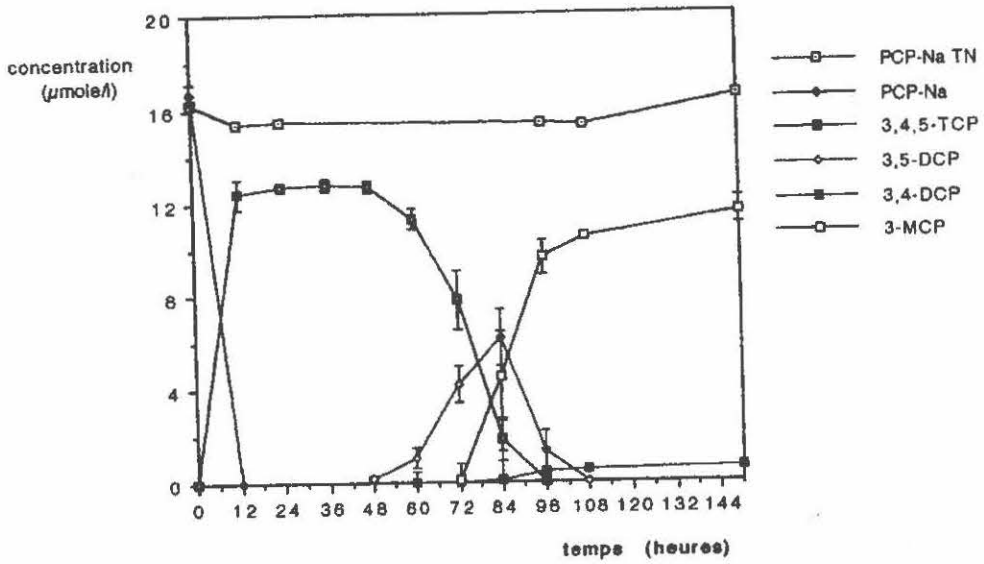


Figure 11 - Métabolisme du pentachlorophénol chez *Desulfitobacterium frappieri*

(A) Voie de dégradation proposée du pentachloropénol, *D I = déshalogénase I; **D II = déshalogénase II; (B) Cinétique de déchloration du pentachlorophénol (tiré de Bouchard 1995).

Tableau 7 - Spectre d'activité chez *Desulfitobacterium frappieri*

Substrats	Produits	Inducteur de l'activité de déshalogénation
2,3,4,5-tétrachlorophénol	3,4,5-trichlorophénol, 3,5-dichlorophénol, 3-chlorophénol	N.D*.
2,3,5,6-trichlorophénol	2,3,5-trichlorophénol, 3,5-dichlorophénol, 3-chlorophénol	N.D.
2,3,4-trichlorophénol	3,4-dichlorophénol	+
2,3,5-trichlorophénol	2,5-dichlorophénol	-
2,3,6-trichlorophénol	2,5-dichlorophénol	N.D.
2,4,5-trichlorophénol	3,4-dichlorophénol	N.D.
2,4,6-trichlorophénol	2,4-dichlorophénol, 4-chlorophénol	+
3,4,5-trichlorophénol	3,5-dichlorophénol, 3-chlorophénol	+
2,6-dichlorophénol	2-chlorophénol	-
2,4-dichlorophénol	4-chlorophénol	-
3,5-dichlorophénol	3-chlorophénol	+
2,3-dichlorophénol	-	-
2,5-dichlorophénol	-	-
3,4-dichlorophénol	-	-
2-chlorophénol	-	-
3-chlorophénol	-	-
4-chlorophénol	-	-
2,4,6-tribromophénol	2,4-dibromophénol, 4-bromophénol	+
2,4,6-trifluorophénol	-	-
2,3,5-trifluorophénol	-	-
2,4,6-trichlorobenzoate	-	-
2,3,5-trichlorobenzoate	-	-
3,5-dichloro-4-hydroxybiphényle	3-chloro-4-hydroxybiphényle	N.D.
3,5-dichloro-2-hydroxybiphényle	-	-
tetrachloroéthylène	trichloroéthylène	N.D.

*N.D. = non-déterminé

2,4 Conclusion

La déshalogénation réductrice de composés aromatiques organochlorés présente une option intéressante pour la biorestauration des sites contaminés par des polluants ou des déchets toxiques. L'étude des microorganismes dotés de la capacité d'effectuer cette réaction est essentielle afin d'être exploitée à des fins de biorémédiation. De plus, elle sert aussi à étendre nos connaissances, encore limitées, sur l'écologie, la physiologie et la phylogénie des organismes capables d'effectuer cette réaction singulière (Mohn et Tiedje 1992).

Ce projet de recherche a pour but d'étudier la capacité de *Desulfitobacterium frappieri* souche PCP-1 à effectuer la déshalogénation réductrice d'une grande gamme de composés organiques aromatiques. Les résultats obtenus à ce jour par Bouchard *et al.* (1996) et Gladu *et al.* (1997), indiquent que la souche a un grand potentiel de déshalogénation envers plusieurs composés organochlorés. L'objectif premier de cet étude sera d'analyser le spectre d'activité de la souche PCP-1 envers des polluants et des molécules analogues au pentachlorophénol. Les résultats de ces travaux vont permettre de mieux comprendre le mécanisme de déshalogénation chez *D. frappieri* et d'évaluer le potentiel de cette souche pour la biorestauration de sites contaminés.

APPROCHE EXPÉRIMENTALE

3,1 Provenance de la souche bactérienne

Desulfitobacterium frappierri souche PCP-1 a été isolée par Bertrand Bouchard (Bouchard *et al.* 1995).

3,2 Détermination du spectre d'activité de déshalogénation de la souche PCP-1 envers différents composés aromatiques

Plusieurs composés ont été testés dans cette étude. La figure 12 indique la structure et le nom des composés purs testés et la figure 13 indique les différents mélanges de BPC hydroxylés testés. Chacun de ces produits était ajouté à une culture de la souche PCP-1 dont les cellules étaient en croissance exponentielle. Les protocoles ont été établis de façon à préciser l'influence des inducteurs connus des deux systèmes de déshalogénation de la souche PCP-1 sur son spectre d'activité de déshalogénation envers les différents composés aromatiques. Pour quantifier la disparition des substrats ajoutés et identifier les métabolites, les techniques analytiques suivantes ont été utilisées: la chromatographie liquide à haute performance (CLHP), la chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CG-SM), la résonnance magnétique nucléaire (RMN) et la chromatographie liquide en couche mince (TLC).

3,2,1 Préparation du milieu minimal

Le milieu minimal de Boyd *et al.* (1983), avec certaines modifications, était le milieu utilisé pour cultiver la souche PCP-1. Ce milieu contenait les minéraux suivants, dissous dans de l'eau distillée: 1,98 mmol/L KH_2PO_4; 2 mmol/L K_2HPO_4; 9,9 mmol/L NH_4Cl; 0,49 mmol/L $MgCl_2 \bullet 6H_2O$; 0,01 mmol/L $FeCl_2 \bullet 4H_2O$; 0,50 mmol/L $CaCl_2 \bullet H_2O$ (Baker, Phillipsburg, É-U). À ce milieu, 10 mL d'une solution d'éléments minéraux a été ajoutée: 0,51 µmol/L $MnCl_2 \bullet 4H_2O$; 0,73 µmol/L $ZnCl_2$; 0,42 µmol/L $CoCl_2 \bullet 6H_2O$; 1,6 µmol/L H_3BO_3; 0,41 µmol/L $Na_2MoO_4 \bullet 2H_2O$. De l'extrait de levure a été ajouté à une

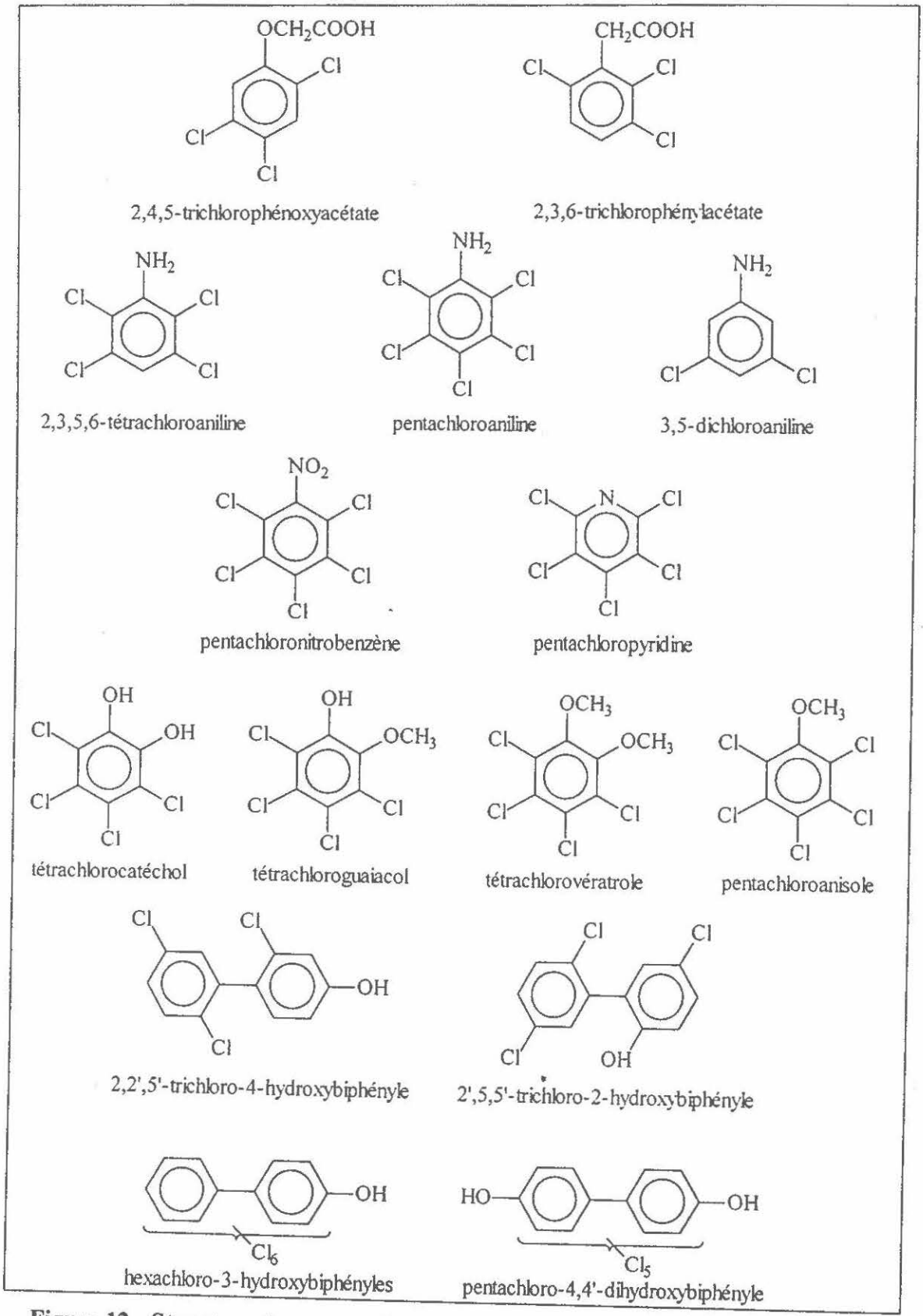
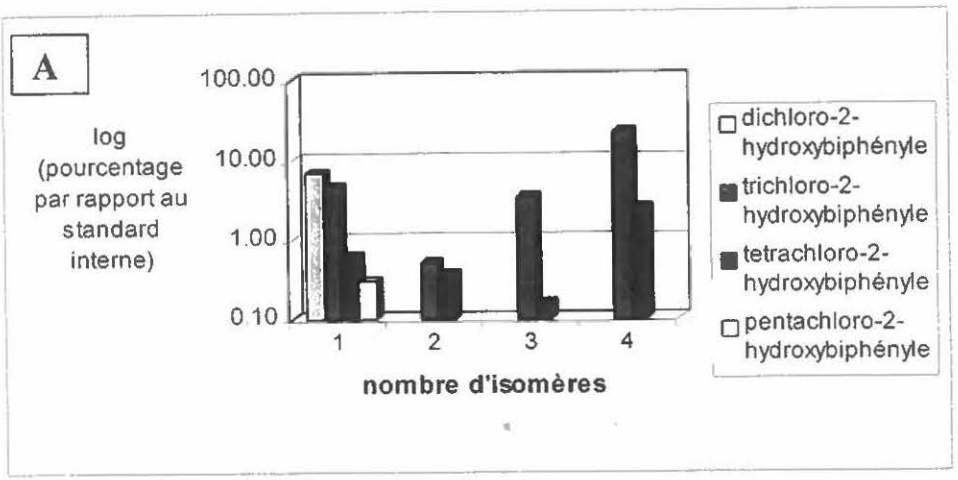
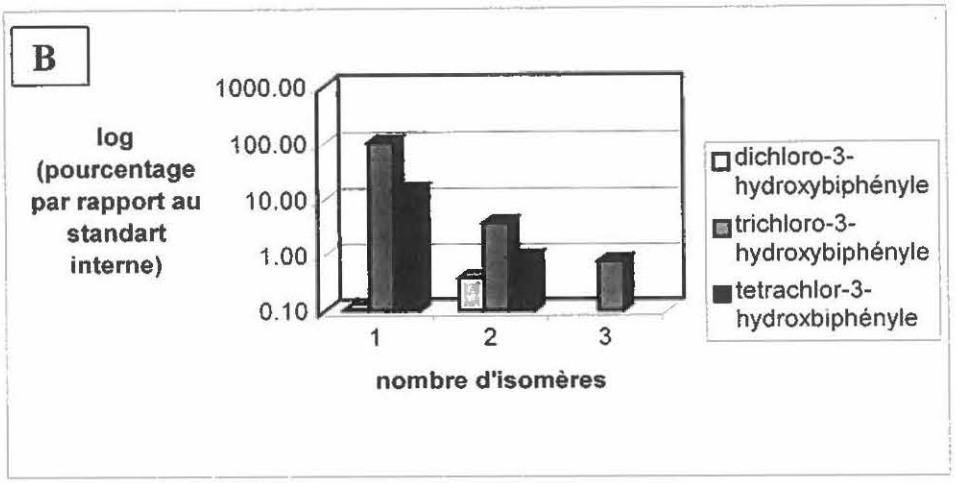


Figure 12 - Structure des composés xénobiotiques étudiés





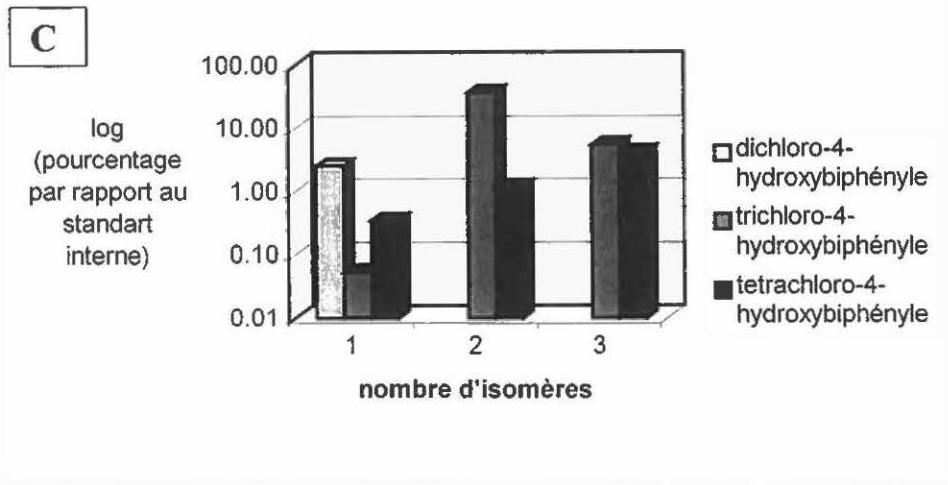


Figure 13 - Mélanges de biphénylpolychlorés hydroxylés

(A) en position 2; (B) en position 3; (C) en position 4.

concentration de 0,1% (w/v) au milieu. Le résazurin (Sigma, St-Louis, É-U) était présent à 4,0 µmol/L et était l'indicateur du potentiel redox. Le pH du milieu était ajusté à 8,0 à l'aide de $NaHCO_3$ (Mallinckrodt, Kentucky, É-U). Le milieu était mis à reflux pendant une heure et distribué par volume de 35 mL dans des bouteilles sérologiques en verre de 70 mL (Canlab, Pointe-Claire). Le milieu dans les bouteilles était barbotté pendant 5 minutes avec un mélange de 10% d'hydrogène (H_2), 10% de gaz carbonique (CO_2) et 80% d'azote (N_2) (Médigas, Ville St-Laurent) afin de rendre le milieu anaérobe. Les bouteilles étaient fermées de façon hermétique à l'aide de bouchons en butyle (Geo-Microbial Technologies, Ochelata, É-U). Le milieu enbouteillé était stérilisé pendant 20 minutes dans l'autoclave à 121°C. Par après, 0,21 mmol/L $Na_2S•9H_2O$ a été ajouté au milieu et a servi d'agent réducteur. La solution mère de 42 mmol/L de $Na_2S•9H_2O$ a été préparée avec de l'eau distillée bouillante et ensuite stérilisée par filtration (0,2µm).

3,2,2 Ajout de la source de carbone, des inducteurs et de l'inoculum bactérien

Les cultures de PCP-1 contenaient, en plus du milieu liquide de 35 mL, une source de carbone, des inducteurs des enzymes de déchloration et l'inoculum. Comme source de carbone, 1 mL d'une solution mère de 2,12 M de pyruvate (Aldrich, Milwaukee, E-U) a été ajouté au milieu, par filtration sur filtre de 0,2 µm (pour stériliser), afin d'obtenir une concentration finale de 60 mM. Dépendant du type d'expérience à effectuer, des inducteurs pouvaient être ajoutés au milieu afin d'induire les enzymes effectuant la déchloration réductrice. Les inducteurs utilisés étaient le 2,4,6-trichlorophénol (Aldrich, Milwaukee, É-U) et le 3,5-dichlorophénol (Aldrich, Milwaukee, É-U). Les expériences ont été effectuées en ajoutant soit le 2,4,6-trichlorophénol ou le 3,5-dichlorophénol, ou avec les deux inducteurs ou sans aucun inducteur. Le 2,4,6-trichlorophénol était ajouté à raison de 0,25 mL au milieu à partir d'une solution mère aqueuse et alcaline de 3,6 mM, stérilisée par filtration (0,2 µm), pour une une concentration finale de 25,7 µM dans le milieu. Cette molécule induit l'enzyme nécessaire à la déchloration en position *ortho*, la déshalogénase I. Pour le 3,5-dichlorophénol, 0,25 mL d'une solution de 4,38 mM

aqueuse et alcaline, stérilisée par filtration à 0,2µm était ajouté au milieu pour une concentration finale de 31,3 µM. Ce composé induit l'enzyme nécessaire à la déchloration en position *meta* et *para*, la déshalogénase II. Finalement, 1,5 mL (4%) d'une culture liquide de PCP-1 était utilisé pour ensemenser les milieux frais. Les milieux inoculés ont été incubés dans l'obscurité à 37°C.

Le protocole suivie pour l'expérience avec le pentachloropyridine diffère quelque peu de celui décrit ci-dessus. Les milieux inoculés auxquels étaient ajoutés le pentachloropyridine devaient être manipulés et incubés en conditions anaérobies puisque les bouteilles sérologiques contenant la culture étaient fermées avec des bouchons en teflon non-hermétiques. Afin de prévenir l'entrée de l'oxygène dans les bouteilles, toutes les manipulations ont été effectuées dans une chambre anaérobie (Shel Lab, Sheldon Manufacturing Inc., modèle BAC II, Oregon, É-U) remplie d'un mélange gazeux constitué de 10% H_2, 10% CO_2 et 80% N_2. Les cultures ont été incubées à 37°C dans une étuve maintenue à l'intérieur de la chambre anaérobie.

3,2,3 Ajout des composés xénobiotiques

La culture liquide de la souche PCP-1, décrite ci-dessus, a été incubée à 37°C pendant une période de 24 heures avant l'ajout des composés xénobiotiques pour avoir une culture en croissance exponentielle. Chaque composé xénobiotique a été testé séparément. Le tableau 8 indique la concentration exacte de chaque composé dans les cultures. De plus, pour chaque milieu de culture dans lequel était testé un composé xénobiotique, un témoin était aussi utilisé. Le témoin consistait en un milieu de culture autoclavé suite à l'inoculation. Immédiatement après la stérilisation, les deux inducteurs des enzymes de déshalogénation étaient ajoutés au milieu alors que le composé xénobiotique à l'étude n'était ajouté que 24 heures plus tard.

Tableau 8 - Concentration des différents xénobiotiques dans les cultures liquides

composé	concentration finale dans les cultures liquides (µM)
2,4,5-trichlorophénoxyacétate (Aldrich, Milwaukee, É-U)	16,8 / 35 mL de culture
Fenac (2,3,6-trichlorophénylacétate) (Aldrich, Milwaukee, É-U)	29,8 / 35 mL de culture
2,3,5,6-tétrachloroaniline (Aldrich, Milwaukee, É-U)	21,7 / 50 mL de culture
pentachloroaniline	10,8 / 35 mL de culture
3,5-dichloroaniline (Aldrich, Milwaukee, É-U)	31,7 / 35 mL de culture
pentachloronitrobenzène (Aldrich, Milwaukee, É-U)	19,3 / 35 mL de culture
pentachloropyridine (Aldrich, Milwaukee, É-U)	19,9 / 50 mL de culture
tétrachloroguaiacol (Helix Biotech, C.-B. Canada)	17,5 / 35 mL de culture
tétrachlorovératrole (Helix Biotech, C.-B. Canada)	16,6 / 35 mL de culture
tétrachlorocatéchol (Helix Biotech, C.-B. Canada)	23,1 / 35 mL de culture
pentachloroanisole (Aldrich, Milwaukee, É-U)	20,4 / 35 mL de culture
2,2'5'-trichloro-4-biphénylol (ChemService, Wester, É-U)	16,5 / 35 mL de culture
2',5,5'-trichloro-2-biphénylol (ChemService, Wester, É-U)	16,5 / 35 mL de culture
nonachloro-4-hydroxybiphényle	8,3 / 35 mL de culture
hexachloro-3-hydroxy biphényle (isomère 222F)	10,6 / 35 mL de culture
hexachloro-3-hydroxy biphényle (isomère 333J)	10,6 / 35 mL de culture
pentachloro-4,4-dihydroxybiphényle	11,2 / 35 mL de culture
mélange de 4-hydroxy biphénylpolychlorés	0,7 mg / 50 mL de culture
mélange de 3-hydroxy biphénylpolychlorés	0,7 mg / 50 mL de culture
mélange de 2-hydroxy biphénylpolychlorés	0,7 mg / 50 mL de culture

3,2,4 Gamme d'expérience effectuées avec chaque composé xénobiotique

Les tests de l'activité de déshalogénation ont été effectués en triplicata. Le tableau 9 indique les différentes expériences effectuées avec chacun des composés xénobiotiques.

3,3 Techniques d'analyse des composés xénobiotiques et de leurs métabolites

3,3,1 Analyse par TLC

La chromatographie en couche mince (TLC) a été utilisée pour purifier certains produits de synthèse ainsi que certains métabolites. Les plaques, d'une épaisseur variant de 0,5 mm à 2 mm, étaient d'origine commerciale (Silica gel 60 F-254, EM Industries, Inc., Allemagne). Les solvants utilisés pour développer les plaques variaient selon les produits à chromatographier. Les produits étaient détectés par exposition aux UV.

3,3,2 Analyse par CLHP

Le dosage en milieu liquide de certains composés xénobiotiques a été effectué par chromatographie liquide à haute performance (CLHP). La préparation des échantillons pour l'analyse s'était effectuée comme suit : 0,5 mL d'une solution d'acétonitrile (Anachemia, Montréal, Canada) et d'acide acétique à 0,33% (Produits Chimiques Américains Ltée., Montréal, Canada), ont été ajoutés à un prélèvement de 1,0 mL d'échantillon. Le tout a été agité et centrifugé pendant cinq minutes à 13 000 rpm (Canlab, modèle Biofuge A). Ensuite, 0,2 mL d'une solution de 93,9 µM de pentachlorophénol (Aldrich, Milwaukee, É-U) a été ajouté à 0,8 mL de l'échantillon centrifugé. Le pentachlorophénol, avec une concentration finale de 18,7 µM, agissait en temps que standard interne. Par la suite, 200 µL de l'échantillon était injecté au CLHP. Il est à noter que le prélèvement des échantillons avait lieu immédiatement après l'ajout du

Tableau 9 - Gamme d'expériences effectuées avec chaque composé xénobiotique

composé	inducteur	enzyme induite
2,4,5-trichlorophénoxyacétate	3,5-DCP* + 2,4,6-TCP** :	déshalogénase I + II
Fenac (2,3,6-trichlorophénylacétate)	3,5-DCP + 2,4,6-TCP :	déshalogénase I + II
2,3,5,6-tétrachloroaniline	3,5-DCP :	déshalogénase II
	2,4,6-TCP :	déshalogénase I
	3,5-DCP + 2,4,6-TCP :	déshalogénase I + II
	aucun :	aucune
pentachloroaniline	3,5-DCP :	déshalogénase II
	2,4,6-TCP :	déshalogénase I
	aucun :	aucune
3,5-dichloroaniline	3,5-DCP :	déshalogénase II
	2,4,6-TCP :	déshalogénase I
	aucun :	aucune
pentachloronitrobenzène	3,5-DCP + 2,4,6-TCP :	déshalogénase I + II
	aucun :	aucune
pentachloropyridine	3,5-DCP + 2,4,6-TCP :	déshalogénase I + II
tétrachlorocatéchol	3,5-DCP + 2,4,6-TCP :	déshalogénase I + II
	aucun :	aucune
tétrachloroguaiacol	aucun :	aucune
tétrachlorovératrole	3,5-DCP + 2,4,6-TCP :	déshalogénase I + II
	aucun :	aucune
pentachloroanisole	tétrachloroguaiacol :	inconnu
	aucun :	aucune
2,2'5'-trichloro-4-biphénylol	3,5-DCP + 2,4,6-TCP :	déshalogénase I + II
2',5,5'-trichloro-2-biphénylol	3,5-DCP + 2,4,6-TCP :	déshalogénase I + II
nonachloro-4-hydroxybiphényl	3,5-DCP + 2,4,6-TCP :	déshalogénase I + II
hexachloro-3-hydroxy biphényl (isomère 222F)	3,5-DCP + 2,4,6-TCP :	déshalogénase I + II
hexachloro-3-hydroxy biphényl (isomère 333J)	3,5-DCP + 2,4,6-TCP :	déshalogénase I + II
pentachloro-4,4-dihydroxybiphényl	3,5-DCP + 2,4,6-TCP :	déshalogénase I + II
mélange de 4-hydroxy biphénylpolychlorés	3,5-DCP + 2,4,6-TCP :	déshalogénase I + II
mélange de 3-hydroxy biphénylpolychlorés	3,5-DCP + 2,4,6-TCP :	déshalogénase I + II
mélange de 2-hydroxy biphénylpolychlorés	3,5-DCP + 2,4,6-TCP :	déshalogénase I + II

*3,5-dichlorophénol

** 2,4,6-trichlorophénol

composé xénobiotique aux milieux de culture afin d'analyser la concentration initiale du composé ajouté (t_0) ainsi qu'à différents temps après l'ajout du composé xénobiotique (t_1, t_2, t_3, etc...) afin d'analyser l'évolution de la dégradation de ce dernier.

Le CLHP utilisé était de marque Waters (Mississauga, Ontario) et comprenait deux pompes automatiques (modèle 510), un spectrophotomètre (Lambda-Max, modèle 481) et un injecteur automatique (Millipore, modèle 717 Plus). Le système était contrôlé par un ordinateur NEC Power Mate 2 (modèle APC IV), régit par le logiciel Chromatography Workstation, version 3,30. La colonne hydrophobe utilisée pour séparer les xénobiotiques était une NovaPaK C_{18} (3,9 mm x 150 mm). Deux phases mobiles étaient nécessaires afin d'obtenir la séparation des divers composés dans les échantillons. La première phase (A) était composée d'eau et d'acide acétique à 0,1%. La deuxième phase mobile (B) était composée d'acétonitrile et d'acide acétique à 0,1%. Avant d'effectuer les injections des échantillons, les deux phases mobiles étaient dégazées sous vide pendant 10 minutes et subséquemment la colonne était équilibrée avec un mélange de 75% de la phase mobile A et 25% de la phase mobile B à un débit de 2 mL/min. Le programme utilisé pour analyser les échantillons est présenté au tableau 10.

Tableau 10 - Programme CLHP

temps (min)	débit (mL/min)	% A	%B	courbe
0	2	75	25	
4	2	35	65	gradient linéaire (courbe 6)
10	2	35	65	isocratique
13	2	75	25	gradient concave (courbe 11)

La concentration des composés xénobiotiques était évaluée en mesurant leur absorbance à une longueur d'onde caractéristique du composé à l'étude. Ces longueurs d'ondes sont présentées au tableau 11. Des courbes d'étalonnage ont été effectuées pour les composés xénobiotiques suivants: le 3,5-dichloroaniline, le 2,3,5,6-tétrachloroaniline, le pentachloroaniline, le pentachloropyridine, le 2,4,5-trichlorophénoxyacétate, le Fenac, le pentachloronitrobenzène, le tétrachlorovératrole et le pentachloroanisole.

Tableau 11 - Longueurs d'ondes employées pour quantifier les composés au CLHP

composé	longueur d'onde (nm)
3,5-dichloroaniline	250
2,3,5,6-tétrachloroaniline	215 et 220
pentachloroaniline	250 et 220
pentachloropyridine	215
2,4,5-trichlorophénoxyacétate	230
fenac	230
tétrachlorovératrole	220
pentachloronitrobenzène	220
pentachloroanisole	220

3,3,3 Analyse CG-SM

Certains intermédiaires ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse associé à la spectrométrie de masse. Le chromatographe utilisé était de marque Varian, modèle 3500, muni d'une colonne capillaire de type DB5 (5% phényle, 95% méthyle silicone) d'une longueur de 30 mètres, d'un diamètre interne de 0,2 mm et ayant une épaisseur de film de 250µm. L'injecteur était à 250°C. L'hélium, le gaz porteur, avait une pression de 25 psi et une vélocité de 39 cm/sec. Le tableau 12 résume le programme de température employé. Une ligne de transfert, ayant une température de 270°C, permettait le couplage du chromatographe à un spectromètre de masse (Finigan Mat, modèle 800) qui fonctionnait en mode IE (impact électronique). Les spectres ont été obtenus en effectuant un balayage par seconde pour les masses comprises entre 70 et 550 D. Le voltage du multiplicateur était fixé à 1400 pour la majorité des composés étudiés.

Tableau 12 - Programme de température du CG

Température(°C)	gradient (°C/min)	temps (min)
70	0	1,0
125	10	5,5
125	0	7,0
165	4	10,0
210	8	5,6
310	20	5,0
310	0	4

3,3,3,1 Extractions des composés avant l'analyse

Les extractions avaient lieu immédiatement après l'ajout du composé xénobiotique aux milieux de culture afin d'analyser la concentration initiale du composé ajouté (t_0) ainsi qu'à différents temps après l'ajout du composé xénobiotique (t_1, t_2, t_3, etc...). Certains échantillons ont dû être entreposés à 4°C quelques heures avant l'injection dû à un manque de disponibilité du CG-SM.

