Université Paul Verlaine-Metz

Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie des Ressources, Procédés, Produits, Environnement (RP2E)

Laboratoire des Interactions Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes (LIEBE), UMR 7146 CNRS - UPV Metz

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PAUL VERLAINE DE METZ

Discipline : Microbiologie moléculaire

Présentée et soutenue
Par

Achour-Rokbani Asma

Le 24 Octobre 2008

Etude du système *ars* bactérien de résistance à l'arsenic : Diversité des transporteurs d'arsénite et Analyse moléculaire d'un opéron *ars*

JURY :

Mr R. DURAN	Professeur, Université de Pau et des Pays de l'Adour (Rapporteur)
Mme. M.C. LETT	Professeur, Université Louis Pasteur Strasbourg (Rapporteur)
Mme V. BONNEFOY	Directeur de recherche, CNRS, Marseille (Examinateur)
Mr. P. POUPIN	Maître de Conférences, Université Paul Verlaine Metz (Examinateur)
Mme B.SCHOEPP-COTHENET	Chargée de Recherche, CNRS, Marseille (Examinateur)
Mme P. BAUDA	Professeur, Université Paul Verlaine Metz (Directeur de Thèse)
Mr. P. BILLARD	Maître de Conférences, Université Henri Poincaré (Co-Directeur de Thèse)



AVERTISSEMENT

Cette thèse est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et disponible à l'ensemble de la communauté universitaire élargie.
Elle est soumise à la propriété intellectuelle de l'auteur au même titre que sa version papier. Ceci implique une obligation de citation, de référencement dans la rédaction de tous vos documents.
D'autre part, toutes contrefaçons, plagiats, reproductions illicites entraînent une poursuite pénale.
Enfin, l'autorisaton de diffusion a été accordée jusqu' à nouvel ordre.

- Contact SCD Metz : daniel.michel@scd.univ-metz.fr

Ecrire au doctorant:

Code de la Proriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Proriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

à la mémoire de mon père

à ma mère

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Mme Paule Vasseur et Mr Jean François Férard de m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire.

J'exprime ma gratitude à Mme Pascale Bauda, directrice de cette thèse, pour ses conseils, son aide et la confiance qu'elle m'a accordé tout au long de ces années de thèse. Merci également pour ses encouragements et son soutien durant la période de rédaction du manuscrit.

Un grand merci à Mr Patrick Billard pour son aide et les bons conseils qu'il a su prodiguer. Son regard critique juste et avisé m'a encouragé à être encore plus perspicace et engagée dans mes recherches.

Je remercie vivement Mr Pascal Poupin qui a toujours montré de l'intérêt pour mes travaux et répondu à mes sollicitations lorsque le besoin s'en faisait sentir. J'espère que cette thèse sera un remerciement suffisant au soutien et à la confiance sans cesse renouvelée dont il a fait preuve à mon égard.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Mme Marie Claire Lett et Mr Robert Duran de m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse ainsi qu'à Mme Violaine Bonnefoy et Mme Barbara Schoepp-Cothenet d'avoir accepté d'en être les examinateurs.

Je remercie également tous les membres du LIEBE qui m'ont tout de suite accueilli à bras ouverts : merci à Christophe, Johanne, Maryline, Mireille, Marie-Andrée, Claudine, Anne-Marie, Marie-Aline, Yann, Aurélie, Marc, Renaud, Audrey…et j'en oublie sûrement. Ce fut pour moi un véritable plaisir de travailler avec vous.

Un merci particulier à Carole Cossu-Leguille pour les discussions enrichissantes que nous avons partagées mais également pour son soutien et ses encouragements à chaque étape. Je garde, en partie grâce à toi, un très bon souvenir de mon passage dans ce laboratoire. Merci également à Rosy Toda

qui m'a tous les jours accueilli avec un grand sourire et à Nelly Brulé qui est tout simplement la personne la plus douce et la plus gentille que j'ai rencontré à Metz.
Une pensée particulière pour tous ceux qui ont quitté le laboratoire, particulièrement à Pascal, Hend, François, Eric, Marco et Sébastien avec qui j'ai partagé des moments de doute, de désespoir mais également de joie et de réussite.

Merci à mon père qui s'est dévoué corps et âme pour nous pousser toujours de l'avant et nous faciliter chaque étape de notre existence (j'aurai tant souhaité que tu sois encore là). Merci à ma mère qui m'a toujours écouté, écarté mes doutes, soigné mes blessures et partagé mes joies.
Merci pour tout ce que vous m'avez donné. Sans vous, je n'y serais pas arrivé. Cette thèse est en grande partie la votre.

Enfin merci à Zied, sans toi j'aurais sans doute abandonné il y a longtemps. Merci pour ton écoute, ton aide, ta patience, ta présence et ton amour.

Sommaire

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction Bibliographique 17
1 L'arsenic dans l'environnement 19
1.1 Propriétés de l'arsenic 19
1.2 Source de l'arsenic dans l'environnement 19
1.3 Formes de l'arsenic 21
1.3.1 Formes inorganiques 21
1.3.2 Formes organiques 23
1.4 Toxicité de l'arsenic 24
1.5 L'arsenic dans le sol 25
2 Transformations microbiennes de l'arsenic 27
2.1 Oxydation d'As(III) en As(V) 28
2.1.1 Oxydation hétérotrophe d'As(III) en As(V) 28
2.1.2 Oxydation chimiolithoautotrophe d'As(III) en As(V) 32
2.2 Réduction dissimilatrice 34
2.3 Méthylation de l'arsenic 37
2.4 Mécanisme de résistance par efflux d'arsenic (système *ars*) 40
2.4.1 Transport d'As(V) et As(III) dans la cellule 41
2.4.2 Différents arrangements des opérons *ars* chez les bactéries 44
2.4.3 Transporteurs d'arsénite : ArsB/Acr3p 48
2.4.4 ATPase : ArsA 51
2.4.5 Arséniate réductase : ArsC 53
2.4.6 Répresseurs transcriptionnels : ArsR et ArsD 56
Objectifs 59
Matériel & Méthodes 63
1 Souches et isolats bactériens 65
2 Plasmides 66
3 Milieux et conditions de culture 68
4 Détermination de la sensibilité à l'arsenic 71
5 Détection des activités arsénite oxydase et arséniate réductase 71
6 Techniques de biologie moléculaire 72
6.1 Extraction des acides nucléiques 72
6.1.1 Extraction de l'ADN total 72
6.1.2 Extraction de l'ADN plasmidique d'*E. coli* 72
6.1.3 Extraction de l'ADN plasmidique de *C. glutamicum* ArsB1-B2 72
6.1.4 Extraction des fragments d'ADN à partir du gel d'agarose 73
6.1.5 Extraction de l'ARN total 73
6.2 Restriction et modification de l'ADN 73

6.3 Transcription inverse 73
6.4 Réaction d'amplification en chaîne (PCR) 74
6.5 Séquençage 75
6.6 Analyses des séquences et constructions des arbres phylogénétiques 76
6.7 Southern blot 77
6.8 Transformation bactérienne 77
6.8.1 Transformation de *C. glutamicum* ArsB1-B2 77
6.8.1.1 Préparation des cellules électrocompétentes 77
6.8.1.2 Transformation par électroporation et choc thermique 77
6.8.2 Protocole utilisé pour tester la capacité de transformation de l'isolat A33 78
6.8.2.1 Préparation des cellules électrocompétentes 78
6.8.2.2 Test de transformation par électroporation 78
6.9 Construction d'une banque d'ADN de l'isolat A33 79
6.9.1 Digestion partielle de l'ADN total 79
6.9.2 Fractionnement de l'ADN hydrolysé avec *Bsp*143I par centrifugation en gradient de saccharose 79
6.9.3 Conservation de la banque 80
6.9.4 Criblage de la banque d'ADN chez *E. coli* MA1 et transfert dans *C. glutamicum* ArsB1-B2 80

Résultats & Discussion 81

Chapitre I : Diversité des gènes de transporteurs d'arsénite de bactéries du sol résistantes à l'arsenic 83

1 Introduction 85

2 Conception d'oligonucléotides dégénérés permettant la détection des gènes de transporteurs d'arsénite 85

2.1 Analyse phylogénétique de 75 séquences protéiques de transporteurs d'arsénite 85
2.2 Conception des oligonucléotides dégénérés 87
2.3 Test de l'efficacité des jeux d'amorces dégénérées 91

3 Analyse de la diversité des gènes de transporteurs d'arsénite d'isolats bactériens du sol résistants à l'arsenic 93

3.1 Caractérisation morphologique des isolats 93
3.2 Identification des 41 isolats sélectionnés 95
3.3 Détermination des niveaux de résistance des 41 isolats à As(III), As(V) et Sb(III) 98
3.4 Recherche de gènes de transporteurs d'arsénite chez les 41 isolats 99
3.4.1 Criblage des isolats par PCR 99
3.4.2 Clonage, séquençage et phylogénie des séquences de transporteurs d'arsénite 101
3.4.3 Analyse phylogénétique 102
3.4.4 Recherche des isolats capables d'oxyder As(III) ou de réduire As(V) 104
3.4.5 Récapitulation des résultats 105

4 Discussion 107

Chapitre II : Recherche des gènes impliqués dans la résistance à l'arsenic chez l'isolat A33 *Microbacterium* sp. 113

1 Introduction 115
2 Résistance de l'isolat A33 à l'arsenic en milieu liquide 115
3 Test de transformation génétique de l'isolat A33 116
3.1 Séquençage de l'ADNr 16S complet de l'isolat A33 117
3.2 Test de sensibilité aux antibiotiques de l'isolat A33 117
3.3 Choix du vecteur et transformation de l'isolat A33 118
4 Première approche : clonage de l'opéron *ars* de *Microbacterium* sp. A33 120
4.1 Hybridation de l'ADN de l'isolat A33 avec la sonde *ACR3(1)*/A33 120
4.2 Clonage des fragments *Bam*HI (4,5 kb) dans le vecteur pUC19 et sélection des clones contenant le gène *ACR3(1)* 121
4.3 Caractérisation de l'insert 39 122
4.3.1 Détermination de l'orientation de l'insert 39 dans le vecteur pUC19 122
4.3.2 Profils de restriction de l'insert 39 et sous-clonage dans le vecteur pUC19 123
4.3.2.1 Profils de restriction de l'insert 39 123
4.3.2.2 Sous-clonage de l'insert 39 dans le plasmide pUC19 124
4.3.3 Séquençage de l'insert 39 126
4.3.4 Analyse de la séquence de l'insert 39 126
4.3.5 Transformation d'*E. coli* MA1 avec le plasmide p39 127
4.3.6 Introduction de l'insert 39 dans le vecteur pSRK21 et transformation de *C. glutamicum* ArsB1-B2 128
5 Deuxième approche: construction d'une banque d'ADN de l'isolat A33 chez *E. coli* MA1 129
5.1 Digestion de l'ADN de l'isolat A33 et sélection des fragments à cloner 129
5.2 Insertion des fragments sélectionnés dans le vecteur pSRK21 et transformation d'*E. coli* MA1 130
5.3 Transfert de la banque dans *C. glutamicum* ArsB1-B2 131
5.4 Analyse des clones recombinants d'*E. coli* MA1 et de *C. glutamicum* ArsB1-B2 résistants à l'arsenic 131
5.4.1 Recherche par PCR du gène *ACR3(1)* 131
5.4.2 Profils de restriction de l'ADN plasmidique des clones résistants à l'arsenic 132
5.5 Choix de l'insert à séquencer 133
5.6 Séquençage de l'insert(1) et analyse de la séquence 134
5.7 Vérification de la séquence de l'ORF 8 135
5.8 Vérification par hybridation moléculaire de l'arrangement des gènes *ars* et des gènes avoisinants 137
5.9 Recherche d'un insert contenant les ORF 3 à 8 de l'isolat A33 139
5.10 Construction d'un fragment d'ADN contenant les ORF 3 à 8 140
6 Analyse des produits des ORF 1 à 10 de la séquence 1/3 143
6.1 Produits des ORF 1, 2, 9 et 10 143
6.2 Protéine ArsRC2 144
6.3 Arséniate réductases putatives : ArsC1, ArsC2 et ArsC3 144
6.4 Transporteur d'arsénite : Acr3(1)p 147

6.5 Répresseur transcriptionnel : ArsR 147
6.6 Thiorédoxine réductase : ArsT 149
6.7 Thiorédoxine : ArsX 151
7 Comparaison des opérons *ars* de l'isolat A33 et *B. linens* BL2 153
8 Recherche de séquences répétées et inversées et de séquences promotrices 154
9 Analyse transcriptionelle d'*arsC1*, *arsRC2*, *ACR3(1)*, *arsT* , *arsX* et *arsC3* par RT-PCR 156
10 Discussion 157
Conclusions générales & Perspectives 165
Annexe I 171
Annexe II 175
Références 187

Liste des figures

Figure 1. Cycle de l'arsenic dans l'environnement 21
Figure 2. Principales formes d'arsenic détectées dans l'environnement..... 22
Figure 3. Diagramme Eh-pH pour les espèces aqueuses de l'arsenic dans un système As–O_2–H_2O à 25ºC et à 1 bar de pression 23
Figure 4. Transformation des différentes formes d'arsenic dans le sol..... 27
Figure 5. Mécanisme d'oxydation d'As(III) par l'arsénite oxydase..... 29
Figure 6. Gènes codant les arsénite oxydases et gènes avoisinants chez *A. faecalis* NCIB 8667*, H. arsenicoxydans* ULPAs1 et *A. tumefaciens* 5A..... 30
Figure 7. Mécanisme de régulation de l'expression de l'opéron *aox* d'*A. tumefaciens* 5A.... 31
Figure 8. Réduction d'As(V) par l'arséniate réductase respiratoire 36
Figure 9. Structure des opérons *arrAB* et *arsDABC* de *Shewanella* sp. ANA-3..... 37
Figure 10. Mécanisme de méthylation d'As(V) en triméthylarsine proposé par Challenger en 1945..... 39
Figure 11. Système de résistance à As(III) et As(V) chez *E. coli*, *S. cerevisiae* et une cellule de mammifère..... 42
Figure 12. Evolution des opérons *ars*..... 44
Figure 13. Organisation de quelques opérons *ars* cités dans le tableau 2..... 47
Figure 14. Modèle topologique de la protéine ArsB..... 48
Figure 15. Arbre phylogénétique de 45 séquences protéiques homologues à Acr3p..... 50
Figure 16. Modèle topologique de la protéine Acr3p 51
Figure 17. Mécanisme de transfert d'As(III) entre ArsD et ArsA proposé par Lin et *al.*, 2007 52
Figure 18. Familles des arséniate réductases..... 53
Figure 19. Mécanisme réactionnel d'ArsC de R773 d'*E. coli* 54
Figure 20. Mécanisme de réaction d'ArsC de pI258 de *S. aureus*..... 55
Figure 21. Région promotrice de l'opéron *ars* de R773 d'*E. coli*..... 57
Figure 22. Carte des plasmides pUM3 (a), pUC19 (b), pCR2.1 (c), pSRK21 (d) et pKGT452Cβ (e)..... 67
Figure 23. Phylogénie de 75 séquences protéiques de transporteurs d'arsénite 86
Figure 24. Alignement des séquences protéiques des transporteurs d'arsénite de la famille ArsB 88

Figure 25. Alignement des séquences protéiques des transporteurs d'arsénite du groupe Acr3(1)p 89
Figure 26. Alignement des séquences protéiques des transporteurs d'arsénite du groupe Acr3(2)p 90
Figure 27. Test de la spécificité des amorces 92
Figure 28. Phylogénie des séquences partielles d'ADNr 16S. 97
Figure 29. Phylogénie des séquences protéiques des transporteurs d'arsénite ArsB (A) et Acr3(1)p/Acr3(2)p (B) 103
Figure 30. Recherche d'activité arsénite oxydase chez les isolats bactériens en utilisant le test de précipitation au nitrate d'argent sur milieu CDM solide. 104
Figure 31. Résistance de l'isolat A33 à As(III) et As(V) en milieu TRIS-LP après 48 h d'incubation à 30°C. 116
Figure 32. Séparation des produits de digestion de l'ADN de l'isolat A33 sur gel d'agarose 0,8 % (a). Résultat de l'hybridation avec la sonde *ACR3(1)*/A33 (b) 121
Figure 33. Résultat de l'hybridation de l'ADN du clone 39 avec la sonde *ACR3(1)*/A33. .. 122
Figure 34. Position du gène *ACR3(1)* dans l'insert 39 123
Figure 35. Profils de restriction du p39 124
Figure 36. Représentation des sites de coupure de *Kpn*I au niveau du plasmide p39 (a). Représentation du plasmide p39(a) (b) 125
Figure 37. Représentation des sites de coupure de *Pst*I au niveau de p39 (a). Représentation du plasmide p39(b) (b) 126
Figure 38. Séquence inconnue de l'insert 39 126
Figure 39. Représentation des phases ouvertes de lecture de l'insert p39 127
Figure 40. Migration électrophorétique des fractions 30 à 39 récupérées à partir du gradient de saccharose 130
Figure 41. Profils de restriction des 6 groupes de plasmides conférant la résistance à l'arsenic avec *Bam*HI (a), *Pst*I (b) et *Kpn*I (c) 133
Figure 42. Représentation schématique des phases ouvertes de lecture de l'insert(1) et de la position de l'opéron *ars* partiel au niveau de cet insert 134
Figure 43. Représentation schématique de l'alignement entre les séquences des inserts (1) et (3) 136
Figure 44. Représentation des phases ouvertes de lecture de l'insert(3) 136
Figure 45. Séquence 1/3 : arrangement des gènes *ars* et des gènes avoisinants au niveau de l'ADN de l'isolat A33 138

Figure 46. Séparation des produits de digestion de l'ADN de l'isolat A33 sur gel d'agarose 0,8 % (a). Résultat de l'hybridation avec la sonde *ACR3(1)*/A33 (b) 139
Figure 47. Représentation de la position des couples d'amorces Mars2F/Mars2R et Mars4R/Mars3F 140
Figure 48. Résultats des amplifications des ADN plasmidiques des 5 groupes de clones avec les couples d'amorces Mars2F/Mars2R (a) et Mars3R/Mars3F (b) 140
Figure 49. Position des fragments *Sca*I/*Bam*HI et *Bam*HI au niveau de la séquence 1/3 (a). Stratégie utilisée pour obtenir tous les gènes *ars* de l'isolat A33 au niveau d'un même fragment d'ADN (b) 142
Figure 50. Sens d'insertion de l'insert B dans le vecteur pSRK21 143
Figure 51. Phylogénie des séquences protéiques des arséniate réductases de différentes bactéries 145
Figure 52. Alignement multiple des séquences des arséniate réductases de bactéries Gram positif et Gram négatif 146
Figure 53. Phylogénie des transporteurs d'arsénite de diverses bactéries Gram+ et Gram- .147
Figure 54. Phylogénie des protéines régulatrices ArsR de diverses bactéries Gram+ et Gram- 148
Figure 55. Alignement multiple des protéines régulatrices ArsR de diverses bactéries Gram+ et Gram- 148
Figure 56. Phylogénie des séquences protéiques de thiorédoxine réductases homologues à ArsT de l'isolat A33. 149
Figure 57. Alignement multiple des séquences de thiorédoxine réductases homologues à ArsT de l'isolat A33 151
Figure 58. Phylogénie des séquences de thiorédoxines homologues à ArsX de l'isolat A33 152
Figure 59. Alignement multiple des séquences des thiorédoxines homologues à ArsX de l'isolat A33 153
Figure 60. Comparaison des opérons *ars* de l'isolat A33 et *B. linens* BL2 153
Figure 61. Séquence d'ADN de l'isolat A33 contenant les gènes *arsC1*, *arsRC2*, *ACR3(1)*, *arsT*, *arsX* et *arsC3* 155
Figure 62. Analyse de la transcription des gènes *arsC1*, *arsRC2*, *ACR3(1)*, *arsT*, *arsX* et *arsC3* par RT-PCR 156
Figure 63. Carte de restriction de l'insert B 168

Liste des tableaux

Tableau 1. Minéraux arséniés les plus courants 20
Tableau 2. Liste des opérons *ars* clonés et caractérisés 46
Tableau 3. Souches et isolats bactériens utilisés 65
Tableau 4. Séquences des amorces utilisées pour la PCR* 74
Tableau 5. Amorces utilisées pour le séquençage 75
Tableau 6. Programmes utilisés pour les analyses des séquences 76
Tableau 7. Tailles attendues (en pb) des produits PCR 91
Tableau 8. Caractéristiques des 41 groupes morphologiques 94
Tableau 9. Identification moléculaire des 41 isolats 96
Tableau 10. CMI d'As(III), As(V) et Sb(III) pour les 41 isolats 98
Tableau 11. Criblage des isolats par PCR en utilisant les 3 couples d'amorces darsB1F/darsB1R, dacr1F/dacr1R et dacr5F/dacr4R 100
Tableau 12. Récapitulation des résultats 105
Tableau 13. CMIs de 6 antibiotiques pour l'isolat A33 118
Tableau 14. Caractéristiques des vecteurs navettes pDM302, pDA71 et pMVS301 118
Tableau 15. Résultats PCR attendus et obtenus avec les 4 couples d'amorces utilisés 122
Tableau 16. Classement des clones résistants à l'arsenic en fonction de leurs profils de restriction 132
Tableau 17. Analyse des 15 phases ouvertes de lecture de l'insert(1) 135
Tableau 18. Tailles attendues des fragments révélés par la sonde *ACR3(1)*/A33 137
Tableau 19. Stratégie de sous clonages du plasmide pB 169

Introduction Bibliographique

1 L'arsenic dans l'environnement

1.1 Propriétés de l'arsenic

L'arsenic (As) est le 20^{éme} élément en terme d'abondance dans la croûte terrestre, le 14^{éme} dans l'eau de mer et le 12^{éme} dans le corps humain (Mandal et Suzuki, 2002). Il appartient au groupe Va du tableau de la classification périodique des éléments qui contient également l'azote (N), le phosphore (P), l'antimoine (Sb) et le bismuth (Bi).

L'arsenic présente des propriétés intermédiaires entre celles des métaux et des non métaux. Il appartient au groupe des métalloïdes.

Le numéro atomique de l'arsenic est le 33 et sa masse atomique est de 74,9 g/mol. Il présente différents degrés d'oxydation : As(-III) (arsine), As(0) (arsenic natif), As(III) (arsénite) et As(V) (arséniate). Dans les eaux naturelles comme dans les sols, As(III) et As(V) sont les principales formes d'arsenic (Laperche *et al.*, 2003 ; WHO, 2001).

1.2 Source de l'arsenic dans l'environnement

L'arsenic est présent naturellement dans les roches qui constituent son principal réservoir (Matschullat, 2000). On connaît plus de 200 espèces minérales d'arsenic incluant des arséniates, des sulfures, des sulfosels, des oxydes, des arséniures, des arsénites et l'arsenic natif (As) (Mandal et Suzuki, 2002). Quelques exemples de ces espèces minérales sont présentés dans le tableau 1. Les plus connues sont l'arsénopyrite (FeAsS), le réalgar (AsS) et l'orpiment (As_2S_3).

L'arsenic contenu dans les roches et les minéraux peut se retrouver dans les différents compartiments de l'environnement (eau, air, sol et organismes vivants) par divers processus naturels et anthropiques. Le principal apport naturel est le volcanisme. Cet apport a été estimé entre 2800 et 8000 t/an (Laperche *et al.*, 2003). L'altération des roches renfermant l'arsenic, les sources thermales (contenant parfois de grande quantité d'arsenic), les eaux souterraines et la volatilisation par les microorganismes constituent d'autres apports naturels d'arsenic dans l'environnement (Smedley et Kinniburgh, 2002 ; WHO, 2001).

Tableau 1. Minéraux arséniés les plus courants (Smedley et Kinniburgh, 2002)

Minéral	Composition
Arsenic natif	As
Niccolite	NiAs
Réalgar	AsS
Orpiment	As_2S_3
Cobaltite	CoAsS
Arsénopyrite	FeAsS
Tennantite	$(Cu,Fe)_{12}As_4S_{13}$
Enargite	Cu_3AsS_4
Arsénolite	As_2O_3
Claudétite	As_2O_3
Scorodite	$FeAsO_4.2H_2O$
Annabergite	$(Ni,Co)_3(AsO_4)_2.8H_2O$
Hoernesite	$Mg_3(AsO_4)_2.8H_2O$
Haematolite	$(Mn,Mg)_4Al(AsO_4)(OH)_8$
Conichalcite	$CaCu(AsO_4)(OH)$
Pharmacosidérite	$Fe_3(AsO_4)_2(OH)_3.5H_2O$

Les activités anthropiques ont aussi largement contribué à la distribution de l'arsenic dans l'environnement essentiellement par l'extraction minière (l'arsenic représente un sous-produit de l'extraction du cuivre, de l'argent et de l'or), la combustion du charbon et du pétrole, les fonderies et l'utilisation de pesticides à base d'arsenic. L'arsenic est également utilisé dans la fabrication des semi-conducteurs (arséniure de gallium AsGa), dans la fabrication du verre, dans la conservation du bois (sous forme de CCA : arséniate de cuivre chromé) et il entre dans les compositions de certains médicaments (en médecine humaine et vétérinaire) (Laperche *et al.*, 2003 ; Mandal et Suzuki, 2002). En 2004, la production mondiale d'arsenic (essentiellement sous forme As_2O_3) a été estimée à 37,500 tonnes (Vaughan, 2006).

Une représentation schématique du cycle de l'arsenic dans l'environnement est présentée dans la figure 1.

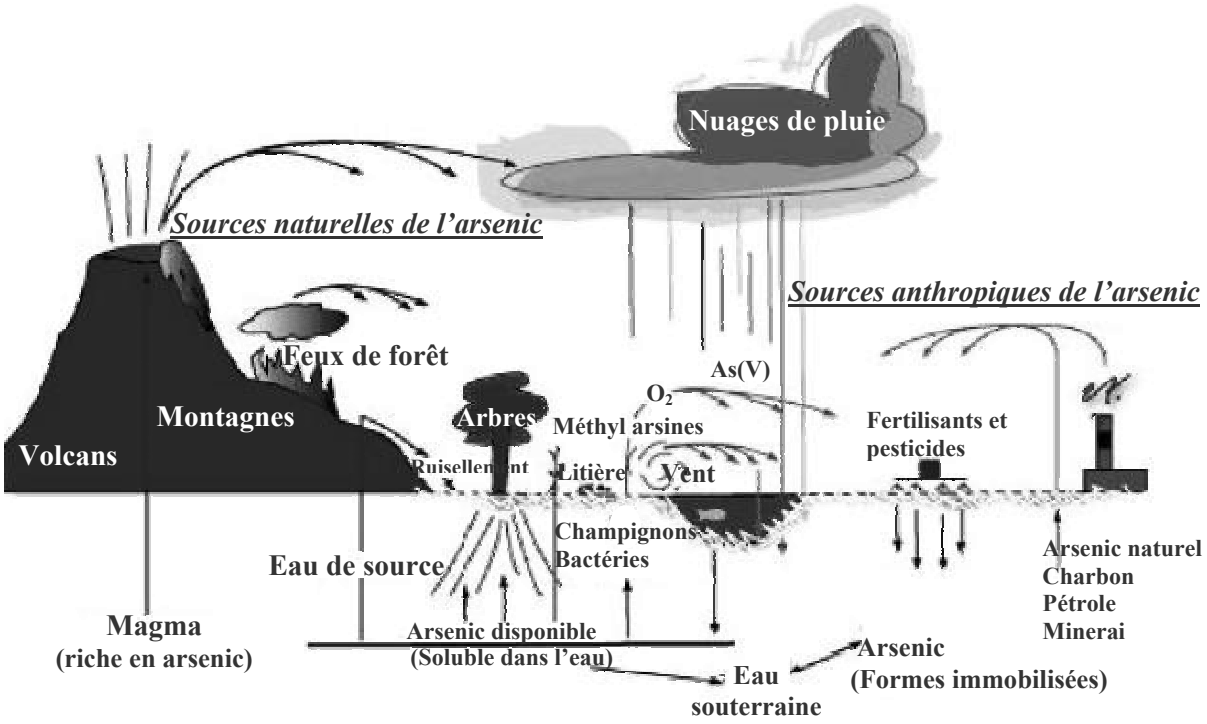


Figure 1. Cycle de l'arsenic dans l'environnement (source : Jones, 2007).

1.3 Formes de l'arsenic

Les formes chimiques de l'arsenic peuvent être classées en deux groupes : l'arsenic inorganique et l'arsenic organique. Les structures chimiques de quelques formes d'arsenic détectées dans l'environnement sont représentées dans la figure 2.

1.3.1 Formes inorganiques

L'arsénite, As(III) et l'arséniate, As(V) sont les formes majoritaires de l'arsenic dans les sols et les eaux. Les équilibres en solutions aqueuses de ces 2 formes sont les suivants :

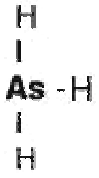
Arséniate

$H_3AsO_4 + H_2O \leftrightarrow H_2AsO_4^- + H_3O^+$ $\quad pKa_1 = 2,20$
$H_2AsO_4^- + H_2O \leftrightarrow HAsO_4^{2-} + H_3O^+$ $\quad pKa_2 = 6,97$
$HAsO_4^{2-} + H_2O \leftrightarrow AsO_4^{3-} + H_3O^+$ $\quad pKa_3 = 11,53$

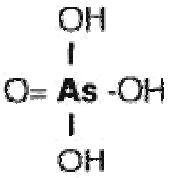
Arsénite

$H_3AsO_3 + H_2O \leftrightarrow H_2AsO_3^- + H_3O^+$ $\quad pKa_1 = 9,23$
$H_2AsO_3^- + H_2O \leftrightarrow HAsO_3^{2-} + H_3O^+$ $\quad pKa_2 = 12,13$
$HAsO_3^{2-} + H_2O \leftrightarrow AsO_3^{3-} + H_3O^+$ $\quad pKa_3 = 13,40$

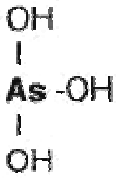
Formes inorganiques



Arsine
As(-III)

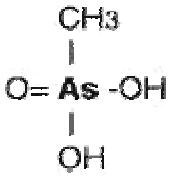


Arséniate
As(V)
pka1,2,3 = 2,20 ; 6,97 ; 11,53

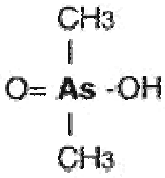


Arsénite
As(III)
pka1,2,3 = 9,23 ; 12,13 ; 13,40

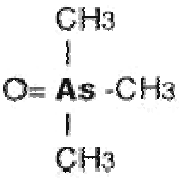
Formes organiques



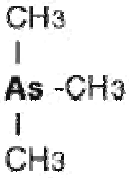
Acide monométhylarsonique
MMA(V)



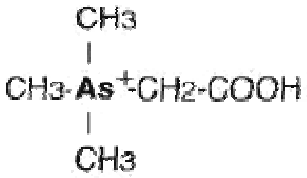
Acide diméthylarsinique
DMA(V)



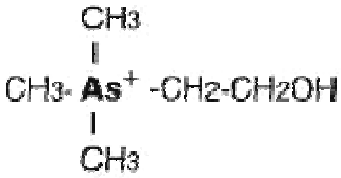
Oxyde de triméthylarsine
TMAO



Triméthylarsine
TMA(III)



Arsénobétaine
(AB)



Arsénocholine
(AC)

Figure 2. Principales formes d'arsenic détectées dans l'environnement (O'Day, 2006 ; WHO, 2001).

La détermination de la distribution de l'arsenic entre les formes As(III) et As(V) est essentielle étant donnée la toxicité et la mobilité d'As(III). Comme le montre la figure 3, le potentiel redox (Eh) et le pH du milieu influencent la spéciation de l'arsenic. Dans des conditions oxydantes, $H_2AsO_4^-$ prédomine à des valeurs de pH inférieures à 6,9 alors que la forme $HAsO_4^{2-}$ est majoritaire à des pH plus élevés. $H_3AsO_4^0$ et AsO_4^{3-} sont présents respectivement dans des conditions extrêmement acides et alcalines. Dans des conditions réductrices et à des pH inférieurs à 9,2 l'espèce neutre $H_3AsO_3^0$ prédomine (figure 3) (Smedley et Kinniburgh, 2002).

L'arsénite est donc présent principalement sous forme neutre contrairement à l'arséniate qui est essentiellement sous forme anionique.

En plus du potentiel redox (Eh) et du pH, d'autres facteurs, comme l'activité bactérienne peuvent influencer la spéciation de l'arsenic (voir section 2: Transformations microbiennes de l'arsenic).