3,3,3,1,1 L'extraction du 2,3,5,6-tétrachloroaniline et du pentachloroaniline et leurs produits de dégradation

Les cutlures contenant les chloroanilines ont été extraites trois fois avec 10 mL d'acétate d'éthyle. Le pyrène (Aldrich, Milwaukee, É-U), ajouté en concentration de 70 µM, servait de standard interne. Les phases organiques ont été récupérées et transférées dans une fiole conique contenant du sulfate de sodium (Na_2SO_4). Après 15 minutes, les extraits étaient évaporés à l'évaporateur rotatif et dissous dans 10 mL d'acétate d'éthyle. Les échantillons étaient concentrés et injectés au CG-SM.

3,3,3,1,2 L'extraction du pentachloropyridine et ses produits de dégradation

Les cultures contenant le pentachloropyridine ont été extraites trois fois avec 2 mL de d'éther. Le biphényle (Aldrich, Milwaukee, É-U) a été ajouté en concentration de 13 µM et servait de standard interne. Les phases organiques étaient prélevées et transférées dans une fiole conique contenant du sulfate de sodium. Après 15 minutes, 1 µL de chaque échantillon a été injecté au CG-SM.

3,3,3,1,3 L'extraction du pentachloronitrobenzène et ses produits de dégradation

Les cultures contenant le pentachloronitrobenzène étaient extraites trois fois avec

5 mL d'acétate d'éthyle. Le pyrène, ajouté en concentration de 7 µM, servait de standard interne. Les phases organiques étaient récupérées et transférées dans une fiole conique contenant du sulfate de sodium. Après 15 minutes, l'extrait était concentré et 1 µL était injecté au CG-SM.

3,3,3,1,4 L'extraction du tétrachlorocatéchol, du tétrachloroguaiacol, du tétrachlorovératrole et du pentachloroanisole et leurs produits de dégradation

Les cultures ont été acidifiées à pH 3 avec du HCl 12N et extraites trois fois avec 5 mL d'éther. Le pyrène, ajouté en concentration de 7 µM, servait de standard interne. Les phases organiques ont été récupérées et transférées dans une fiole conique contenant du sulfate de sodium. Après 15 minutes, les extraits ont été concentrés. Avant l'analyse au CG-SM, 20 µL de bis-(triméthylsilyl)-trifluoroacétamide (BSTFA 5%, Pierce, Rockford, É-U) ont été ajoutés à 100 µl de chaque échantillon. Ceux-ci ont été chauffés à 70°C pendant 20 minutes afin de permettre la réaction de silylation et ensuite 1 µL a été injecté au CG-SM.

3,3,3,1,5 L'extraction des hydroxybiphényles et leurs produits de dégradation

Les cultures ont été extraites trois fois avec 5 mL d'acétate d'éthyle après acidification à pH 3 avec du HCl 12N. Le 2,3,5-trichlorophénol (Aldrich, Milwaukee, É-U) (10 µM) servait de standard interne. Les phases organiques étaient récupérées et transférées dans une fiole conique contenant du sulfate de sodium. Après 15 minutes, l'extrait a été concentré et 1 µL a été injecté au CG-SM.

3,3,3,2 Identification des composés

Afin d'identifier les composés de départs et leurs produits de dégradation plausibles dans les échantillons, les composés suivants ont été utilisés: le

pentachloronitrobenzène, le 2,3,5,6-tétrachloroaniline, le 2,3,4,5-tétrachloroaniline (Riedel-de Haën, Seelze, Allemagne), le 2,4,6-trichloroaniline (Aldrich, Milwaukee, É-U), le 2,3,4-trichloroaniline (Aldrich, Milwaukee, É-U), le 2,4,5-trichloroaniline (Aldrich, Milwaukee, É-U), le 3,4,5-trichloroaniline (Aldrich, Milwaukee, É-U), le 3,5-dichloroaniline, le pentachlorophénol (Aldrich, Milwaukee, É-U), le 2,3,5,6-tétrachlorophénol (Aldrich, Milwaukee, É-U), le 2,3,4,5-tétrachlorophénol (Aldrich, Milwaukee, É-U), le 2,3,5-trichlorophénol, le 3,4,5-trichlorophénol (Aldrich, Milwaukee, É-U), le 2,4,6-trichlorophénol, le 2,3,6-trichlorophénol (Aldrich, Milwaukee, É-U), le 2,4-dichlorophénol (Aldrich, Milwaukee, É-U), le 3,5-dichlorophénol, le 3-chlorophénol (Aldrich, Milwaukee, É-U), le 4-chlorophénol (Aldrich, Milwaukee, É-U), le pentachloroanisole, le 2,3,4,5-tétrachloroanisole (Aldrich, Milwaukee, É-U), le 3,5-dichloroanisole (Aldrich, Milwaukee, É-U), le pentachloropyridine, le tétrachlorocatéchol, le 3,4,5-trichlorocatéchol (Helix Biotech, Richmond, Canada), le 3,4,6-trichlorocatéchol (Helix Biotech, Richmond, Canada), le 4,5-dichlorocatéchol (Helix Biotech, Richmond, Canada), le 3,5-dichlorocatéchol (Helix Biotech, Richmond, Canada), le 3,4-dichlorocatéchol (Helix Biotech, Richmond, Canada), le 3,6-dichlorocatéchol (Helix Biotech, Richmond, Canada), le 4-chlorocatéchol (Helix Biotech, Richmond, Canada), le 3-chlorocatéchol (Helix Biotech, Richmond, Canada), le tétrachloroguaiacol, le 4,5,6-trichloroguaiacol (Helix Biotech, Richmond, Canada), le tétrachlorovératrole, le 3,4,5-trichlorovératrole (Helix Biotech, Richmond, Canada). Afin d'identifier les composés dans les échantillons, les temps de rétention sur les chromatogrammes ainsi que leurs spectres étaient comparés à ceux des standards. Certains composés ont été isolés du milieu de culture afin de permettre leur identification.

3,3,3,2,1 L'identification du 2,3,6-trichloroaniline

Afin d'identifier le 2,3,6-trichloroaniline, un produit de dégradation du 2,3,5,6-tétrachloroaniline, celui-ci a été isolé 24 heures après l'ajout de 86,6 µmol/L de 2,3,5,6-tétrachloroaniline à 10 cultures de 35 mL et induits avec le 2,4,6,-trichlorophénol. Les cultures ont été centrifugés à 5000 rpm pendant 20 minutes. Le surnageant a été extrait

trois fois à l'acétate d'éthyle, déshydraté avec le Na_2SO_4, et concentré à 1,0 mL. L'extrait a été chromatographié sur une plaque de chromatographie en couche mince de 2 mm et développé en utilisant un mélange d'hexane (90%) et d'acétate d'éthyle (10%) comme phase mobile. Les bandes ont été détectées par exposition aux UV. Toutes les bandes ont été grattées, éluées dans une colonne de verre avec de l'acétate d'éthyle et 1 µL était injecté au CG-SM. Une des bandes avait un spectre de masse dont l'ion moléculaire correspondait à celui d'un trichloroaniline. L'acétate d'éthyle utilisant pour éluer le trichloroaniline a été évaporé à sec et le produit a été mis sous vide pendant 24 heures. Par la suite, les cristaux ont été dissous dans 1 mL d'acétone deutérée (Aldrich, Milwaukee, É-U) et analysés par résonance magnétique nucléaire à 500 MHz (Bruker AMX-2).

3,3,3,2,2 L'identification du 3,5,6-trichloroguaiacol

Afin d'identifier le 3,5,6-trichloroguaiacol, un produit de dégradation du tétrachloroguaiacol, celui-ci a été isolé 24 heures après l'ajout de 19,0 µmol/L de tétrachloroguaiacol à 8 cultures de 50 mL. Les cultures ont centrifugées à 5000 rpm pendant 20 minutes. Le surnageant a été acidifié à pH 3,0 avec du 12N HCl et extrait quatre fois avec de l'éther. La phase organique a été prélevée, déshydratée avec le Na_2SO_4 et concentrée à 1,0 mL. L'extrait a ensuite été chromatographié sur une plaque de chromatographie en couche mince de 2 mm. La plaque a été développée en utilisant un mélange d'hexane (65%) et d'acétate d'éthyle (35%) comme phase mobile. Les bandes ont été révélées par exposition aux UV. Trois bandes ont été détectées. Celles-ci ont été grattées et la silice éluée dans une colonne de verre avec de l'éther. Une analyse par CG-SM a démontré que la bande ayant un facteur de rétention 0,78 correspondait à un trichloroguaiacol. L'éther a été évaporé à sec et 1,0 mg de cristaux blancs a été récolté. Le produit a été mis sous vide pendant 24 heures. Les cristaux ont été dissous dans 1 mL de chloroforme deutéré ($CDCl_3$; Aldrich, Milwaukee, É-U) et analysés par RMN à 500 MHz. Le spectre a été comparé à celui décrit par Smith *et al.* (1994).

3,4 Synthèse de certains composés xénobiotiques

3,4,1 Synthèse du pentachloroaniline

Le pentachloroaniline a été synthétisé d'après la méthode de Vogel (1978). Dans un ballon de 100 mL, les réactifs suivants ont été ajoutés: 1 g de fer en poudre (BDH Chemicals, Montréal, Canada), 10 mL d'éthanol, 500 mg de pentachloronitrobenzène et 200 µL de HCl 12N. Le tout a été chauffé à reflux pour 4,5 heures. Par la suite, le mélange réactionnel a été neutralisé avec du NaOH 1N et le produit de la réaction a été extrait avec de l'acétate d'éthyle (Anachemia, Montréal, Canada). Un aliquot de l'extrait a été injecté au CG-SM afin de confirmer la structure du produit. Le tout a été filtré et déshydraté avec du Na_2SO_4. Ensuite, le solvant a été évaporé et les crystaux de pentachloroaniline ont été laissés sous vide pendant 15 heures. Le pentachloroaniline a été recrystalisé avec de l'éthanol et son point de fusion était de 227°C. D'après le Dictionary of Organic Compounds (1982), le point de fusion du pentachloroaniline est de 232°C.

3,4,2 Synthèse du 2,3,5,6-tétrachloropyridine

Afin d'identifier le 2,3,5,6-tétrachloropyridine, un composé provenant de la dégradation du pentachloropyridine, il a été synthétisé d'après la méthode de Sobieralski (1988). Dans un ballon de 100 mL, les réactifs suivants ont été ajoutés: 500 mg de pentachloropyridine, 1 g de zinc (Aldrich, Milwaukee, É-U), 5 g de NaOH (J.T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, É-U), 20 mL H_2O et 15 mL CH_2Cl_2 (Anachemia, Montréal, Canada). Le tout a été mélangé à température pièce pendant 108 heures. Par la suite, le mélange a été filtré et la phase organique récupérée et concentrée à 500 µL. Le mélange a été chromatographié sur une plaque de chromatographie en couche mince de 2 mm. La plaque a été développée avec une phase mobile constituée de 90% d'hexane et de 10% d'éther. Trois bandes étaient visibles sous UV sur la plaque. Chaque bande a été grattée,

extraite de la silice avec de l'éther et 1µL a été injecté au CG-SM. La bande ayant un facteur de rétention de 0,68 sur la couche mince avait un spectre de masse dont l'ion moléculaire était de 215, ce qui correspond à celui du tétrachloropyridine. 107,3 mg de 2,3,5,6-tétrachloropyridine sous forme de cristaux blancs ont été isolés.

3,4,3 Synthèse des hexachloro-3-hydroxybiphényles et du pentachloro-4,4-dihydroxybiphényle

Le pentachloro-4,4-dihydroxybiphényle a été synthétisé à partir du 4,4-dihydroxybiphényle (Aldrich, Milwaukee, É-U) et les hexachloro-3-hydroxybiphényles ont été synthétisés à partir du 3-hydroxybiphényle (Aldrich, Milwaukee, É-U). Les deux isomères d'hexachloro-3-hydroxybiphényles produits ont été subséquemment séparés par chromatographie en couche mince.

3,4,3,1 La synthèse

Ces hydroxybiphénylpolychlorés ont été synthétisés par la méthode de Hutzinger *et al.* (1972). Une solution BMC a été préparée en mélangeant des volumes équivalents des réactifs suivants : (a) le monochlorure de soufre (Aldrich, Milwaukee, É-U) (S_2Cl_2; 5 g) dans 500 mL de chlorure de sulfuryl (Aldrich, Milwaukee, É-U), et (b) le chlorure d'aluminium anhydre en poudre (Aldrich, Milwaukee, É-U) (2,5 g) dans 500 mL de chlorure de sulfuryl. Ensuite, 100 mg de 3-hydroxybiphényle ou de 4,4-dihydroxybiphényle, ont été dissous dans 10 mL de la solution BMC. Le mélange a été chauffé pendant 2 heures à 69°C, ou jusqu'à ce que deux tiers du chlorure de sulfuryl (SO_2Cl_2) soit évaporé. Par la suite, 30 mL de HCl 25% ont été ajoutés et le mélange a été chauffé (60°-80°; 10-60 min) jusqu'à ce que le dérivé chloré précipite de la solution. Afin de récupérer le précipité, de l'éther a été ajouté au ballon. Ensuite, de l'eau a été ajouté au ballon afin de dissoudre les réactifs qui pouvaient encore être présents. La phase organique a été prélevée, déshydratée avec du Na_2SO_4, évaporée à l'évaporateur rotatif et le produit a été dissous dans un minimum d'éther.

3,4,3,2 La purification

3,4,3,2,1 Les hexachloro-3-hydroxybiphényles: isomères 333J et 222F

Le mélange des deux isomères d'hexachloro-3-hydoxybiphényle (333J et 222F) obtenu de la réaction de chloration du 3-hydroxybiphényle ont été purifié par chromatographie en couche mince. Les produits ont été chromatographiés sur une plaque de chromatographie en couche mince de 2 mm et développés avec un mélange d'acétate d'éthyle (5%) et d'hexane (95%). Les bandes ont été détectées par expostion aux UV. L'isomère nommé 333J avait un facteur de rétention de 0,63 l'isomère nommé 222F avait un facteur de rétention de 0,38. Ces deux bandes ont été grattées, éluées à l'éther et concentrées. Les deux isomères ont été chromatographiés à nouveau sur deux plaques de chromatographie en couche mince séparées de 0,5mm (Silica gel 60 F-254, EM Industries, Inc., Allemagne). L'isomère 333J a été chromatographié en utilisant une phase mobile de 100% pentane et l'isomère 222F a été chromatographié avec un mélange de chloroforme (35%) et de pentane (65%). L'isomère 333J avait un facteur de rétention de 0,5 tandis que l'isomère 222F avait un facteur de rétention de 0,8. Les isomères ont été extraits de la silice avec de l'éther. La structure exacte des deux isomères est inconnue mais l'analyse au CG-SM a permis de confirmer la présence de six chlores sur les deux composés.

3,4,3,2,2 Le pentachloro-4,4-dihydroxybiphényle

Afin de purifier le pentachloro-4,4-dihydoxybiphényle, les produits de la réaction de chloration du 4,4-dihydroxybiphényle ont été chromatographiés sur une plaque de chromatographie en couche mince de 2 mm. La plaque a été développée deux fois avec un mélange de chloroforme (Anachemia, Montréal, Canada) (50%) et d'hexane (50%). Lors de la première élution, le composé a été détecté par exposition aux UV dans une

bande ayant un facteur de rétention de 0,51 et lors de la deuxième élution, le composé a été retrouvé dans une bande avec un facteur de rétention de 0,78. Cette bande a été récoltée et extraite avec de l'éther. Le composé a été repurifié par une deuxième chromatographie, utilisant une plaque de chromatographie en couche mince de 0,5 mm. La phase mobile était un mélange d'hexane (50%) et d'éther (50%). La bande recherchée a été détectée par UV et avait un facteur de rétention de 0,71. Cette bande a été grattée, extraite avec de l'éther et recrystalisée dans l'hexane.

3,4,4 Synthèse des mélanges de 4-hydroxy BPC, 3-hydroxy BPC et 2-hdyroxy BPC

Trois mélanges de BPC hydroxylés en position 4, 3 ou 2 ont été synthétisés. Dans trois flacons, 30 mg de $FeCl_3$ (Aldrich, Milwaukee, É-U) et 30 mL de chloroforme ont été ajoutés. Un biphényle hydroxylé a été ajouté par flacon, soit le 4-hydroxybiphényle, le 3-hydroxybiphényle ou le 2-hydroxybiphényle (Aldrich, Milwaukee, É-U). La réaction était effectuée à –15°C et sous agitation. Du chlore (Aldrich, Milwaukee, É-U) a été barbotté dans chacun des flacons. La réaction était terminée lorsqu'une trappe composée de NaI dans l'eau devenait jaune foncée. Le tout a été lavé avec une solution saturée en Na_2SO_3 et extrait cinq fois avec du NaOH concentré. La phase aqueuse a été prélevée et acidifiée à pH 2 avec du HCl 12N. Les BPC hydroxylés présents dans la phase aqueuse ont été extraits quatre fois avec de l'éther. La phase organique a été prélevée, séchée avec du Na_2SO_4, évaporée et les produits de la réaction ont été dissous dans le $CHCl_3$ ou dans l'éthanol. Les mélanges de BPC hydroxylés ont été injectés au CG-SM afin d'y analyser leurs compositions. La figure 13 (p. 47) indique les résultats obtenus.

3,5. Métabolisme du pyruvate

Afin de quantifier le pyruvate et l'acétate dans le milieu de culture, un échantillon d'un milieu de culture fraîchement inoculé ainsi qu'un échantillon de cette même culture

après 91 heures ont été prélevés. Les échantillons ont été dilués dix fois et analysés au CLHP d'après la méthode décrite par Dupont et Clarke (1991). Les pompes du CLHP utilisé était de marque Spectro-Physics SP-8810. La colonne, chauffée à 45°C avec un chauffe colonne de type Jones Chromatography, était du type Aminex Ion Exclusion HPX-87H (BioRad; 7,8 mm X 300 mm). L'appareil fonctionnait en mode isocratique, avec un débit de 0,5 mL/min et avec une phase mobile qui consistait en une solution d'acide sulfurique à 10 mM. La détection se faisait à 210 nm à l'aide d'un spectrophotomètre de type Waters 484 Tuneable Absorption Detector. Finalement, la quantification des composés a été effectuée avec un intégrateur de type Waters 746 Data Module. Des courbes d'étalonnage ont été effectuées pour le pyruvate ainsi que pour l'acétate. Le pic correspondant au temps de rétention de l'acétate a été récolté afin de comparer son spectre UV à celui d'un standard d'acide acétique avec un spectrophotomètre Milton Roy Spectronic 1100 Plus.

RÉSULTATS

4,1 Le 2,4,5-trichlorophénoxyacétate (2,4,5-T)

Le 2,4,5-tichlorophénoxyacétate était présent dans la culture à une concentration initiale de 22 µM. Les inducteurs, incorporés 24 heures avant l'ajout du 2,4,5-T, étaient aussi présents dans le milieu de culture afin d'induire les déshalogénases I et II. D'après les données du CLHP présentées à la figure 14, la concentration du 2,4,5-T est restée comparable à la concentration initiale du composé après 10 jours d'incubation. On peut donc supposer que les déshalogénases ne pouvaient pas s'attaquer à ce composé. Il est important de noter que les inducteurs ont été dégradés (le 2,4,6-trichlorophénol en 4-chlorophénol et le 3,5-dichlorophénol en 3-chlorophénol). La dégradation des inducteurs a été observée sur une période de plus de 24 heures, donc même après l'ajout du 2,4,5-T. Par conséquent, il est fort probable que le 2,4,5-T ne soit pas toxique pour la souche. La concentration du 2,4,5-T dans les témoins autoclavés est demeurée stable durant la période d'incubation.

4,2 Le 2,3,6-trichlorophénylacétate (FENAC)

Le Fenac a été ajouté au milieu de culture en même temps que les inducteurs des déshalogénases I et II et avait une concentration initiale de 28 µM. Après 48 heures, les inducteurs, soit le 2,4,6-trichlorophénol et le 3,5-dichlorophénol, ont été dégradés. Cela implique que le Fenac n'était pas toxique pour la bactérie. Par contre, d'après les données du CLHP présentées à la figure 15, il est évident que même après 6 jours, le Fenac a persisté dans le milieu de culture. La concentration de ce dernier est restée autour de 28 µM pendant toute la période d'incubation. Il en était de même pour la concentration du Fenac dans les témoins autoclavés. On peut conclure que les déshalogénases étaient incapables de dégrader ce composé.

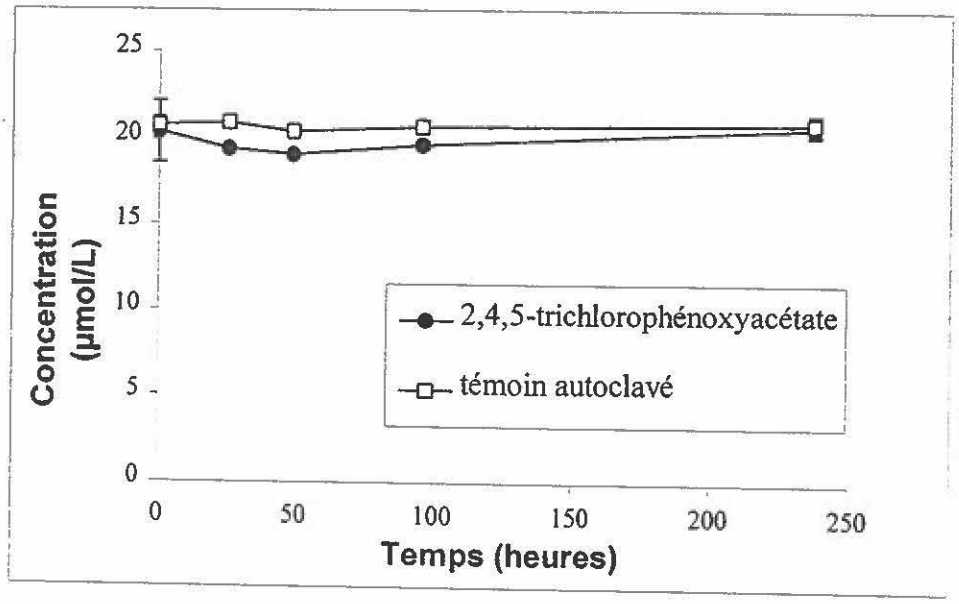


Figure 14 – Courbes de la métabolisation du 2,4,5-trichlorophénoxyacétate

Ajout du composé dans un milieu où les déshalogénases I et II ont été induites avec le 2,4,6-trichlorophénol et le 3,5-dichlorophénol.

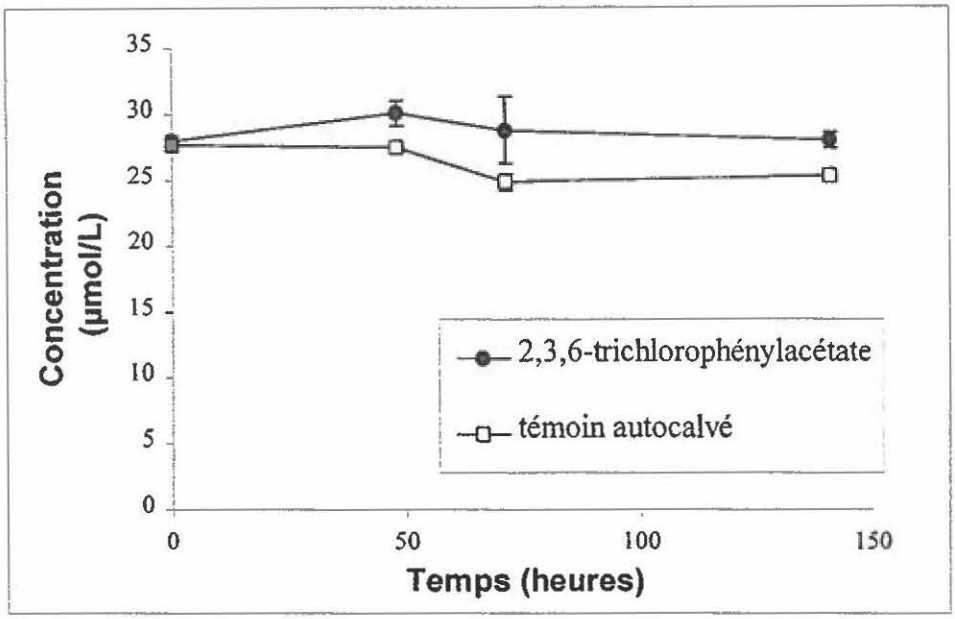


Figure 15 – Courbes de la métabolisation du 2,3,6-trichlorophénylacétate

Ajout du composé dans un milieu où les déshalogénases I et II ont été induites avec le 2,4,6-trichlorophénol et le 3,5-dichlorophénol.

INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
BIBLIOTHÈQUE

4,3 Les chloroanilines

4,3,1 Le 2,3,5,6-tétrachloroaniline

4,3,1,1 Mise en évidence d'une activité de déshalogénation envers le 2,3,5,6-tétrachloroaniline par CLHP

Quatre différents tests ont été effectués avec le 2,3,5,6-tétrachloroaniline. Dans un premier temps, le composé a été ajouté à un milieu de culture où la déshalogénase I était induite par l'ajout du 2,4,6-trichlorophénol. Dans un deuxième temps, le 2,3,5,6-tétrachloroaniline a été ajouté à une culture où le 3,5-dichlorophénol avait induit la déshalogénase II. Lors d'une troisième expérience, le composé a été ajouté à une culture induite avec les deux inducteurs. Finalement, une quatrième expérience avait pour but de tester la capacité du 2,3,5,6-tétrachloroaniline à induire les déshalogénases. Pour ce faire, le composé a été ajouté à une culture dans laquelle aucun inducteur n'était présent. Dans toutes les expériences, le 2,3,5,6-tétrachloroaniline était à une concentration initiale de 50 µM. Le chloroaniline était toujours ajoutées 24 heures après l'ajout des inducteurs et les inducteurs étaient toujours complètement dégradé en moins de 48 heures.

D'après les résultats de la figure 16, trois des quatre expériences démontrent que les déshalogénases ont été capables de s'attaquer au 2,3,5,6-tétrachloroaniline. Dans l'expérience où la déshalogénase I était induite (figure 16a), le 2,3,5,6-tétrachloroaniline a mis plus de 48 heures à disparaître. Par contre, dans les expériences où la déshalogénase II et où les deux déshalogénases étaient induites (figure 16b et 16c), le 2,3,5,6-tétrachloroaniline a disparu en moins de 24 heures. Cette disparition du composé de départ est accompagnée d'une apparition de nouveaux pics au CLHP qui étaient des produits de dégradation du tétrachloroaniline. Les structures des produits de dégradation ont été élucidées par CG-SM et RMN-H^1.

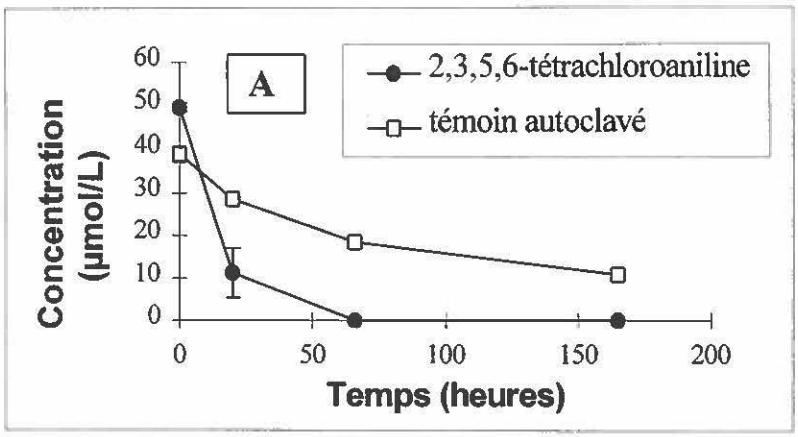
Dans les cultures où les déshalogénases n'étaient pas induites, la concentration du 2,3,5,6-tétrachloroaniline a diminué à 4 µM à partir d'une concentration initiale de 42 µM après sept jours d'incubation (figure 4,3d), soit une disparition de plus 90% du produit. Par contre, le patron de diminution de la concentration du tétrachloroaniline était identique à celui dans le témoin autoclavé de cette expérience ainsi que dans les trois autres expériences (figure 16a-c). De plus, dans tous les témoins autoclavés, ainsi que dans l'expérience à la figure 16d, aucun pic pouvant provenir de la transformation du tétrachloroaniline n'était observable au CLHP. On peut donc supposer un processus physico-chimique qui pourrait expliquer la disparition du tétrachloroaniline dans le temps. Ce phénomène sera discuté à la section 4,9.

4,3,1,2 La dégradation du 2,3,5,6-tétrachloroaniline

Pour identifier les produits de transformation du 2,3,5,6-tétrachloroaniline, les cultures ont été extraites et analysées au CG-SM. D'après les résultats obtenus au CG-SM, deux trichloroanilines et trois dichloroanilines étaient présents dans le milieu de culture. Malheureusement, seul le standard du 3,5-dichloroaniline était disponible. La structure d'un des trichloroanilines a été confirmée par RMN mais les structures des dichloroanilines demeurent encore hypothétiques.

4,3,1,2,1 L'identification du 2,3,6-trichloroaniline: métabolite du 2,3,5,6-tétrachloroaniline

Le chromatogramme d'une expérience où la déshalogénase I était induite est présenté à la figure 17a. Les flèches indiquent la présence de deux métabolites, dont l'ion moléculaire ($M^+ = 195$) (figure 17b) correspond à un trichloroaniline. Étant donné que le 2,3,5,6-tétrachloroaniline est une molécule symétrique, sa déchloration peut seulement générer deux isomères de trichloroanilines: soit le 2,3,5-trichloroaniline, si la déchloration se fait en position *ortho*, ou soit le 2,3,6-trichloroaniline si la déchloration se fait en position *meta*. Dans les trois expériences où la déchloration a eu lieu, le patron de déchloration était toujours semblable: c'est à dire qu'un isomère, celui dont le temps de



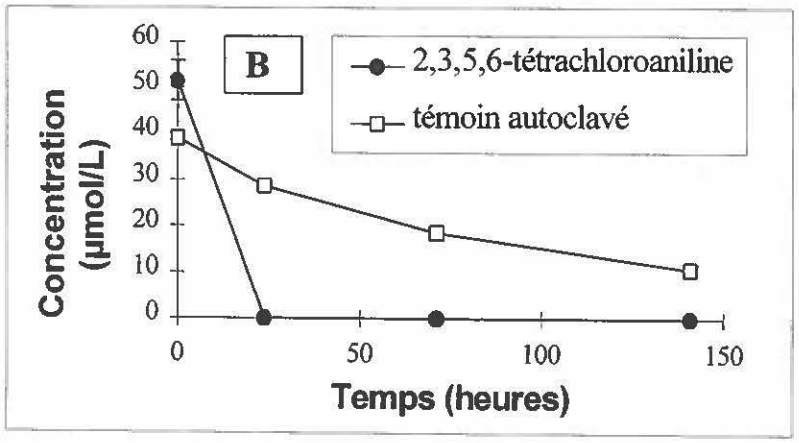
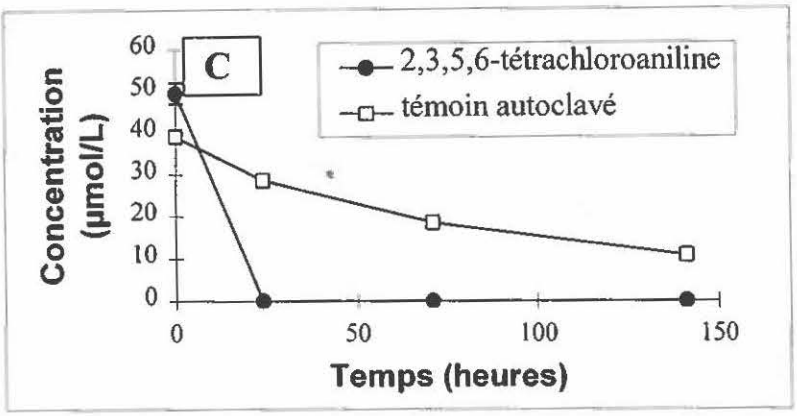


Figure 16 – Courbe de la métabolisation du 2,3,5,6-tétrachloroaniline

Ajout du composé dans un milieu où **A**) la déshalogénases I a été induite avec le 2,4,6-trichlorophénol et **B**) la déshalogénase II a été induite avec le 3,5-dichlorophénol.