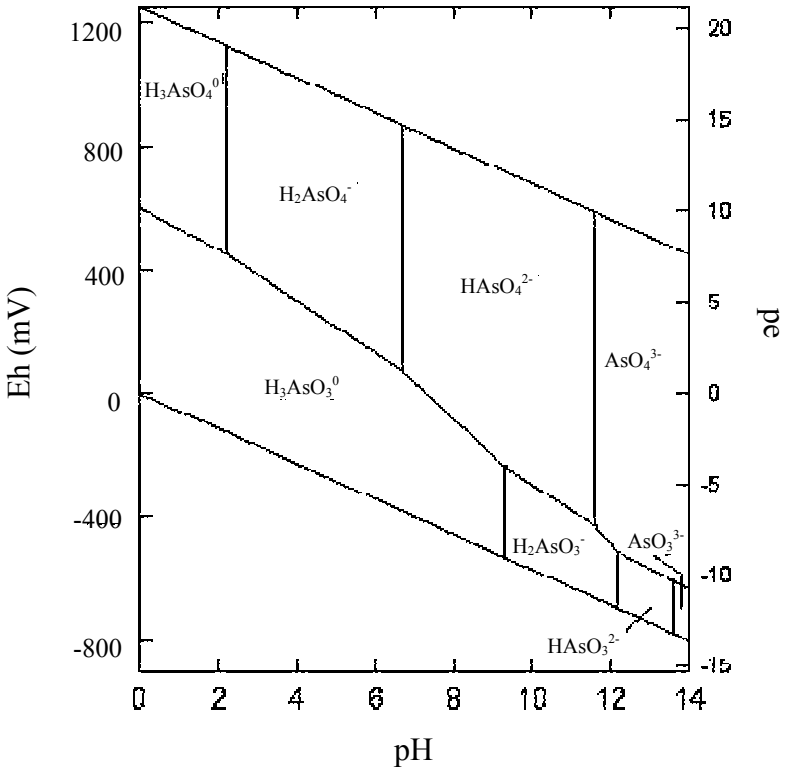


Figure 3. Diagramme Eh-pH pour les espèces aqueuses de l'arsenic dans un système As–O_2–H_2O à 25ºC et à 1 bar de pression (source : Smedley et Kinniburgh, 2002).

1.3.2 Formes organiques

Certains microorganismes sont capables de méthyler l'arsenic inorganique pour former des composés organiques non volatils (par exemple MMA(V), DMA(V), TMAO …) ou volatils (comme le TMA(III)) (figure 2). Le mécanisme de méthylation de l'arsenic par les microorganismes (proposé par Challenger en 1945) est présenté dans la section 2.3 (Méthylation de l'arsenic). Cependant, la biométhylation ne se produit pas uniquement chez les microorganismes mais également chez les algues, les plantes, les animaux et les humains (Bentley et Chasteen, 2002).

Des composés organiques plus complexes comme l'arsénobétaine et l'arsénocholine sont essentiellement retrouvés dans des animaux marins. Les arsénosucres, qui sont d'autres

composés organiques de l'arsenic, représentent la forme majoritaire de l'arsenic dans les algues marines (Francesconi et Edmonds, 1997). Ces composées organiques sont essentiellement attribués aux organismes marins, cependant certains ont été également retrouvés dans des espèces terrestres par exemple des champignons comestibles (Bentley et Chasteen, 2002).

1.4 Toxicité de l'arsenic

La toxicité de l'arsenic dépend de sa forme chimique et de son degré d'oxydation. L'arsénite, As(III) est plus toxique que l'arséniate, As(V). Ces deux espèces exercent leur toxicité selon deux mécanismes différents. L'arsénite présente une grande affinité pour les groupements thiol (SH) des protéines, il perturbe ainsi l'activité de nombreuses enzymes cellulaires dont les groupements thiols sont généralement impliqués dans la structure et sont nécessaires à l'activité catalytique. L'arséniate, qui est un analogue du phosphate, inhibe la phosphorylation oxydative et les réactions de phosphorylation (Oremland et Stolz, 2003).

L'homme peut être exposé à l'arsenic par inhalation, ingestion ou par voie cutanée. Cependant pour un individu non exposé professionnellement, la principale voie d'exposition est l'ingestion (eau de boisson et aliments). Dans l'eau de boisson, As(III) et As(V) sont les espèces majoritaires. L'exemple le plus dramatique de contamination d'eau de boisson par l'arsenic est observé au Bangladesh où la situation a été qualifiée par l'organisation mondiale de la santé (O.M.S.) comme "le plus vaste empoisonnement d'une population dans l'histoire". L'eau contaminée provient de puits qui ont été installés à partir des années 60 afin de procurer à la population une ressource en eau de meilleure qualité (les eaux de surface présentant un risque de contamination microbiologique important). Des millions de personnes ont été ainsi exposés à des eaux chargées en arsenic (Mukherjee et Bhattacharya, 2001 ; Smith *et al.*, 2000).

Plusieurs études épidémiologiques ont reporté des associations entre l'exposition chronique à l'arsenic hydrique et la survenue de multiples effets sanitaires négatifs comme des lésions cutanées (hyperkératoses, hyperpigmentation), des maladies vasculaires (maladie du pied noir (*blackfoot disease*, BFD), hypertension artérielle, atteintes vasculaires cérébrales) ainsi que différents cancers (cancer du poumon, de la peau, des reins et du sang). D'autres problèmes de santé comme le diabète et des atteintes neurologiques ont été observés. L'arsenic peut également induire des avortements spontanés, des naissances prématurées, ou une mortalité

néonatale ou infantile (Hopenhayn, 2006 ; Hughes *et al.*, 2007). Ces enquêtes épidémiologiques ont été réalisées pour la plupart dans des régions où la population est fortement exposée à l'arsenic hydrique par exemple au Bangladesh, à Taiwan, au Chili et en Argentine. Cependant les effets sanitaires négatifs de l'arsenic hydrique sur la santé humaine, notamment les effets cancérigènes, ont aussi été observés pour des niveaux d'exposition plus faibles. En 1993, l'O.M.S. a recommandé une concentration maximale admissible (CMA) pour l'arsenic dans les eaux destinées à la consommation humaine de 10 µg/L. La norme française est passée de 50 à 10 µg/L en décembre 2003 (Ravault *et al.*, 2003).

Les mécanismes par lesquels l'arsenic induit l'apparition des divers effets négatifs sur la santé sont encore mal connus. Cependant, il est clair que certains facteurs influencent la susceptibilité de l'individu ou des populations aux effets toxiques de l'arsenic. Ces facteurs peuvent être soit génétiques, soit liés au mode de vie (tabagisme, régime alimentaire, exposition concomitantes à d'autres substances) (Hopenhayn, 2006 ; Hughes *et al.*, 2007).

Après ingestion, l'arsenic inorganique passe rapidement dans le sang puis se distribue dans plusieurs organes. Il est éliminé de l'organisme par (i) une excrétion par voie urinaire rapide ou (ii) une méthylation préalable en DMA(V) et MMA(V) au niveau hépatique. Ce processus de méthylation a été longtemps considéré comme une voie de détoxification ayant pour résultat des espèces moins toxiques et qui sont plus facilement excrétées (Hopenhayn, 2006). Cependant les études récentes ont mis en doute la validité de cette hypothèse. Elles ont particulièrement montré que l'acide monométhylarsineux, MMA(III) et l'acide diméthylarsineux DMA(III), qui sont des intermédiaires formés au cours du processus de méthylation, seraient à l'origine de divers effets néfastes liés à l'arsenic inorganique (Hopenhayn, 2006 ; Styblo *et al.*, 2002).

Les composés organiques d'arsenic, comme l'arsénobétaine et l'arsénocholine, sont retrouvés à des concentrations parfois élevées dans les produits de la mer (de l'ordre du mg/kg). Cependant ils sont beaucoup moins toxiques que l'arsenic inorganique et ils sont éliminés rapidement dans les urines, sans aucune transformation (Hopenhayn, 2006).

1.5 L'arsenic dans le sol

La concentration de l'arsenic dans les sols est très variable (de 0,1 à 1000 mg/kg) (Mukhopadhyay *et al.*, 2002). Elle dépend principalement de la nature de la roche mère et des

activités humaines. En général les sols non contaminés contiennent de 1 à 40 mg/kg d'arsenic (Mandal et Suzuki, 2002).

Les arsénites et les arséniates sont les formes majoritaires dans les sols. Les arséniates sont les espèces stables dans les sols oxydants, ils se fixent aux argiles, aux oxydes/hydroxydes de fer, de manganèse et d'aluminium et aux substances organiques (Mandal et Suzuki, 2002).

Dans les conditions réductrices, les arsénites sont les espèces majoritaires (figure 3). D'une manière générale As(III) a tendance à moins se fixer qu'As(V). Ainsi dans des conditions réductrices, les teneurs en arsenic dissous sont souvent plus élevées qu'en milieu oxydant. D'autre part, la dissolution, dans les conditions réductrices, des oxydes/hydroxydes de fer et de manganèse (principales phases porteuses d'arsenic), entraîne la libération de l'arsenic dans la phase aqueuse (Laperche *et al.*, 2003).

Les formes organiques (essentiellement MMA(V), DMA(V) et TMAO) sont également détectées dans les sols mais sont généralement minoritaires par rapport aux formes inorganiques. La présence de ces formes organiques est due soit à l'activité biologique soit à un apport anthropique. Par ailleurs, les espèces arséniées volatiles (arsine et méthylarsines) peuvent être formées par les microorganismes. Ces formes sont facilement oxydables (Mandal et Suzuki, 2002).

L'étude du comportement de l'arsenic dans le sol est une tache assez complexe. En effet, plusieurs facteurs sont susceptibles d'influencer la mobilité de cet élément. Les principaux sont le pH, le potentiel redox, le climat, la quantité et le type des constituants du sol susceptibles d'interagir avec l'arsenic, la présence d'éléments compétiteurs comme le phosphate (qui entre en compétition avec As(V) pour des sites de fixation dans le sol) et l'activité microbienne (impliquée dans l'oxydation, la réduction et la méthylation de l'arsenic) (Laperche *et al.*, 2003 ; Mandal et Suzuki, 2002 ; Smedley et Kinniburgh, 2002). Des exemples de réactions de transformation de l'arsenic pouvant se dérouler dans le sol, sont présentés dans la figure 4.

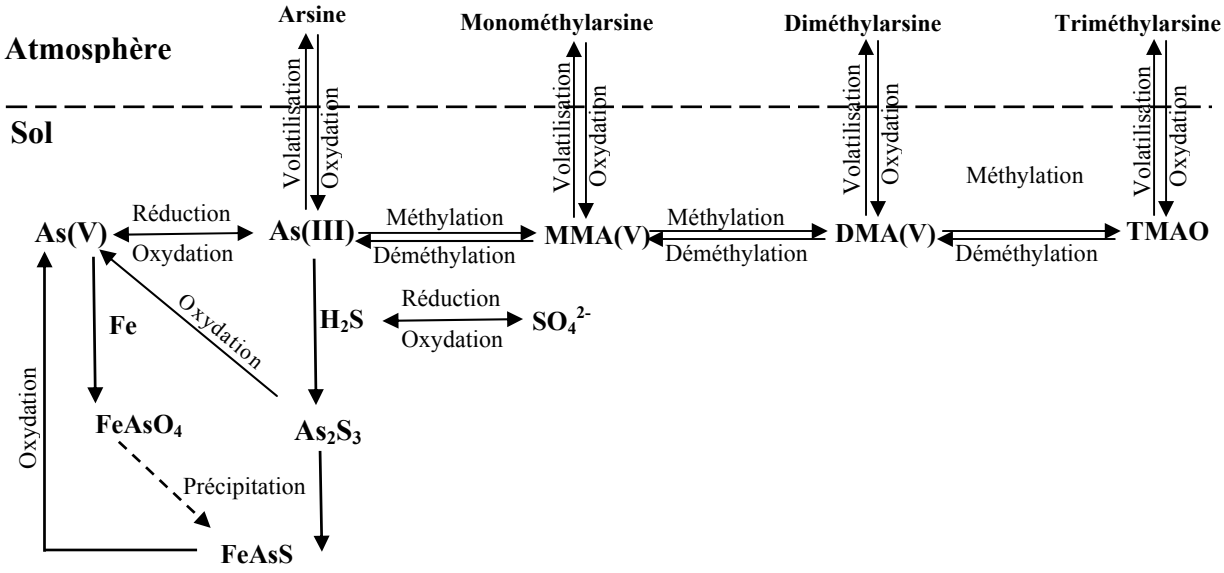


Figure 4. Transformation des différentes formes d'arsenic dans le sol (D'après Jones, 2007, Turpeinen *et al.*, 2002 et Pongratz, 1998).

2 Transformations microbiennes de l'arsenic

Les microorganismes et notamment les bactéries ont développé différents mécanismes leur permettant de tolérer cet élément toxique ou de l'utiliser dans leur métabolisme énergétique. Ces processus sont responsables de la transformation de l'arsenic et participent ainsi directement au cycle géobiochimique de cet élément.

Les mécanismes bactériens impliqués dans la transformation de l'arsenic sont :

- L'oxydation hétérotrophe d'As(III) en As(V)
- L'oxydation chimiolithoautotrophe d'As(III) en As(V)
- La réduction dissimilatrice d'As(V)
- La méthylation d'As(V) et As(III) et la déméthylation des formes méthylées
- La réduction d'As(V) en As(III) par les bactéries possédant le système *ars* de résistance à l'arsenic

Tous ces mécanismes sont détaillés dans les paragraphes suivants de l'analyse bibliographique.

2.1 Oxydation d'As(III) en As(V)

L'oxydation bactérienne d'As(III) en As(V) a été observée dès 1918 en Afrique du Sud. La bactérie identifiée a été nommée *Bacillus arsenoxydans* (Green, 1918). Depuis, plusieurs espèces bactériennes capables d'oxyder As(III) ont été identifiées. Elles sont divisées en deux groupes : les bactéries hétérotrophes oxydant l'arsenic (heterotrophic arsenite oxidizers ou "HAO") et les bactéries chimiolithoautotrophes oxydant l'arsenic (chemolithoautotrophic arsenite oxidizers ou "CAO") (Stolz *et al.*, 2006).

2.1.1 Oxydation hétérotrophe d'As(III) en As(V)

Le groupe des HAO comporte des bactéries arsénite oxydantes hétérotrophes et constitue la majorité des bactéries connues pour oxyder As(III). Il inclut des *α*-protéobactéries comme *Agrobacterium tumefaciens* 5A et *A. albertimagni* ALO15 (Macur *et al.*, 2004 ; Salmassi *et al.*, 2002), des β-protéobactéries comme *Alcaligenes faecalis, Herminiimonas arsenicoxydans* ULPAs1 et *Hydrogenophaga* sp. NT-14 (Anderson *et al.*, 1992 ; vanden Hoven et Santini, 2004 ; Weeger *et al.*, 1999), des γ-protéobactéries comme *Pseudomonas fluorescens* (Macur *et al.*, 2004), des *Deinococci* comme *Thermus thermophilus* HB8 (Gihring *et al.*, 2001) et des *Crenarcheota* comme *Sulfolobus acidocaldarius* (Sehlin et Lindstrom, 1992).
Ces bactéries ont été isolées à partir d'environnements variés (sols, eaux usées industrielles, sources chaudes, macrophytes aquatiques…). Pour la majorité de ces bactéries hétérotrophes, l'oxydation de l'arsénite est considérée comme un mécanisme de détoxification. Cependant, il a été suggéré que *Hydrogenophaga* sp. NT-14 pouvait utiliser l'énergie libérée par l'oxydation de l'arsénite, pour sa croissance (vanden Hoven et Santini, 2004).
L'enzyme qui catalyse la réaction d'oxydation d'As(III) en As(V) est l'arsénite oxydase. Elle a été purifiée et entièrement caractérisée chez *A. faecalis* NCIB 8667 (Anderson *et al.*, 1992 ; Ellis *et al.*, 2001). Elle est localisée au niveau de la surface externe de la membrane cytoplasmique bactérienne et son expression est induite par As(III). Cette enzyme appartient à la famille des diméthyl sulfoxyde réductases (DMSO) des molybdoenzymes et est composée de 2 sous-unités (figure 5) :
- une grande sous-unité catalytique (88 kDa) qui possède un cofacteur à molybdène et un centre [3Fe-4S] ;

- une petite sous-unité (14 kDa) comportant un centre [2Fe-2S] de type Rieske.

L'arsénite oxydase d'*Hydrogenophaga* sp. NT-14 a été également purifiée et partiellement caractérisée (vanden Hoven et Santini, 2004). Elle serait localisée au niveau du périplasme.