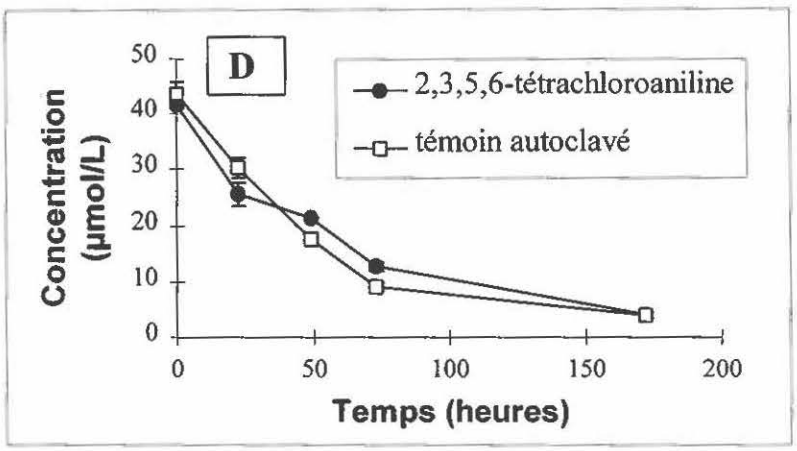


Figure 16 (suite) – Courbes de la métabolisation du 2,3,5,6-tétrachloroaniline

Ajout du composé dans un milieu où **C**) la déshalogénases I et II ont été induites avec le 2,4,6-trichlorophénol et le 3,5-dichlorophénol respectivement et **D**) aucun inducteur n'a été ajouté.

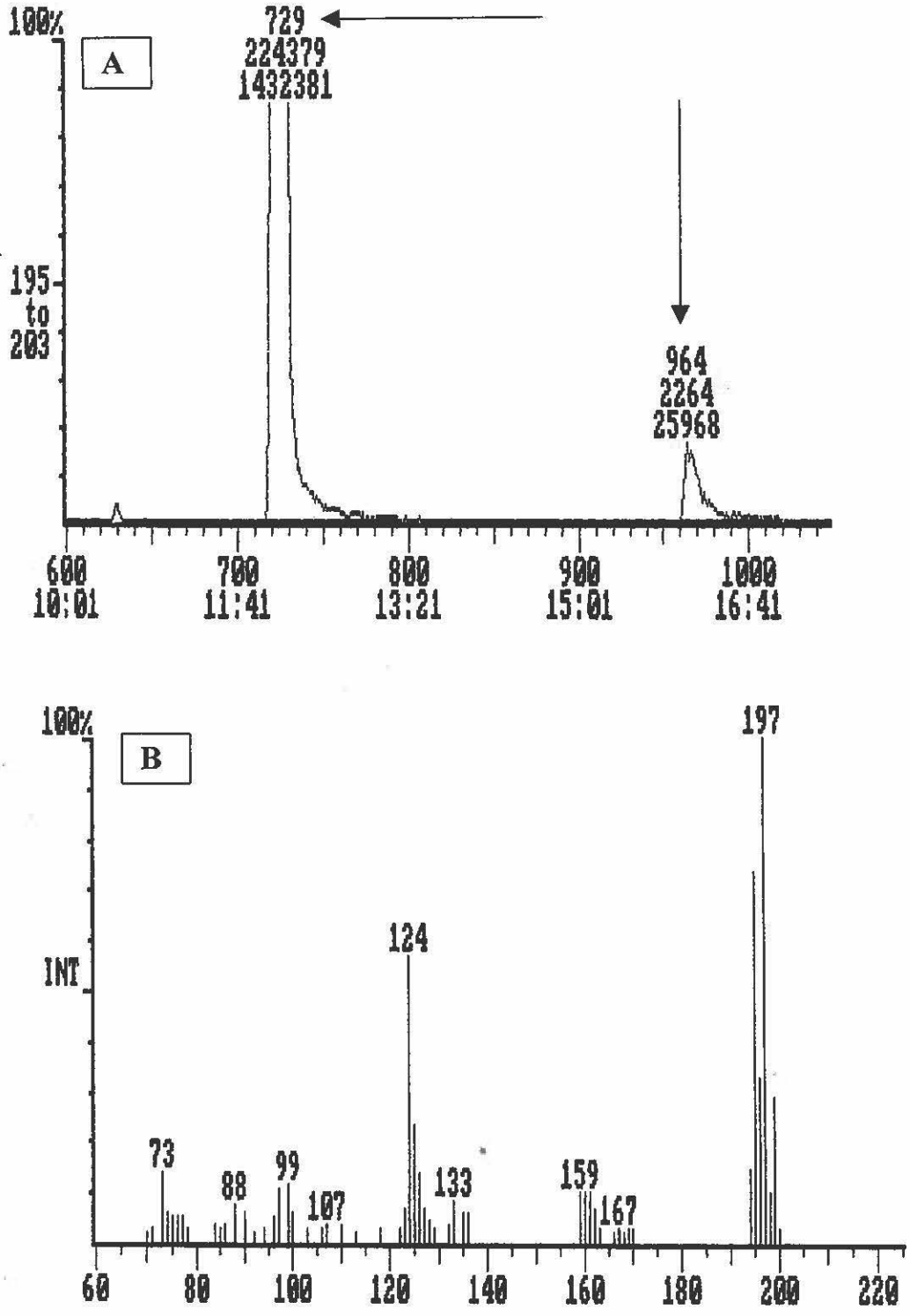


Figure 17 - Les spectres CG-SM des métabolites du 2,3,5,6-tétrachloroaniline

A) chromatogramme des métabolites du 2,3,5,6-tétrachloroaniline et **B)** spectre de masse d'un des isomères des trichloroanilines indiqués par les flèches en A). Par contre, les spectres des deux composés sont identiques.

rétention est de 12 min à la figure 17a, était toujours majoritaire, indépendamment de l'inducteur utilisé. Faute de standard disponible commercialement, le trichloroaniline majoritaire a dû être isolé du milieu de culture afin de l'analyser au RMN-H^1.

Après l'extraction de 350 ml de milieu culture dans lequel avait été ajouté le 2,3,5,6-tétrachloroaniline et le 2,4,6-trichlorophénol comme inducteur, l'extrait a été chromatographié sur une plaque de chromatographie en couche mince de silice de 2 mm. La plaque a été développée avec un mélange d'hexane (90%) et de l'acétate d'éthyle (10%), cinq bandes sont apparues sous UV. La bande avec un R_f de 0,6 a été grattée, extraite, et analysée au CG-SM, permettant de confirmer que le produit isolé était le trichloroaniline majoritaire avec un temps de rétention de 12 min au CG et un spectre de masse dont l'ion moléculaire (M^+) était de 195. Le composé isolé a été évaporé à sec et mis sous vide, ce qui a donné des cristaux blancs. Afin d'analyser ce composé au RMN, il a été dissous dans l'acétone deutérée.

La figure 18 présente un agrandissement du spectre RMN du trichloroaniline isolé. Le tableau 13 démontre les caractéristiques de chaque pic présent dans le spectre. Les données présentées dans ce tableau, permettent d'identifier le trichloroaniline majoritaire comme étant le 2,3,6-trichloroaniline. Les deux doublets ayant des fréquences de 6,85 ppm et 7,25 ppm indiquent la présence de deux atomes d'hydrogène adjacents sur le cycle aromatique (position 4 et 5). Le dédoublement des pics est causé par le couplage entre deux hydrogènes avoisinant (Pasto et Johnson 1979). Si le trichloroaniline majoritaire avait été le 2,3,5-trichloroaniline, les atomes d'hydrogène ne seraient pas adjacents (position 4 et 6) sur le cycle aromatique. Dans ce cas, les pics représentant les atomes d'hydrogène auraient été des singulets. Les résultats obtenus prouvent que la déchloration s'est faite de façon majoritaire en postion *meta*, indépendamment de l'inducteur utilisé, et que le trichloroaniline minoritaire, le 2,3,5-trichloroaniline, était le composé possédant un temps de rétention de 16 min au CG.

Tableau 13 - Données provenant du RMN-H[1] du trichloroaniline

Fréquence (ppm)	interprétation*	multiplicité	constante de couplage (J) (Hz)	interprétation*	Intégration†
5,5	NH_2 sur un cycle aromatique	singulet	-	-	202mm/(92,75mm/H) = 2,18 atomes d'hydrogène
6,85	hydrogène sur un cycle aromatique	doublet	9,25	couplage J_{12}** sur un noyau de benzène	73mm/(92,75mm/H) = 0,8 atome d'hydrogène
7,25	hydrogène sur un cycle aromatique	doublet	7,245	couplage J_{12} sur un noyau de benzène	96mm/(92,75mm/H) = 1 atome d'hydrogène

* Pasto et Johnson (1979)

** J_{12} représente deux atomes d'hydrogène adjacents sur un noyau de benzène

† L'intégration des 3 pics s'additionne à 371 mm. Puisqu'il y a quatre atomes d'hydrogène dans le trichloroaniline donc 371mm/4 = 92,75mm/atome d'hydrogène.

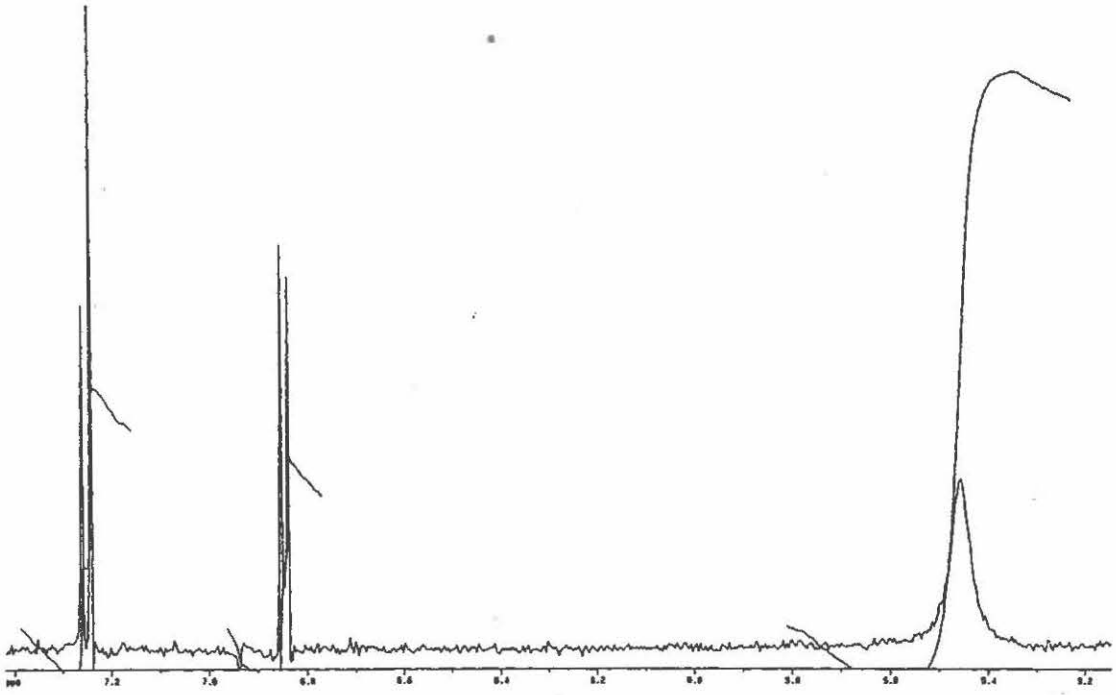


Figure 18 - RMN-H[1] du 2,3,6-trichloroaniline

4,3,1,2,2 L'identification préliminaire des dichloroanilines

Les structures exactes des dichloroanilines n'ont pu être établies à cause de l'absence de standards disponibles commercialement. Néanmoins, les isomères de dichloroanilines qui pouvaient être générés à partir des 2,3,5- et 2,3,6-trichloroanilines sont les suivants : le 2,3-dichloroaniline, le 2,5-dichloroaniline, le 2,6-dichloroaniline et le 3,5-dichloroaniline. Cependant, il est à noter qu'aucun des dichloroanilines formés n'avait un temps de rétention au CG qui correspondait à celui du 3,5-dichloroaniline. La seule voie de dégradation qui pouvait produire ce composé était la déchloration en *ortho* du 2,3,5-trichloroaniline. L'absence du 3,5-dichloroaniline indique que le 2,3,5-trichloroaniline n'a pas été déchloré à cette position.

4,3,1,2,3 Voies de dégradation proposées du 2,3,5,6-tétrachloroaniline

Des voies de dégradation du 2,3,5,6-tétrachloroaniline ont été proposées à partir des analyses effectuées au CG-SM et au RMN. Ces résultas sont présentés à la figure 19. Cette figure présente les voies de dégradation du 2,3,5,6-tétrachloroaniline en présence des deux déshalogénases, soit ensemble ou séparément, après 8 jours d'incubation. Le 2,3,5,6-tétrachloroaniline a été presque complètement dégradé de façon majoritaire en position *meta* pour donner le 2,3,6-trichloroaniline. Par contre, le 2,3,5,6-tétrachloroaniline pouvait aussi être déchloré en position *ortho* et produire le 2,3,5-trichloroaniline. Il y a très peu de dichloroanilines formés à partir de la déchloration des trichloroanilines. Les dichloroanilines produits à partir d'une déchloration en position *ortho* et *meta* des trichloroanilines étaient le 2,6-dichloroaniline, le 2,3-dichloroaniline et le 2,5-dichloroaniline. Finalement, aucun monochloroaniline n'a été retrouvé dans les milieux de culture.

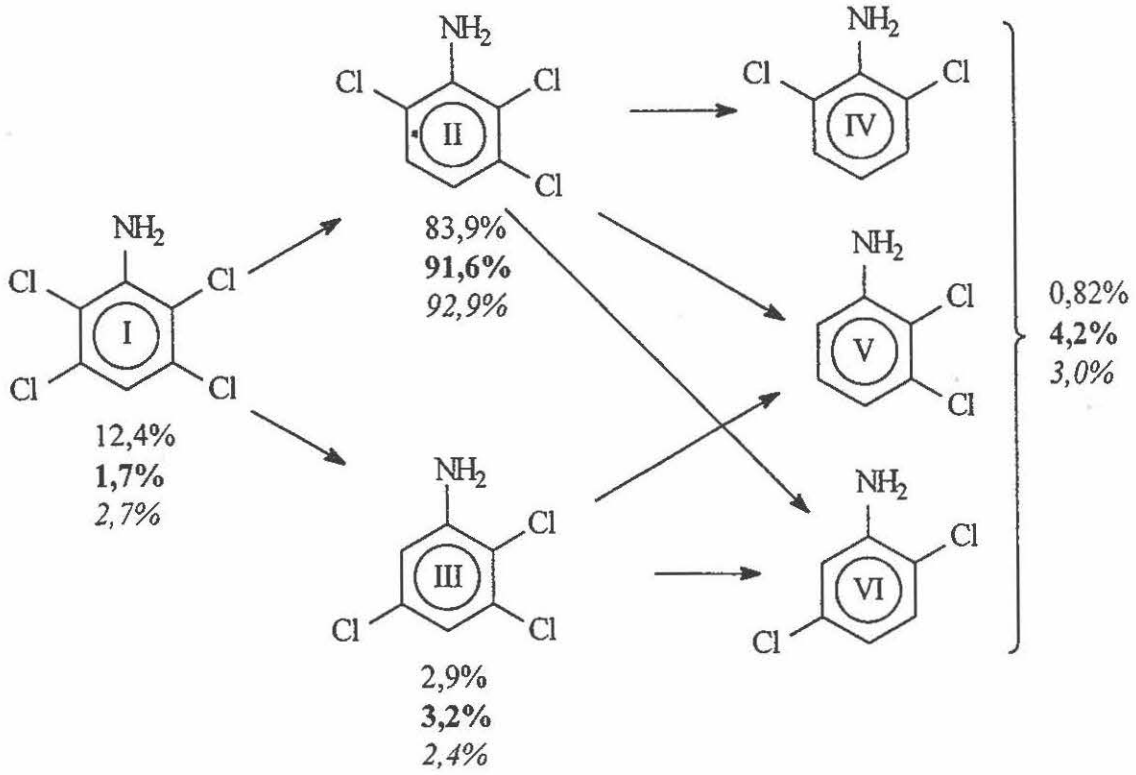


Figure 19 - Voies de dégradation proposées du 2,3,5,6-tétrachloroaniline

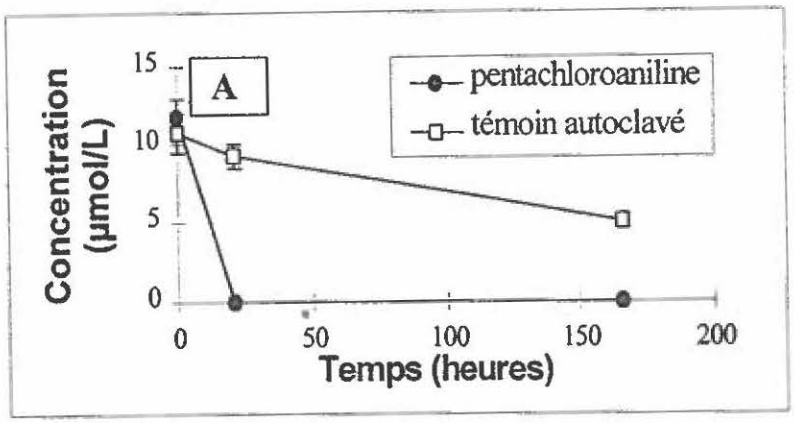
Les pourcentages marqués en *italique* représentent les expériences où les déshalogénases I et II étaient induites dans le milieu; les pourcentages marqués en **gras** indiquent les expériences où la déshalogénase II était induite; les pourcentages marqués en caractères normaux représentent les expériences où la déshalogénase I était induite. Les pourcentages ont été calculés en additionnant l'aire sous la courbe au CG de tous les composés et en divisant par la somme du nombre total de composés. (I) 2,3,5,6-tétrachloroaniline; (II) 2,3,6-trichloroaniline; (III) 2,3,5-trichloroaniline; (IV) 2,6-dichloroaniline; (V) 2,3-dichloroaniline; (VI) 2,5-dichloroaniline.

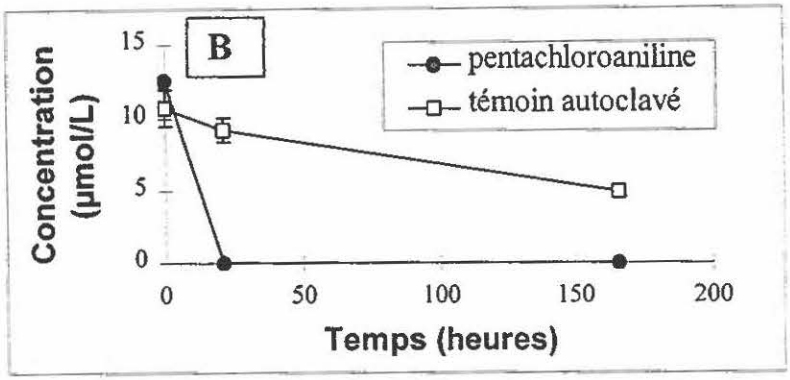
4,3,2 Le pentachloroaniline

Trois tests ont été effectués avec le pentachloroaniline. Dans la première expérience, le pentachloraniline a été ajouté à une culture où la déshalogénase I a été induite grâce au 2,4,6-trichlorophénol. Dans la deuxième expérience, le pentachloroaniline a été ajouté à une culture où le 3,5-dichlorophénol a été utilisé afin d'induire la déshalogénase II. Finalement, le pentachloroaniline a été ajouté dans un milieu ou aucun inducteur n'a été ajouté afin d'étudier la possibilité d'une induction des déshalogénases par ce composé. Dans toutes les expériences, le composé avait une concentration initiale d'approximativement 12 µM et il était ajouté au milieu de culture 24 heures après l'addition des inducteurs. La figure 20 illustre la disparition du pentachloroaniline dans chacune des trois expériences effectuées.

4,3,2,1 Mise en évidence d'une activité de déshalogénation envers le pentachloroaniline par CLHP

D'après les données CLHP de la figure 20a et 20b, le pentachloroaniline disparait en moins de 24 heures après son addition aux cultures où la déshalogénase I ou la déshalogénase II étaient présentes. Cette disparition était complémentée par l'apparition de nouveaux pics qui n'ont pa pu être identifiés par CLHP. Dans l'expérience où le pentachloroaniline était ajouté à une culture dont les déshalogénases n'étaient pas induites (figure 20c), la concentration du pentachloroaniline a diminué de moitié après huit jours d'incubation. Par contre, cette diminution de la concentration était parallèle à celle observée dans les témoins autoclavés. De plus, aucun nouveau pic correspondant à des produits de transformation du pentachloroaniline est apparu sur les chromatogrammes du CLHP des témoins autoclavés ou sur les chromatogrammes de l'expérience présentée à la figure 20c. Comme pour le 2,3,5,6-tétrachloroaniline, on peut donc supposer un processus physico-chimique qui pourrait expliquer la disparition du pentachloroaniline dans les cultures.





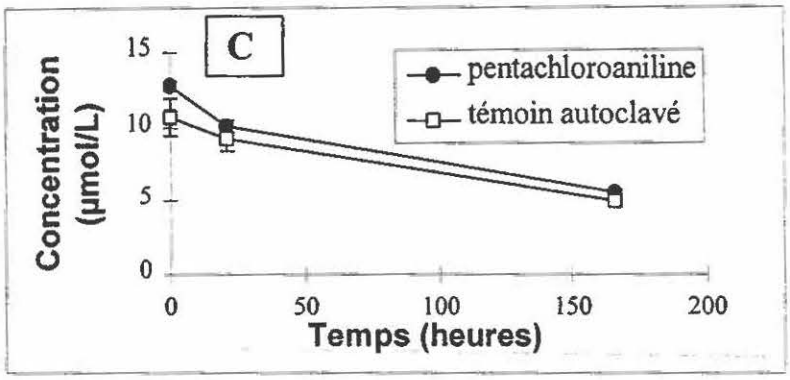


Figure 20 – Courbes de la métabolisation du pentachloroaniline

Ajout du composé dans un milieu où **A**) la déshalogénase I a été induite avec le 2,4,6-trichlorophénol et **B**) la déshalogénase II a été induite avec le 3,5-dichlorophénol et **C**) aucun inducteur n'a été ajouté.

4,3,2,2 Dégradation du pentachloroaniline

À la fin de la période d'incubation de huit jours, les échantillons ont été analysés par CG-SM afin d'identifier les produits de dégradation du pentachloroaniline.

4,3,2,2,1 L'identification des tétrachlroanilines par CG-SM

Deux tétrachloroanilines étaient présents dans l'échantillon. Il y a seulement trois isomères de tétrachloroanilines possibles. Seuls les standards pour le 2,3,5,6-tétrachloroaniline et le 2,3,4,5-tétrachloroaniline étaient disponibles. Le 2,3,5,6-tétrachloroaniline a été identifié en comparant le temps de rétention du standard avec le composé présent dans l'échantillon. Les temps de rétention étaient identiques. Le temps de rétention du standard pour le 2,3,4,5-tétrachloroaniline était très différent du standard pour le 2,3,5,6-tétrachloroaniline, ainsi que du deuxième tétrachloroaniline présent dans l'échantillon. Par déduction, le deuxième tétrachloroaniline est probablement le 2,3,4,6-tétrachloroaniline.

4,3,2,2,2 L'identification des trichloroanilines par CG-SM

Trois trichloroanilines étaient présents dans l'échantillon. L'identité du 2,3,6-trichloroaniline a été confirmée en comparant son temps de rétention au 2,3,6-trichloroaniline isolé et identifié par RMN (voir section 4,3,1,2,1). Les temps de rétention étaient identiques. L'identité du 2,4,6-trichloroaniline a été confirmée puisque les temps de rétention du standard et du métabolite dans l'échantillon étaient identiques. Le dernier trichloroaniline dans l'échantillon était probablement le 2,3,5-trichloroaniline puisqu'il avait le même temps de rétention que le 2,3,5-trichloroaniline produit lors de la dégradation du 2,3,5,6-tétrachloroaniline (voir section 4,3,1,2).

4,3,2,2,3 L'identification préliminaire des dichloroanilines

Les trichloroanilines produits ont été dégradés en position *ortho*, *meta* ou *para* et pouvaient générer les cinq isomères suivants: le 2,3-dichloroaniline, le 2,4-dichloroaniline, le 2,5-dichloroaniline, le 2,6-dichloroaniline et le 3,5-dichloroaniline. Par contre, seulement quatre isomères ont été détectés au CG-SM. Le seul standard disponible commercialement était le 3,5-dichloroaniline. Aucun des dichloroanilines obtenus n'avaient le même temps de rétention que le 3,5-dichloroaniline, ce qui indique que le 3,5-dichloroaniline n'était pas parmi les quatre dichloroanilines présents dans l'échantillon. Les quatre isomères détectés étaient possiblement les quatre premiers dichloroanilines énumérés plus haut.

4,3,2,2,4 Voies de dégradation proposées du pentachloroaniline

Suite à l'identification des différents produits de dégradation du pentachloroaniline identifiés à l'aide du CG-SM, des voies de dégradation de ce dernier ont été proposées. Ces résultas sont présentés à la figure 21. Il y a peu de différences entre la voie de déshalogénation utilisée par la déshalogénase I et celle utilisée par la déshalogénase II. Dans les deux cas, le pentachloroaniline a été déchloré en position *meta* ou *para* pour donner le 2,3,4,6-tétrachloroaniline et le 2,3,5,6-tétrachloroaniline respectivement. Le 2,3,4,6-tétrachloroaniline était, par la suite, presque complètement transformé en trichloroaniline. Ce dernier a été déchloré en position *para* pour donner le 2,3,6-trichloroaniline. Il était aussi déchloré en position *meta* pour donner le 2,4,6-trichloroaniline. De son côté, le 2,3,5,6-tétrachloroaniline a été presque complètement transformé. Il a été déchloré soit en position *meta*, ce qui a produit le 2,3,6-trichloroaniline, ou en position *ortho*, pour donner le 2,3,5-trichloroaniline. Finalement, les trichloroanilines produits ont été dégradés en position *ortho*, *meta* ou *para* et ont généré les quatres isomères suivants: le 2,3-dichloroaniline, le 2,4-dichloroaniline, le 2,5-dichloroaniline et le 2,6-dichloroaniline.

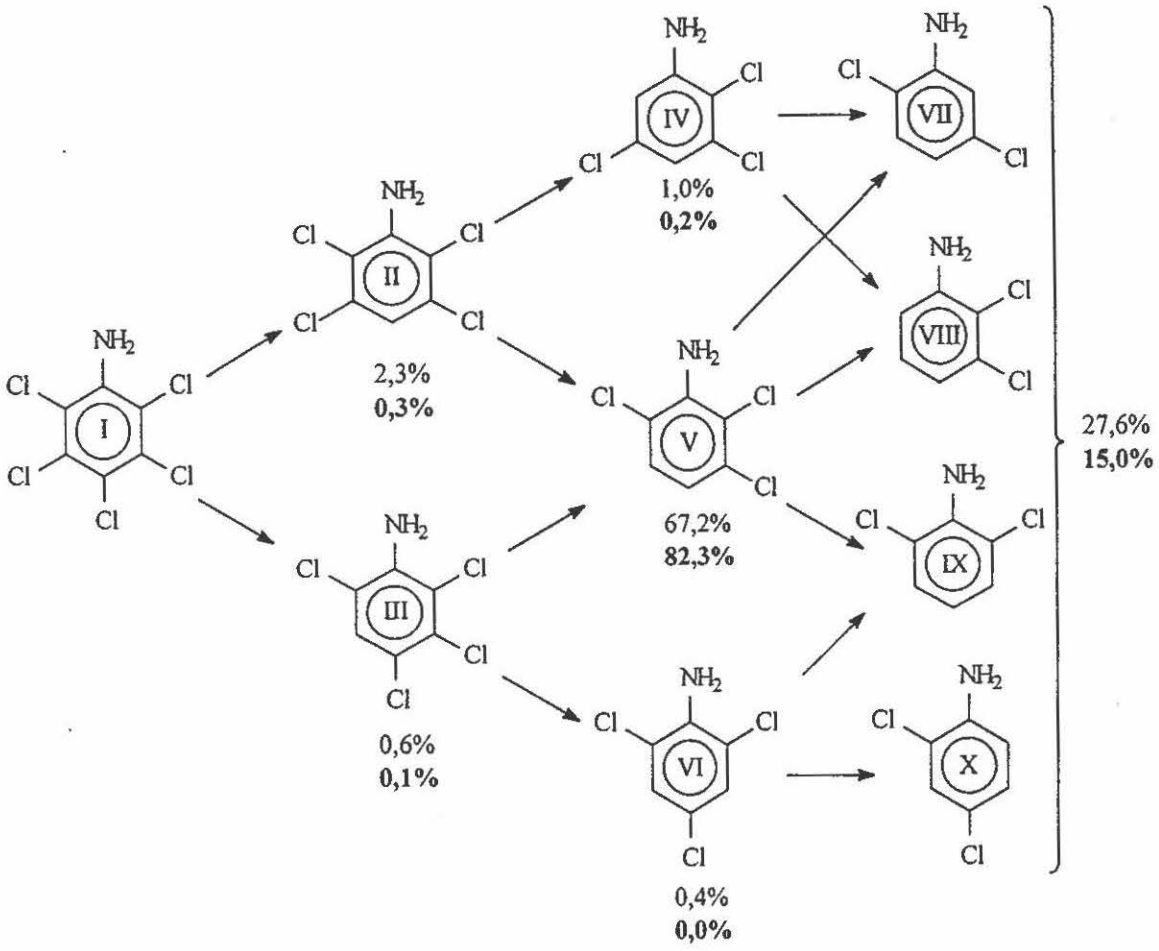


Figure 21 - Voies de dégradation proposées du pentachloroaniline

Les pourcentages marqués en **gras** indiquent les expériences où la déshalogénase II était présente; les pourcentages marqués en caractères normaux représentent les expériences où la déshalogénase I était présente. Les pourcentages ont été calculés en additionnant l'aire sous la courbe au CG de tous les métabolites et en divisant par la somme du nombre total des composés. (I) pentachloroaniline; (II) 2,3,5,6-tétrachloroaniline; (III) 2,3,4,6-tétrachloroaniline; (IV) 2,3,5-trichloroaniline; (V) 2,3,6-trichloroaniline; (VI) 2,4,6-trichloroaniline; (VII) 2,5-dichloroaniline; (VIII) 2,3-dichloroaniline; (IX) 2,6-dichloroaniline; (X) 2,4-dichloroaniline.