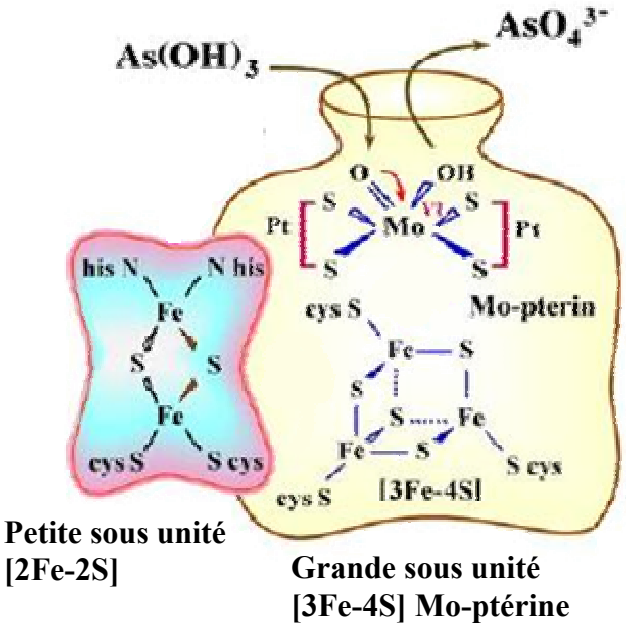


Figure 5. Mécanisme d'oxydation d'As(III) par l'arsénite oxydase (modifiée à partir de Silver et Phung, 2005b).

Les gènes codant les 2 sous unités de l'arsénite oxydase ont été clonés et séquencés par différents groupes (figure 6). Cependant, leur désignation diffère selon les auteurs : le gène codant la grande sous-unité de l'arsénite oxydase a été désigné *aoxB* pour *H. arsenicoxydans* ULPAs1 et *A. tumefaciens* 5A (Kashyap *et al.*, 2006 ; Muller *et al.*, 2003) et *asoA* pour *A. faecalis* NCIB 8667.

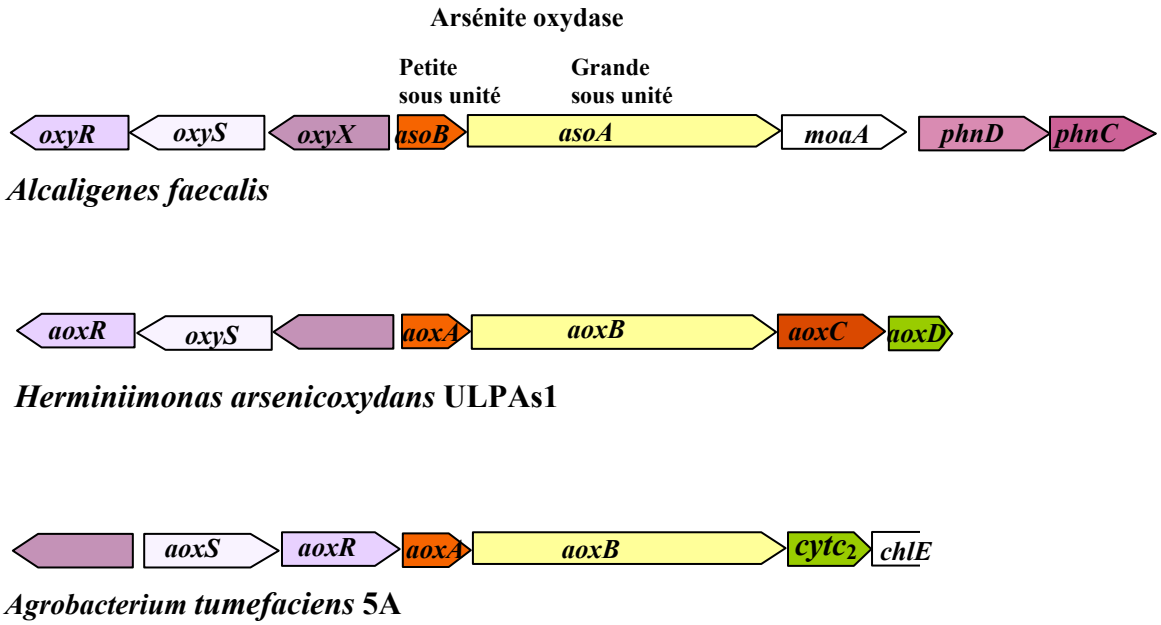


Figure 6. Gènes codant les arsénite oxydases et gènes avoisinants chez *A. faecalis* NCIB 8667, *H. arsenicoxydans* ULPAs1 et *A. tumefaciens* 5A.
Le gène *moaA* code une protéine impliquée dans la synthèse de la molybdoptérine. Les gènes *phnD* et *oxyX* codent une composante périplasmique d'un système de transport de type ABC impliqué dans le transport d'oxyanion. Le gène *phnC* code une ATPase d'un système de transport de type ABC impliqué dans le transport d'oxyanion (Silver et Phung, 2005a).

Tous les gènes codant la petite sous unité contiennent au niveau de leur extrémité N-terminale, une séquence codant pour un peptide signal comprenant un motif spécifique avec deux arginines contiguës (Muller *et al.*, 2003 ; Silver et Phung, 2005a). La présence de ce peptide suggère que l'arsénite oxydase serait exportée à travers la membrane cytoplasmique par le système de sécrétion Tat.

La région du génome contenant les gènes *asoBA* d'*Alcaligenes faecalis* NCIB 8667 (71 kb) a été entièrement séquencée. L'analyse de cette séquence suggère que les gènes *asoBA* font partie d'un îlot de plus de 20 gènes qui seraient impliqués dans la résistance et le métabolisme de l'arsenic (Silver et Phung, 2005a). Certains de ces gènes sont représentés dans la figure 6.

Chez *A. tumefaciens* 5A, les gènes codant l'arsénite oxydase font partie d'un opéron *aoxSRAB-cytc*$_2$*-chlE* (Kashyap *et al.*, 2006). Les protéines AoxR et AoxS constituent un système à deux composants impliqué dans la régulation de l'expression de l'opéron *aox*. La protéine AoxS est le récepteur qui perçoit le signal environnemental et AoxR est un régulateur assurant la réponse cellulaire au signal perçu (figures 6 et 7). La régulation de l'oxydation

d'As(III) d'*Agrobacterium* semble cependant plus complexe. Elle impliquerait l'exposition à As(III), la transduction du signal par un système de régulation à deux composants et le quorum sensing (figure 7) (Kashyap *et al.*, 2006). Les gènes $cytc_2$ et *chlE* codent respectivement un cytochrome *c* et une protéine qui serait impliquée dans la synthèse de la molybdoptérine.

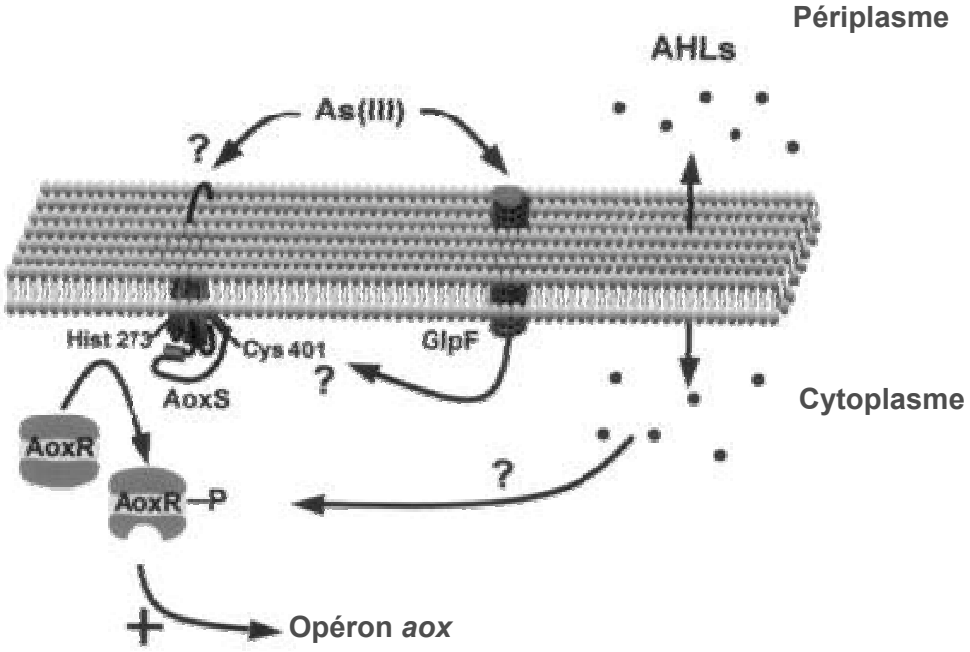


Figure 7. Mécanisme de régulation de l'expression de l'opéron *aox* d'*A. tumefaciens* 5A (source : Kashyap *et al.*, 2006).
AHLs : N-acyl-homosérine lactones utilisé comme autoinducteurs. GlpF : aquaglycéroporine permettant l'entrée d'As(III) dans la cellule.

Pour *H. arsenicoxydans* ULPAs1, il a été montré que les gènes *aoxAB* font partie d'un opéron contenant deux autres gènes désignés *aoxC* et *aoxD* qui codent respectivement une nitroréductase et un cytochrome *c* (Muller *et al.*, 2003 ; Silver et Phung, 2005a). Plus récemment, le séquençage du génome de *H. arsenicoxydans* ULPAs1 a révélé que les gènes *aoxABCD* feraient probablement partie d'un îlot de gènes impliqués dans la résistance et le métabolisme de l'arsenic, comme c'est le cas pour *A. faecalis* NCIB 8667.
Les gènes *aoxS* et *aoxR* identifiés au niveau de l'opéron *aox* d'*A. tumefaciens* 5A sont également présents chez *H. arsenicoxydans* ULPAs1 et *A. faecalis* NCIB 8667 (figure 6) (Muller *et al.*, 2007 ; Silver et Phung, 2005b). L'inactivation de ces gènes chez *H. arsenicoxydans* ULPAs1 entraîne une perte complète de l'activité arsénite oxydase. Ces

observations suggèrent que le même système de régulation de l'oxydation d'As(III) serait utilisé par les trois bactéries *A. tumefaciens, H. arsenicoxydans* ULPAs1 et *A. faecalis* NCIB 8667.

Grâce aux données de séquençage des génomes bactériens, des gènes codant une arsénite oxydase putative ont été identifiés au niveau des génomes de plusieurs bactéries (eubactéries et archaebactéries). Pour toutes ces dernières, l'ordre des gènes *aoxAB* est toujours le même bien que les gènes avoisinants puissent être différents (Muller *et al.*, 2007 ; Stolz *et al.*, 2006).

Dans des travaux récents, des équipes ont mis au point des amorces dégénérées ciblant la grande sous-unité de l'arsénite oxydase. Les amorces dégénérées définies par une première équipe (Rhine *et al.*, 2007) ont été utilisées pour la détection des gènes *aoxB* de bactéries autotrophes. A l'exception d'*A. tumefaciens* 5A, ces amorces n'ont pas encore été utilisées avec des bactéries hétérotrophes.

Pour deux autres équipes (Inskeep *et al.*, 2007 ; Quemeneur *et al.*, 2008), les amorces dégénérées définies, ont été utilisées avec succès pour la détection des gènes *aoxB* de souches autotrophes et hétérotrophes oxydant l'arsénite et appartenant à des groupes taxonomiques variés. Elles ont également permis la détection de gènes *aoxB* à partir de sites contaminés par l'arsenic.

Les amorces dégénérées définies dans ces travaux représentent un outil moléculaire puissant qui facilite la détection de nouveaux gènes d'arsénite oxydases ainsi que l'étude de la diversité de ces gènes dans des bactéries de l'environnement (Rhine *et al.*, 2007).

2.1.2 Oxydation chimiolithoautotrophe d'As(III) en As(V)

Le groupe des CAO (chemolithoautotrophic arsenite oxidizers) comprend des bactéries chimiolithoautotrophes qui tirent l'énergie nécessaire à leur croissance de l'oxydation de l'arsénite. Elles utilisent As(III) comme donneur d'électrons, le CO_2 comme source de carbone et l'oxygène ou les nitrates comme accepteur d'électrons (Oremland et Stolz, 2003).

La première bactérie chimiolithoautotrophe oxydant As(III) en As(V) qui a été identifiée est *Pseudomonas arsenotoxidans* (γ-protéobactérie) (Ilialetdinov et Abdrashitova, 1981). Elle a été isolée à partir d'effluents provenant d'une mine d'or. D'autres souches (NT-25, NT-26, NT-2, NT-3, NT-4 et BEN-5) appartenant au groupe des CAO ont été également isolées à partir de mines d'or en Australie (Santini *et al.*, 2000 ; Santini *et al.*, 2002). Elles appartiennent toutes à la classe des α-protéobactéries. L'isolat NT-26 (*Rhizobium* sp.) est aujourd'hui le plus étudié.

Une souche de *Thiomonas* (β-protéobactérie) capable de croître de façon autotrophe en oxydant As(III) a également été isolée à partir d'une ancienne mine d'or (Limousin, France) (Battaglia-Brunet *et al.*, 2002). Cette souche représente une nouvelle espèce du genre *Thiomonas,* connue aujourd'hui sous le nom de *Tm. arsenivorans* (Battaglia-Brunet *et al.*, 2006). D'autres souches du genre *Thiomonas*, capables de tirer l'énergie nécessaire à leur croissance de l'oxydation d'As(III) ont été isolées (Coupland *et al.*, 2003 ; Duquesne *et al.*, 2008).

En 2002, Oremland *et al*., ont isolé à partir d'un lac alcalin contaminé par l'arsenic, une γ-protéobactérie identifiée comme *Alkalilimnicola ehrlichei* MLHE-1 (Oremland *et al.*, 2002). Cette souche est le premier microorganisme capable d'oxyder As(III) en As(V) en utilisant les nitrates comme accepteur terminal d'électrons au lieu de l'oxygène. Plus récemment, six nouvelles espèces bactériennes du groupe des CAO, identifiées comme *Ancylobacter* sp. OL1, *Thiobacillus* sp. S1, *Hydrogenophaga* sp. CL3, *Bosea* sp. WAO, *Azoarcus* sp. DAO1 et *Sinorhizobium* sp. DAO10 ont été isolées à partir de différents environnements (Rhine *et al.*, 2006 ; Rhine *et al.*, 2007). Les deux dernières souches sont des bactéries dénitrifiantes isolées à partir d'un sol contaminé par l'arsenic. Elles sont capables, comme l'isolat *A. ehrlichei* MLHE-1, de coupler l'oxydation d'As(III) à la fixation du CO_2 et à la réduction de NO_3^-. Cependant, contrairement à MLHE-1, elles peuvent réduire complètement NO_3^- en N_2 du fait de la présence d'une oxyde nitreux réductase.

Plus récemment des bactéries photosynthétiques anaérobies capables d'oxyder As(III) ont été découvertes, suggérant que l'arsénite pourrait être une source d'électrons pour la photosynthèse (Stolz *et al.*, 2006).

A ce jour, parmi toutes les bactéries du groupe des CAO, seule l'arsénite oxydase de *Rhizobium* sp. NT-26 a été purifiée et caractérisée (Santini et vanden Hoven, 2004). Elle appartient à la famille des diméthyl sulfoxide (DMSO) réductase des molybdoenzymes. Cette enzyme, dont l'expression est induite par l'arsénite, est localisée au niveau du périplasme. Elle est constituée de 2 sous-unités désignées AroA (98 kDa) et AroB (14 kDa).

Les gènes codant cette arsénite oxydase ont été clonés et séquencés (Santini et vanden Hoven, 2004). Le produit du gène *aroA* présente 49,2 % d'identité avec AsoA d'*A. faecalis* NCIB 8667 et le produit du gène *aroB* présente 44,8 % d'identité avec AsoB d'*A. faecalis* NCIB 8667 (voir section 2.1.1 : Oxydation hétérotrophe d'As(III) en As(V)). En aval de *aroBA*, 2 autres gènes ont été identifiés (Santini *et al.*, 2007). Ils sont désignés *cytC* (codant un cytochrome *c*) et *moeA1* (codant une protéine impliquée dans la synthèse de la molybdoptérine). Bien que les 4 gènes *aroBA-cytC-moeA1* semblent faire partie d'un même

opéron, ils sont transcrits ensemble uniquement en présence d'arsénite. En absence de ce dernier, seuls les gènes *cytC* et *moeA1* sont transcrits (Santini *et al.*, 2007). Par ailleurs, le produit du gène *cytC* contribue à l'oxydation d'As(III) mais n'est pas essentiel à la réaction.

Plus récemment l'opéron *aoxAB-cytC* de *Thiomonas* sp. a été identifié (Duquesne *et al.*, 2008). La comparaison de chaque sous-unité de l'arsénite oxydase de *Thiomonas* sp. avec la sous-unité correspondante des arsénite oxydases de *H. arsenicoxydans* ULPAs1 (HAO), *A. tumefaciens* 5A (HAO) et *Rhizobium* sp. NT-26 (CAO) a montré que les similarités entre les sous-unités sont en cohérence avec l'affiliation phylogénétique plutôt qu'avec la source de carbone utilisée par la bactérie (autotrophe/hétérotrophe) (Duquesne *et al.*, 2008).