4,3,3 Le 3,5-dichloroaniline

Trois tests ont été effectués avec le 3,5-dichloroaniline: il a été ajouté à un milieu de culture où la déshalogénase I avait été induite. Il a aussi été ajouté à un milieu de culture où la déshalogénase II avait été induite. Finalement, il a été ajouté à un milieu de culture où aucun inducteur n'était présent afin de déterminer si le 3,5-dichloroaniline pouvait induire les déshalogénases. Dans tous les cas, le composé xénobiotique avait une concentration initiale de 90 µM dans le milieu, sauf dans l'expérience où la déshalogénase II était induite. Dans cette expérience, la concentration initiale du 3,5-dichloroaniline était de 60 µM.

D'après les données du CLHP présentées à la figure 22, on peut constater qu'après 5 jours d'incubation, la concentration du 3,5-dichloroaniline est restée comparable à la concentration initiale du composé. On peut conclure que les déshalogénases ne pouvaient pas dégrader le 3,5-dichloroaniline et que ce dernier ne pouvait pas induire les enzymes nécessaires à la déchloration. Il est important de noter que la dégradation des inducteurs a eu lieu en 48 heures: le 2,4,6-trichlorophénol a été dégradé en 4-chlorophénol et le 3,5-dichlorophénol a été dégradé en 3-chlorophénol. Ceci indique le 3,5-dichloroaniline n'était pas toxique pour la souche. Enfin, la concentration du 3,5-dichloroaniline est demeurée stable dans les témoins autoclavés durant le temps d'incubation.

4,4 Le pentachloronitrobenzène

Afin de vérifier si le pentachloronitrobenzène pouvait être dégradé par les déshalogénases, deux séries d'expériences ont été effectuées. Dans un premier temps, le pentachloronitrobenzène a été ajouté à un milieu de culture où les déshalogénases I et II avaient été induites 24 heures auparavant par l'ajout des inducteurs 2,4,6-trichlorophénol et 3,5-dichlorophénol. Dans la deuxième expérience, le pentachloronitrobenzène a été ajouté à un milieu de culture où aucun inducteur n'était présent afin de vérifier le

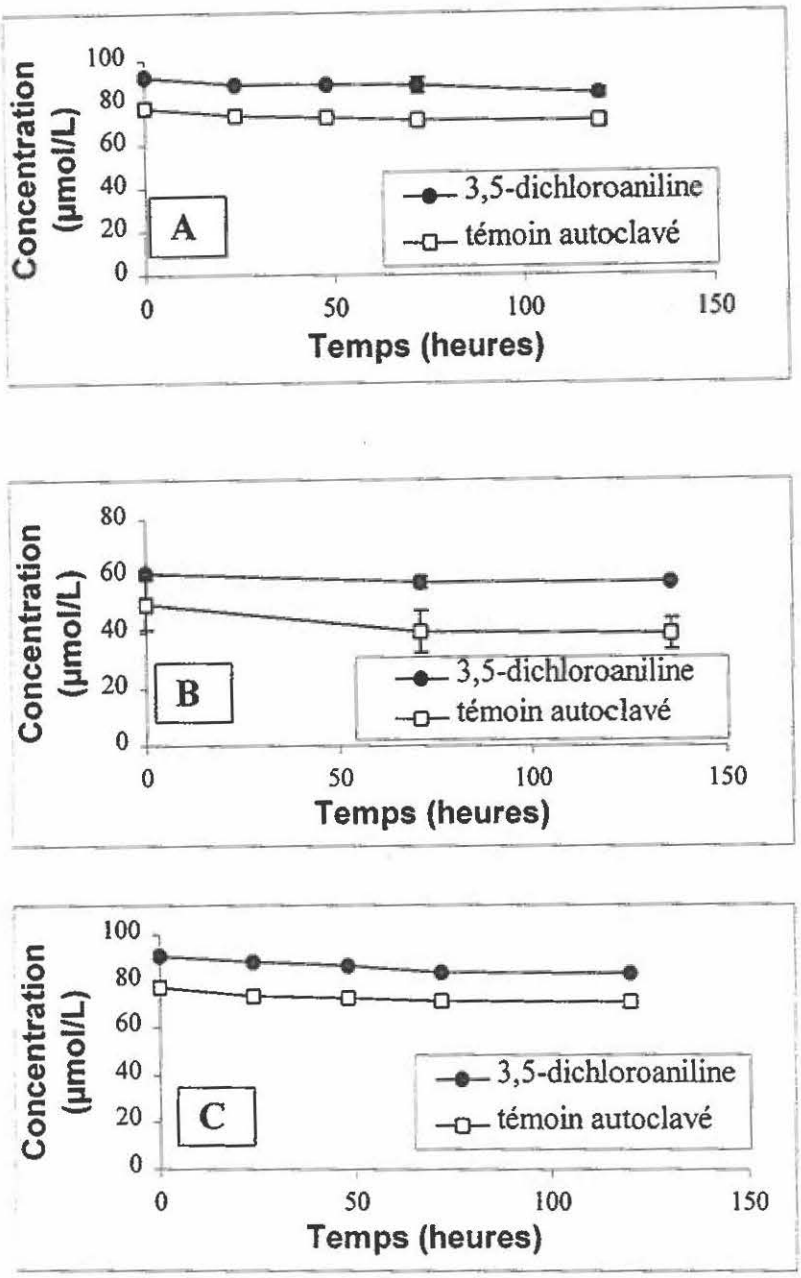


Figure 22 – Courbes de la métabolisation du 3,5-dichloroaniline

Ajout du composé dans un milieu où **A**) la déshalogénase I a été induite avec le 2,4,6-trichlorophénol et **B**) la déshalognéase II a été induite avec le 3,5-dichlorophénol et **C**) aucun inducteur n'a été ajouté.

potentiel de ce composé xénobiotique à induire les déshalogénases. La concentration initiale du pentachloronitrobenzène dans les deux séries d'expériences était de 16 µM. Les anlayses ont été effectuées par CG-SM et les résultats sont présentés à la figure 23.

Les métabolites de la transformation du pentachloronitrobenzène ont été identifiés en comparant au CG-SM les temps de rétention des standards aux temps de rétention des métabolites retrouvés dans l'échantillon.

D'après la figure 23a, 75% du pentachloronitrobenzène a été transformé en pentachloroaniline 10 minutes après son ajout dans le milieu de culture. Après 10 heures d'incubation, le pentachloronitrobenzène a complètement été transformé. Le pentachloroaniline formé était subséquemment dégradé en position *para* et donne le 2,3,5,6-tétrachloroaniline. Ce dernier était déchloré en position *meta* pour être complètement transformé en 2,3,6-tétrachloroaniline. La figure 24a montre la voie de dégradation du pentachloronitrobenzène. La transformation du pentachloronitrobenzène en pentachloroaniline a pu être soit effectuée par le milieu qui est très réducteur ou soit être le résultat d'une transformation catalysée par une enzyme chez la PCP-1.

D'après les résultats du témoin autoclavé, affichés à la figure 23b, le pentachloronitrobenzène n'était nullement transformé dans les premières 10 heures d'incubation, le temps nécessaire pour la transformation complète du composé dans l'expérience présentée à la figure 23a. Ce résultat laisse croire que la réduction du groupe nitro en amino était une réaction effectuée par la souche PCP-1 et non une transformation accomplie par le milieu. Cependant, le graphique à la figure 23b montre une baisse importante de la concentration du pentachloronitrobenzène après les premières 10 heures d'incubations. La concentration du pentachloronitrobenzène a diminué de 16 µM (concentration initiale) à 2,5 µM (concentration après 50 heures d'incubation). Étant donné qu'il n'y avait pas d'augmentation parallèle de la concentration du pentachloroaniline, la disparition du pentachloronitrobenzène était peut-être due à un facteur physico-chimique, un phénomène qui sera abordé à la section 4,9. Néanmoins, la formation de 2 µM de pentachloroaniline dans les contrôles négatifs après 50 heures

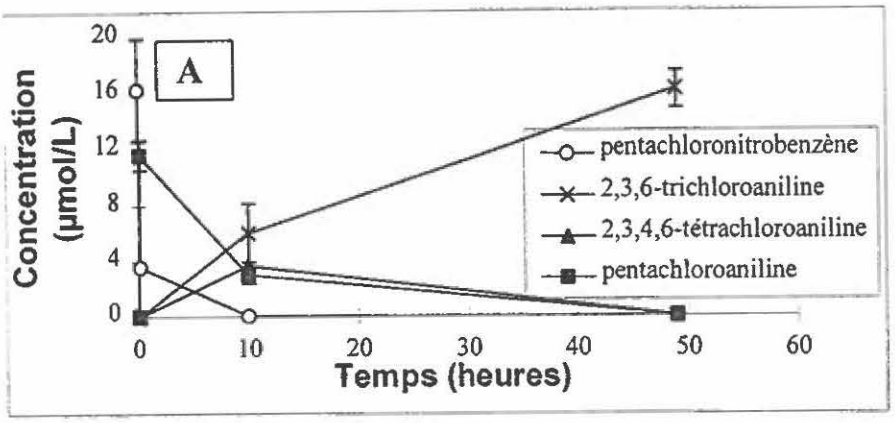
d'incubation laisse supposer que le milieu réducteur pourrait contribuer de façon minime à la réduction du groupe nitro.

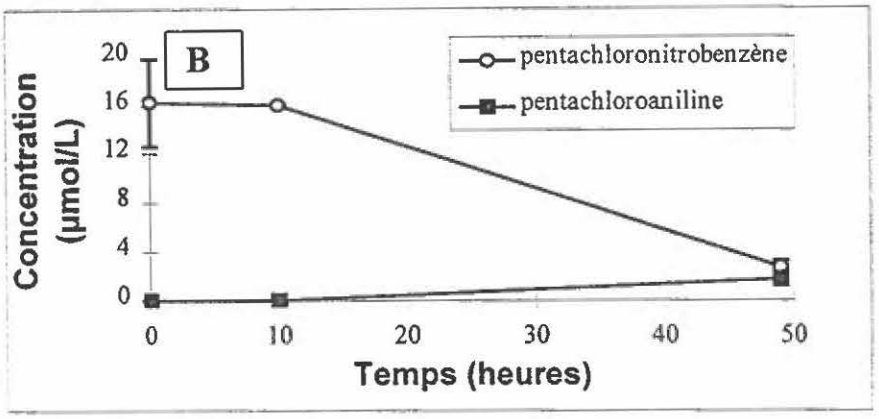
La dernière expérience effectuée avec le pentachloronitrobenzène est présentée à la figure 23c. Dans un milieu où les déshalogénases n'étaient pas induites, le pentachloronitrobenzène a été rapidement transformé en pentachloroaniline. Par contre, le pentachloroaniline formé n'est pas métabolisé. Les résultats suggèrent que le pentachloronitrobenzène ainsi que le pentachloroaniline, comme déjà démontré, ne pouvaient pas induire les enzymes nécessaires à la déshalogénation. De plus, cette expérience suggèrent que les enzymes responsables de la réduction du groupe nitro ne sont pas les déshalogénases I ou II. La voie métabolique de transformation du pentachloronitrobenzène dans un milieu sans déshalogénases est illustrée à la figure 24b.

4,5 Le pentachloropyridine

4,5,1 Mise en évidence d'une activité de déshalogénation envers le pentachloropyridine par CLHP

Seulement une expérience a été réalisée avec le pentachloropyridine. Ce dernier a été ajouté à un milieu de culture 24 heures après l'ajout des deux inducteurs. La concentration initiale du pentachloropyridine était de 53 µM. Le graphique à la figure 25 montre les résultats observés au CLHP. D'après ce graphique, la concentration du pentachloropyridine a chuté de 53 µM à 11 µM en moins de 24 heures et un nouveau pic représentant un métabolite apparaît au CLHP. Par la suite, les quantités observées du pentachloropyridine et du nouveau pic sont demeurées stables pendant les prochains six jours d'incubation. Il est à remarquer que la concentration du témoin autoclavé est passée de 54 µM (concentration initiale) à 23 µM en 24 heures. Par contre, il y aucun nouveau produit, pouvant provenir de la dégradation du pentachloropyridine, qui a été detecté soit au CLHP ou au CG-SM. De plus, il est important de noter que les cultures utilisées lors de cette expérience étaient fermées avec des bouchons en teflon.





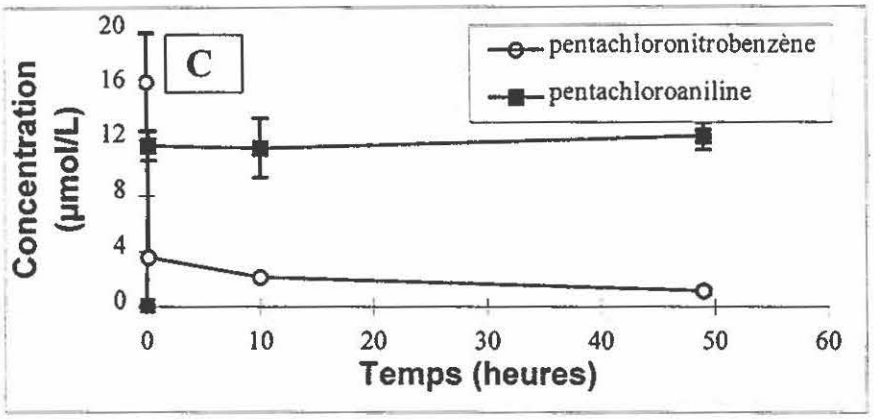


Figure 23 – Courbes de la métabolisation du pentachloronitrobenzène

Ajout du composé dans un milieu **A**) où les déshalogénases I et II ont été induites avec le 2,4,6-trichlorophénol et avec le 3,5-dichlorophénol respectivement et **B**) autoclavé (témoin) et **C**) où aucun inducteur n'a été ajouté.

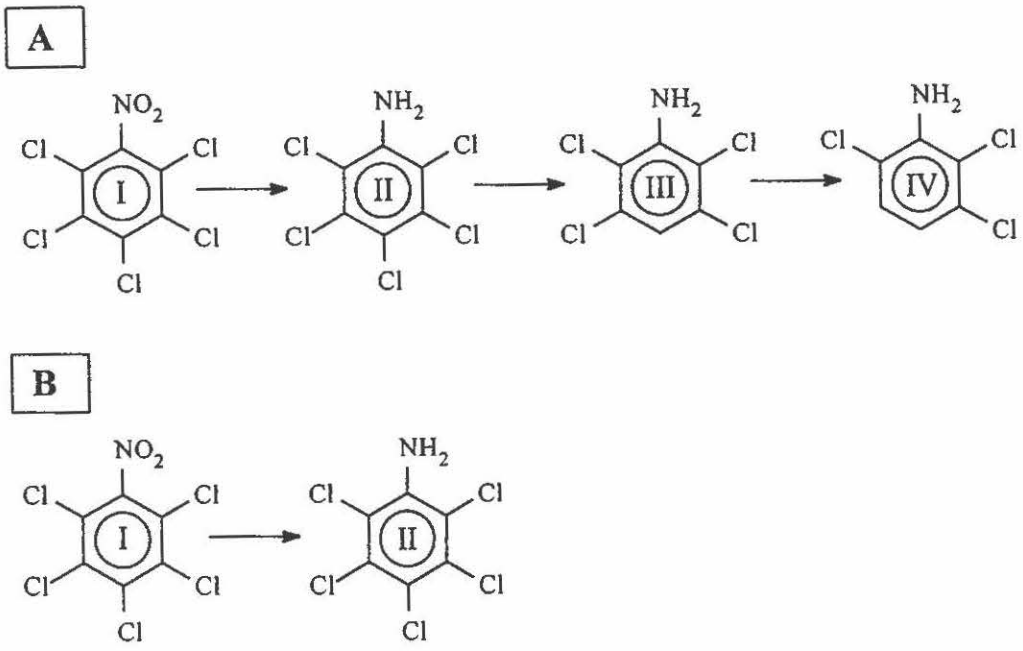


Figure 24 - Voies de dégradation proposées du pentachloronitrobenzène

A) avec induction des déshalogénases I et II et **B)** sans induction des déshalogénases. (I) pentachloronitrobenzène; (II) pentachloroaniline; (III) 2,3,5,6-tétrachloroaniline; (IV) 2,3,6-trichloroaniline.

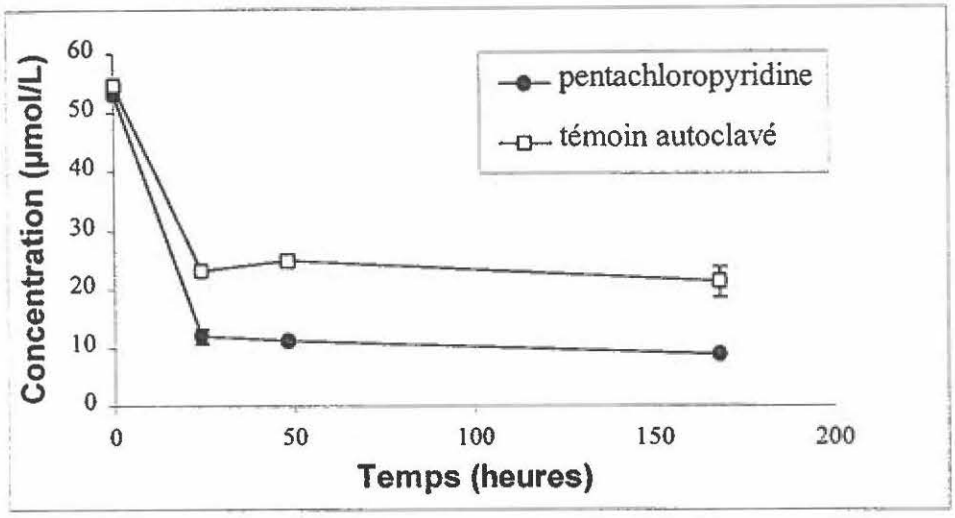


Figure 25 – Courbes de la métabolisation du pentachloropyridine

Ajout du composé dans un milieu où les déshalogénases I et II ont été induites avec le 2,4,6-trichlorophénol et avec le 3,5-dichlorophénol, respectivement.

4,5,2 La dégradation du pentachloropyridine

Après sept jours d'incubation, les milieux ont été extraits et analysés au CG-SM pour identifier les métabolites du pentachloropyridine.

4,5,2,1 L'identification du 2,3,5,6-tétrachloropyridine

Un tétrachloropyridine ayant un temps de rétention de 9,37 min au CG et un ion moléculaire de 215 était présent dans l'échantillon. Aucun standard de tétrachloropyridine n'était disponible. Le seul composé que l'on pouvait rapidement synthétiser était le 2,3,5,6-tétrachloropyridine. La figure 26 montre le spectre de masse du composé synthétisé. Ce spectre de masse est semblable à celui généré par le tétrachloropyridine dans l'échantillon. Afin de prouver que le tétrachloropyridine provenant de la dégradation du pentachloropyridine était bien le 2,3,5,6-tétrachloropyridine, une portion du 2,3,5,6-tétrachloropyridine synthétisé a été ajoutée à un échantillon de l'extraction de l'expérience avec le pentachloropyridine et ensuite injectée au CG-SM. D'après la figure 27, on peut voir que la concentration du tétrachloropyridine, avec un temps de rétention de 9,37 min, a augmenté dramatiquement. Ceci nous indique que le 2,3,5,6-tétrachloropyridine avait le même temps de rétention que le tétrachloropyridine qui provenait de la dégradation du pentachloropyridine. Ceci pourrait donc indiquer que le pentachloropyridine a été déshalogéné en position *para* pour produire le 2,3,5,6-tétrachloropyridine.

4,5,2,2 Voie de dégradation proposée du pentachloropyridine

Les résultats suggèrent que le pentachloropyridine a été déchloré en position *para* pour générer le 2,3,5,6-tétrachloropyridine. Ce dernier a été métabolisé en trichloropyridine qui avait un temps de rétention de 7,13 min au CG. Malheureusement, aucun standard de trichloropyridine n'était disponible. La figure 28 illustre la voie de dégradation du pentachloropyridine.

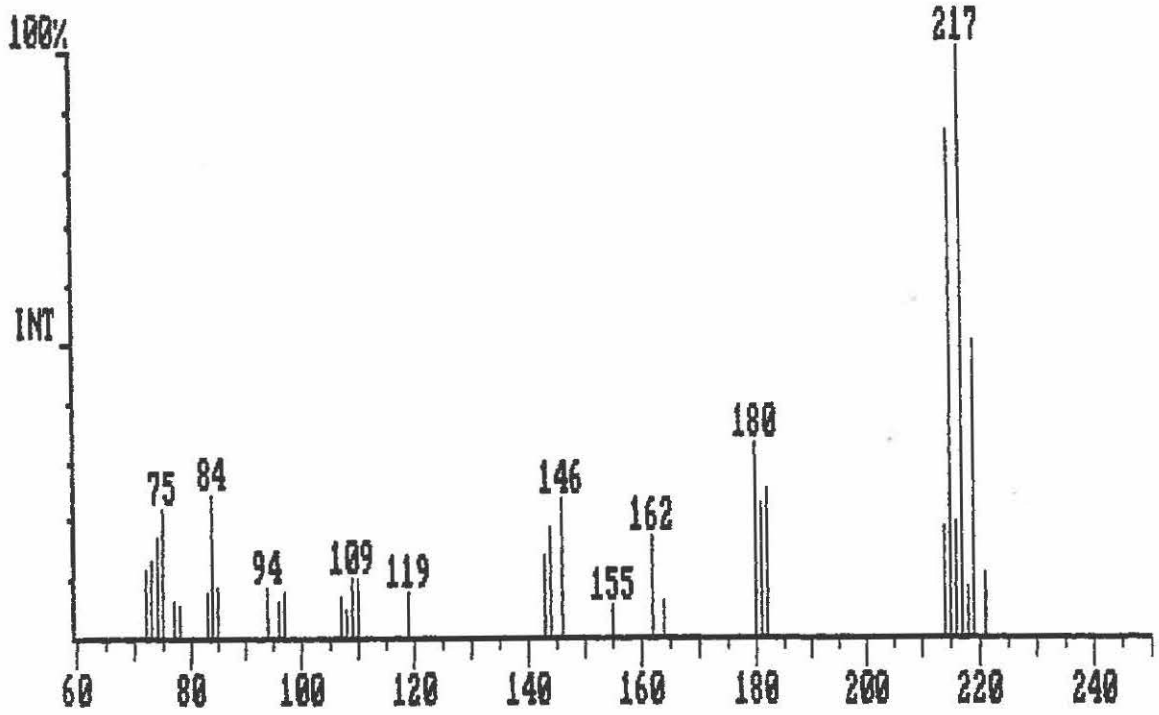


Figure 26 - Spectre de masse du 2,3,5,6-tétrachloropyridine

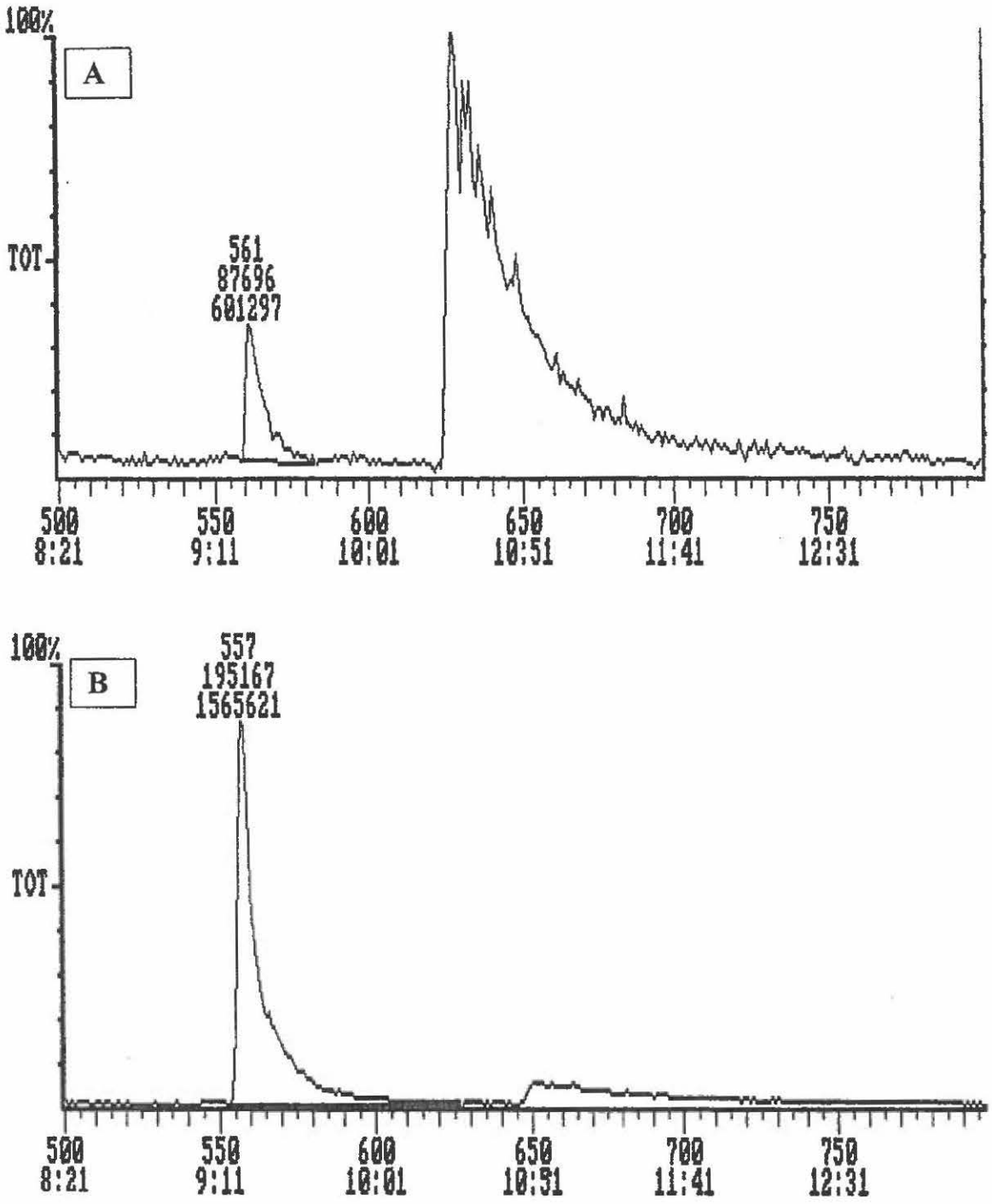


Figure 27 - Ajout d'authentique 2,3,5,6-tétrachloropyridine

A) pic du tétrachloropyridine (scan #561) provenant d'un échantillon de la dégradation du pentachloropyridine et **B)** ajout du 2,3,5,6-tétrachloropyridine à l'échantillon en A).

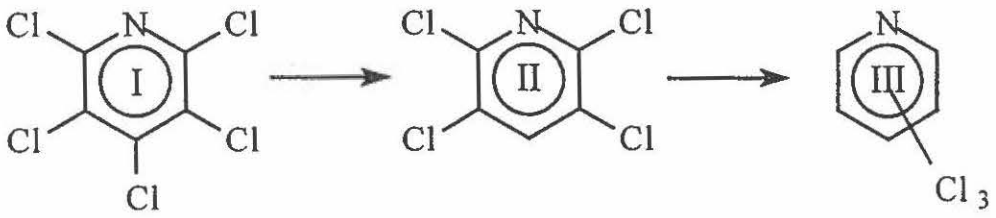


Figure 28 - Voie de dégradation proposée du pentachloropyridine

Avec induction des déshalogénases I et II. (I) pentachloropyridine; (II) 2,3,5,6-tétrachloropyridine; (III) trichloropyridine

4,6 Les polluants d'usines de pâtes et papiers

4,6,1 Le tétrachlorocatéchol

Deux expériences ont été effectuées avec le tétrachlorocatéchol. En premier lieu, le composé xénobiotique a été ajouté à un milieu de culture où les déshalogénases I et II étaient induites. Les inducteurs, le 2,4,6-trichlorophénol et le 3,5-dichlorophénol, ont été ajoutés 24 heures avant l'ajout du tétrachlorocatéchol. Pour la deuxième expérience, le tétrachlorocatéchol a été ajouté à un milieu de culture sans déshalogénases afin de vérifier s'il pouvait induire ces enzymes. Le tétrachlorocatéchol avait une concentration initiale de 24 µM. Toutes les analyses ont été effectuées au CG-SM. Tous les composés ont été identifiés en comparant les temps de rétention des standards aux temps de rétention des métabolites dans l'échantillon.

D'après les résultats présentés à la figure 29a, le tétrachlorocatéchol était complètement dégradé en 12 heures et plusieurs intermédiaires, jusqu'aux monochlorocatéchols, se sont accumulés dans cette courte période d'incubation. Après cinq jours d'incubation, le catéchol est apparu avec une concentration de 1,3 µM, indiquant que les déshalogénases ont complètement déchloré le tétrachlorocatéchol. La figure 30a illustre les voies de dégradation du tétrachlorocatéchol observées lors de cette expérience. Ce dernier a été dégradé soit en position *ortho* afin de donner le 3,4,5-trichlorocatéchol, ou bien il a été dégradé en position *meta* pour donner le 3,4,6-trichlorocatéchol. Dans une première voie de déchloration à partir du 3,4,5-trichlorocatéchol, les déshalogénases pouvaient soit enlever un chlore en position *ortho* pour donner le 4,5-dichlorocatéchol ou les enzymes pouvaient déchlorer en position *meta* pour donner le 3,4-dichlorocatéchol. La concentration du 4,5-dichlorocatéchol est restée relativement stable à 6 µM après les premières 48 heures d'incubation. La faible diminution qui a été observée pour le 4,5-dichlorocatéchol pourrait s'expliquer par une déchloration partielle en position *meta* qui a généré le 4-chlorocatéchol dont la concentration est demeurée constante, à 9,5 µM, après les premières 48 heures d'incubation. De son côté, le 3,4-dichlorocatéchol a été complètement dégradé soit en

position *ortho*, et a produit le 4-chlorocatéchol, ou soit en position *meta*, pour donner le 3-chlorocatéchol. La concentration du 3-chlorocatéchol a diminué légèrement vers la fin de la période d'incubation. Cette diminution a pu être causée par la déchloration du composé pour former le catéchol. Dans une deuxième voie de déchloration à partir du 3,4,6-trichlorocatéchol, ce dernier a été déchloré soit en position *ortho*, ce qui a produit le 3,4-dichlorocatéchol, ou soit en position *meta* pour donner le 3,6-dichlorocatéchol. Le 3,6-dichlorocatéchol a été partiellement dégradé en position *ortho*, durant les dernières 96 heures d'incubation afin de produire le 3-chlorocatéchol.

Lors de la deuxième série d'expériences (figure 29b), le tétrachlorocatéchol, ajouté à un milieu où les déshalogénases n'étaient pas induites, a été déchloré. Ceci nous indique que ce composé, pouvait induire les déshalogénases. La figure 30b indique les voies de dégradation du tétrachlorocatéchol lors de cette expérience. La voie majoritaire de dégradation était celle en position *ortho* pour donner le 3,4,5-trichlorocatéchol. Ce dernier était aussi dégradé en position *ortho* et a produit le 4,5-dichlorocatéchol. Il semblerait que le tétrachlorocatéchol n'était pas un inducteur aussi efficace que le 2,4,6-trichlorophénol puisqu'il était encore présent à une concentration de 8 µM dans le milieu de culture après cinq jours d'incubation. La déchloration en position *meta* était minime. Seulement 0,2 µM de 3,4,6-trichlorocatéchol était présent dans le milieu de culture après 5 jours d'incubation. Ceci pourrait indiquer que le tétrachlorocatéchol a induit la déshalogénase I, l'enzyme responsable de la déchloration en position *ortho* chez les chlorophénols, de façon plus efficace que la déshalogénase II.

4,6,2 Le tétrachloroguaiacol

Une seule expérience a été effectuée avec le tétrachloroguaiacol. Celui-ci a été ajouté à un milieu de culture où les déshalogénases n'étaient pas induites afin d'examiner la possibilité d'une induction des déshalogénases par le tétrachloroguaiacol. Ce dernier était présent à une concentration initiale de 10,1 µM dans les milieux de culture. Toutes les analyses ont été effectuées au CG-SM. Tous les chlorocatéchols ont été identifiés en

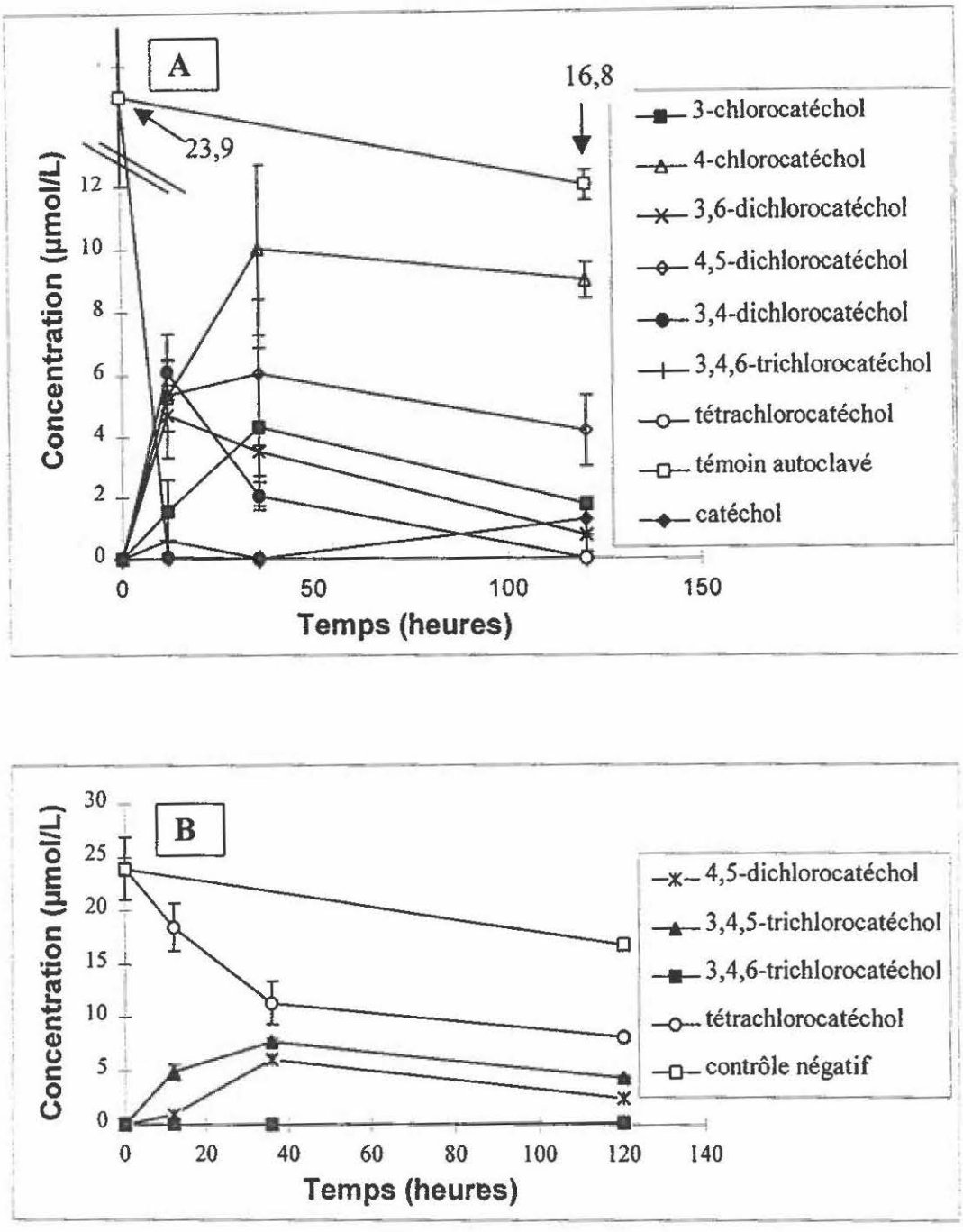


Figure 29 – Courbes de la métabolisation du tétrachlorocatéchol

Ajout du composé dans un milieu **A**) où les déshalogénases I et II ont été induites avec le 2,4,6-trichlorophénol et avec le 3,5-dichlorophénol, respectivement et **B**) où aucun inducteur n'a été ajouté.

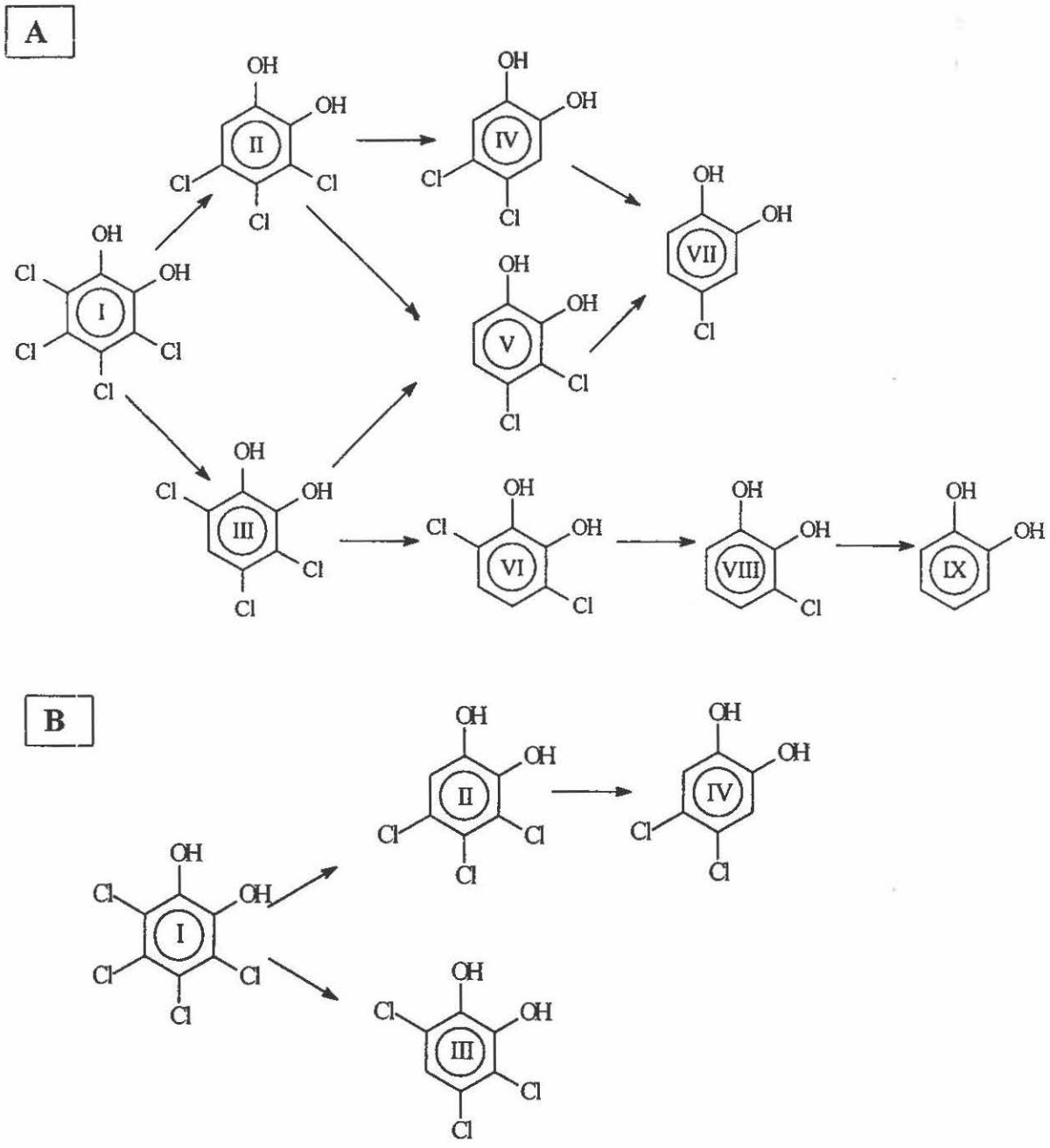


Figure 30 - Voies de dégradation proposées du tétrachlorocatéchol

A) avec induction des déshalogénases I et II et **B)** sans induction des déshalogénases. (I) tétrachlorocatéchol; (II) 3,4,5-trichlorocatéchol; (III) 3,4,6-trichlorocatéchol; (IV) 4,5-dichlorocatéchol; (V) 3,4-dichlorocatéchol; (VI) 3,6-dichlorocatéchol; (VII) 4-chlorocatéchol; (VIII) 3-chlorocatéchol; (IX) catéchol.

INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
BIBLIOTHÈQUE

comparant les temps de rétention de ces derniers aux temps de rétention des standards. Le trichloroguaiacol présent dans l'échantillon a été identifié par RMN.

4,6,2,1 L'identification du 3,5,6-trichloroguaiacol

Lors de l'analyse des résultats de la dégradation du tétrachloroguaiacol, un trichloroguaiacol de structure inconnue a été identifié au CG-SM. Afin de connaître la structure de ce dernier, 400 ml de culture renfermant 162,8 µM de tétrachloroguaiacol ont été incubés pendant une période de 24 heures. Après l'extraction des composés dans le milieu, un des produits isolés avait le même temps de rétention et le même spectre de masse que le trichloroguaiacol identifié lors des expériences. Ce composé a donc été analysé au RMN-H^1.

L'identification du produit était possible en comparant les données du spectre présentés à la figure 31 avec les résultats de Smith *et al.* (1994). Le tableau 14b indique la fréquence des protons (en ppm) obtenus par Smith *et al.* lors de l'analyse des quatre isomères de trichloroguaiacol tandis que le tableau 14a indique les résultats du spectre (figure 31). Le pic à la fréquence 7,26 ppm sur le spectre à la figure 31 provenait du solvent, le $CDCl_3$. D'après ces résultats, le trichloroguaiacol isolé, provenant de la dégradation du tétrachloroguaiacol, était le 3,5,6-trichloroguaiacol.

Tableau 14a - Données provenant du RMN-H[1] du trichloroguaiacol

Fréquence (ppm)	interprétation*	multiplicité	Intégration†
6,098	OH sur un cycle aromatique	singulet	45mm/(43,6mm/H) = 1,03 atomes d'hydrogène
7,089	hydrogène sur un cycle aromatique	singulet	33mm/(43,6mm/H) = 0,76 atome d'hydrogène
3,942	hydrogènes sur un groupement méthoxy	singulet	140mm/(43,6mm/H) = 3,21 atomes d'hydrogène

* Pasto et Johnson (1979)

† L'intégration des 3 pics s'additionne à 218 mm. Puisqu'il y a cinq atomes d'hydrogène dans le trichloroguaiacol donc 218mm/5 = 43,6mm/atome d'hydrogène.

Tableau 14b - Fréquence des protons au RMN-H[1] (em ppm) de quatre isomères de trichloroguaiacol (Smith *et al.* 1994) et de l'inconnu présenté au tableau 14a

isomère	H aromatique	OCH_3
3,4,5-trichloroguaiacol	7,06	3,92
4,5,6-trichloroguaiacol	6,87	3,88
3,4,6-trichloroguaiacol	7,26	3,94
3,5,6-trichloroguaiacol	7,08	3,94
inconnu	**7,089**	**3,942**

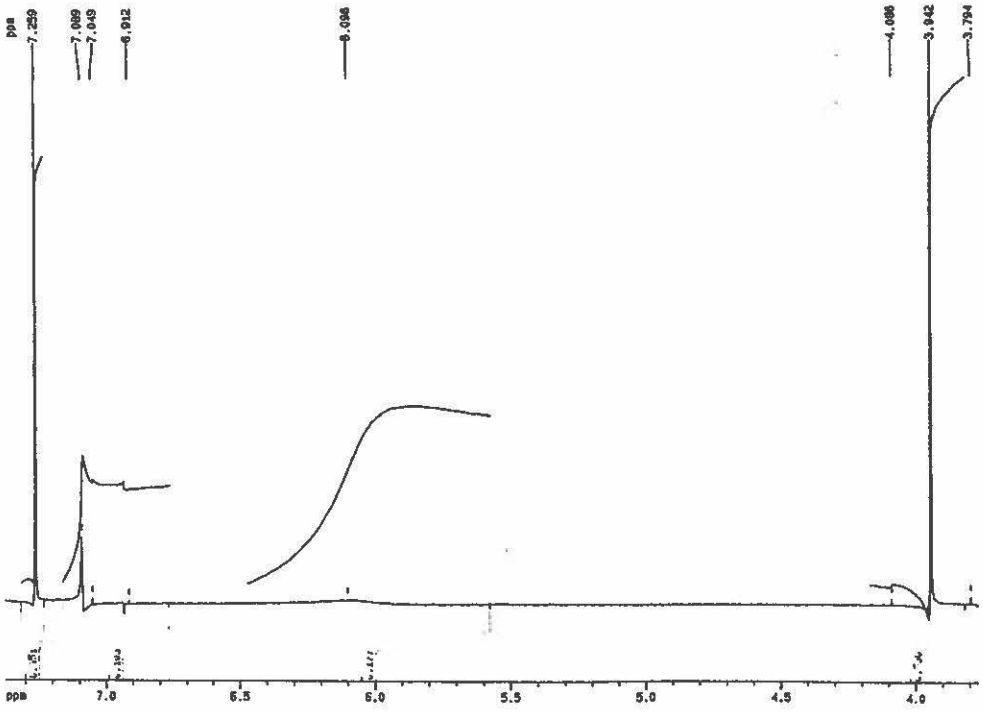


Figure 31 - RMN-H[1] du 3,5,6-trichloroguaiacol

4,6,2,2 Voies de dégradation proposées du tétrachloroguaiacol

La figure 32 présente les concentrations des métabolites et la figure 33 la voie de dégradation du substrat. Dans les premiers 24 heures, le tétrachloroguaiacol était complètement déchloré en position *para*, par rapport au groupement hydroxy et a donné le 3,5,6-trichloroguaiacol. Par la suite, ce trichloroguaiacol a été complètement transformé lorsque le groupement méthoxy a été déméthylé pour produire le 3,4,6-trichlorocatéchol. Ce composé, qui avait une concentration finale de 8 µM après 6 jours d'incubation, n'était que très peu déchloré en position *ortho* et *meta* et a produit le 3,6-dichlorocatéchol, le 3,5-dichlorocatéchol et le 3,4-dichlorocatéchol. Le 3,5-dichlorocatéchol n'est pas indiqué à la figure 32 à cause de sa faible concentration (0,1 µM après 144 heures d'incubation). Finalement, la présence de 0,02 µM de 4-chlorocatéchol après 6 jours d'incubation (non indiquée à la figure 32) a indiqué qu'il y avait une légère déchloration des 3,4- et 3,5-dichlorocatéchol. Il est aussi à noter qu'une quantité infime (0,024 µM) de tétrachlorocatéchol était présente après 24 heures d'incubation, ce qui nous indique que la déméthylation du tétrachloroguaiacol pouvait avoir lieu avant la déchloration de ce composé (non indiquée à la figure 32). Par contre, compte tenu des 11 µM de 3,5,6-tétrachloroguaiacol qui étaient présents dans le milieu de culture après 24 heures, il semblerait que la production du tétrachlorocatéchol était une voie de dégradation minoritaire du tétrachloroguaiacol.

4,6,3 Le tétrachlorovératrole

Deux expériences ont été réalisées avec le tétrachlorovératrole. Dans la première expérience, les deux inducteurs ont été ajoutés 24 heures avant l'ajout du tétrachlorovératrole. Pour la deuxième expérience, le tétrachlorovératrole a été ajouté à un milieu de culture où les déshalogénases n'étaient pas induites afin de voir si le tétrachlorovératrole pouvait les induire. Dans les deux expériences, le tétrachlorovératrole avait une concentration initiale de 14 µM dans le milieu de culture. La figure 34 montre les résultats graphiques des deux expériences. Toutes les analyses

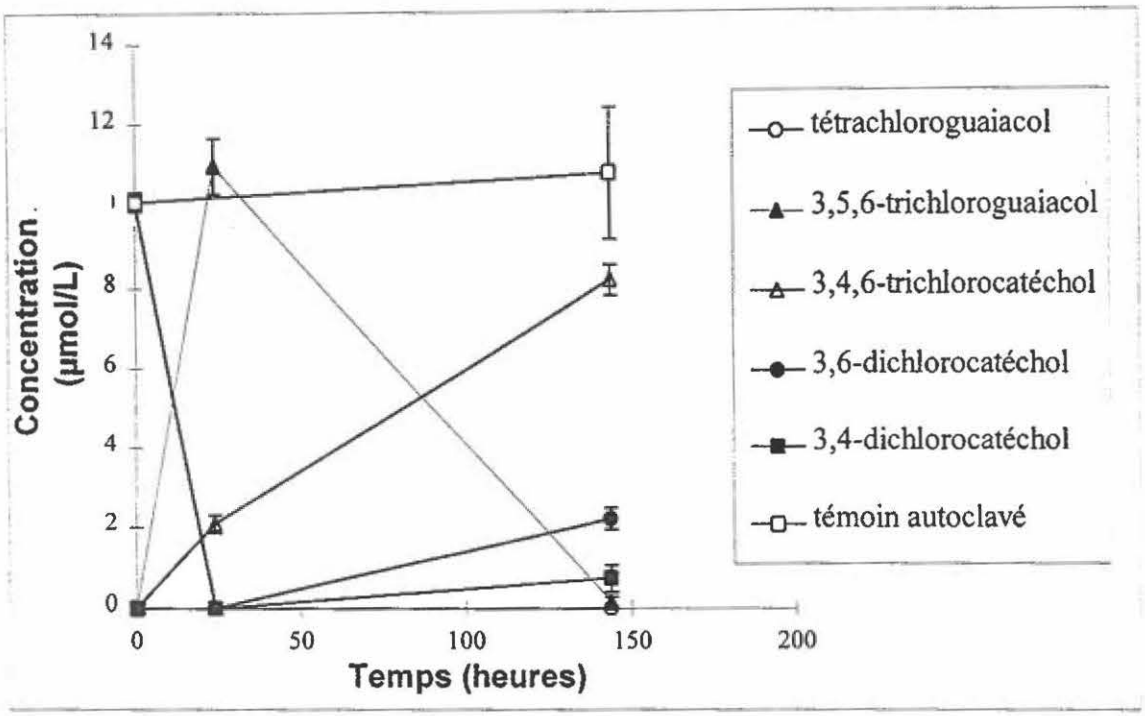


Figure 32 – Courbes de la métabolisation du tétrachloroguaiacol

Ajout du composé dans un milieu où aucun inducteur n'a été ajouté.

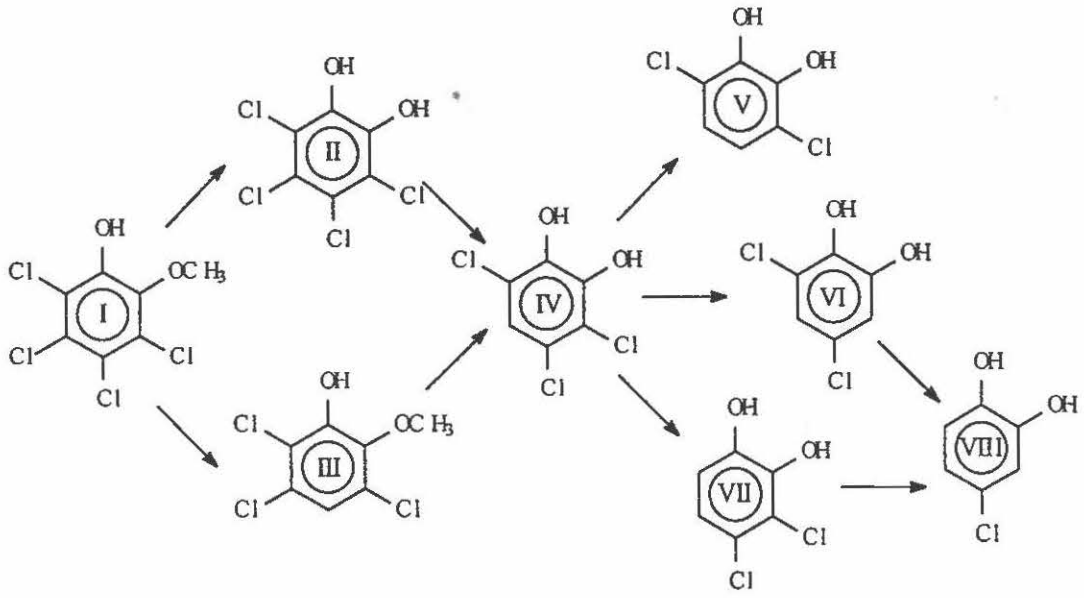


Figure 33 - Voies de dégradation proposées du tétrachloroguaiacol

Sans induction des déshalogénases. (I) tétrachloroguaiacol; (II) tétrachlorocatéchol; (III) 3,5,6-trichloroguaiacol; (IV) 3,4,6-trichlorocatéchol; (V) 3,6-dichlorocatéchol; (VI) 3,5-dichlorocatéchol; (VII) 3,4-dichlorocatéchol; (VIII) 4-chlorocatéchol.

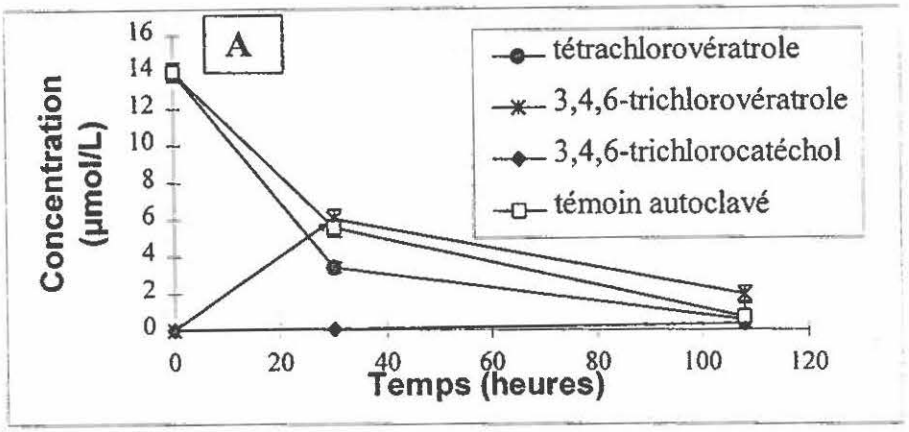
ont été effectuées au CG-SM et tous les métabolites ont été identifiés en comparant leurs temps de rétention aux temps de rétention des standards.

D'après la figure 34a, le tétrachlorovératrole pouvait seulement être déchloré lorsque les déshalogénases étaient déjà induites. La figure 35 illustre la voie de dégradation proposée du composé lors de cette expérience. Le tétrachlorovératrole a été déchloré très lentement. Il y avait encore 3,5 µM du substrat après 30 heures d'incubation et 0,5 µM du composé après 110 heures d'incubations. Le métabolite de dégradation était le 3,4,6-trichlorovératrole, indiquant donc que la déchloration s'était fait en position *meta*. Une petite fraction du 3,4,6-tétrachlorovératrole a été déméthylée afin de produire le 3,4,6-trichlorocatéchol qui était présent à 0,3 µM dans le milieu de culture après 110 heures d'incubation.

La figure 34b illustre les transformations du tétrachlorovératrole lors de l'expérience où les déshalogénases n'étaient pas induites. D'après le graphique, la concentration du tétrachlorovératrole est passée de 14 µM à 0,7 µM après 100 heures d'incubation. Par contre, aucun intermédiaire de dégradation n'a été détecté lors de l'analyse des extractions au CG-SM. De plus, la concentration du tétrachlorvératrole a chuté de façon semblable dans les témoins autoclavés des deux séries d'expériences effectuées avec le composé. Il est à noter que les inducteurs dans les témoins n'ont pas été dégradés et qu'aucun intermédiaire de la dégradation du tétrachlorovératrole n'a été isolé. Cette disparition du composé sera élucidée à la section 4,9.

4,7 Le pentachloroanisole

Deux expériences ont été réalisées avec le pentachloroanisole. Lors de la première expérience, le composé a été ajouté dans un milieu de culture où les deux déshalogénases étaient présentes. Dans cette expérience, les inducteurs ont été ajoutés 24



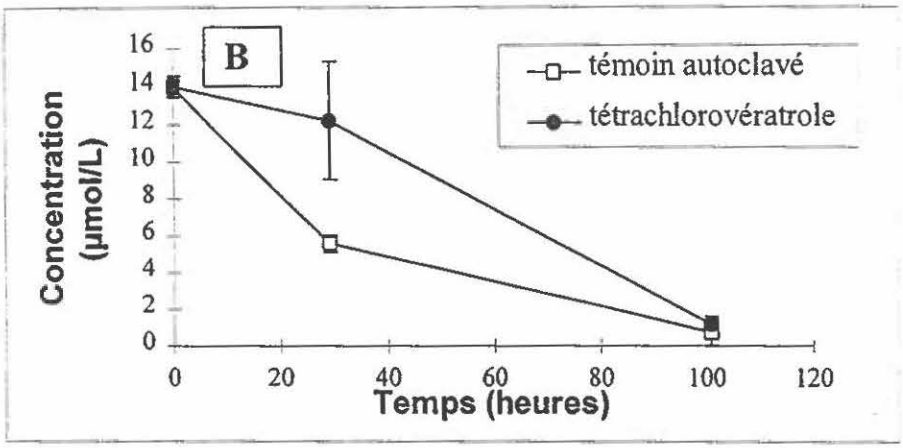


Figure 34 – Courbes de la métabolisation du tétrachlorovératrole

Ajout du composé dans un milieu **A)** où les déshalogénases I et II ont été induites avec le 2,4,6-trichlorophénol et avec le 3,5-dichlorophénol respectivement et **B)** où aucun inducteur n'a été ajouté.

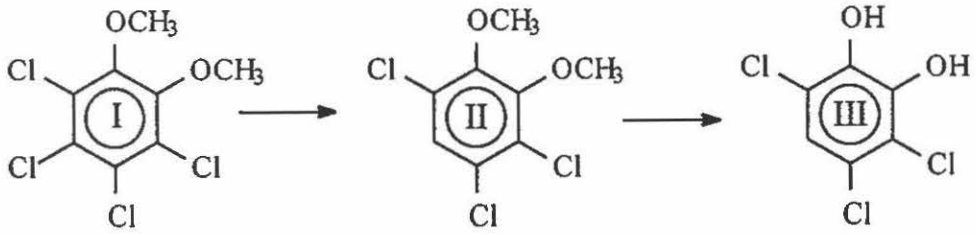


Figure 35 - Voie de dégradation proposée du tétrachlorovératrole

Avec induction des déshalogénases I et II. (I) tétrachlorovératrole; (II) 3,4,6-trichlorovératrole; (III) 3,4,6-trichlorocatéchol.

heures avant l'ajout du pentachloroanisole. Pour la deuxième expérience, le composé xénobiotique a été ajouté à un milieu de culture où les déshalogénases n'étaient pas induites afin de voir s'il pouvait les induire. Dans les deux expériences, le pentachloroanisole avait une concentration initiale de 19,7 µM dans le milieu de culture. La figure 36 présente les résultats graphiques des deux expériences tels qu'observés au CG-SM. Tous les métabolites chlorophénolés ont été identifiés en comparant leurs temps de rétention au CG-SM aux temps de rétention des standards. L'identité du 2,3,5,6-tétrachloroanisole a été déduite à partir de la présence du 2,3,5,6-tétrachlorophénol. Seul le 2,3,5,6-tétrachloroanisole aurait pu générer le 2,3,5,6-tétrachlorophénol.

D'après la figure 36a, le pentachloroanisole a été déchloré lorsque les déshalogénases étaient induites. La figure 37 illustre les voies de dégradation du composé lors de cette expérience. Le pentachloroanisole n'était pas complètement déchloré à la fin de la période d'incubation de 75 heures, ayant une concentration résiduelle de 1,5 µM. Après 15 heures d'incubation, le premier produit de dégradation observé était le 2,3,5,6-tétrachloroanisole, indiquant donc que la déchloration s'était fait en position *para*. Ce composé méthylé a été rapidement déméthylé afin de produire le 2,3,5,6-tétrachlorophénol. Ce dernier a été déchloré majoritairement en position *ortho* pour produire le 2,3,5-trichlorophénol, et minoritairement en position *meta* pour donner le 2,3,6-trichlorophénol. Les trichlorophénols n'ont pas été déchlorés.

La figure 36b présente les concentrations du pentachloroanisole lors de l'expérience où les déshalogénases n'étaient pas induites. D'après le graphique, la concentration du pentachloroanisole est passée de 19,7 µM à 2 µM après 192 heures d'incubation. Par contre, aucun intermédiaire de dégradation du pentachloroanisole n'a été détecté lors de l'analyse des extraits au CG-SM. Pareillement, la concentration du pentachloroanisole a chuté dans les témoins autoclavés des deux séries d'expériences effectuées avec le composé. Il est à noter que les inducteurs dans les témoins n'ont pas été dégradés et qu'aucun intermédiaire de la dégradation du pentachloroanisole n'a été isolé dans leurs extraits. La disparition du composé sera expliquée à la section 4,9.