Les gènes codant la grande sous-unité des arsénite oxydases des isolats *Ancylobacter* sp. OL1, *Thiobacillus* sp. S1, *Hydrogenophaga* sp. CL3, *Bosea* sp. WAO et *Sinorhizobium* sp. ont été également amplifiés par PCR et séquencés. Il s'avère que l'isolat *Ancylobacter* sp. OL1 contient 2 copies de gènes qui présentent 87 % d'identité nucléotidique et 96 % d'identité en acides aminés (Rhine *et al.*, 2007).

Le génome de l'isolat *A. ehrlichei* MLHE-1 a été complètement séquencé et aucun gène homologue aux gènes codant pour l'arsénite oxydase n'a été détecté. De même Rhine et *al.*, n'ont pas réussi à amplifier le gène codant pour l'arsénite oxydase de la bactérie dénitrifiante *Azoarcus* sp. DAO1. Ces résultats suggèrent que les gènes codant les arsénite oxydases des 2 isolats diffèrent de ceux actuellement identifiés (Rhine *et al.*, 2007).

2.2 Réduction dissimilatrice

En milieu anoxique, certaines bactéries sont capables de générer de l'énergie par réduction dissimilatrice de l'arséniate. Ces bactéries, désignées DARP (dissimilatory arsenate reducing prokaryotes) utilisent As(V) comme accepteur final d'électrons dans le processus de respiration anaérobie et le réduisent en As(III) (Oremland et Stolz, 2003).

Les deux premières souches bactériennes capables de produire de l'énergie par respiration de l'arséniate ont été isolées en 1994 (Ahmann *et al.*, 1994 ; Oremland *et al.*, 1994). La première souche, *Sulfurospirillum arseniphilum* MIT-13, a été isolée à partir de sédiments de rivière contaminée par l'arsenic et la seconde, *S. barnesii* SES-3, à partir d'un marais d'eau douce contaminé par le séléniate (Stolz et *al*., 1999).

Actuellement la réduction dissimilatrice de l'arséniate est connue pour plus de 24 souches bactériennes (Stolz *et al.*, 2006). Elles incluent des membres de *Deferribacteres*

(*Deferribacter desulfuricans*) (Takai *et al.*, 2003), *Chrysiogenetes* (cette classe n'est représentée que par une seule espèce, *Chrysiogenes arsenatis,* isolée à partir des eaux usées sur le site d'une mine d'or) (Macy *et al.*, 1996), *Aquificae* (isolat HGM-K1) (Takai *et al.*, 2002), des firmicutes [*Desulfotomaculum auripigmentum* (Newman *et al.*, 1997)*, Bacillus arsenicoselenatis* E1H, *B. selenitireducens* MLS10 (Newman *et al.*, 1997 ; Switzer Blum *et al.*, 1998) et l'isolat SLAS-1 appartenant à l'ordre des *Halanaerobacteriales* (Oremland *et al.*, 2005)] et des γ- δ- ε-protéobactéries [*Shewanella* sp. ANA-3 (Saltikov *et al.*, 2003a), *S. barnesii* SES-3 (Stolz *et al.*, 1999) et une δ-protéobactérie non encore identifiée et désignée isolat MLMS-1 (Hoeft *et al.*, 2004)]. Parmi les archaebactéries, 2 espèces du genre *Pyrobaculum* (*P. arsenaticum* et *P. aerophilum*) sont capables de respirer l'arséniate (Huber *et al.*, 2000).

Les bactéries respirant l'arséniate peuvent utiliser des donneurs d'électrons très variés, aussi bien organiques comme l'acétate, le lactate, des composés aromatiques (acide syringique, acide férulique, phénol, benzoate et toluène) qu'inorganiques (hydrogène et sulfures) (Stolz *et al.*, 2006). D'autre part, à l'exception de l'isolat MLMS-1 (Hoeft *et al.*, 2004), la respiration de l'arséniate n'est pas "obligatoire", les bactéries respirant l'arséniate peuvent utiliser d'autres accepteurs terminaux d'électrons comme l'oxygène, les nitrates, les nitrites, le Fe(III), le fumarate, les sulfates, le thiosulfate, le soufre, le diméthylsulfoxyde et l'oxyde de triméthylamine (Stolz *et al.*, 2006).

Aujourd'hui, seules les arséniate réductases respiratoires (Arr) de *C. arsenatis, B. selenitireducens* MLS10 et *Shewanella* sp. ANA3 ont été purifiées et caractérisées (Afkar *et al.*, 2003 ; Krafft et Macy, 1998 ; Malasarn *et al.*, 2008). Elles diffèrent des arséniate réductases ArsC utilisées par de nombreuses bactéries dans un objectif de détoxification (voir section 2.4.5: Arséniate réductase : ArsC).

Ces 3 arséniate réductases respiratoires appartiennent à la famille des diméthyl sulfoxyde réductases (DMSO) des molybdoenzymes. Elles sont constituées d'une grande sous-unité ArrA contenant un cofacteur à molybdène et un centre [4Fe-4S] et une petite sous-unité ArrB qui peut contenir jusqu'à 4 centres [4Fe-4S] (Silver et Phung, 2005b) (figure 8). Les Arr de *C. arsenatis* et *Shewanella* sp. ANA3 sont spécifiques de l'arséniate alors que celle de *B. selenitireducens* MLS10 est capable de réduire l'arsénite, le sélénate et le sélénite en plus de l'arséniate (Malasarn *et al.*, 2008).

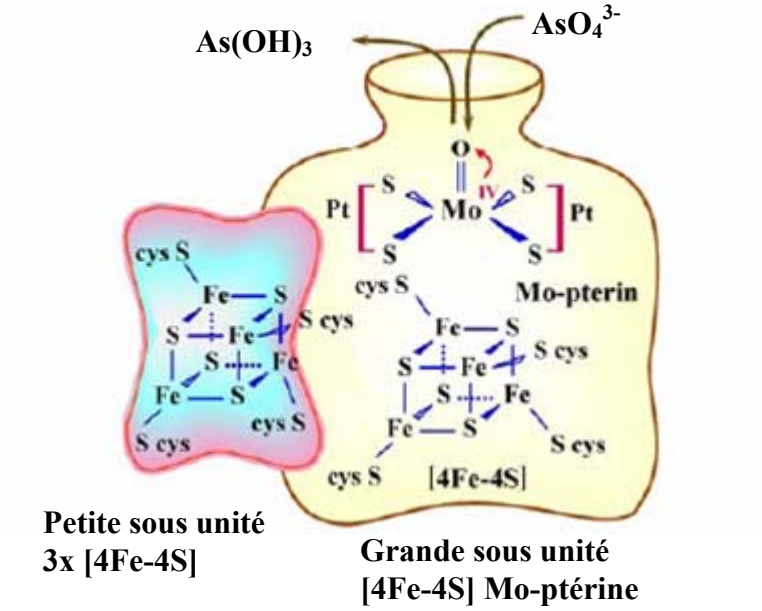


Figure 8. Réduction d'As(V) par l'arséniate réductase respiratoire (Modifiiée à partir de Silver et Phung, 2005b).

Le mécanisme de réduction d'As(V) par l'arséniate réductase n'est pas encore clairement établi. Cependant, il a été suggéré que la petite sous unité ArrB dirige les électrons venant d'un composant de la chaîne respiratoire jusqu'à la protéine ArrA qui réduit As(V) en As(III) (figure 8) (Silver et Phung, 2005b).

Sur le plan génétique, l'arséniate réductase de *Shewanella* sp. ANA-3 est codée par deux gènes organisés en opéron : *arrA* (grande sous-unité) et *arrB* (petite sous-unité) (Saltikov et Newman, 2003). Ces 2 gènes sont suffisants pour assurer la respiration de l'arséniate chez *Shewanella* sp. ANA3. Le produit du gène *arrA* contient au niveau de la partie N-terminale, 42 acides aminés qui correspondent à un peptide signal de type Tat (figure 8). En amont de l'opéron *arrAB* se trouve un opéron *ars* (*arsDABC*) de résistance à l'arsenic (figure 9). Ce dernier est transcrit dans le sens opposé de celui de l'opéron *arrAB*. Il permet à la bactérie de mieux s'adapter à un environnement contaminé par l'arsenic, cependant il n'intervient pas dans le processus de respiration de l'arséniate (Saltikov *et al.*, 2003).

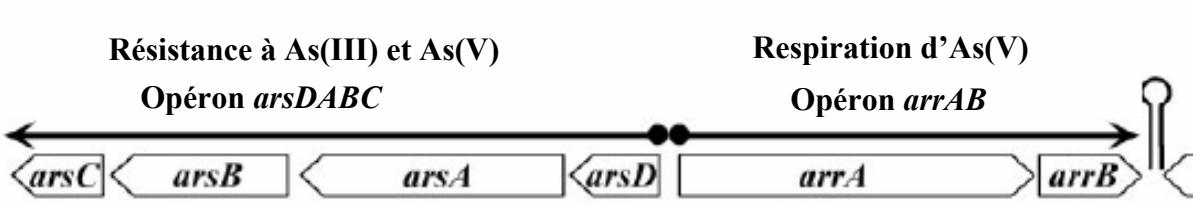


Figure 9. Structure des opérons *arrAB* et *arsDABC* de *Shewanella* sp. ANA-3 (source : Silver et Phung, 2005a).

Les gènes *arrA* de plusieurs espèces bactériennes (*B. arsenicoselenatis, C. arsenatis*, *S. barnesii* SES-3 et *Desulfosporosinus* sp. Y5) ont été également identifiés par PCR, au moyen d'amorces dégénérées (Malasarn *et al.*, 2004 ; Perez-Jimenez *et al.*, 2005).

D'autre part, des opérons *arr* de bactéries respirant l'arséniate ont été identifiés par homologie de séquence avec les gènes *arr* connus au niveau des génomes des bactéries suivantes : *Desulfitobacterium hafniense* (*arrSKRCAB*)*, Wolinella succinogenes* (*arrCAB*)*, Alkaliphilus metalliredigenes* (*arrCAB*)*, Clostridium* sp. OhILAs (*arrCAB*) et l'isolat désigné MLMS-1 (*arrSKRCAB*) (Stolz *et al.*, 2006). Tous ces opérons putatifs contiennent immédiatement en amont du gène *arrA*, un gène *arrC* qui code une protéine membranaire, probablement une troisième sous unité (ArrC) de l'arséniate réductase respiratoire. Par ailleurs en amont du gène *arrC*, les opérons *arr* de *D. hafniense* et de l'isolat MLMS-1, contiennent des gènes qui seraient impliqués dans un système de régulation à deux composants (Stolz *et al.*, 2006).

Plus récemment, 3 autres opérons *arr* ont été identifiés au niveau des génomes de *Geobacter lovleyi* SZ, *Shewanella* sp. W3-18-1 et *Alkalilimicola ehrlichei* MLHE-1. Les deux premiers ne contiennent pas de gène *arsC* (Duval *et al.,* 2008)

2.3 Méthylation de l'arsenic

Plusieurs organismes (bactéries, champignons, algues, plantes et animaux) sont capables de convertir des espèces arséniées en formes méthylées volatiles ou non volatiles. Initialement la méthylation a été considérée comme un processus de détoxification permettant de transformer l'arsenic inorganique en composés organiques moins toxiques. Cependant, des études de plus en plus nombreuses suggèrent que certains produits méthylés sont plus toxiques que les

formes inorganiques de l'arsenic (Bentley et Chasteen, 2002 ; Stolz *et al.*, 2006) (voir section 1.4 : Toxicité de l'arsenic).

La méthylation de l'arsenic par les champignons a été observée au 19ème siècle quand plusieurs cas d'empoisonnement survenus en Allemagne et en Angleterre ont été associés à la présence de papier peint teint par des colorants à base d'arsenic. En 1891, le scientifique italien B. Gosio a montré que des moisissures qui se développent en présence d'arsenic sont capables de former un gaz très toxique qui présente une forte odeur d'ail (gaz Gosio). En 1933, Challenger et ses collaborateurs ont identifié ce gaz comme du triméthylarsine. Plusieurs champignons sont capables de méthyler l'arsenic incluant : *Scopulariopsis brevicaulis*, *Penicillium* sp. et *Gliocladium roseum* (Bentley et Chasteen, 2002).

La méthylation de l'arsenic par les bactéries est beaucoup moins étudiée que chez les champignons et les autres eucaryotes. On sait cependant que certaines bactéries sont capables de méthyler l'arsenic en aérobiose. C'est le cas par exemple de *Proteus* sp., *Escherichia coli*, *Flavobacterium* sp., *Corynebacterium* sp. et *Pseudomonas* qui après une période de six mois d'acclimatation en présence d'arséniate de sodium sont capables de produire du diméthylarsine volatil. La souche *Pseudomonas* sp. produit du mono- et tri-méthylarsine en plus du diméthylarsine. D'autres bactéries comme *Nocardia* sp. sont capables de transformer l'acide monométhylarsonique [MMA(V)] en mono-, di- et tri-méthylarsine (Shariatpanahi et *al.*, 1981 ; Shariatpanahi et *al.*, 1983 : cité dans Bentley et Chasteen, 2002).

La biométhylation de l'arsenic peut aussi être catalysée par des bactéries anaérobies comme *Methanobacterium bryantii* (précédemment désignée comme *Methanobacterium* sp. M.0.H) qui produit du diméthylarsine à partir de différents composés d'arsenic [arséniate, arsénite et acide monométhylarsonique MMA(V)] (McBride et Wolfe, 1971). *Methanobacterium formicicum*, *Clostridium collagenovorans*, *Desulfovibrio vulgaris et Desulfovibrio gigas* sont également capables de méthyler l'arsenic en anaérobiose (Michalke *et al.*, 2000). *M. formicicum* est capable de produire du mono-, di- et tri-méthylarsine alors que *C. collagenovorans, D. vulgaris* et *D. gigas* produisent uniquement du triméthylarsine.

Le produit final de la réaction de méthylation semble donc être variable d'un microorganisme à l'autre ainsi que le substrat arsénié utilisé par ces bactéries.

Un mécanisme de méthylation de l'arsenic a été proposé par Challenger en 1945 suite à ses travaux chez le champignon *Scopulariopsis brevicaulis*. Ce même mécanisme serait utilisé par les eucaryotes et les procaryotes (figure 10) (Bentley et Chasteen, 2002 ; Stolz *et al.*, 2006).

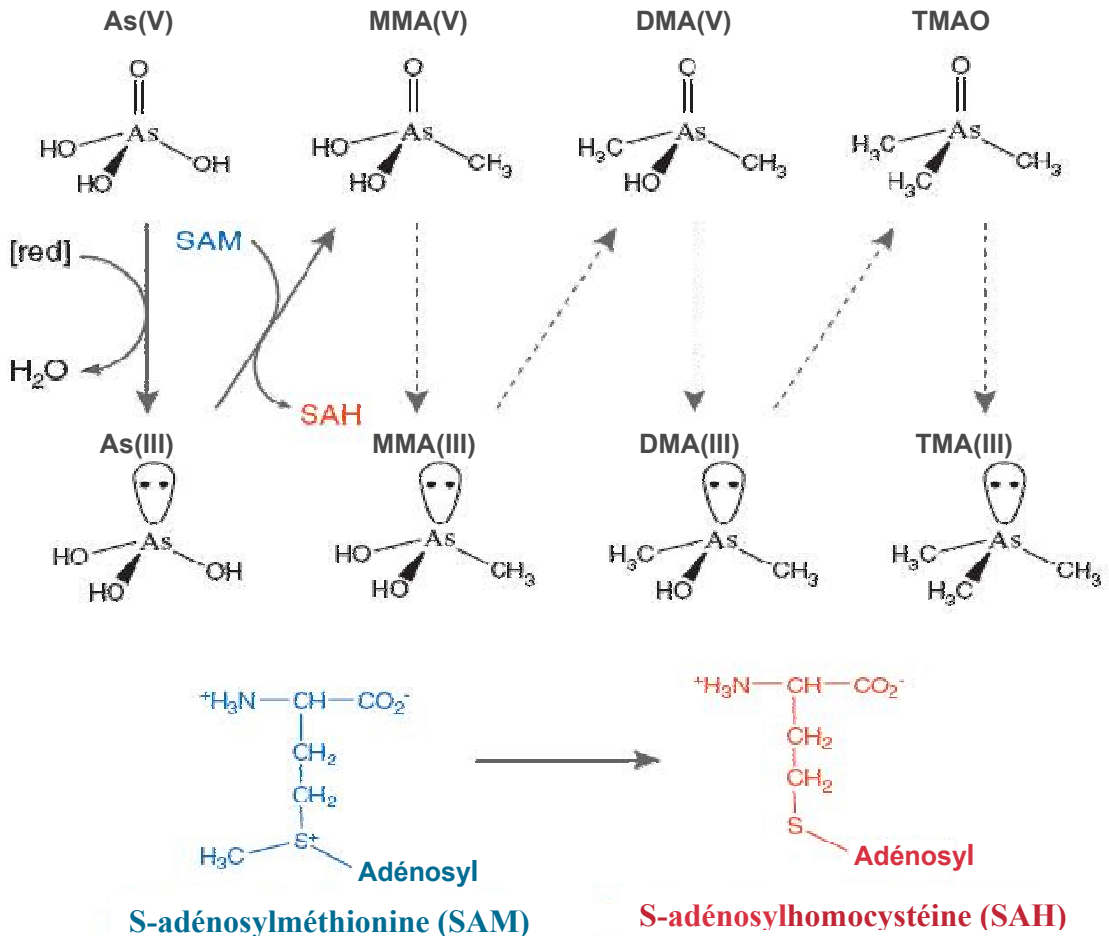


Figure 10. Mécanisme de méthylation d'As(V) en triméthylarsine proposé par Challenger en 1945 (source : Stolz et *al.*, 2006).
Les flèches verticales indiquent les étapes de réduction et les flèches en diagonales indiquent les étapes de méthylation. As(III), arsénite ; As(V), arséniate ; MMA(V), acide monométhylarsonique ; MMA(III), acide monométhylarsénieux ; DMA(V), acide diméthylarsinique ; DMA(III), acide diméthylarsénieux ; TMAO, oxyde de triméthylarsine et TMA(III), triméthylarsine.

Le processus de méthylation de Challenger implique une série de réactions de réduction et de méthylation oxydative. Chaque étape de méthylation serait obligatoirement couplée à l'oxydation d'As(III) en As(V). Le méthyl-As(V) ainsi formé est ensuite réduit en méthyl-As(III). Au cours de ce processus plusieurs composés méthylés sont formés (figure 10). Pour la majorité des organismes, le donneur de groupement méthyl pour les réactions de méthylation serait la S-adénosylméthionine (SAM). Cependant pour la bactérie méthanogène *Methanobacterium bryantii* et probablement pour d'autres bactéries anaérobies, la méthylcobalamine pourrait être le donneur du groupement méthyl (Bentley et Chasteen, 2002).

L'enzyme responsable de l'activité As(III)-*S*-adénosylméthyltransférase a été identifiée chez les rats et les humains (Thomas *et al.*, 2004 ; Waters *et al.*, 2004). Elle a été désignée Cyt19 (ou As3MT). Un homologue du gène *cyt19* a été identifié, par homologie de séquence, au niveau de 125 génomes d'eubactéries et 16 génomes archaebactéries (Qin *et al.*, 2006). Ces gènes putatifs ont été désignés *arsM*. En amont de 12 gènes *arsM* appartenant à diverses bactéries, un gène *arsR* a été identifié. Le produit de ce dernier est homologue au répresseur transcriptionnel qui contrôle l'expression des opérons *ars* de résistance à l'arsenic.

Récemment, le gène *arsM* de *Rhodopseudomonas palustris* a été exprimé dans une souche *E. coli* AW3110 sensible à l'arsenic (délétée pour l'opéron *ars* chromosomique *arsRBC*) (Qin *et al.*, 2006). Les résultats ont montré que la souche recombinante exprimant *arsM* est capable de convertir l'arsénite se trouvant dans le milieu sous formes méthylées [acide diméthylarsinique, (DMA(V) ; oxyde de triméthylarsine, TMAO et tri-méthylarsine, TMA(III)]. De plus, cette bactérie devient plus résistante à l'arsenite.

La protéine ArsM a été purifiée et son rôle en tant qu'As(III)-*S*-adénosylméthyltransférase a été confirmé. Cependant, l'identité de l'agent réducteur et l'implication d'une éventuelle méthylarséniate réductase restent encore à définir (Qin *et al.*, 2006). Les résultats de cette étude indiquent cependant pour la première fois que le processus de méthylation de l'arsenic par les bactéries serait plutôt un mécanisme de détoxification.

Le mécanisme inverse de la biométhylation de l'arsenic peut également se produire. Par exemple, certaines bactéries du genre *Alcaligenes, Pseudomonas et Mycobacterium* sont capables de déméthyler des composés d'arsenic mono et di-méthylés (Stolz *et al.*, 2006). Très peu de données sont cependant disponibles concernant ce processus de déméthylation. Les gènes et les enzymes qui y sont impliqués sont encore totalement inconnus (Silver et Phung, 2005a).

2.4 Mécanisme de résistance par efflux d'arsenic (système *ars*)

Pour éviter les effets toxiques de l'arsenic, certains microorganismes ont développé un mécanisme de résistance qui consiste à expulser l'arsenic se trouvant dans leur cytoplasme. Ce système désigné *ars* permet en général à la bactérie de résister à la fois à As(III) et As(V) (figure 11). L'arsénite est expulsé dans le milieu extracellulaire par un transporteur d'arsénite désigné ArsB ou Acr3p selon la famille à laquelle il appartient. Dans certains cas, ArsB est associée à une ATPase ArsA, l'arsénite est alors expulsé par un complexe ArsB-ArsA.

L'arséniate n'est pas reconnu par le transporteur d'arsénite. Une arséniate réductase cytoplasmique catalyse au préalable la réduction d'As(V) en As(III) permettant ainsi à la cellule bactérienne de diminuer la concentration d'As(V) intracellulaire en utilisant le transporteur d'arsénite. Certains transporteurs d'arsénite sont également capables d'expulser l'antimoine (Mukhopadhyay *et al.*, 2002).

La transformation d'As(V) en As(III) (forme la plus toxique) a été une découverte intrigante pour les scientifiques. Une hypothèse a été émise afin d'expliquer l'absence d'un système d'efflux spécifique pour l'arséniate. Elle postule que lorsque l'atmosphère était pauvre en oxygène, As(III) représentait la forme majoritaire de l'arsenic. Les premières bactéries avaient développé un système de résistance à l'arsénite permettant d'expulser As(III) du cytoplasme bactérien. La forme As(V) de l'arsenic est apparue plus tard après l'introduction de l'oxygène dans l'atmosphère par les cyanobactéries. Le système de résistance à l'arsenic déjà présent chez les bactéries a alors évolué afin de permettre à ces dernières de résister à l'arséniate. Les arséniate réductases auraient évolué à partir de phosphatases déjà présentes dans les cellules bactériennes (Rosen, 2002a).

Les caractéristiques du système *ars* de résistance à l'arsenic comme les voies d'entrées d'As(V) et As(III) dans la cellule, les différents arrangements des opérons *ars* et leur régulation, ainsi que les propriétés des différents composants du système (transporteur d'arsénite et arséniate réductase) sont abordées dans les paragraphes suivants.

2.4.1 Transport d'As(V) et As(III) dans la cellule

L'arséniate est transporté dans la cellule à travers les systèmes de transport de phosphate aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes (figure 11). Deux systèmes de transporteurs de phosphate ont été identifiés chez *E. coli* : le système Pit et le système Pst. Les deux permettent le transport d'As(V) cependant le système Pst est plus spécifique pour le phosphate *"phosphate specific transport"*. Les mutants d'*E. coli* dont le système Pit a été inactivé (et donc utilisant le système spécifique Pst) sont beaucoup plus résistants à As(V). De même, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae,* les transporteurs de phosphate seraient la voie d'entrée d'As(V) dans la cellule. En effet les souches mutantes pour les gènes PHO84, -86, -87 et -88 (codant des composants impliqués dans le transport du phosphate) sont plus résistantes à As(V) que la souche sauvage (Bun-ya *et al.*, 1996 ; Yompakdee *et al.*, 1996a ; Yompakdee *et al.*, 1996b). Pour les mammifères, la voie d'entrée d'As(V) dans la cellule n'est pas encore identifiée (Rosen, 2002a).

L'arsénite est transporté dans la cellule à travers des aquaglycéroporines comme GlpF pour *E. coli* (Sanders *et al.*, 1997), Fps1p pour la levure *S. cerevisiae* (Wysocki *et al.*, 2001) et les aquaglycéroporines AQP7 et AQP9 pour les mammifères (Liu *et al.*, 2002) (figure 11).

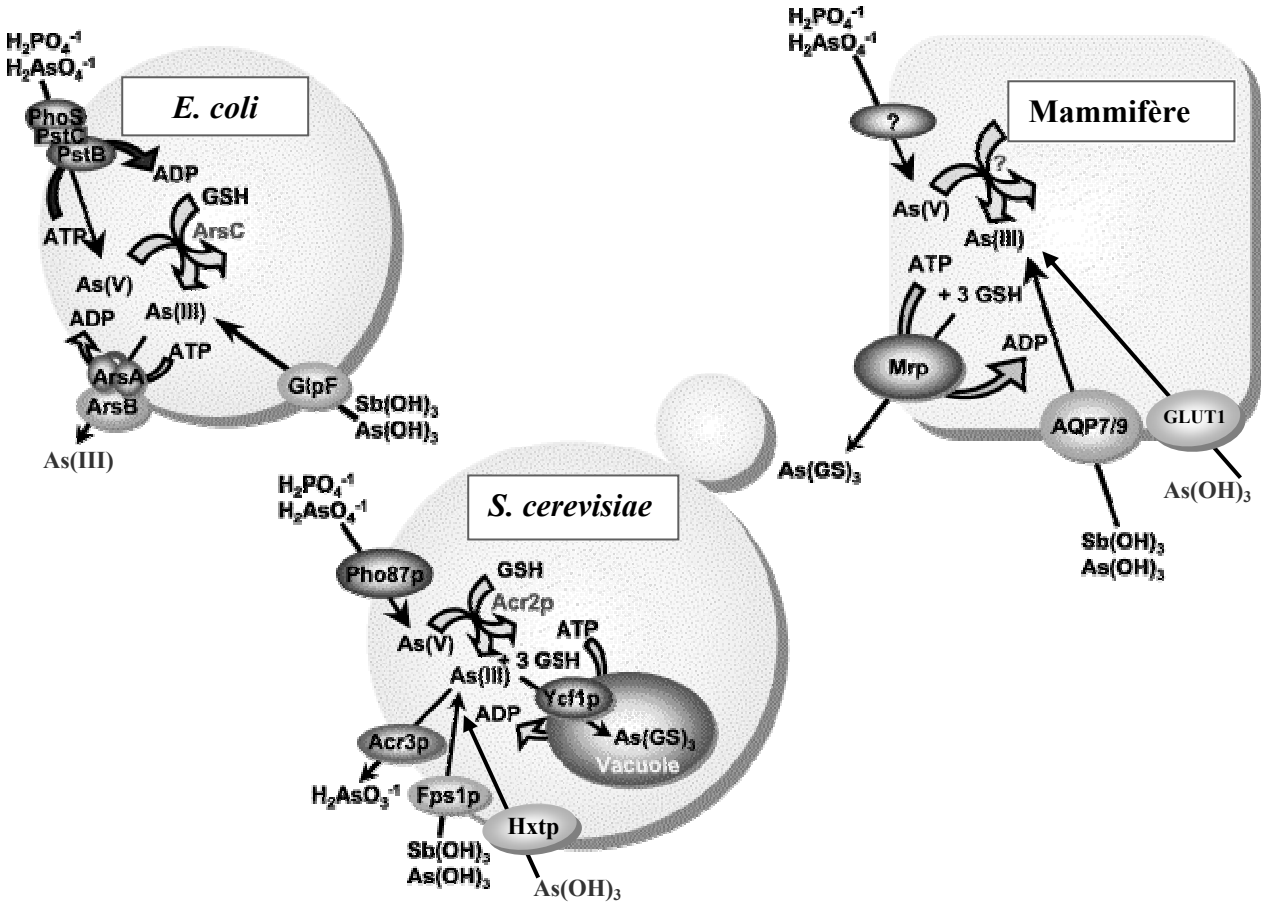


Figure 11. Système de résistance à As(III) et As(V) chez *E. coli*, *S. cerevisiae* et une cellule de mammifère (Modifiée à partir de Rosen, 2002a).
Les voies d'entrées d'As(III) et As(V) au niveau de ces cellules ainsi que les transporteurs d'As(III) à l'extérieur du cytoplasme sont représentées.

L'aquaglycéroporine GlpF a été initialement identifiée comme un transporteur d'antimoine (Sanders *et al.*, 1997). Les aquaglycéroporines sont des canaux assurant le passage des molécules d'eau et des solutés organiques neutres (comme le glycérol et l'urée) à travers la membrane plasmique (Verkman et Mitra, 2000). Il a été alors supposé que GlpF reconnaît la forme $Sb(OH)_3$ de l'antimoine (forme prédominante à pH neutre) et transporte ainsi l'antimoine comme un équivalent inorganique d'un polyol. Étant données les propriétés chimiques voisines de Sb(III) et As(III), il a été suggéré que GlpF est également impliquée dans le transport de l'arsénite (sous forme $As(OH)_3$). Cependant, comme la souche *E. coli*

mutée pour le gène *glpF* n'est pas particulièrement résistante à l'arsénite, il est probable qu'un second système intervienne dans le transport d'As(III) chez *E. coli* (Rosen, 2002b ; Sanders et al., 1997).

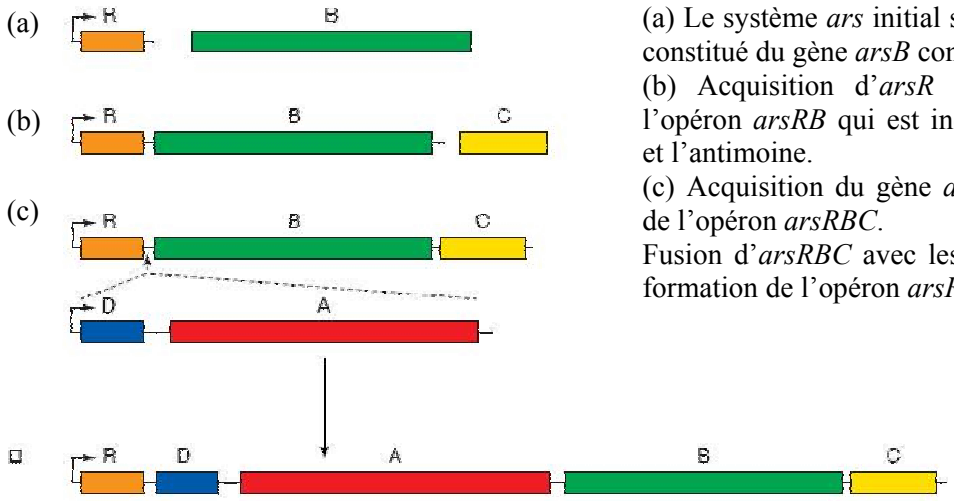
En 2004, le taux d'accumulation de Sb(III) et As(III) dans une souche d'*E. coli* délétée pour l'opéron *ars* (et donc incapable d'expulser As(III) ou Sb(III) à l'extérieur de la cellule) a été mesuré. L'inactivation du gène *glpF* chez cette souche diminue considérablement le taux d'As(III) et Sb(III) accumulé dans la cellule. L'implication de GlpF dans le transport de Sb(III) et As(III) chez *E. coli* a été ainsi clairement démontrée (Meng *et al.*, 2004).

Des résultats similaires ont été obtenus chez *S. cerevisiae*. La délétion du gène *FPS1* (codant une aquaglycéroporine homologue à GlpF) confère la résistance à Sb(III) et As(III). Cependant la souche mutée reste relativement sensible à As(III) suggérant que, comme pour *E. coli*, un autre système impliqué dans le transport d'As(III) serait probablement présent chez *S. cerevisiae* (Wysocki *et al.*, 2001). Plus récemment, Liu et *al.,* (2004) ont montré que chez *S. cerevisiae,* les transporteurs d'hexoses représentent la principale voie d'entrée d'As(III) dans la cellule (Liu *et al.*, 2004).