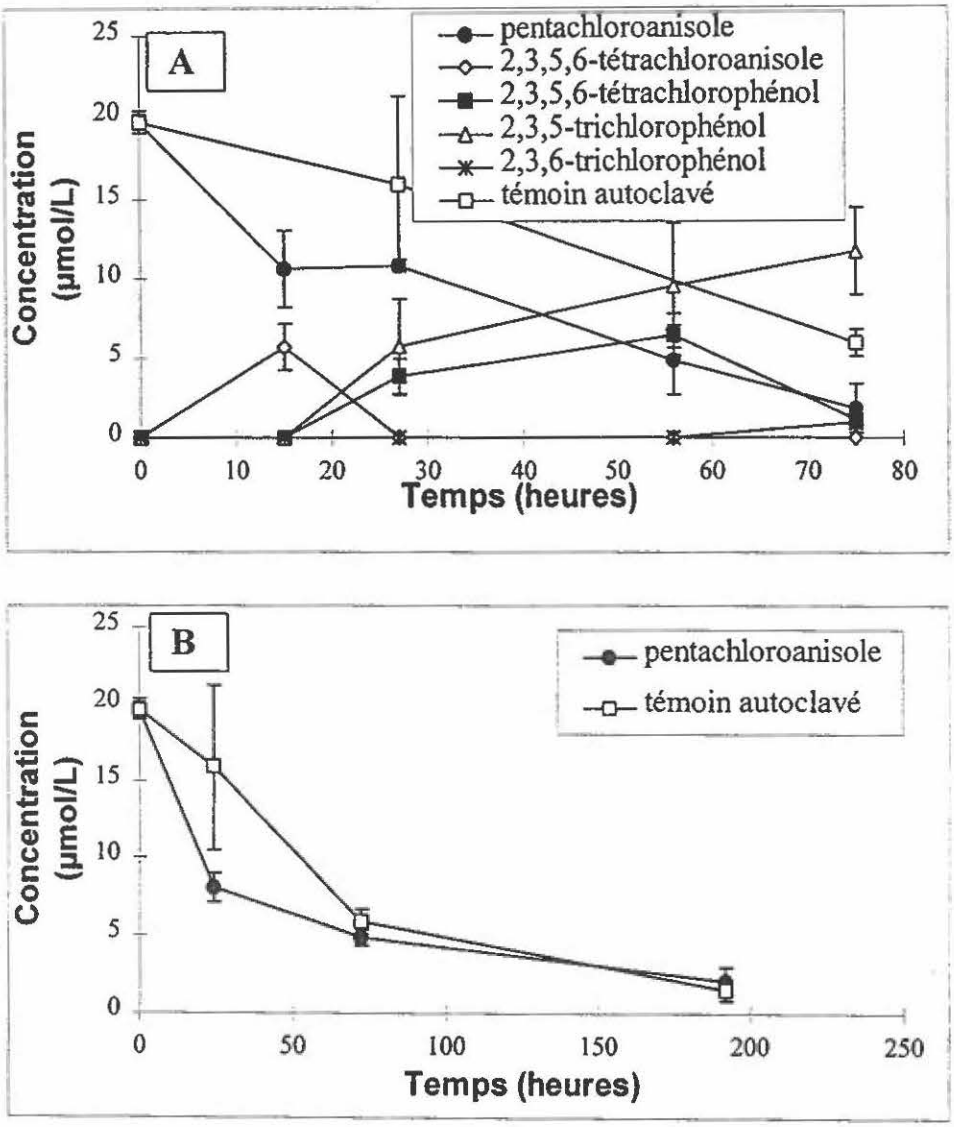


Figure 36 – Courbes de la métabolisation du pentachloroanisole

Ajout du composé dans un milieu **A)** où la déshalogénases I et II ont été induites avec le 2,4,6-trichlorophénol et avec le 3,5-dichlorophénol respectivement et **B)** où aucun inducteur n'a été ajouté.

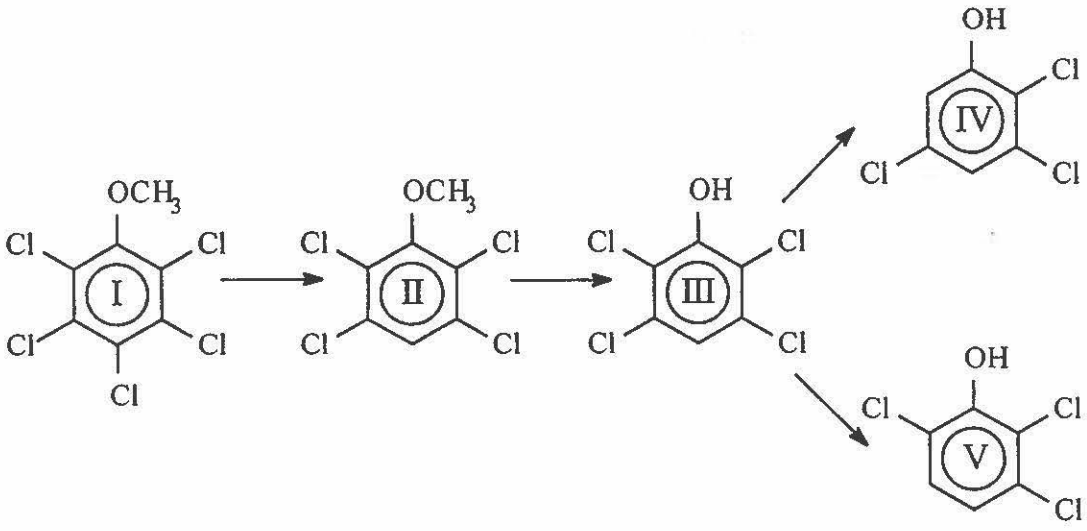


Figure 37 - Voies de dégradation proposées du pentachloroanisole

Avec induction des déshalogénases I et II. (I) pentachloroanisole; (II) 2,3,5,6-tétrachloroanisole; (III) 2,3,5,6-tétrachlorophénol; (IV) 2,3,5-trichlorophénol; (V) 2,3,6-trichlorophénol.

4,8 Les biphénylpolychlorés hydroxylés

4,8,1 Les 2,2',5'-trichloro-4- et 2',5,5'-trichloro-2-hydroxybiphényle

Le 2,2',5'-trichloro-4-hydroxybiphényle et le 2',5,5'-trichloro-2-hydroxybiphényle ont été ajoutés à des milieux de culture séparés dans lesquels les deux déshalogénases avaient été induites par les deux inducteurs 24 heures auparavant. La concentration initiale des composés dans le milieu était de 14,8 µM pour le 2,2',5'-trichloro-4-hydroxybiphényle et de 14,4 µM pour le 2',5,5'-trichloro-2-hydroxybiphényle. Les figures 38a et 38b présentent les concentrations de ces composés après une période d'incubation de 96 heures. D'après le graphique, la concentration des deux composés est demeurée stable lors de l'incubation ce qui suggère que les déshalogénases étaient incapables de déshalogéner ces deux types de BPC hydroxylés. Les inducteurs ont été dégradés indiquant que les composés xénobiotiques n'étaient pas toxiques à la souche PCP-1.

4,8,2 Les deux isomères de hexachloro-3-hydroxybiphényle: 333J et 222F

Afin de tester la capacité de la souche à dégrader ces BPC hydroxylés, les deux isomères ont été ajoutés séparément à des milieux de cultures où les déshalogénases I et II avaient été induites 24 heures plus tôt par l'ajout du 2,4,6-trichlorophénol et du 3,5-dichlorophénol. L'isomère 333J avait une concentration initiale de 8,5 µM et l'isomère 222F avait une concentration initiale de 11,5µM. Toutes les analyses de cette expériences ont été effectuées au CG-SM.

D'après les figures 39a et 39b, il est évident qu'après 96 heures d'incubation, les déshalogénases étaient incapables de s'attaquer à ces deux isomères. Dans les deux cas, il y avait une diminution dans la concentration des deux isomères dans les échantillons. La concentration du 333J passe de 8,5 µM à 6,0 µM et celle du 222F passe de 11,5 µM à 6,5 µM. Par contre, cette diminution n'était pas accompagnée d'une apparition de produits

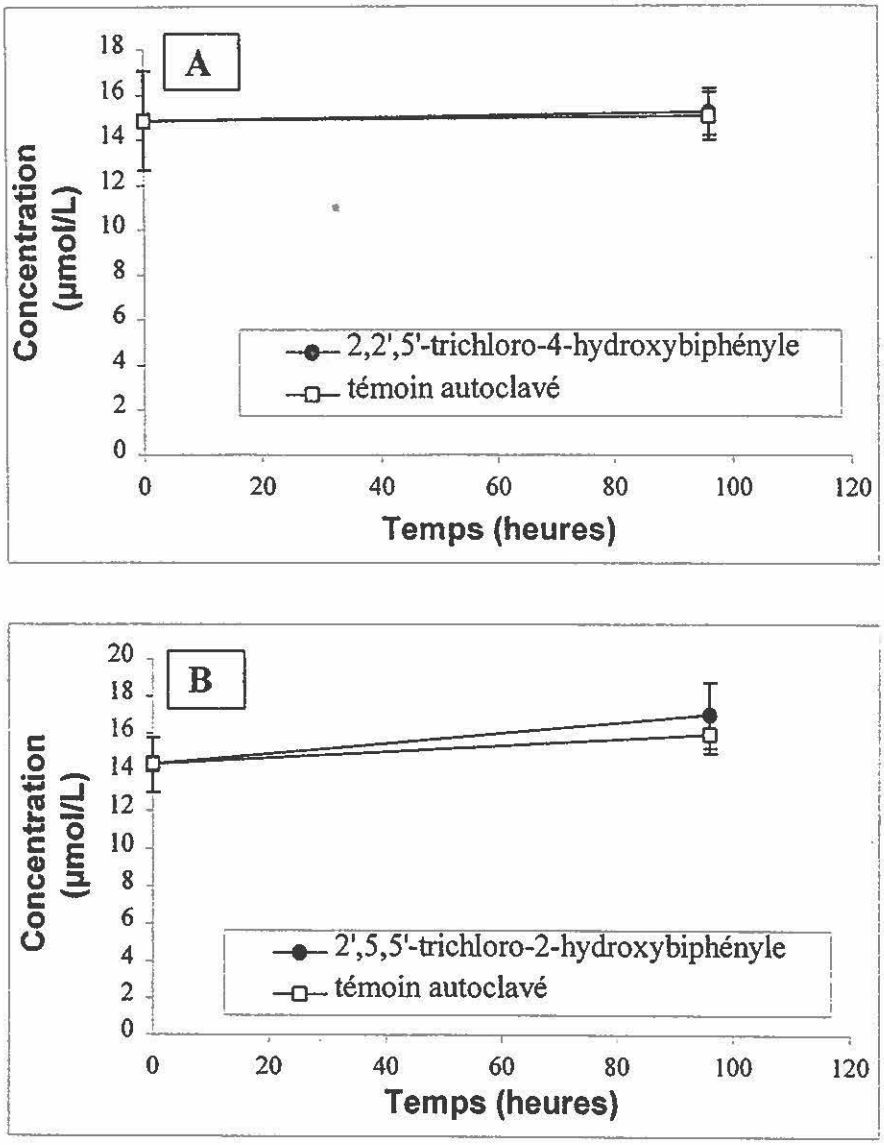
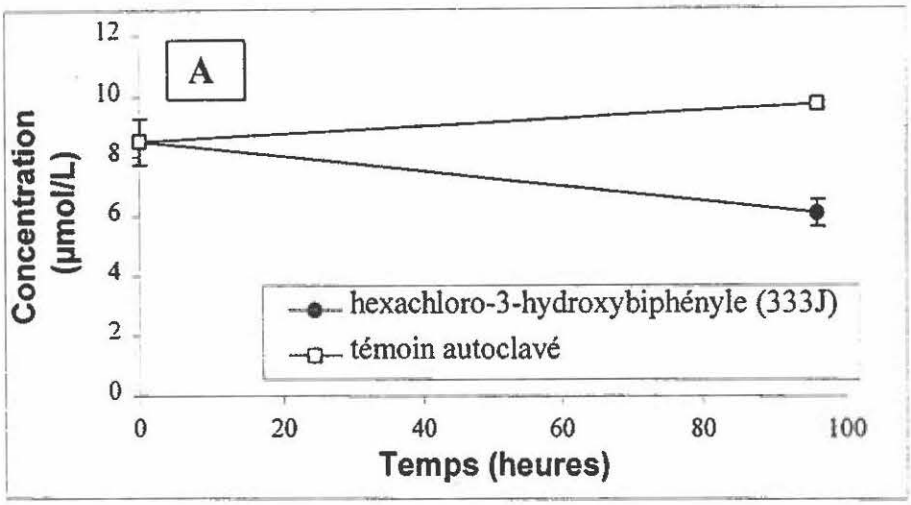


Figure 38 – Courbes de la métabolisation du (A) 2,2',5'-trichloro-4-hydroxybiphényle et du (B) 2',5,5'-trichloro-2-hydroxybiphényle

Les composés ont été ajoutés à des milieux où les déshalogénases I et II ont été induites avec le 2,4,6-trichlorophénol et avec le 3,5-dichlorophénol respectivement.



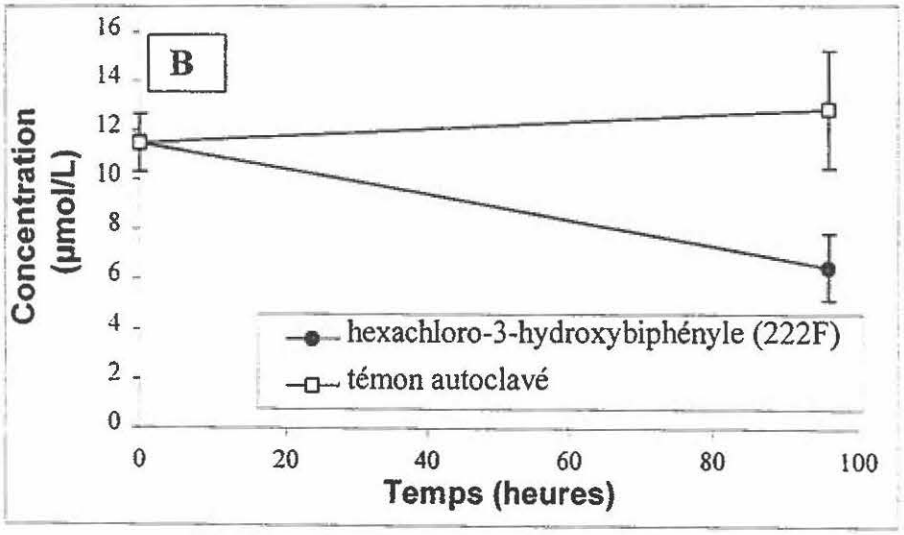


Figure 39 – Courbes de la métabolisation du (A) hexachloro-3-hydroxybiphényle 333J et du (B) hexachloro-3-hydroxybiphényle 222F

Les composés ont été ajoutés à des milieux où les déshalogénases I et II ont été induites avec le 2,4,6-trichlorophénol et avec le 3,5-dichlorophénol respectivement.

de dégradation. Aucun métabolite de dégradation de ces deux isomères n'a été détecté au CG-SM. Donc, il est vraisemblable que les déshalogénases sont incapables de déshalogéner des BPC hydroxylés en position 3.

4,8,3 Le pentachloro-4,4'-dihydroxybiphényle

Afin de tester la capacité des déshalogénases à dégrader ce composé, il a été ajouté à un milieu de culture où les déshalogénases I et II avaient été induites. Le 2,4,6-trichlorophénol ainsi que le 3,5-dichorophénol ont été ajoutés 24 heures plus tôt afin d'induire les déshalogénases. Le composé xénobiotique à tester avait une concentration initiale de 13,4 µM dans le milieu de culture.

D'après la figure 40, les déshalogénases ont enlevé deux atomes de chlore au pentachloro-4,4'-dihydroxybiphényle pour produire un trichloro-4,4'-dihydroxybiphényle en 96 heures. La structure exacte de ces composés est inconnue faute de manque de standards. Cette expérience a confirmé que les déshalogénases peuvent s'attaquer aux BPC hydroxylés dont le groupe hydroxyle est en position 4.

4,8,4 Les mélanges de BPC hydroxylés

Trois mélanges de BPC hydroxylés ont été synthétisés. Les BPC étaient hydroxylés en position 2, 3 ou 4. Chaque mélange a été ajouté à un milieu de culture dans lequel les déshalogénases étaient induites grâce à l'ajout des deux inducteurs 24 heures plus tôt. La concentration de chaque mélange dans les milieux étaient de 14 ppm.

La figure 41 présente les résultats des expériences avec les mélanges de 2-hydroxy BPC, de 3-hydroxy BPC et de 4-hydroxy BPC. Les résultats de l'expérience avec le mélange de 2-hydroxy BPC (figure 41a) montrent qu'il y avait une augmentation dans la

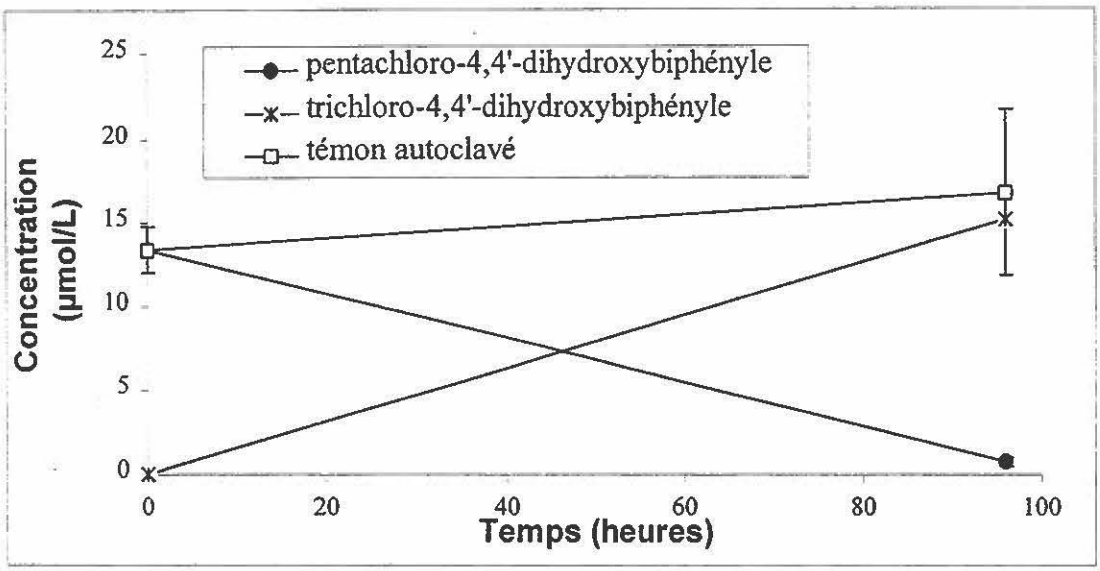


Figure 40 – Courbes de la métabolisation du pentachloro-4,4'-dihydroxybiphényle

Les composés sont ajoutés à des milieux où les déshalogénases I et II ont été induites avec le 2,4,6-trichlorophénol et avec le 3,5-dichlorophénol, respectivement.

concentration d'un dichloro-2- hydroxybiphényl après 4 jours d'incubation. Par contre, cette augmentation n'est pas liée à une diminution significative de la concentration initiale d'un BPC hydroxylé avec trois atomes de chlore ou plus dans le mélange. En effet, il n'y a aucune baisse significative dans la concentration initiale de tous les constituants dans ce mélange. À la figure 41b, les résultats semblent aussi démontrer qu'il n'y avait aucun changement significatif dans la concentration initiale des constituants du mélange des 3-hydroxy BPC. Les déshalogénases étaient vraisembablement incapables de déchlorer des BPC hydroxylés en position 2 ou en position 3. Il est important de remarquer que les mélanges de BPC hydroxylés ajoutés au milieu n'étaient pas toxiques puisque les inducteurs ont toujours été dégradés.

Les résultats de l'expérience avec le mélange de 4-hydroxy BPC, présentés à la figure 41c, indique qu'il y a eu la dégradation d'au moins un composant dans le mélange. La concentration du composé identifié comme le trichloro-4-hydroxy BPC #2 a diminué de façon significative. Liée à cette dégradation était l'apparition de deux nouveaux composés qui n'étaient pas présent dans le mélange original: un dichloro-4-hydroxy BPC et un monochloro-4-hydroxy BPC. Les déshalogénases ont été capables d'enlever un ou même deux atomes de chlore sur un des BPC hydroxylé en position 4. On peut donc conclure que les déshalogénases étaient capables de déchlorer des BPC hydroxylés en position 4.

4,9 Évaluation de l'interaction des bouchons en butyle avec les produits testés

Certains résultats présentés aux sections ci-dessus (§4,3,1; §4,3,2; §4,4; §4,5; §4,6,3; §4,7) démontraient une diminution marquée de la concentration initiale des composés xénobiotiques ajoutés aux milieu de culture lors des expériences ainsi que dans les contrôles abiotiques. Cette diminution n'était pas accompagnée d'une apparition de nouveaux produits pouvant provenir de la dégradation du composé de départ. Il a été suggéré que les bouchons en butyle, utilisés pour fermer de façon hermétique les bouteilles dans lesquels était contenu le milieu de culture, pouvaient adsorber les

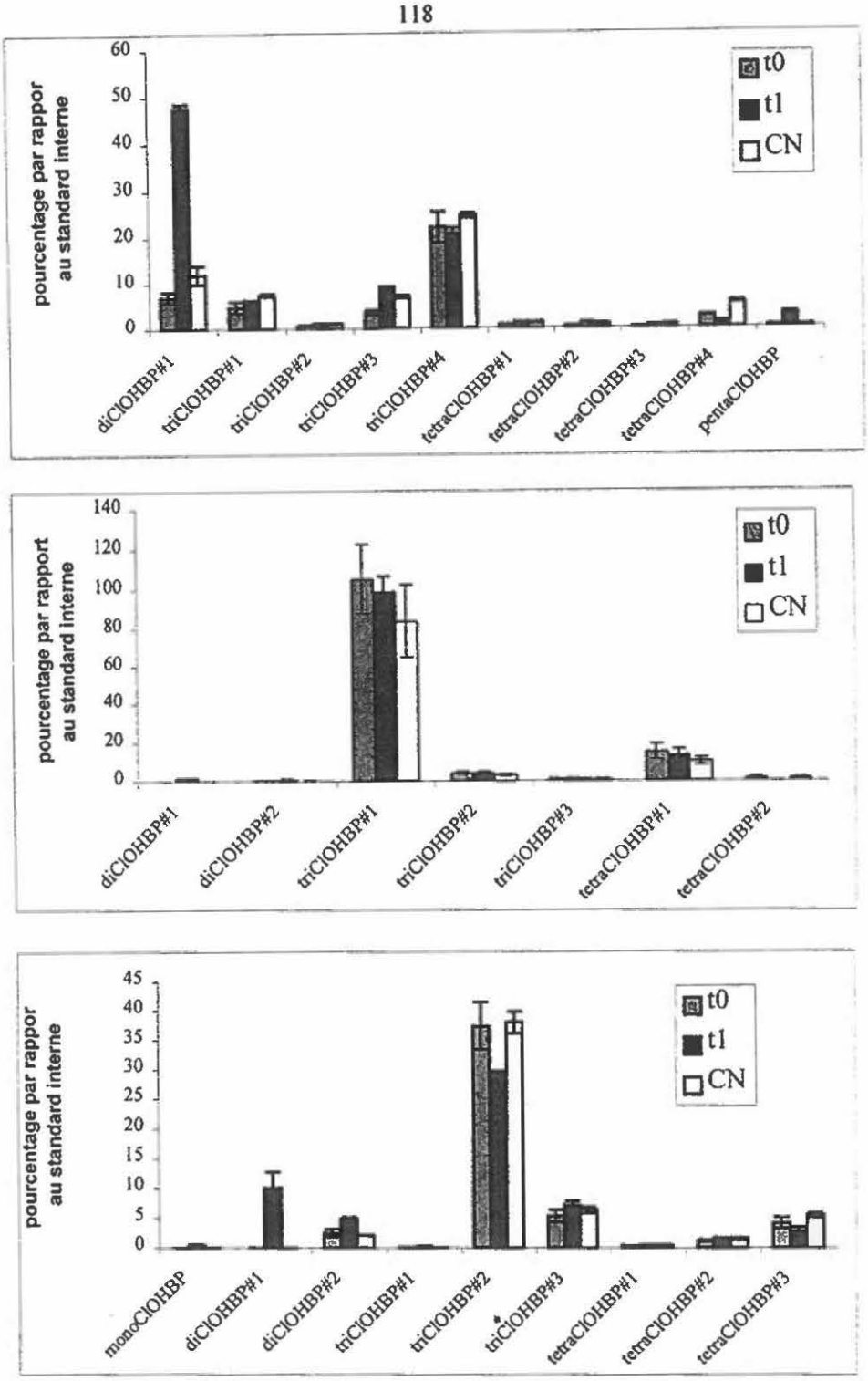


Figure 41 – Histogrammes de la métabolisation des mélanges de BPC hydroxylés en position (A) 2 ou (B) 3 ou (C) 4

Les composés ont été ajoutés à des milieux où la déshalogénases I et II étaient induites avec le 2,4,6-trichlorophénol et avec le 3,5-dichlorophénol respectivement. t0 = concentration initiale; t1 = concentration après 96 heures; CN = témoin autoclavé; ClOHBP = chlorohydroxybiphényle.

composés xénobiotiques. Afin de tester cette hypothèse, cinq composés, ayant subit une diminution marquée de leur concentration initiale lors des expériences précédentes, ont été ajoutés à une culture autoclavée ayant un bouchon en teflon au lieu d'un bouchon en butyle habituel. Les cinq composés ajoutés et leurs concentrations initiales sont les suivants: le tétrachloroaniline à 26,2 µM, le pentachloroaniline à 26,5 µM, le pentachloronitrobenzène à 20,9 µM, le tétrachlorovératrole à 24,35 µM et le pentachloroanisole à 22,6 µM. Les analyses ont été effectuées au CLHP.

D'après la figure 42, après six jours d'incubation, la concentration des composés testés est demeurée stable. Par contre, la concentration du pentachloronitrobenzène est passée de 20,9 µM à 17,2 µM. Cette diminution semble être, en partie, liée à l'augmentation de la concentration du pentachloroaniline qui passe de 26,5µM à 28,5 µM. La réduction du pentachloronitrobenzène en pentachloroaniline dans les témoins autoclavés avait déjà été observée (§4,4) et peut être attribuée au milieu réducteur. Néanmoins, les résultats de cette expérience laissent supposer que les bouchons en butyle étaient la cause du décroissement de la concentration initiale des composés xénobiotiques ajoutés au milieu de culture dans les expériences abiotiques.

4,10 Le métabolisme du pyruvate

Une expérience a été concue pour étudier le métabolisme du pyruvate par la souche PCP-1. L'hypothèse est que le pyruvate serait métabolisé en acétate. Un échantillon d'une culture a été récolté lors de l'ajout de l'inoculum (t_0), et un autre échantillon a été prélevé après 91 heures d'incubation. Les deux échantillons ont été analysés au CLHP. D'après la figure 43, le pyruvate est passé d'une concentration initiale de 49,67 mM au t_0 à 1,41mM après 91 heures d'incubation. Cette diminution était reliée à l'augmentation de la concentration de l'acétate qui est passée de 5,99 mM au t_0 à 60,8 mM. D'après cette expérience, le pyruvate était complètement métabolisé en acétate en moins de quatre jours.

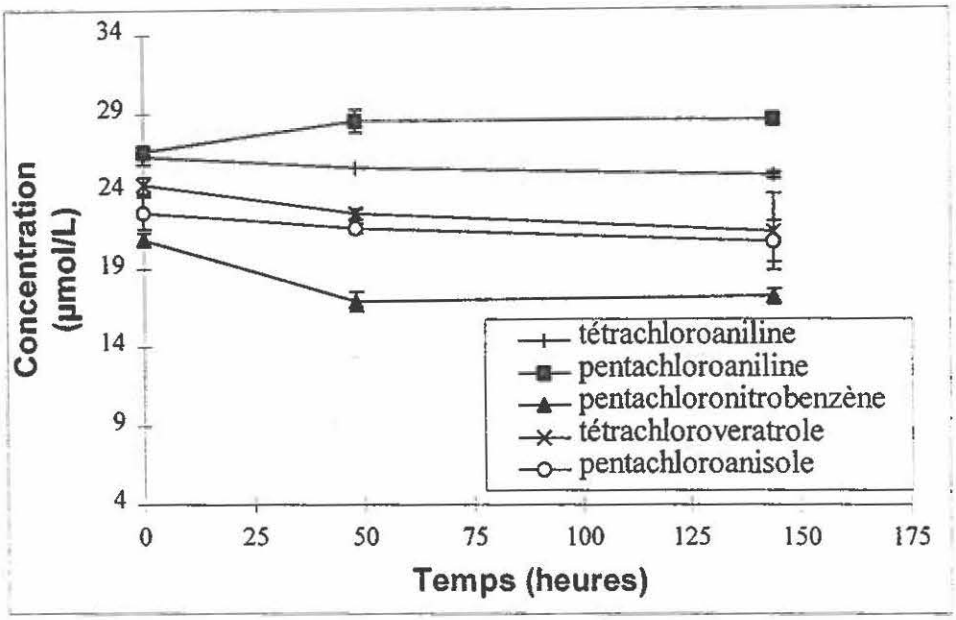


Figure 42 – Évaluation de l'intéraction des bouchons en teflon avec les produits testés

Les composés ont été ajoutés à des cultures autoclavées.

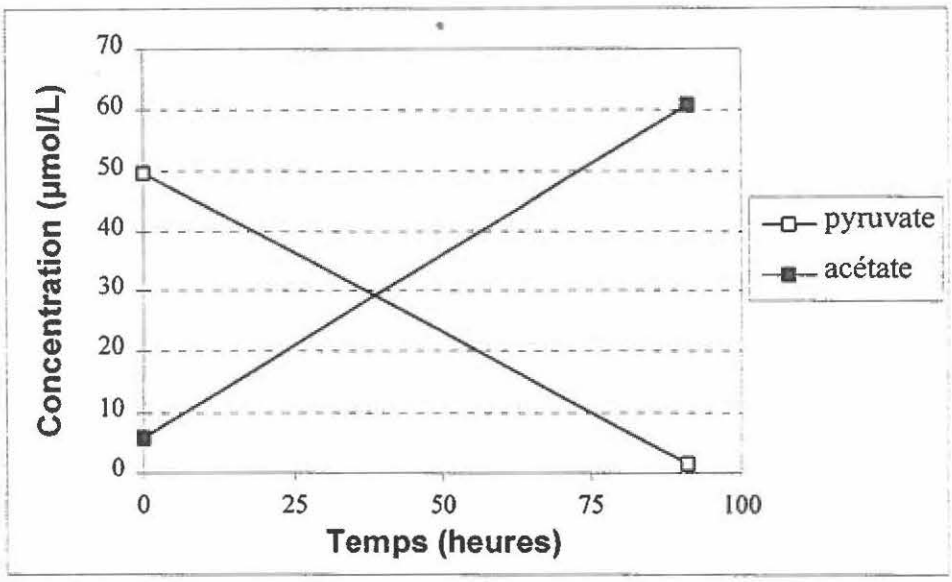


Figure 43 - Métabolisme du pyruvate chez *Desulfitobacterium frappieri.*

DISCUSSION

5,1 Le 2,4,5-trichlorophénoxyacétate (2,4,5-T)

Dans cette étude, *Desulfitobacterium frappieri* était incapable de déshalogéner ou d'éliminer le groupement oxyacétate du 2,4,5-T (voir figure 12 p.46 et figure 14 p.68). Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce résultat tel que la toxicité du produit, les descripteurs électroniques, stériques ou hydrophobiques du goupe oxyacétate.

Nos résultats permettent d'éliminer la possibilité que le 2,4,5-T soit toxique puisque les inducteurs ont continué à être dégradés même après l'ajout du 2,4,5-T.

Concernant la capacité des enzymes à déchlorer des substances plus ou moins semblables aux chlorophénols, Bryant (1992) a noté que plus le composé à dégrader diffère en sa composition chimique ou structurale du composé servant d'inducteur des enzymes de transformation, plus la vitesse et la spécificité de déchloration peuvent être affectées. Le 2,4,6-trichlorophénol et le 3,5-dichlorophénol, des composés dont les atomes de chlore ne sont pas dans les mêmes positions que le 2,4,5-T, sont les inducteurs de l'activité de déshalogénation chez la souche PCP-1. Ceci pourrait partiellement expliquer la raison pour laquelle le 2,4,5-T n'a pas été dégradé. De plus, les résultats de Bouchard (1995) indiquent que seulement 20% du 2,4,5-trichlorophénol, qui lui a un patron de substitution semblable au 2,4,5-T, a pu être dégradé par la souche après une période d'incubation de huit jours.

Dolfing et Tiedje (1991) ont observés lors d'une étude sur la dégradation d'analogues du 3-chlorobenzoate par *Desulfomonile tiedjei* que les différents substituents en position *para* sur le 3-chlorobenzoate pouvaient altérer la pénétration du composé dans la cellule ce qui pourrait en soit empêcher ou ralentir considérablement leur dégradation. De plus, les effets stériques et électroniques causés par le substituent modifient l'emboîtement du substrat sur l'enzyme et/ou la conformation de l'enzyme ce qui pourrait également altérer sa capacité à catalyser la réaction de déchloration. Ce raisonnement pourrait également expliquer l'incapacité de la souche PCP-1 à déshalogéner le 2,4,5-T.