En 2002, Liu et *al* ont examiné l'implication des aquaglycéroporines AQP9 et AQP7 des mammifères dans l'entrée de l'arsénite dans les cellules. Les résultats ont montré que l'aquaglycéroporine AQP9 s'exprime dans *S. cerevisiae* et remplace Fps1p dans les souches mutées pour le gène *FPS1* (Liu et al., 2002). AQP7 n'est pas exprimée chez *S. cerevisiae.* Cependant lorsque l'ARNc de AQP7 ou de AQP9 est microinjecté dans les oocytes de *Xenopus laevis*, une augmentation de l'entrée de l'arsénite est observée. Ces résultats indiquent qu'As(III) pénètre également dans les cellules des mammifères à travers des aquaglycéroporines (Liu *et al.*, 2002). Récemment, les mêmes auteurs ont montré que le transporteur de glucose GLUT1 permet également le transport de l'arsénite dans les cellules des mammifères (Liu *et al.*, 2006).

2.4.2 Différents arrangements des opérons *ars* chez les bactéries

Une fois l'arsénite et/ou l'arséniate dans le cytoplasme, la bactérie qui possède le système *ars* met en œuvre tous les composants nécessaires pour expulser ces deux formes toxiques à l'extérieur de la cellule. Les gènes impliqués dans ce système de résistance ont été identifiés et largement étudiés. Les premiers gènes identifiés sont ceux portés par le plasmide R773 d'*E. coli*. Ce plasmide confère la résistance à l'arsenic grâce à un opéron composé de 5 gènes *arsR, arsD, arsA, arsB* et *arsC* (Chen *et al.*, 1986 ; San Francisco *et al.*, 1990 ; Wu et Rosen, 1993a ; Wu et Rosen, 1993b). En 1992, Ji et Silver ont identifié au niveau du plasmide pI258 de *S. aureus* un autre opéron *ars* composé uniquement de 3 gènes *arsR*, *arsB* et *arsC*. Ces deux opérons *arsRDABC* et *arsRBC* sont aujourd'hui les mieux étudiés. Le gène *arsB* code le transporteur d'arsénite (ArsB), *arsC* code l'arséniate réductase (ArsC) et *arsR* code un répresseur transcriptionnel (ArsR) impliqué dans la régulation de l'opéron. L'opéron *ars* d'*E. coli* contient en plus 2 autres gènes *arsD* et *arsA*. *arsA* code une ATPase (ArsA) qui se fixe à ArsB et *arsD* code un second répresseur transcriptionnel (ArsD) qui fonctionnerait également comme une protéine métallo-chaperonne transfèrant As(III) à ArsA (Lin *et al*., 2007). Selon Barry Rosen, l'opéron *arsRDABC* serait le résultat de l'évolution de l'opéron *arsRBC* qui aurait acquis les deux gènes *arsDA*. L'opéron *arsRBC* aurait lui même évolué à partir d'un opéron *arsRB* primitif (Rosen, 1999a) (figure 12).



(a) Le système *ars* initial serait uniquement constitué du gène *arsB* constitutif.
(b) Acquisition d'*arsR* et formation de l'opéron *arsRB* qui est induit par l'arsenic et l'antimoine.
(c) Acquisition du gène *arsC* et formation de l'opéron *arsRBC*.
Fusion d'*arsRBC* avec les gènes *arsDA* et formation de l'opéron *arsRDABC*.

Figure 12. Evolution des opérons *ars* (source : Rosen, 1999).

Depuis l'identification des opérons *ars* de R773 d'*E. coli* et de pI258 de *S. aureus*, plusieurs travaux ont mis en évidence la présence du système *ars* dans des procaryotes appartenant à des groupes phylogénétiques très variés. De même, les données de séquençage des génomes ont permis d'identifier des opérons *ars* putatifs dans de nombreuses bactéries et archaebactéries. A la lumière de ces données, il est aujourd'hui évident que le système *ars* est largement distribué chez les bactéries (Mukhopadhyay *et al.*, 2002 ; Silver et Phung, 2005b). Le tableau 2 présente une liste des opérons *ars* caractérisés sur le plan fonctionnel. La figure 13 illustre l'organisation de quelques opérons *ars* cités dans le tableau 2.

Les opérons *ars* caractérisés, sont chromosomiques, plasmidiques ou portés par un transposon. Certains présentent la même organisation que l'opéron *ars* de R773 ou de pI258. D'autres sont cependant différents par la composition et/ou l'arrangement de leurs gènes.

L'opéron *ars* de *Sinorhizobium meliloti* contient à la place du gène *arsB* un gène *aqpS* codant une aquaglycéroporine. Cet opéron, *arsRaqpSCH,* confère uniquement la résistance à As(V). Ce dernier est d'abord réduit en As(III) par l'arséniate réductase ArsC, puis As(III) passe du milieu le plus concentré (cytoplasme) au milieu le moins concentré (milieu extracellulaire) à travers l'aquaglycéroporine AqpS (Yang *et al.*, 2005).

L'opéron *arsADRC* du plasmide pNRC100 de *Halobacterium* sp. NRC-1 ne contient pas non plus de gène *arsB*. En aval de cet opéron, un deuxième opéron $arsR_2M$ a été identifié. Le gène *arsM* code une As(III)-*S*-adénosylméthyltransférase (Wang *et al.*, 2004). Récemment, l'implication des gènes *arsM* dans la résistance à l'arsénite, via un processus de méthylation d'As(III), a été démontrée (Qin *et al.*, 2006) (voir section 2.3 : Méthylation de l'arsenic).

D'autres opérons *ars* contiennent des gènes dont la fonction dans la résistance à l'arsenic est encore inconnue. Par exemple, l'ORF 2 de l'opéron *arsR*(ORF2)*BC* de *Bacillus subtilis* ou encore les gènes *arsO* et *arsT* de l'opéron *arsRBOCT* de *Streptomyces* sp. FR-008. *arsO* et *arsT* codent respectivement une monooxygénase et une thiorédoxine réductase (Sato et Kobayashi, 1998 ; Wang *et al.*, 2006). De même, l'opéron *arsRCDADA*(ORF7 ORF8)*B* d'*Acidithiobacillus caldus* contient 2 ORF dont les rôles dans la résistance à l'arsenic ne sont pas encore connus. Les ORF 7 et 8 codent respectivement une NADH oxydase et une protéine CBS (cystathionine beta-synthase) (Tuffin *et al.*, 2005). Un gène désigné CBS, homologue à l'ORF 7 d'*A. caldus,* est également retrouvé au niveau de l'opéron *arsRCDA(CBS)B* de *Leptospirillum ferriphilum* (Tuffin *et al.,* 2006). Par ailleurs, plusieurs opérons *ars* contiennent un gène *arsH*. Le produit de ce gène serait indispensable pour la résistance à l'arsenic chez *Yersinia enterocolitica*, *Serratia marcescens* et *S. meliloti* mais pas

chez *Acidithiobacillus ferrooxidans* et *Synechocystis* sp. 6803 (Butcher *et al.*, 2000 ; Neyt *et al.*, 1997 ; Ryan et Colleran, 2002 ; Yang *et al.*, 2005).

Tableau 2. Liste des opérons *ars* clonés et caractérisés

Bactéries/Archaebactéries	**Gram**	**Localisation de l'opéron**	**Structure**	**Famille ArsB/Acr3p**	**Rf.**
Escherichia coli	-	R773	*arsRDABC**	ArsB	1
Staphylococcus aureus	+	pI258	*arsRBC**	ArsB	2
Staphylococcus xylosus	+	pSX267	*arsRBC*	ArsB	3
Escherichia coli	-	chromosome	*arsRBC*	ArsB	4
Escherichia coli	-	pR46	*arsRDABC*	ArsB	5
Yersinia enterocolitica	-	pYV	*arsHRBC**	ArsB	6
Acidiphilium multivorum	-	pKW301	*arsRDABC*	ArsB	7
Bacillus subtilis	+	élément skin	*arsR*(ORF2)*BC**	Acr3p	8
Pseudomonas aeruginosa	-	chromosome	*arsRBC*	ArsB	9
Acidithiobacillus ferrooxidans	-	chromosome	*arsCRBH*	ArsB	10
Pseudomonas fluorescens	-	chromosome	*arsRBC*	ArsB	11
Serratia marcescens	-	pR478	*arsHRBC*	ArsB	12
Shewanella sp. ANA-3	-	chromosome	*arsDABC*	ArsB	13
Synechocystis sp. PCC 6803	-	chromosome	*arsBHC**	Acr3p	14
			arsR		
Halobacterium sp. NRC-1		pNRC100	*arsADRC - arsR*$_2$*M**	-	15
Corynebacterium glutamicum	+	chromosome	*arsR*$_1$*B*$_1$*C*$_1$*C*$_1$$^{'}$*	Acr3p	16
			arsR$_2$*B*$_2$*C*$_2$*	Acr3p	
Acidithiobacillus caldus	-	Transposon	*arsRCDADA*(ORF7ORF8)*B*	ArsB	17
Sinorhizobium meliloti	-	chromosome	*arsR-aqpS-CH**	-	18
Streptomyces sp. FR-008	+	pHZ227	*arsRBOCT**	Acr3p	19
Leptospirillum ferriphilum	-	transposon	*arsRCDA(CBS)B**	ArsB	20
		chromosome	*arsRCB**	ArsB	
Acidithiobacillus caldus	-	chromosome	*arsRC*(ORF1)*B*(ORF5)	ArsB	21

Rf. : référence. 1 : (Chen *et al.*, 1986), 2 : (Ji et Silver, 1992a), 3 : (Rosenstein *et al.*, 1992), 4 : (Carlin *et al.*, 1995), 5 : (Bruhn *et al.*, 1996), 6 : (Neyt *et al.*, 1997), 7 : (Suzuki *et al.*, 1998), 8 : (Sato et Kobayashi, 1998), 9 : (Cai *et al.*, 1998), 10 : (Butcher *et al.*, 2000), 11 : (Prithivirajsingh *et al.*, 2001), 12 : (Ryan et Colleran, 2002), 13 : (Saltikov *et al.*, 2003), 14 : (Lopez-Maury *et al.*, 2003), 15 : (Wang *et al.*, 2004), 16 : (Ordonez *et al.*, 2005), 17 (Tuffin *et al.*, 2005), 18 : (Yang *et al.*, 2005), 19 : (Wang *et al.*, 2006), 20 : (Tuffin *et al.*, 2006) et 21 : (Kotze *et al.*, 2006).* : l'organisation de l'opéron est représentée dans la figure 13.

Certains opérons contiennent plusieurs copies d'un même gène, par exemple l'opéron *arsR*$_1$*B*$_1$*C*$_1$*C*$_1$$^{'}$ de *Corynebacterium glutamicum* qui contient 2 gènes *arsC* et l'opéron *arsRCDADA5(ORF7 ORF8)B* d'*A. caldus* qui contient une duplication des gènes *arsA* et *arsD* (Ordonez *et al.*, 2005 ; Tuffin *et al.*, 2005). Par ailleurs, un même génome bactérien peut

contenir plusieurs opérons *ars*, c'est le cas par exemple pour *C. glutamicum* qui contient un opéron $arsR_2B_2C_2$ en plus de l'opéron $arsR_1B_1C_1C_1'$. Beaucoup d'autres exemples sont retrouvés parmi les opérons *ars* putatifs. L'ordre des gènes au niveau des opérons *ars* peut également varier (figure 13). Dans certains cas (par exemple l'opéron *arsCRBH* d'*A. ferrooxidans*), les gènes sont transcrits dans des directions opposées suggérant une régulation complexe.

Malgré toutes les variations observées, la majorité des opérons *ars* contiennent au moins les 3 gènes *arsR, arsB/ACR3* et *arsC*.

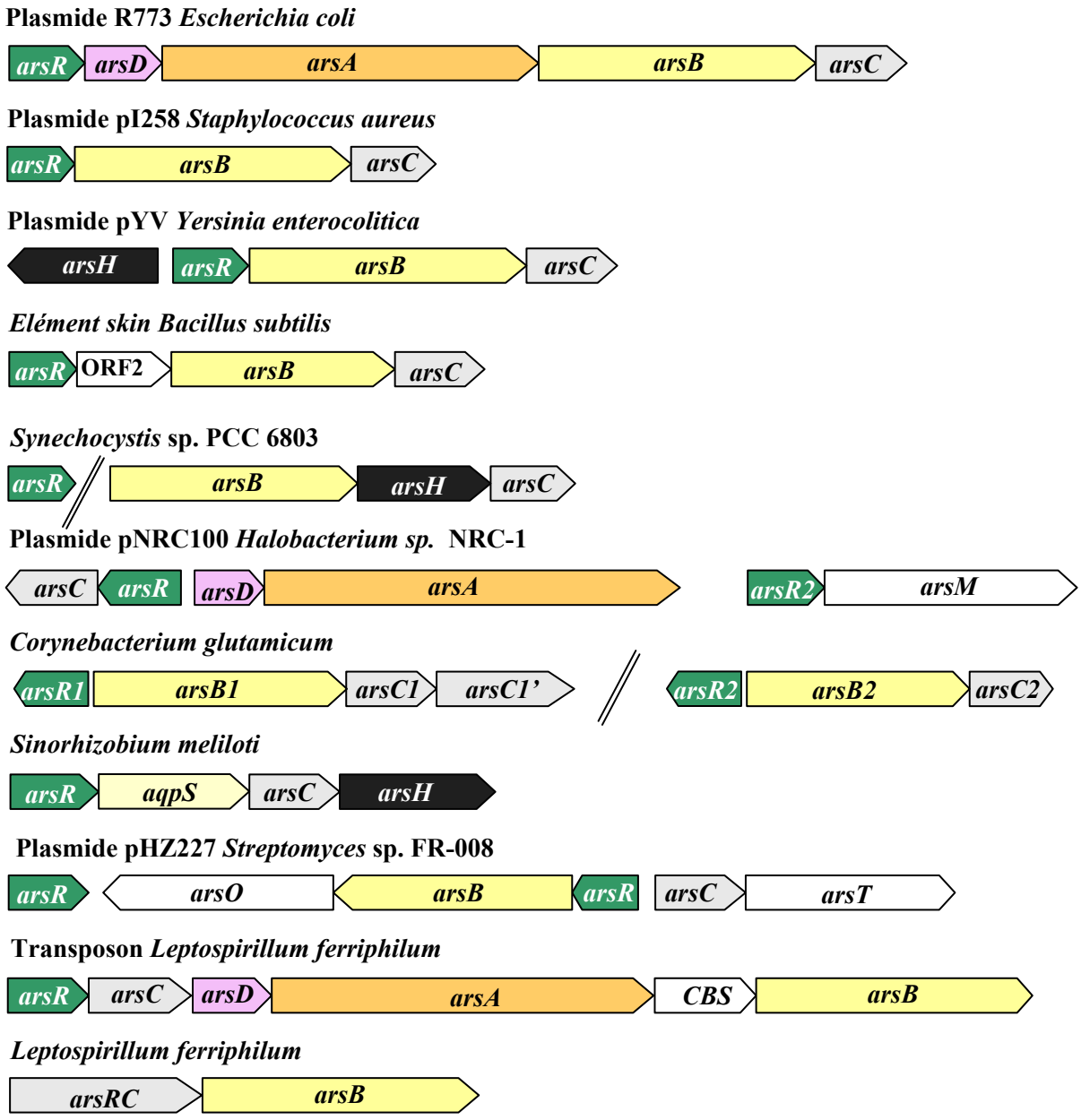


Figure 13. Organisation de quelques opérons *ars* cités dans le tableau 2.

2.4.3 Transporteurs d'arsénite : ArsB/Acr3p

Trois familles distinctes de transporteurs d'arsénite ont été identifiées (Mukhopadhyay *et al.*, 2002 ; Rosen, 1999a).

La première famille, désignée famille ArsB, inclut la majorité des transporteurs d'arsénite qui ont été identifiés par les premiers travaux concernant le système *ars* (par exemple ArsB de R773 d'*E. coli* et ArsB de pI258 de *S. aureus*). Les transporteurs ArsB confèrent la résistance à l'arsénite et à l'antimoine (Rosen, 1999a). Meng et *al*., 2004 ont montré qu'en absence d'ArsA, ArsB d'*E. coli* fonctionne comme un antiporteur [$As(OH)_3$/H+ ou $Sb(OH)_3$/H+] (Meng *et al.*, 2004).

La protéine ArsB d'*E. coli* est la seule qui a été caractérisée (figure 14). Elle contient 12 segments transmembranaires reliés par 6 boucles périplasmiques (P1 à P6) et 5 boucles cytoplasmiques (C1 à C5) de différentes longueurs. Les extrémités N- et C- terminales sont cytoplasmiques (Wu *et al.*, 1992).