Seulement quelques études ont été réalisées qui mettent en évidence la capacité des organismes à dégrader le 2,4,5-T en milieu anaérobie (Bryant 1992; Gibson et Suflita 1986, 1990; Mikesell et Boyd 1985; Suflita *et al.* 1984). Lors de ces études, la déshalogénation réductrice du 2,4,5-T par des consortiums est souvent accompagnée par le clivage du groupement oxyacétate donnant ainsi des chlorophénols ou même le phénol (voir la section 2,2,1). Par contre, aucun clivage du groupement oxyacétate a été observé chez *Desulfitobacterium frappieri.*

5,2 Le 2,3,6-trichlorophénylacétate (Fenac)

La biodégradation du Fenac, un herbicide, n'est pas mentionnée dans la littérature. *D. frappieri*, n'a pas été capable de transformer ce composé (voir figure 12 p. 46 et figure15 p.69). Gladu *et al.* (1997) a noté que le groupement acétate du 3-chloro-4-hydroxyphénylacétate, qui présente une analogie de structure avec le Fenac, a été clivé par la souche PCP-1. Il est donc curieux que le groupement acétate du Fenac n'était pas clivé. Les mêmes arguments invoqués pour l'absence de transformation du 2,4,5-trichlorophénoxyacétate pourraient être utilisés pour expliquer nos résultats.

. En effet, les inducteurs ont continué à être dégradés même après l'ajout du Fenac. Le dosage des métabolites permettent de doser la toxicité du composé xénobiotique. On peut donc conclure que le produit n'était pas toxique pour la souche. En ce qui concerne la spécificité des enzymes, Bouchard (1995) a démontré que le 2,3,6-trichlorophénol, un analogue de structure du Fenac, était rapidement déchloré en position *ortho* pour produire le 2,5-dichlorophénol. Donc la disposition des atomes de chlores sur le Fenac n'est probablement pas la raison qui empêche la transformation du composé. Par contre, les différentes caractéristiques chimiques des substituents hydroxyle et acétate sur le noyau benzénique pourraient affecter la pénétration du composé dans la cellule ou l'emboîtement de la molécule dans le site actif de l'enzyme (Dolfing et Tiedje 1991).

5,3 Les chloroanilines

5,3,1 Le 2,3,5,6-tétrachloroaniline

Lorsque le 2,3,5,6-tétrachloroaniline a été ajouté à une culture de la souche PCP-1 où la déshalogénase I et/ou la déshalogénase II avaient été induites, le composé a été déshalogéné très rapidement. La déshalogénation a eu lieu en 24 heures dans les cultures où la déshalogénase II et la déshalogénase I et II avaient été induites et en 66 heures dans les cultures où seule la déshalogénase I avait été induite (voir figure 19 p.79). Aucune déshalogénation n'a eu lieu lorsque les enzymes n'étaient pas été induites. Ceci signifie que le 2,3,5,6-tétrachloroaniline est incapable d'induire les enzymes nécessaires à la déshalogénation.

Le patron de dégradation de ce composé est très particulier. Indépendamment de l'inducteur utilisé, le 2,3,5,6-tétrachloroaniline est déshalogéné pour produire deux trichloroanilines dont un est toujours majoritaire. Afin de connaître la structure de ces deux produits, ils ont été isolés par chromatographie sur couche épaisse et analysés par RMN. Le composé majoritaire est le 2,3,6-trichloroaniline provenant d'une déchloration en position *meta*. Il y eu très peu de 2,3,5-trichloroaniline produit, ce qui impliquerait une déchloration en position *ortho*, même lorsque la déshalogénase I avait été induite. Cette enzyme enlève, de façon préférentielle, les atomes de chlore en position *ortho* chez les chlorophénols (Bouchard *et al.* 1996). Finalement, un faible pourcentage de dichloroanilines ont été produits à partir des trichloroanilines.

Les causes possibles de l'accumulation d'intermédiaires chloroaromatiques sont la toxicité de ces intermédiaires, la diminution de la densité électronique des intermédiaires chloroaromatiques et la diminution du pH dans le milieu de culture. D'après des études de toxicité envers *Vibrio fischeri* (anciennement *Photobacterium phosphoreum*) avec le test Microtox, Gombar et Enslein (1988) ont pu conclure que quatre des six isomères possibles de trichloroaniline ainsi que tous les isomères des dichloroanilines sont tous

moins toxiques que le 2,3,5,6-trichloroaniline. Une concentration 6,9 mM du 2,3,5,6-tétrachloroaniline occasionne la réduction de 50% de la lumière émise par la bactérie en 30 minutes. Malheureusement, le 2,3,6-trichloroaniline n'a pas été testé. Il est toutefois probable que la faible production de dichloroaniline ne soit pas due à une toxicité des trichloroanilines intermédiaires.

D'autres phénomènes peuvent expliquer l'accumulation des intermédiaires de dégradation du 2,3,5,6-tétrachloroaniline. La diminution du nombre d'atomes de chlore sur une molécule chloroaromatique entraîne aussi la diminution de la densité électronique du composé. Ce phénomène augmente l'énergie nécessaire à retirer un chlore sur la molécule et la réaction de déshalogénation réductive devient moins efficace (Dolfing et Harrison 1993). Aussi, le métabolisme de la bactérie diminue le pH du milieu ce qui ralentit la croissance de la bactérie (Bouchard et al. 1996) et diminue l'activité des déshalogénases (Beaudet, communication personnelle). Ces deux raisonnements peuvent expliquer la cause de l'accumulation des intermédiaires de dégradation lors de cette expérience.

Chez la souche PCP-1, la voie de dégradation du 2,3,5,6-tétrachlorophénol diffère de la voie de dégradation du 2,3,5,6-tétrachloroaniline qui en est un analogue structural. À l'encontre du 2,3,5,6-tétrachloroaniline, le 2,3,5,6-tétrachlorophénol est un inducteur des enzymes de déchloration (Bouchard 1995) et sa dégradation par la PCP-1 est plus poussée. En 24 heures, ce composé avait été complètement dégradé en position *ortho* afin de produire le 2,3,5-trichlorophénol et le 3,5-dichlorophénol. Après quatre jours, seul le 3-chlorophénol était présent dans le milieu.

Il n'est pas surprenant que les déshalogénases chez PCP-1 puissent déchlorer les chloroanilines. En effet, Struijs et Rogers (1989) ont pu remarquer que l'addition des chlorophénols à certains consortiums anaérobies pouvaient aider à l'acclimatation et la dégradation de certains chloroanilines. Afin d'expliquer ces résultats, les chercheurs ont avancé les arguments suivants: les groupements hydroxy et amino sont tous les deux des groupes activants qui orientent en *ortho* ou *para*, les deux groupes forment des ponts

d'hydrogène et les deux groupes ont un rayon Van der Waals comparable. Il est donc probable que ces deux groupes de composés puissent occuper le même site catalytique ce qui pourrait bien expliquer la raison pour laquelle le 2,3,5,6-tétrachloroaniline est déchloré par les déshalogénases de *D. frappieri*. Malgré les caractéristiques chimiques très similaires des deux composés, il est de prime abord surprenant que premièrement, le 2,3,5,6-tétrachloroaniline ne puisse induire les enzymes de déchloration et que, deuxièmement, le patron de déchloration majoritaire du 2,3,5,6-tétrachloroaniline en présence de la déshalogénase I soit en position *meta*. Il est possible que le groupement amino change l'orientation de la molécule dans le site catalytique de la déshalogénase I, rendant le l'atome de chlore en position *meta* plus accessible que l'atome de chlore en position *ortho*. Il est également possible que le groupement aminé, étant un groupe électrodonneur plus efficace que le groupe hydroxy, augmente la densité électronique de la molécule et influence donc le patron de dégradation de celle-ci.

Peu d'études ont traité de la voie de dégradation des chloroanilines par des microorganismes anaérobies. D'après les études de Kuhn et Suflita (1989) et Susarla *et al.* (1998), l'ordre de déchloration du 2,3,4,5-tétrachloroaniline, dégradé par des consortiums anaérobies, était *para* > *ortho* > *meta* (voir la section 2,2,2). Cette dégradation s'étendait sur une période de mois. Par contre, Kuhn et Suflita (1989) ont aussi observé une voie minoritaire de dégradation du 2,3,4,5,-tétrachloroaniline qui commençaient en position *meta*.

5,3,2 Le pentachloroaniline

Lorsque le pentachloroaniline a été ajouté à une culture de la souche PCP-1 où la déshalogénase I ou la déshalogénase II avaient été induites, le composé a été déshalogéné en 24 heures (voir figure 21 p.84). Aucune déshalogénation n'a eu lieu si les enzymes n'avaient pas été induites. Ceci signifie que le pentachloroaniline est incapable d'induire les enzymes nécessaires à la déshalogénation. La voie de transformation du pentachloroaniline était semblable indépendemment de l'inducteur utilisé. La voie métabolique majoritaire était une première déchloration en position *para* afin de donner le

2,3,5,6-tétrachloroaniline suivit d'une déchloration en position *meta* afin de produire le 2,3,6-trichloroaniline qui s'est accumulé dans le milieu. Quatres dichloroanilines ont été observés. Aucun monochloroaniline n'a été observé. L'accumulation des intermédiaires lors de la dégradation du pentachloroaniline peut être expliquée de la même façon que pour le 2,3,5,6-tétrachloroaniline (voir section 5,3,1).

Le patron de déshalogénation observé pour le pentachloroaniline est très différent du patron de déshalogénation du pentachlorophénol, un analogue structural, observé chez *D. frappieri* par Bouchard (1995). Cette molécule, qui contrairement au pentachloroaniline, peut induire les enzymes de déshalogénation, est complètement déchlorée en position *ortho* afin de donner le 3,4,5-trichlorophénol. Subséquemment, les atomes de chlore en position *para* et *meta* sont enlevés afin de donner le 3-chlorophénol, qui ne peut être dégradé par la souche.

Seulement une étude dans la littérature traite de la dégradation du pentachloroaniline par un consortium anaérobie (Susarla *et al.* 1998). Ces chercheurs ont observé que le pentachloroaniline était dégradé de façon identique au pentachlorophénol chez la souche PCP-1 : c'est-à-dire que la dégradation débutait en position *ortho* afin de donner le 3,4,5-trichloroaniline. Par la suite, elle continuait en position *para* et ensuite en position *meta* afin de donner le 3-chloroaniline.

5,3,3 Le 3,5-dichloroaniline

Lorsque le 3,5-dichloroaniline a été ajouté à un milieu de culture induit pour la déshalogénase I et/ou II ou sans inducteurs, le composé n'a pas été déchloré (voir figure 12 p.46 et la figure 22 p.86). Étant donné que le 3,5-dichlorophénol, un analogue structural au 3,5-dichloroaniline, induit la déshalogénase II et est par la suite déchloré en 3-chlorophénol, il est surprenant que cet enzyme ne puisse transformer le 3,5-dichloroaniline en 3-chloroaniline. D'après un test Microtox effectué par Gombar et Enslein (1988), la toxicité du 3,5-dichloroaniline est moindre que celle du 3,5-dichlorophénol. La récalcitrance du 3,5-dichloroaniline pourrait donc être due à un

emboîtement non-conforme du composé dans le site catalytique de l'enzyme (Dolfing et Tiedje 1991) ou au fait que l'énergie nécessaire à retirer un chlore sur la molécule est trop élevée (Dolfing et Harrison 1993). Aussi, il est probable que le composé ne puisse pénétrer dans la cellule.

Dans la littérature, il y a seulement quelques recherches qui abordent la dégradation des dichloroanilines par des consortiums bactériens anaérobies. Kuhn et Suflita (1989), Kuhn *et al.* (1990), Struijs et Rogers (1989) ainsi que Susarla *et al.* (1998) ont tous observé la déchloration de divers dichloroanilines à savoir le 2,4-dichloroaniline, le 2,3-dichloroaniline, le 3,4-dichloroaniline ou le 3,5-dichloroaniline. La déchloration de ces dichloroanilines a mené à la formation d'un monochloroaniline qui demeurait récalcitrant. Struijs et Rogers (1989) ont même remarqué que la déshalogénation du 2,4- et du 3,4-dichloroaniline était plus rapide si les consortiums étaient préalablement acclimatés à déchlorer le 2,4- et le 3,4-dichlorophénol. En comparant ces résultats avec ceux obtenus lors de cette étude, il est donc difficile d'expliquer l'absence de déchloration du 3,5-dichloroaniline par *D. frappieri* étant donné que la bactérie est acclimatée à la déchloration du 3,5-dichlorophénol.

5,4 Le pentachloronitrobenzène

Lorsque le pentachloronitrobenzène a été ajouté à des cultures de PCP-1 où, dans un cas, les déshalogénases I et II étaient induites et, dans l'autre expérience, les déshalogénases ne l'étaient pas, la première étape de transformation a été la réduction complète du groupe nitro en groupe amino (voir figure 24 p.90). Cette transformation était effectuée en moins de dix minutes. Le contrôle abiotique indique que la transformation du groupement nitro en amino était biotique puisque après dix heures d'incubation, le pentachloronitrobenzène n'était pas transformé en pentachloroaniline.

En présence des inducteurs des déshalogénases I et II, le pentachloroaniline produit par la réduction du groupement nitro était déchloré en 24 heures en position *para*

pour donner le 2,3,5,6-tétrachloroaniline et en position *meta* afin de donner le 2,3,6-trichloroaniline tel qu'observé à la section 5,3,2. Après 48 heures, seul le 2,3,6-trichloroaniline était présent dans le milieu de culture mais il n'a pas été déchloré. En absence des inducteurs, le pentachloroaniline produit à partir du pentachloronitrobenzène n'était nullement dégradé puisque le pentachloroaniline est incapable d'induire les enzymes de déchloration.

Seulement deux études mettent en évidence la dégradation du pentachloronitrobenzène par des consortiums anaérobies. Susarla *et al.* (1996, 1998) ont démontré que le pentachloronitrobenzène était transformé en pentachloroaniline en moins d'une journée. Par la suite, la voie de dégradation observée par Susarla *et al.* (1996, 1998) (voir figure 6 p.22) est identique au patron de dégradaion du pentachlorophénol chez la souche PCP-1 (Bouchard 1995) (voir figure 11 p.39): c'est-à-dire que la dégradation débute en position *ortho* afin de donner le 3,4,5-trichloroaniline. Par la suite, elle continue en position *para* et ensuite en position *meta* pour donner le 3-chloroaniline.

Pour ce qui est de la réduction du groupe nitro, plusieurs études relevant des réductases nitroaryl ont décrit cette activité chez des procaryotes, des eucaryotes et des mammifères (Angermaier et Simon 1983a). D'après Macalady et ses collaborateurs (1986), la première étape de la transformation ou la minéralisation de composés nitroaromatiques en milieu anaérobe serait la réduction du groupe nitro. He et Spain (1997) précisent que le groupe nitro serait réduit en nitroso, ensuite en hydroxylamine et finalement, en amine. Cette activité est souvent retrouvée comme réaction fortuite chez plusieurs enzymes telles les NADPH:cytochrome P_{450} oxydo-réductases, les NADH:cytochrome *c* réductases, les aldéhyde oxydases, les dihydrolipoamide déhydrognases, et les cytochrome b_5 réductases (Angermaier et Simon 1983b). Angermaier et Simon (1983b) ont purifié une nitroaryle réductase NADH-dépendente de *Clostridium kluyveri*, une enzyme inconnue jusqu'à présent. Cette enzyme avait un centre fer-soufre qui était impliquée dans la réduction des composés nitroaromatiques mais les chercheurs ignoraient le substrat naturel de l'enzyme ainsi que son rôle

physiologique. Ils estiment que cette enzyme pourrait être présente chez plusieurs bactéries anaérobies.

5,5 Le pentachloropyridine

Le pentachloropyridine a été testé puisqu'il a une structure analogue au pentachlorophénol. Lorsqu'il a été ajouté à une culture de PCP-1 où les déshalogénases I et II avaient été induites, le composé a été dégradé rapidement. Après 24 heures, seulement 20% du pentachloropyridine était présent dans le milieu de culture. Par contre, après les six jours qui suivirent cette diminution rapide du composé de départ, la concentration du pentachloropyridine est demeurée stable (voir figure 28 p.95). Le pentachloropyridine a été déshalogéné en position *para* pour donner le 2,3,5,6-tétrachloropyridine. Un standard du 2,3,5,6-tétrachloropyridine n'était pas disponible commercialement donc la synthèse de ce composé a permis son identification. Le 2,3,5,6-tétrachloropyridine a été dégradé soit en position *ortho* ou *meta* pour donner un trichloropyridine dont la structure demeure inconnue. Il est impossible de savoir laquelle des deux enzymes a agit sur la molécule pour la déchlorer étant donné que, d'après les expériences effectuées lors de cette étude, les deux déshalogénases sont capables de déchlorer en position *para*. Aucune expérience n'a été effectuée pour évaluer le potentiel de ce composé à induire les déshalogénases et aucune expérience n'a été entreprise afin d'étudier l'effet individuel des deux enzymes sur la molécule.

La toxicité du pentachloropyridine ou de ses produits de dégradation est inconnue. Par contre, Liu *et al.* (1998) ont effectué un test Microtox du type EC_{50}-15 min avec *Vibrio fischeri* : ils ont mesuré la concentration à laquelle le 2-, 3- ou 4-chloropyridine diminuait de 50% la bioluminescence de la bactérie après 15 minutes. Les concentrations des 2-, 3- et 4-chloropyridines qui avaient cet effet étaient les suivantes : 1,64 mM, 0,91 mM et 0,47 mM respectivement. D'après une autre étude (Gombar et Enslein 1988), cette fois avec des chloroanilines, des chlorophénols et des chlorobenzènes, plus il y avait d'atomes de chlore sur la molécules, plus la molécule était toxique. Au cours de cette

étude, ils ont observé que la molécule la plus toxique après 30 min d'exposition à *Vibrio fischeri* était le pentachlorophénol avec une concentration de 1,9 mM. Puisque tous les monochloropyridines sont plus toxiques que le pentachlorophénol et que la toxicité de certaines molécules augmente plus elles possèdent des atomes de chlore, il est possible que le pentachloropyridine soit donc plus toxique que les monochloropyridines et que le pentachlorophénol. Il est donc possible que la toxicité du pentachloropyridine ainsi que de ses produits de dégradation soient responsables de l'arrêt de la dégradation 24 heures après son ajout à la culture. Lors de cette expérience, les inducteurs étaient complètement dégradés 24 heures après l'ajout du pentachloropyridine. Il est donc impossible d'utiliser la dégradation des inducteurs en terme de mesure qualitative de la toxicité.

Aucune étude dans la littérature ne porte sur la dégradation du pentachloropyridine. Par contre, deux groupes de recherche qui ont étudié la dégradation des monochloropyridines (Adrian et Suflita 1994; Liu 1995) ont remarqué que les 2-, 3- et 4-chloropyridine n'ont pas été déchlorés après plus de 200 jours dans des sédiments provenant d'un aquifère. Seul Liu *et al.* (1998) ont observé une dégradation du 4-chloropyridine en 129 jours sous conditions sulfidogéniques lorsque celui-ci a été ajouté à des sédiments provenant d'un estuaire. Par contre, les 2-, et 3-chloropyridines n'ont pas été dégradés.

5,6 Les polluants d'usines de pâtes et papiers

Lors des expériences effectuées avec *D. frappieri*, les trois classes de polluants d'usines de pâtes et papiers ont été dégradées. La première expérience était avec le tétrachlorocatéchol. Ce composé a pu induire les enzymes de déchloration, et les produits de dégradation majoritaires, soit le 3,4,5-trichlorocatéchol et le 4,5-dichlorocatéchol, semblent suggérer que l'enzyme induite était la déshalogénase I puisque la déchloration a eu lieu en position *ortho* (voir figure 30 p.99). En absence d'inducteur, la dégradation du tétrachlorocatéchol n'était pas complète, et 33% du composé était encore présent dans la culture après cinq jours d'incubation. Il est possible que le temps nécessaire au tétrachlorocatéchol pour induire les déshalogénases pourrait expliquer ce résultat. De

plus, le métabolisme rapide de la bactérie diminuait le pH du milieu de culture à moins de 6,5 après seulement 4 jours d'incubation. Ce pH ralentit considérablement la croissance de la bactérie (Bouchard *et al.* 1996) et de plus, les déshalogénases sont peu actives à ce pH (Beaudet, communication personnelle).

Dans une culture où les déshalogénases I et II étaient induites, le tétrachlorocatéchol était complètement dégradé en 12 heures et plusieurs produits de dégradation ont été identifiés. La présence du deuxièment groupement hydroxyle semble avoir permi la déshalogénation complète du composé afin de produire du catéchol, quoique en faible concentration. Il y a plusieurs raisons qui pourraient expliquer la déshalogénation complète du tétrachlorocatéchol. Par exemple, d'après Vogel *et al.* (1987), plus un composé a des atomes halogénés, plus son potentiel standard relatif est élévé, et plus le composé en question dégage de l'énergie lorsqu'il est réduit. De plus, Susarla *et al.* (1996) stipule que lorsque deux atomes de chlore ou plus sont adjacents sur une molécule aromatique, il y a une augmentation de la polarization positive de l'atome de carbone sur lequel se trouve l'atome de chlore. Cette polarization déstabilise le lien C-Cl et augmente l'énergie associée à la réduction de cette liaison lors d'une attaque enzymatique. Quoique le deuxième groupement hydroxyle sur les chlorocatéchols n'est pas un atome halogéné, il pourrait servir à augmenter le potentiel de réduction de la molécule et à déstabiliser les liens C-Cl et entraîner la déshalogénation complète du tétrachlorocatéchol en catéchol. Le catéchol est seulement présent en quantité infime, mais la chute probable du pH après 4 jours d'incubation et donc l'arrêt de la déshalogénation pourrait expliquer ce résultat.

Le tétrachloroguaiacol a aussi été testé. Il a été dégradé en 24 heures dans une culture où les déshalogénases n'avaient pas été induites, ce qui suggère que le tétrachloroguaiacol peut induire les enzymes nécessaire à la déchloration. Le premier produit de dégradation, le 3,5,6-trichloroguaiacol, démontre que la déshalogénation s'est effectuée en position *para* par rapport au goupement hydroxyle. Ce résultat laisse supposer que la déshalogénase II, plutôt que la déshalogénase I, a été induite et a donc déchloré le composé. La deuxième étape de dégradation a été une déméthylation du

groupement méthoxy ce qui a entraîné la production du 3,4,6-trichlorocatéchol (voir figure 33 p.105). La déméthylation du composé a été complète mais s'est étendue sur une période de cinq jours. Très peu de déchloration s'est effectué à partir du 3,4,6-trichlorocatéchol. Lors des tests avec le tétrachlorocatéchol, le 3,4,6-trichlorocatéchol a pu être déchloré par les déshalogénases. Il semble donc que la déméthylation a été l'étape limitante de la dégradation. Néanmoins, quelques dichlorocatéchols ont été produits à partir d'une déchloration du 3,4,6-trichlorocatéchol en position *meta* ainsi qu'en *ortho*.

Il est important de noter que la déchloration en position *ortho* a eu lieu seulement après que le groupement méthoxy du 3,5,6-trichloroguaiacol ait été transformé en groupement hydroxyle pour produire le 3,4,6-trichlorocatéchol. Il est donc possible que le 3,4,6-trichlorocatéchol ait induit la déshalogénase I. Ceci laisse supposer que la déshalogénase I puisse seulement s'attaquer aux molécules ayant des groupements hydroxyles et que le groupement méthoxy empêche la déshalogénation du 3,5,6-trichloroguaiacol. Ceci expliquerait aussi nos résultats avec le tétrachlorovératrole.

Lorsque le tétrachlorovératrole a été ajouté à un milieu de culture où les déshalogénases n'avaient pas été induites, aucune déchloration et aucune déméthylation n'a eu lieu. Ce résultat est intéressant puisqu'il supporte l'hypothèse que les molécules ayant des groupements méthoxy ne peuvent induire les enzymes de déchloration. De plus, l'absence de déméthylation couplée à l'absence des déshalogénases pourrait signifier que soit les déshalogénases ont un inducteur commun avec les enzymes responsables de la déméthylation ou que le tétrachlorovératrole, contrairement au tétrachloroguaiacol, est incapable d'induire les enzymes nécessaire à la déméthylation. La déméthylation dans les environnements anaérobies de composés aromatiques méthoxylés est bien connue. Plusieurs bactéries, tels les acétogènes, qui métabolisent des substituents méthoxy sur des composés aromatiques en fixant le groupement méthyle pour former l'acétate ou le butyrate, ont été isolés (DeWeerd *et al.* 1988). Dans la revue de Fuchs *et al.* (1994), les enzymes qui catalysent la déméthylation de composés aromatiques ayant des liaisons O-méthyles, sont des protéines corrinoïdes ayant un centre

de cobalt. Le cobalt (I) est un nucléophile puissant qui lie le groupement méthyl à la protéine.

Lors de la deuxième expérience avec le tétrachlorovératrole, le composé a été ajouté à une culture où les deux déshalogénases avaient été induites. La déshalogénation a eu lieu en position *para* ou *meta* par rapport aux groupements méthoxy pour produire le 3,4,6-trichlorovératrole. D'après la position de déchloration, il est probable que seule la déshalogénase II ait agit sur le composé. Par contre, le composé n'a pas été complètement dégradé après 4 jours d'incubation. Les deux étapes de transformation consistent en deux déméthylations successives (voir figure 35 p.108), et comme pour le tétrachloroguaiacol, l'étape de déméthylation semble avoir été l'étape limitante de la transformation. Très peu de 3,4,6-trichlorocatéchol était présent dans le milieu après 4 jours d'incubation. D'après ces résultats, il semblerait que la capacité de dégradation du tétrachlorovératrole par la bactérie, dans ces conditions, est limitée.

Il est important de noter que la déshalogénase I avait été induit dans cette expérience avec le tétrachlorovératrole mais aucune déchloration en position *ortho* a eu lieu. Ce résultat renforce l'hypothèse, émise lors de l'expérience avec le tétrachloroguaiacol, que la déshalogénase I est incapable de déshalogéner les molécules où les hydroxyles sont méthylés.

Les voies de dégradation du tétrachlorocatéchol, du tétrachloroguaiacol et du tétrachlorovératrole effectuées par *D. frappieri* ont des points communs avec celles décrites par plusieurs chercheurs pour ces mêmes composés par des consortiums anaérobies. Quelques équipes suédoises (Remberger *et al.* 1986; Neilson *et al.* 1987; Allard *et al.* 1991) et une équipe américaine (Woods *et al.* 1989) ont étudié la dégradation de ces composés et ont trouvé que la première étape de dégradation du tétrachloroguaiacol et du tétrachlorovératrole était une O-déméthylation rapide. Contrairement à *D. frappieri*, aucune déshalogénation avait lieu avant l'enlèvement du groupe méthoxy et la déméthylation semble ne pas avoir été l'étape limitante de la dégradation. Par la suite, Remberger *et al.* (1986), Neilson *et al.* (1987) et Allard *et al.*

(1991), ont démontré que le tétrachlorocatéchol était seulement dégradé en position *meta* pour produire le 3,4,6-trichlorocatéchol. Par contre, les résultats de Woods *et al.* 1989 montrent que la voie de dégradation du tétrachlorocatéchol par leur consortium anaérobie est identique à celle empruntée par *D. frappieri* en absence d'inducteurs de déshalogénases. C'est à dire que la déshalogénation a été effectuée en position *ortho* en premier afin de donner le 4,5-dichlorocatéchol. Par la suite, leur consortium a enlevé un chlore en position *meta* pour donner le 4-chlorocatéchol qui demeurait récalcitrant. Leurs expériences ont été effectuées dans un réacteur UASB à flux continu. L'apport continu de nutriments et le contrôle des paramètres du milieu, tel le pH, pourrait expliquer la raison pour laquelle tout le tétrachlorocatéchol a été transformé en 4-chlorocatéchol. Puisque *D. frappieri* est cultivé dans une système fermé, l'apport limité des nutriments ainsi que l'accumulation de déchets métaboliques (baisse du pH) sont des conditions qui empêchent la bactérie de complètement transformer le tétrachlorocatéchol. Cet argument est aussi semblable pour le tétrachloroguaiacol et le tétrachlorovératrole. La souche démontre toutefois un grand potentiel envers le tétrachlorocatéchol ainsi que ses dérivés puisqu'elle peut pousser la déchloration jusqu'au catéchol.

5,7 Le pentachloroanisole

Le pentachloroanisole a été testé lors de cette étude puisqu'il est un analogue structural du pentachlorophénol. Le composé a été ajouté à un milieu de culture où les déshalogénases n'avaient pas été induites. Lors de cette expérience, aucuns produits de dégradation n'ont été observés ce qui voudrait dire que le pentachloroanisole est incapable d'induire les déshalogénases. Par contre, lorsque le composé est ajouté à une culture où le tétrachloroguaiacol avait servi d'inducteur des déshalogénases, un patron de dégradation semblable à celui observé pour le tétrachloroguaiacol a été constaté (voir figure 37 p.111). Le tétrachloroguaiacol a été ajouté en tant qu'inducteur au lieu des chlorophénols afin d'éviter des problèmes d'identification entre les métabolites du pentachloroanisole et les inducteurs chlorophénolés.

La première étape de transformation du pentachloroanisole était une déshalogénation en position *para* par rapport au groupement méthoxy afin de donner le 2,3,5,6-tétrachloroanisole. Puisque le tétrachloroguaiacol semble induire la déshalogénase II, il n'est pas surprenant que la première étape de déshalogénation pour le pentachloroanisole soit une déchloration en *para*. Par la suite, une déméthylation a eu lieu produisant le 2,3,5,6-tétrachlorophénol. Contrairement à l'expérience avec le tétrachlorovératrole, l'étape de déméthylation était relativement rapide. La déméthylation du tétrachloroguaiacol, utilisé comme inducteur, pourrait avoir accentuée la vitesse de cette étape. Finalement, la déshalogénase I, induite soit par les produits de dégradation de l'inducteur, ou par la formation du 2,3,5,6-tétrachlorophénol, a déchloré ce dernier en position *ortho* afin de donner le 2,3,5-trichlorophénol. Il est à noter que le pentachloroanisole à mis 72 heures à disparaître de la culture. Comme pour le tétrachlorovératrole, il semblerait que les déshalogénases ont une faible affinité pour les composés ayant seulement des groupements méthoxy.

D'après les études de Bouchard (1995), la dégradation du 2,3,5,6-tétrachlorophénol est très rapide. Ce composé induit les déshalogénases et en 24 heures, le 2,3,5,6-tétrachlorophénol est complètement transformé produisant un mélange de 2,3,5-trichlorophénol et de 3,5-dichlorophénol. Après quatre jours, seul le 3-chlorophénol est présent dans la culture. Lors de l'étude avec le pentachloroanisole, le 2,3,5-trichlorophénol n'a pas été dégradé. Puisque *D. frappieri* est cultivé dans une système fermé, l'apport limité des nutriments ainsi que les déchets métaboliques qui s'accumulent pourraient constitués des conditions qui empêchent la bactérie de complètement dégrader le composé.

Dans la littérature, seulement une étude traite de la déshalogénation réductrice des chloroanisoles. Susarla *et al.* (1998) a testé le 2,3,4-trichloroanisole, le 3,5-dichloroanisole et le 3-chloroanisole. Comme dans toutes les études examinant la dégradation anaérobie des composés ayant des groupements méthoxy, la première étape de transformation observée par ces chercheurs était une déméthylation. Par la suite, la déchloration a eu lieu pour produire le 3-chlorophénol qui était récalcitrant.

5,8 Les BPC hydroxylés

Les BPC hydroxylés ne sont pas des molécules disponibles commercialement. Presque tous les composés étudiés dans notre étude ont été synthétisés. Les BPC non-hydroxylés qui sont présents comme contaminants dans l'environnement sont souvent sous forme de mélanges très complexes. Le but derrière la synthèse de mélanges de BPC hydroxylés était donc d'étudier la capacité de la souche PCP-1 à déshalogéner ces composés analogues aux BPC retrouvés dans l'environnement.

Premièrement, aucune déshalogénation n'a eu lieu lors de l'expérience avec le 2,2'5'-trichloro-4-hydroxybiphényle (voir figure 12 p.46 et figure 38 p.113), même si le groupement hydroxyle était en position 4. Il est possible que le faible nombre d'atome de chlore ou que la position des atomes de chlore sur la molécule soit en cause. Tel que déjà expliqué, deux atomes de chlore adjacents sur un noyau benzénique augmentent la polarization positive du lien C-Cl. Ceci déstabilise le lien C-Cl et augmente l'énergie et donc la probabilité d'une réduction enzymatique de la liaison. Par contre, les tests avec le pentachloro-4,4'-dihydroxybiphényle et le mélange de BPC hydroxylés en position 4 confirment que les déshalogénases peuvent s'attaquer aux biphénylpolychlorés dont le groupement est en position 4 (voir figure 12 p.46, figure 40 p.116 et figure 41 p.118).

L'expérience avec le 2',5,5'-trichloro-2-hydroxybiphényle indique que les déshalogénases ne peuvent s'attaquer aux biphényles dont le groupement hydroxyle est en position 2 (voir figure 12 p.46 et figure 38 p. 113). De plus, l'absence de déchloration des deux isomères d'hexachloro-3-hydroxybiphényles indique que les déshalogénases ne peuvent s'attaquer aux biphénylpolychlorés dont le groupement hydroxyle est en position 3 (voir figure 12 p. 46 et figure 39 p. 114). Ces deux derniers résultats ont été confirmés lorsqu'aucun produit de transformation n'a été observé lors des tests avec deux mélanges de BPC hydroxylés soit en position 2 ou 3 (voir 41 p.118).

Gladu *et al.* (1997) ont démontré que *D. frappieri* pouvait déchlorer le 3,5-dichloro-4-hydroxybiphényle en 3-chloro-4-hydroxybiphényle mais non le 3,5-dichloro-2-hydroxybiphényle. Ces résultats, ainsi que ceux présentés ci-dessus, indiquent que la position du groupement hydroxyle sur le biphénylpolychloré est très importante pour la déchloration. Tous les résultats obtenus jusqu'à présent suggèrent que *D. frappieri* est peu prometteur pour la dégradation des BPC.

Aronstein *et al.* (1995), en essayant d'augmenter la biodisponibilité et la biodégradation des BPC prétendent avoir ajouté des groupements hydroxyles à un tétrachlorobiphényle via le réactif de Fenton. En oxydant ainsi le 2,2',4,4'-tétrachlorobiphényle marqué au ^{14}C et ensuite en ajoutant ce produit dit transformé à des cultures de *Pseudomonas* souche LB400 et *Alcaligenes eutrophus* souche H850, les auteurs prétendent que 50% du BPC initial a pu être récolté sous forme de $^{14}CO_2$, indiquant une minéralisation partielle du polluant. Par contre, la structure des produits provenant de l'oxydation de tétrachlorobiphényle n'a pas été étudiée. Il est fort possible que le $^{14}CO_2$ récolté provenait de produits de dégradation du tétrachlorobiphényle plutôt que d'hypothétiques hydroxy-BPC ou même du produit de départ non-oxydé (François Lépine, communications personnelles).

5,9 Interaction des bouchons en butyle avec les produits testés

Plusieurs composés testés lors de cette étude étaient adsorbés sur les bouchons en butyle. Les chloroanilines et les composés ayant un groupement méthoxy semblent avoir été les plus affectés. Mais lorsque ces composés étaient ajoutés à des bouteilles abiotiques fermées avec des bouchons en teflon, aucune diminution remarquable des composés n'a été notée (voir figure 42 p. 120).

Quelques auteurs ayant travaillés avec ces composés ont aussi remarqué des difficultés. Par exemple, Kuhn et Suflita (1989) ont constaté qu'après huit mois, 50% du 3,4-dichloroaniline et 60% du 2,3,4,5-tetrachloroaniline demeuraient indétectables dans

leur témoin stérile. Ils admettent que ce résultat n'est pas surprenant puisque les anilines polyhalogénés démontrent de plus grandes pertes abiotiques que les anilines moins halogénés. Ils attribuent cette particularité au fait que les anilines polyhalogénés sont plus hydrophobes (un coeffecient octanol/eau élevé) et donc ont une plus grande tendance à s'adsorber aux solides dans les aquifères et de la même façon peut être aux bouchons des bouteilles. De plus, Neilson *et al.* (1987), ont modifié leur méthode expérimentale par rapport aux méthodes utilisées pour des chloroguaiacols et des chlorocatéchols puisqu'ils ont constatés que les anisoles et les vératroles chlorés étaient plus volatiles.

5,10 Le métabolisme du pyruvate

La conversion du pyruvate en acétate est une voie métabolique commune en anaérobiose (Brock *et al.* 1994). En fait, *Desulfitobacterium hafniense* (Christiansen et Ahring 1996), *Desulfitobacterium* sp. PCE-1 (Gerritse *et al.* 1996) et *Desulfitobacterium chlororespirans* (Sanford *et al.* 1996) peuvent tous convertir, mole pour mole, le pyruvate en acétate. Couplé aux résultats obtenus de *D. frappieri*, il semblerait que cette conversion est typique pour l'espèce. Par contre, *D. dehalogenans* est la seule espèce dans le genre *Desulfitobacterium* dont les produits de fermentation diffèrent. La fermentation de 22,2 mols de pyruvate a produit 10 mols de lactate et 9,2 mols d'acétate (Utkin *et al.* 1994).

CONCLUSION

L'objectif majeur de cette recherche était de préciser la capacité catalytique de *Desulfitobacterium frappieri* souche PCP-1 envers un certains nombre de composés organochlorés et de proposer des voies métaboliques en se basant sur l'identité des métabolites présents dans le milieu de culture.

Plusieurs polluants organochlorés ont été testés: le 2,3,6-trichlorophénylacétate, le 2,4,5-trichlorophénoxyacétate, le tétrachlorocatéchol, le tétrachloroguaiacol et le tétrachlorovératrole. Les composés ayant des substituants acétate ou oxyacétate n'ont pas été dégradés par la bactérie. Par contre, le tétrachlorocatéchol a été facilement dégradé et pouvait même induire les déshalogénases. Cette découverte permet d'envisager des procédés de biotraitement de sites contaminés sans avoir à s'inquiéter de l'accumulation de produits chlorés comme métabolites finaux de la dégradation.

Le tétrachloroguaiacol ainsi que le tétrachlorovératrole ont aussi été dégradés par les déshalogénases. Le tétrachloroguaiacol, contrairement au tétrachlorovératrole, peut induire les enzymes de déchloration. Les composés ont été déchlorés en position *para* et ensuite déméthylés. Ce résultat est important puisqu'il démontre que les déshalogénases peuvent dégrader des composés ayant des groupements méthoxy en plus des composés ayant des substituants hydroxyles. Les déshalogénases chez *D. frappieri* semblent avoir un spectre d'activité très large par rapport aux déshalogénases chez les autres bactéries de ce genre. La déshalogénation s'est poursuivit après la déméthylation pour de produire des chlorocatéchols qui s'accumulaient dans la culture. Cette étude a démontré que la souche peut dégrader les chlorocatéchols jusqu'au catéchol, donc il est probable que lors d'un procédé en réacteur fonctionnant à flux continu, où l'apport de nutriments et l'ajustement du pH est toujours adéquat, la déméthylation ainsi que la déchloration du tétrachloroguaiacol et du tétrachlorovératrole seraient complètes. Encore une fois, le seul déchet produit serait le catéchol. Afin de rendre la souche plus intéressante aux industries produisant des grandes quantités de ces déchets, il faudrait optimiser les conditions en réacteur qui permettraient d'effectuer un tel traitement.

Plusieurs composés aromatiques halogénés qui sont des analogues structurels des chlorophénols ont aussi été testés. Parmi ces composés, on retrouve le pentachloroaniline, le 2,3,5,6-tétrachloroaniline, le 3,5-dichloroaniline, le pentachloropyridine, le pentachloroanisole et les biphénylpolychlorés hydroxylés.

Tous les chloroanilines, sauf le 3,5-dichloroaniline ont été déchlorés, et le patron de dégradation majeur était une déchloration en position *para* et *meta* indépendamment de l'inducteur utilisé. Lors de la dégradation, le 2,3,6-trichloroaniline était plutôt récalcitrant et s'accumulait dans les cultures. L'absence de déchloration du 3,5-dichloroaniline, la récalcitrance du 2,3,6-trichloroaniline et la voie de dégradation majoritairement en position *meta* et *para* par les déshalogénases I et II posent plusieurs questions au sujet du fonctionnement des déshalogénases ainsi que le mécanisme qui caractérise la déshalogénation réductrice. En effet, des études fondamentales axées sur les enzymes effectuant la déshalogénation, telles que la mutagenèse dirigée afin de créer des protéines mutantes et la cristallisation des protéines, pourraient certainement aider à mieux les comprendre.

Le pentachloropyridine a aussi été dégradé rapidement. Malheureusement, la dégradation du produit de départ n'était pas complète et un trichloropyridine s'est accumulé dans le milieu. Encore une fois, l'étude du fonctionnement enzymatique mais aussi une étude sur les effets physiologiques (ie. de toxicité) du composé sur la bactérie permetterait de mieux comprendre les résultats obtenus lors de cette étude.

Le pentachloroanisole a aussi été dégradé. Le composé n'a pas été dégradé rapidement, mais plusieurs produits de dégradation ont été observés. Comme pour le tétrachloroguaiacol et le tétrachlorovératrole, la déchloration initiale a eu lieu en position *para* afin de produire le 2,3,5,6-tétrachloroanisole, et par la suite, une déméthylation a produit le 2,3,5,6-tétrachlorophénol. Ce résultat a permis de confirmer la capacité des enzymes à s'attaquer aux composés ayant des groupements méthoxy et permet d'envisager des études approfondies des déshalogénases afin de mieux comprendre les interactions enzyme-substrat nécessaires afin d'effectuer ce type de réaction.

Finalement, les expériences avec les biphénylpolychlorés hydroxylés ont démontré que seul les composés ayant un groupement hydroxyle en position 4 pouvaient être déchlorés. Les BPC ayant un groupement hydroxyle en position 2 ou 3 n'étaient pas déshalogénés.

En conclusion, les résultats de ce projet ont permis d'élucider le spectre d'activité de *D. frappieri*. Il a été observé que son spectre est très large par rapport aux autres bactéries capables d'effectuer la déshalogénation réductrice de composés aromatiques halogénés. En effet, la bactérie peut s'attaquer à des composés aromatiques halogénés ayant des groupements hydroxyles, méthoxy, amino et des hétérocycles avec un atome d'azote. Par contre, la bactérie ne peut s'attaquer à ceux ayant des substituants acétate ou oxyacétate. De plus, seul les composés ayant un groupement hydroxyle peuvent induire les déshalogénases. Étant donné la complexité des composés testés et dégradés, plusieurs avenues de recherches découlant des résultats de cette étude sont possibles. Par exemple, il serait possible d'entreprendre des études appliquées, telles le développement d'un procédé biotechnologique permettant l'assainissement de l'environnement en utilisant la souche ou les déshalogénases seules.

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie pour son appui financier. Je remercie aussi mon directeur François Lépine pour tous ses bons conseils. Je voudrais remercier Sylvain Milot pour son aide technique. Finalement je remercie Réjean Beaudet et son équipe pour l'aide microbiologique.

BIBLIOGRAPHIE

Adrian, N.R. et J.M. Suflita. 1994. Anaerobic biodegradation of halogenated and nonhalogenated N- ,S-, and O-heterocyclic compounds in aquifer slurries. Environ. Toxicol. Chem. **13**:1551-1557.

Allard, A.S., P.A. Hynning, C. Lindgren, M. Remberger. 1991. Dechlorination of chlorocatechols by stable enrichment cultures of anaerobic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **57**: 77-84.

Angermaier, L. et H. Simon. 1983a. On the reduction of aliphatic and aromatic nitro compounds by *Clostridia*, the role of ferredoxin and its stabilization. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **364**:961-975.

Angermaier, L. et H. Simon. 1983b. On nitroaryl reductase activities in several *Clostridia*. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **364**:1653-1663.

Aronstein, B.N., J.R. Paterek, R.L. Kelley et L.E. Rice. 1995. The effect of chemical pretreatment on the aerobic microbial degradation of PCB congeners in aqueous systems. J. Ind. Microbiol. **15**:55-59.

Bouchard, B. 1995. Isolement et caractérisation d'un microorganisme anaérobie effectuant la déchloration du pentachlorophénol. Mémoire de maîtrise. Institut Armand-Frappier. 105 p.

Bouchard, B., R. Beaudet, R. Villemur, G. McSween, F. Lépine et J.-G. Bisaillon. 1996. Isolation and Characterization of *Desulfitobacterium frappieri* sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates pentachlorophenol to 3-chlorophenol. Int. J. Syst. Bacteriol. **46**: 1010-1015.

Boyd, S.A., D.R. Shelton, D. Berry, J. Tiedje. 1983. Anaerobic biodegradation of phenolic compounds in digested sludge. Appl. Environ. Microbiol. **46**: 50-54.

Brock, T.D., M.T. Madigan, J.M. Martinko et J. Parker. 1994. Biology of Microorganisms. Prentice Hall. New Jersey. 909p.

Brown, J.F., Jr., D.L. Bedard, M.J. Brennan, J.C. Carnahan, J. Feng et R. E. Wagner. 1987. Polychlorinated biphenyl dechlorination in aquatic sediments. Science. **236**:709-711.

Bryant, F.O. 1992. Biodegradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by dichlorophenol-adapted microorganisms from freshwater, anaerobic sediments. Appl. Microbiol. Biotechnol. **38**:276-281

Cole, J.R., A.L. Cascarelli, W.W. Mohn, et J.M. Tiedje. 1994. Isolation and characterization of a novel bacterium growing via reductive dehalogenation of 2-chlorophenol. Appl. Environ. Microbiol. **60**: 3536-3542.

Christiansen, N. et B. K. Ahring. 1996. *Desulfitobacterium hafniense* sp. nov., an anaerobic, reductively dechlorinating bacterium. Int. J. Syst. Bacteriol. **46**: 442-448.

de Jong, E., J.A. Field, H.-E. Spinnler, J.B.P.A. Wijnberg et J.A. M. de Bont. 1994. Significant biogenesis of chlorinated aromatics by fungi in natural environments. Appl. Environ. Microbiol. **60**:264-270.

Dennie, D., I. Gladu. F. Lépine, R. Villemur, J.-G. Bisaillon, R. Beaudet. 1998. Spectrum of the Reductive Dehalogenation Activity of *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. Appl. Environ. Microbiol. **64**:4603-4606

DeWeerd, K.A., A. Saxena, D.P. Nagel Jr. et J.M. Suflita. 1988. Metabolism of the ^{18}O-methoxy substituent of 3-methoxybenzoic acid and other unlabeled methoxybenzoic acids by anaerobic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **54**:1237-1242.

DeWeerd, K.A., L. Mandelco, R.S. Tanner, C.R. Woese, J.M. Suflita. 1990. *Desulfomonile tiedjei* gen. nov. and sp. nov., a novel anaerobic dehalogenation, sulfate-reducing bacterium. Arch. Microbiol. **154**: 23-30.

DeWeerd, K.A. et J.M. Suflita. 1990. Anaerobic aryl reductive dehalogenation of halobenzoates by cell extracts of *Desulfomonile tiedjei* . Appl. Environ. Microbiol. **56**: 2999-3005.

DeWeerd, K.A., J.M. Suflita, T.G. Linkfield, J.M. Tiedje et P.H. Pritchard. 1986. The relationship between reductive dehalogenation and other aryl substituent removal reactions catalyzed by anaerobes. FEMS Microbiol. Ecol. **38**: 293-298.

Dictionary of Organic Compounds. 5th Edition. 1982. Chapman and Hall. Toronto. **4**:4507.

Dolfing, J. 1990. Reductive dechlorination of 3-chlorobenzoate is coupled to ATP production and growth in an anaerobic bacterium, strain DCB-1. Arch. Microbiol. **153**: 264-266.

Dolfing, J. et B.K. Harrison. 1993. Redox and reduction potentials as parameters to predict the degradation pathway of chlorinated benzenes in anaerobic environments. FEMS Microbiol. **13**:23-30.

Dolfing, J. et J.M. Tiedje. 1991. Influence of substituents on reductive dehalogenation of 3-chlorobenzoate analogs. Appl. Environ. Microbiol. **57**: 820-824.

Dupont, C. et A.J. Clarke. 1991. Dependence of lysozyme-catalysed solubilization of *Proteus mirabilis* peptidoglycan on the extent of O-acetylation. Eur. J. Biochem. **195**:763-769.

Fetzner, S. et F. Lingens. 1994. Bacterial Dehalogenases: Biochemistry, Genetics, and Biotechnological Applications. Microbiol. Rev. **58**:641-685.

Fuchs, G., M.E.S. Mohamed, W. Altenschmidt, J. Koch, A. Lack, R. Brackmann, C. Lochmeyer et B. Oswald. 1994. Biochemistry of anaerobic biodegradation of aromatic compounds dans C. Ratledge (ed.), Biochemistry of Microbial Degradation. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp. 513-553.

Gerritse, J., V. Renard, T.M.P. Gomes, P.A. Lawson, M.D. Collins et J.C. Gottschal. 1996. *Desulfitobacterium* sp. strain PCE1, an anaerobic bacterium that can grow by reductive dechlorination of tetrachloroethene or *ortho* -chlorinated phenols. Arch. Microbiol. **165**: 132-140.

Gibson, S.A. and J.M. Suflita. 1986. Extrapolation of biodegradation results to groundwater aquifers : reductive dehalogenation of aromatic compounds. Appl. Environ. Microbiol. **52**:681-688

Gibson, S.A. and J.M. Suflita. 1990. Anaerobic biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid in samples from a methanogenic aquifer : stimulation by short-chain organic acids and alcools. Appl. Environ. Microbiol. **56**:1825-1832

Gladu, I., R. Beaudet, D. Dennie, F. Lépine, R. Villemur, et J.-G. Bisaillon. Specificity of reductive dehalogenation of different halogenated substances by *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. Conférence de la Société Canadiennne de Microbiologie, 15-19 juin, 1997, Université Laval, Québec. Programme et Sommaires p. 68, EMP29.

Gombar, V.K. et K. Enslein. 1988/89. Topological shape and electronic descriptors and their correlation with toxicity to *Photobacterium phophoreum*. In Vitro Toxicol. **2A**:117-127.

Griffith, G.D., J.R. Cole, J.F. Quensen III et J.M. Tiedje. 1992. Specific deuteration of dichlorobenzoate during reductive dehalogenation by *Desulfomonile tiedjei* in D_2O. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 409-411.

He, Z. et J.C. Spain. 1997. Studies of the catabolic pathway of degradation of nitrobenzene by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45: removal of the amino group from 2-aminomuconic semialdehyde. Appl. Environ. Microbiol. **63**:4839-4843.

Heijman, C.G., C. Holiger, M.A. Glaus, R.P. Schwarzenbach et J. Zeyer. 1993. Abiotic reduction of 4-chloronitrobenzene to 4-chloroaniline in a dissimilatory iron-reducing enrichment culture. Appl. Environ. Microbiol. **59**:4350-4353.

Holliger, C. et W. Schumacher. 1994. Reductive dehalogenation as a respiratory process. Antonie Van Leeuwenhoek. **66**:239-246.

Hutzinger, O., S. Safe, V. Zitko. 1972. Analysis of chlorinated aromatic hydrocarbons by exhaustive chlorination: qualitative and structural aspects of the perchloro-derivatives of biphenyl, naphthalene, terphenyl, dibenzofuran, dibenzodioxin and DDE. Intern. J. Environ. Anal. Chem. **2**:95-106.

Juteau, P., R. Beaudet, G. McSween, F. Lépine, S. Milot et J.-G. Bisaillon. 1995a. Anaerobic biodegradation of pentachlorophenol by a methanogenic consortium. Appl. Microbiol. Biotechnol. **44**: 218-224.

Juteau, P., R. Beaudet, G. McSween, F. Lépine et J.-G. Bisaillon. 1995b. Study of the reductive dechlorination of pentachlorophenol by a methanogenic consortium. Can. J. Microbiol. **41**: 862-868.

Kearny, P.C. et D.D. Kaufmann. 1965. Enzyme from soil bacterium hydrolyzes phenylcarbamate herbicides. Science. **147**: 740.

King, G.M. 1988. Dehalogenation in marine sediments containing natural sources of halophenols. Appl. Environ. Microbiol. **54**:3079-3085.

Kuhlmann, B. et B. Kaczmarzcyk. 1995. Biodegradation of the herbicides 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid, and 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid in a sulfate-reducing aquifer. Envion. Toxicol. Wat. Qual. **10**: 119-125.

Kuhn, E.P. et J.M. Suflita. 1989. Sequential reductive dehalogenation of chloroanilines by microorganisms from a methanogenic aquifer. Environ. Sci. Technol. **23**: 848-852.

Kuhn, E.P., G.T. Townsend et J.M. Suflita. 1990. Effect of sulfate and organic carbon supplements on reductive dechlorination of chloranilines in anaerobic aquifer slurries. Appl. Environ. Microbiol. **56**: 2630-2637.

Linkfield, T.G. et J.M. Tiedje. 1990. Characterization of the requirements and substrates for reductive dehalogenation by strain DCB-1. J. Ind. Microbiol. **5**: 9-16.

Liu, S.M. 1995. Anaerobic dechlorination of chlorinated pyridines in anoxic freshwater sediment slurries. J. Environ. Sci. Technol. **16**:714-723.

Liu, S.M. C.H. Wu et H.J. Huang. 1998. Toxicity and anaerobic biodegradability of pyridine and its derivatives under sulfidogenic conditions. Chemosphere. **36**:2345-2357.

Löffler, F.E., R.A. Sanford et J.M. Tiedje. 1996. Initial characterization of a reductive dehalogenase from *Desulfitobacterium chlororespirans* Co23. App. Environ. Microbiol. **62**: 3809-3813.

Macalady, D.L., P.G. Tratnyek, et T.J. Grundl. 1986. Abiotic reduction reactions of anthropogenic organic chemicals in anaerobic systems : a critical review. J. Contam. Hydrol. **1**:1-28.

MacKiewicz, M. et J. Wiegel. 1998. Comparison of energy and growth yields for *Desulfitobacterium dehalogenans* during utilization of chlorophenols and various traditional electron acceptors. Appl. Environ. Microbiol. **64**:352-355.

Madsen, R. et D. Licht. 1992. Isolation and characterization of an anaerobic chlorophenol transforming bacterium. Int. J. Syst. Bacteriol. **58**: 2874-2878.

Mikesell, M.D., et S.A. Boyd. 1985. Reductive dechlorination of the pesticides 2,4-D, 2,4,5-T, and pentachlorophenol in anaerobic sludges. J. Environ. Qual. **14**: 337-340.

Mohn, W.W. et J.M. Tiedje. 1990. Strain DCB-1 conserves energy for growth from reductive dechlorination coupled to formate oxidation. Arch. Microbiol. **153**: 267-271

Mohn, W.W. et J.M. Tiedje. 1991. Evidence for chemiosmotic coupling of reductive dechlorination and ATP synthesis in *Desulfomonile tiedjei*. Arch. Microbiol. **157**: 1-6

Mohn, W.W. et K.J. Kennedy. 1992. Reductive dehalogenation of chlorophenols by *Desulfominile tiedjei* DCB-1. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 1367-1370.

Mohn, W.W. et J.M. Tiedje. 1992. Microbial reductive dehalogenation. Microbiol. Rev. **56**: 482-507.

Neilson, A.G. A.S. Allard, C. Lindgren, et M. Remberger. 1987. Transformations of chloroguaiacols, chloroveratroles, and chlorocatechols by stable consortia of anaerobic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **53**: 2511-2519.

Neilson, A.G., A.S. Allard, P.A. Hynning, et M. Temberger. 1991. Distribution, fate and persistence of organochlorine compounds formed during production of bleached pulp. Toxicol. Environ. Chem. **30**: 3-41.

Ni, S., J.K. Fredrickson, and L. Xun. 1995. Purification and Characterization of a Novel 3-Chlorobenzoate-Reductive Dehalogenase from the Cytoplasmic Membrane of *Desulfomonile tiedjei* DCB-1. J. Bacteriol. **177**:5135-5139.

Nicholson, D.K., S.L. Woods, J.D. Istok et D.C. Peek. 1992. Reductive dechlorination of chlorophenols by a pentachlorophenol-acclimated methanogenic consortium. Appl. Environ. Microbiol. **58**:2280-2286.

Nies, L. and T.M. Vogel. 1991. Identification of the proton source for the microbial reductive dechlorination of 2,3,4,5,6-pentachlorobiphenyl. Appl. Environ. Microbiol. **57**:2772-2774.

Ott, M., C. Symons, D. Parke et G. Sorli. 1996. The Chemistry of Polychlorinated Biphenyls (PCB's) [En ligne]. 4 pages. Adresse HTTP : http://bordeaux.uwaterloo.ca/bio1447new/ assignments/ott.html

Pasto, D.J. et C.R. Johnson. 1979. Laboratory text for organic chemistry. Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs. 542 p.

Quensen, J.F., III, S.A. Boyd et J.M. Tiedje. 1990. Dechlorination of four commercial polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclors) by anaerobic microorganisms from sediments. Appl. Environ. Microbiol. **56**:2360-2369.

Remberger, M., A.S. Allard et A.H. Neilson. 1986. Biotransformation of chloroguaiacols, chlorocatechols, and chloroveratroles in sediments. Appl. Environ. Microbiol. **51**: 552-558.

Sanford, R.A., J.R. Cole, F.E. Löffler et J.M. Tiedje. 1996. Characterization of *Desulfitobacterium chlororespirans* sp. nov., which grows by coupling the oxidation of lactate to the reductive dechlorination of 3-chloro-4-hydroxybenzoate. Appl. Environ. Microbiol. **62**: 3800-3808.

Schotz-Maramatsu, H., A. Neumann, M. Meβner, E. Moore et G. Diekert. 1995. Isolation and characterization of *Dehalospirillum multivorans* gen. nov., sp. nov., a tetrachloroethene-utilizing, strictly anaerobic bacterium. Arch. Microbiol. **163**: 48-56.

Shelton, D.R. et J.M. Tiedje. 1984. Isolation and partial characterization of bacteria in an anaerobic consorium that mineralizes 3-chlorobenzoic acid. Appl. Environ. Microbiol. **48**: 840-848.

Shuisong, N., J.K. Fredrickson, et L.Xun. 1995. Purification and characterization of a novel 3-chlorobenzoate-reductive dehalogenase from the cytoplasmic membrane of *Desulfomonile tiedjei* DCB-1. J. Bacteriol. **177**: 5135-5139.

Smith, T.J., R.H. Wearne et A.F.A. Wallis. 1994. Conversion of Dichlorovinillins to Trichloroguaiacols – Components of Pulp Bleaching Effluents. Holzforschung. **48**:512-516.

Sobieralski, T.J. 1988. Selective reduction of pentachloropyridine to 2,3,5,6-tetrachloropyridine with zinc dust in basic media. U.S. Patent No. 4,783,536.

Steward, C.C., T.C. Dixon, Y.P. Chen et C. R. Lovell. 1995. Enrichment and isolation of a reductively debrominating bacterium from the burrow of a bromometabolite-producing marine hemichordate. Can. J. Microbiol. **41**:637-642.

Struijs, J. et J.E. Rogers. 1989. Reductive dehalogenation of dichloroanilines by anaerobic microorganisms in fresh and dichlorophenol-acclimated pond sediment. Appl. Environ. Microbio. **55**: 2527-2531.

Suflita, J.M., J. Stout et J.M Tiedje. 1984. Dechlorination of 2,4,5-trichlorophenoxy acetic acid by anaerobic microorganisms. J. Agric. Food Chem. **32**: 218-221.

Susarla, S., S. Masunaga, and Y. Yonczawa. 1996. Transformations of chloronitrobenzenes in anaerobic sediment. Chemosphere. **32**:967-977.

Susarla, S., Y. Yonezawa, and S. Masunaga. 1998. Reductive transformations of halogenated aromatics in anaerobic estuarine sediment: kinetics, products and pathways. Wat. Res. **32**:639-648.

Tamura, K., Y. Hasegawa et T. Kudo. 1995. Isolation and Characterization of PCNB Degrading Bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* Strain I-41. J. Pesticide Sci. **20**:145-151.

Tiedje, J.M., J.M. Quensen III, J. Chen-Sanford, J.P. Schimel et S.A. Boyd. 1993. Microbial reductive dechlorination of PCBs. Biodegrad. **4**: 231-240.

Townsend, G.T. et J.M. Suflita. 1996. Characterization of chloroethylene dehalogenation by cell extracts of *Desulfomonile tiedje* and its relationship to chlorobenzoate dehalogenation. Appl. Environ. Microbiol. **62**: 2850-2853.

Utkin, I., C. Woese et J. Wiegel. 1994. Isolation and characterization of *Desulfitobacterium dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates chlorophenolic compounds. **44**: 612-619.

Utkin, I., D.D. Dalton et J. Wiegel. 1995. Specificity of reductive dehalogenation of substituted *ortho*-chlorophenols by *Desulfitobacterium dehalogenans* JW/IU-DC1. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 346-351.

Vogel, A. 1978. Vogel's Practical organic chemistry, including qualitative organic analysis. Lougman Group Limited, New York. 1368 p.

Vogel, T.M., C.S. Criddle, and P.L. McCarty. 1987. Transformations of halogenated aliphatic compounds. Environ. Sci. Technol. **21**:722-736.

Weber, E.J. and N.L. Wolfe. 1987. Kinetic studies of the reduction of aromatic azo compounds in anaerobic sediment/water systems. Environ. Toxicol. Chem. 6:911-919

Woods, S.L., J.F. Ferguson et M.M. Benjamin. 1989. Characterization of chlorophenol and chloromethoxybenzene biodegradation during anaerobic treatment. Environ. Sci. Technol. **23**: 62-68.

Wu, Q., D.L. Bedard et J. Wiegel. 1997a. Effect of Incubation Temperature on the Route of Microbial Reductive Dechlorination of 2,3,4,6-Tetrachlorobiphenyl in Polychlorinated Biphenyl (PCB)-Contaminated and BPC-Free Freshwater Sediments. Appl. Environ. Microbiol. **63**:2836-2843.

Wu, Q., D.L. Bedard et J. Wiegel. 1997b. Temperature Determines the Pattern of Anaerobic Microbial Dechlorination of Aroclor 1260 Primed by 2,3,4,6-Tetrachlorobiphenyl in Woods Pond Sediment. Appl. Environ. Microbiol. **63**:4818-4825.