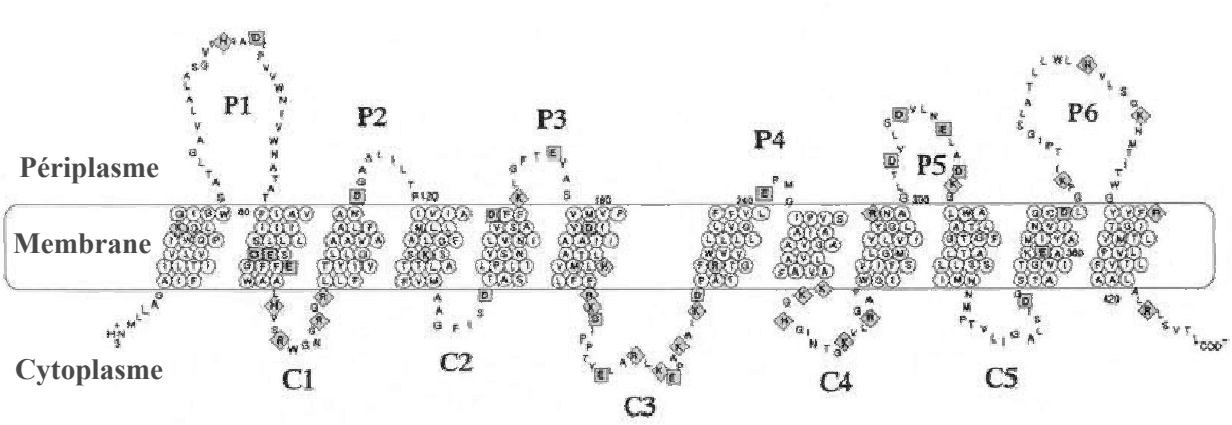


Figure 14. Modèle topologique de la protéine ArsB (source : Wu *et al*., 1992).

La deuxième famille est désignée Acr3p ou encore Arr3p (Mukhopadhyay *et al.*, 2002 ; Rosen, 2002a). Le premier membre de cette famille a été identifié en 1997 chez *S. cerevisiae*. Chez cette levure, trois gènes *ACR1*, *ACR2* et *ACR3* impliqués dans la résistance à l'arsenic ont été isolés (Bobrowicz *et al.*, 1997). Leurs produits (Acr1p, Acr2p et Acr3p) présentent respectivement la même fonction qu'ArsR, ArsC et ArsB des systèmes *ars* bactériens (figure 13). Le transporteur Acr3p de la levure présente cependant une faible identité de séquence avec les transporteurs ArsB, malgré leur fonction identique.

En 1998, l'opéron *arsR*(ORF2)*BC* de *Bacillus subtilis* a été étudié. Le transporteur d'arsénite codé par cet opéron présente une forte identité de séquence avec Acr3p de *S. cerevisiae* (Sato et Kobayashi, 1998).

Aujourd'hui la famille Acr3p comporte d'autres transporteurs d'arsénite bactériens comme ArsB de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Lopez-Maury *et al.*, 2003), ArsB1 et ArsB2 de *C. glutamicum* (Ordonez *et al.*, 2005) et ArsB du plasmide pHZ227 de *Streptomyces* sp. FR-008 (Wang *et al.*, 2006). Bien que ces transporteurs appartiennent à la famille Acr3p, ils ont été désignés ArsB en référence à leur fonction similaire à celle des transporteurs de cette famille. Dans le tableau 2, nous précisons pour chaque opéron *ars* la famille à laquelle le transporteur d'arsénite appartient. Pour plus de simplicité nous désignerons, dans la suite du texte, les transporteurs d'arsénite de la deuxième famille comme Acr3p.

Les transporteurs de la famille Acr3p semblent présenter des spécificités différentes. En effet, Acr3p de *B. subtilis* et *S. cerevisiae* ne confèrent pas la résistance à l'antimoine contrairement à Acr3p de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Lopez-Maury *et al.*, 2003). Pour les autres membres de cette famille la résistance à l'antimoine n'a pas été testée.

Bien que la famille Acr3p soit beaucoup moins étudiée que la famille ArsB, les données des séquençages des génomes bactériens montrent une large distribution de ces transporteurs chez les bactéries. En 2003, Wysocki *et al*., ont réalisé une analyse phylogénétique avec 45 séquences protéiques similaires aux transporteurs Acr3p. Les résultats de cette étude montrent que cette famille serait elle-même divisée en deux groupes (figure 15).

Acr3p de *B. subtilis* est le seul transporteur de la famille Acr3p à avoir été caractérisé. Cette caractérisation a été effectuée très récemment par Aaltonen et Silow (2008). Elle a montré que Acr3p de *B. subtilis* est formé de 10 segments transmembranaires reliés par 5 boucles extracellulaires et 4 boucles intracellulaires relativement courtes. Les boucles cytoplasmiques sont toutefois plus longues que les boucles extracellulaires. Les extrémités N- et C- terminales sont localisées au niveau du cytoplasme (figure 16).

L'identification de la structure d'Acr3p représente un premier pas pour une meilleure compréhension du fonctionnement de cette famille de transporteurs (Aaltonen et Silow, 2008).

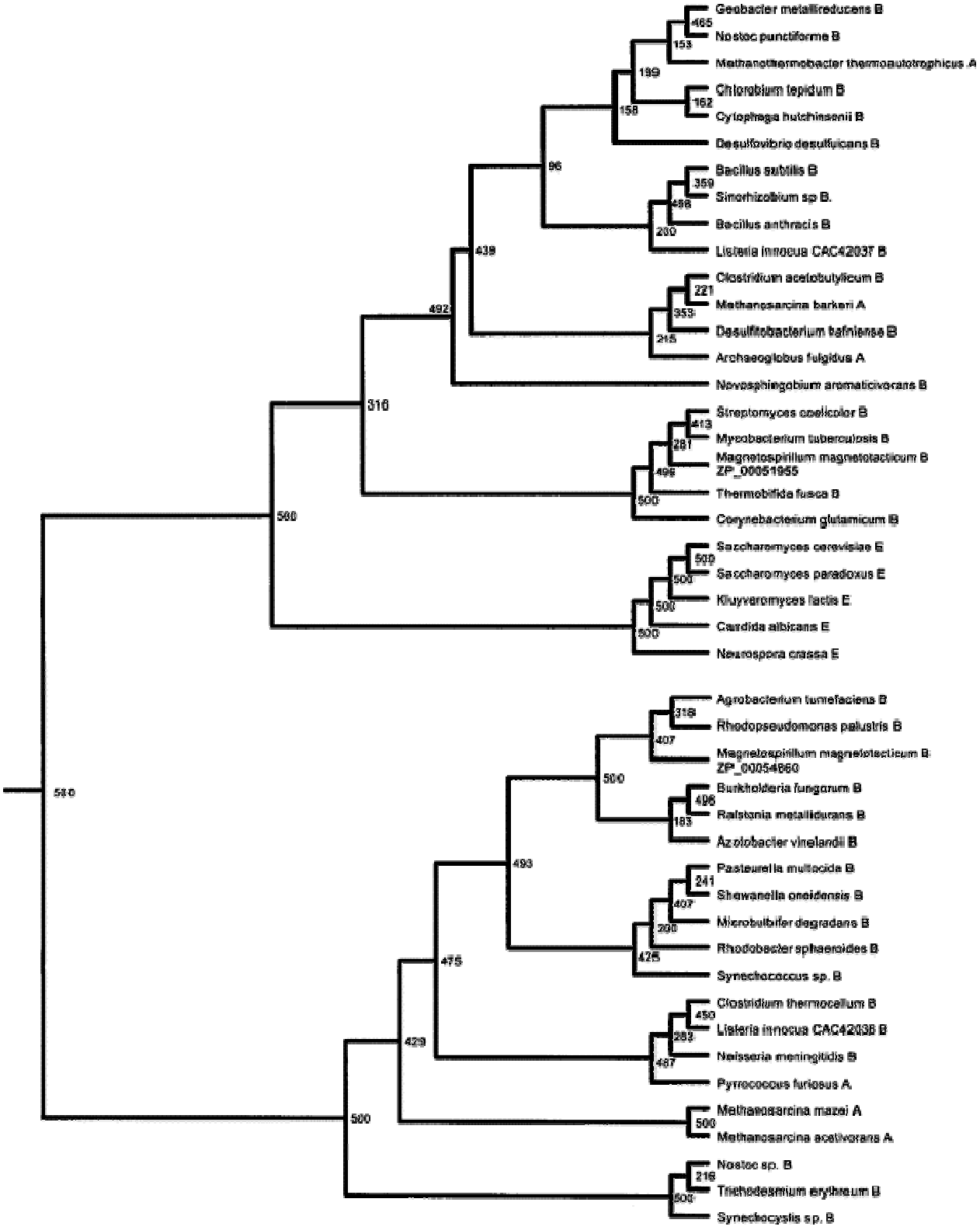


Figure 15. Arbre phylogénétique de 45 séquences protéiques homologues à Acr3p (source : Wysocki et *al.*, 2003).
Les lettres A, B et E désignent respectivement archaebactéries, bactéries et champignons. Les valeurs de *bootstrap* sont indiquées sur les noeuds.

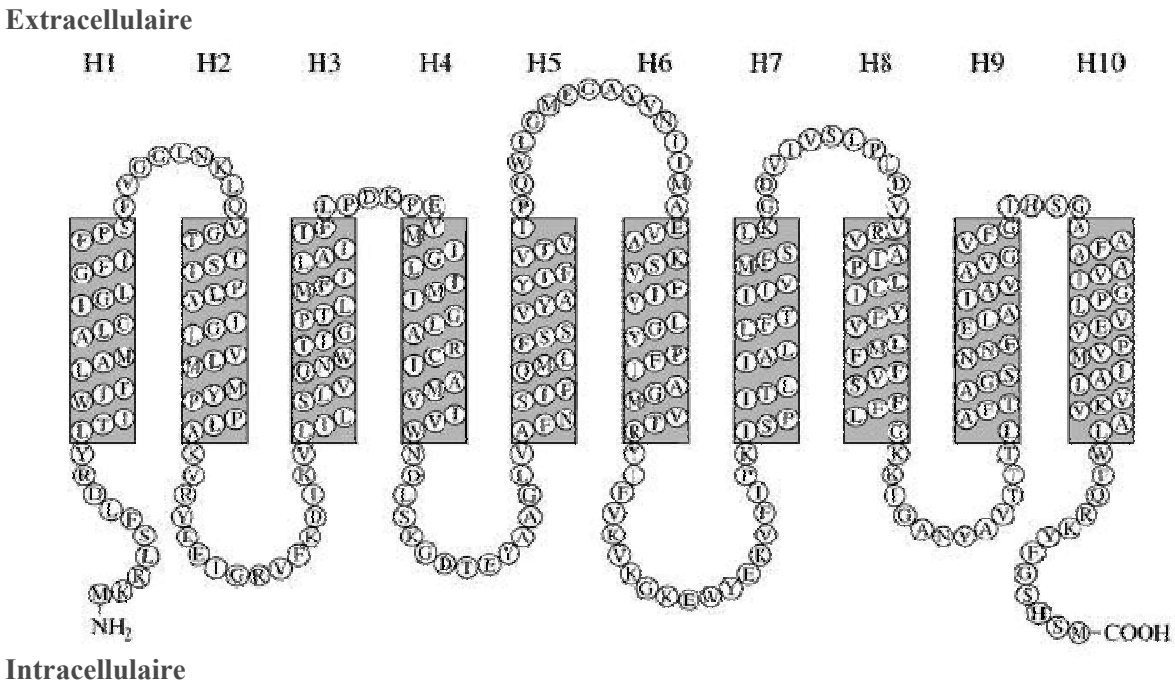


Figure 16. Modèle topologique de la protéine Acr3p (source : Aaltonen et Silow, 2008).

La troisième famille des transporteurs d'arsénite est désignée "famille MRP" (Rosen, 1999a) ou encore famille ABC (Rosen, 2002a). Elle inclut la protéine ycf1p de la levure *S. cerevisiae* qui est un transporteur de type ABC localisé au niveau de la membrane vacuolaire. Ce transporteur pompe l'arsénite conjugué au glutathion sous forme As(GS)3 du cytoplasme vers la vacuole permettant ainsi à *S. cerevisiae* de résister à As(III) (figure 11) (Ghosh *et al.*, 1999). La famille des transporteurs MRP comporte également la protéine MRP1 humaine, un transporteur de type ABC impliqué dans la résistance à divers antibiotiques. La protéine MRP1 confère la résistance à l'arsénite en l'éliminant de la cellule également sous forme As(GS)3 (figure 11) (Rosen, 1999a ; Rosen, 2002a).

2.4.4 ATPase : ArsA

En présence d'ArsA, l'arsénite est pompé à l'extérieur de la cellule à travers une pompe d'efflux composée de la protéine ArsB et d'une ATPase ArsA (ArsAB). L'énergie nécessaire à l'efflux de l'arsénite provient de l'hydrolyse de l'ATP. La pompe ArsAB est plus efficace pour le transport d'arsénite que le transporteur ArsB seul (Dey et Rosen, 1995).

Cetrains opérons *ars* putatifs, comme celui présent au niveau du plasmide pBD2 de *Rhodococcus erythropolis,* codent à la fois une ATPase putative (ArsA) et un transporteur

d'arsénite putatif de la famille Acr3p. Cependant, aucune pompe d'efflux ArsA-Acr3p n'a été caractérisée au niveau fonctionnel.

La protéine ArsA catalyse l'hydrolyse de l'ATP en présence d'As(III) ou Sb(III). Elle est constituée de deux parties identiques A1 et A2 reliées par 25 acides aminés. Chaque partie contient un domaine NBD (*nucleotide binding domain*) qui correspond au site de fixation de l'ATP. L'interaction entre ces deux domaines NBDs est nécessaire à l'activité ATPase et à la résistance à l'arsénite. ArsA contient également un domaine unique de fixation du métalloïde (MBD) incluant 3 résidus cystéines (Cys113, Cys172 et Cys422). Un domaine de transduction du signal (DTAP) composé de 12 acides aminés est localisé au niveau de chaque moitié d'ArsA. Ces domaines de transduction du signal relient le site de fixation du métalloïde (MBD) aux domaines NBDs. Le contact entre A1 et A2 (et donc l'interaction entre les 2 domaines NBDs et l'activité ATPase) ne peut s'effectuer qu'en présence d'As(III) ou Sb(III) qui se fixe au niveau du domaine MBD (Rosen *et al.*, 1999b ; Rosen, 2002a). Récemment il a été montré qu'ArsD, en plus de sa fonction de répresseur, fonctionnerait comme une protéine métallo-chaperonne qui transfère As(III) à ArsA (figure 17) (Lin *et al.*, 2007).

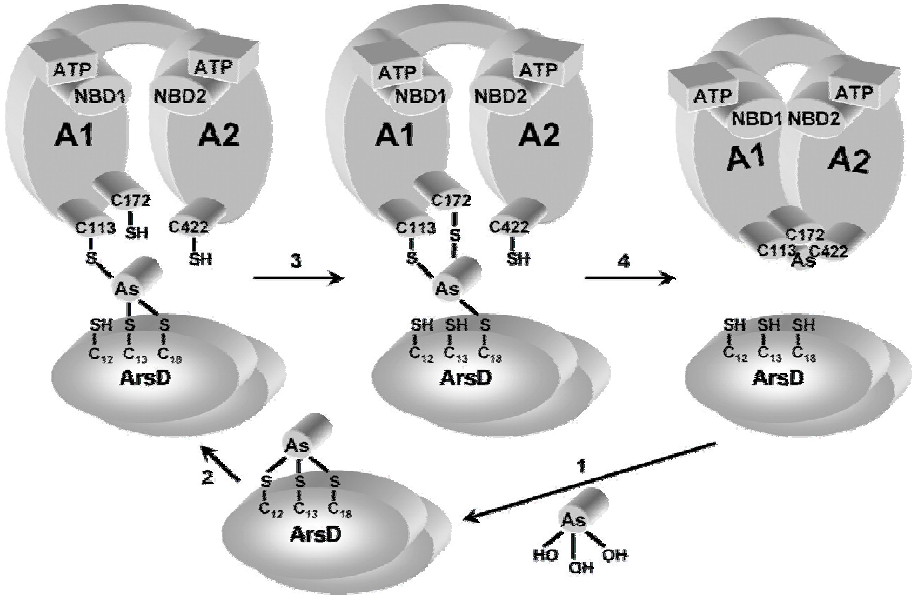


Figure 17. Mécanisme de transfert d'As(III) entre ArsD et ArsA proposé par Lin et *al.*, 2007.

2.4.5 Arséniate réductase : ArsC

Les arséniate réductases (ArsC) sont des petites protéines cytoplasmiques qui catalysent la réduction d'As(V) en As(III). Bien qu'ayant une fonction similaire, les arséniate réductases présentent des séquences, des domaines structuraux et des propriétés catalytiques différentes et sont classées en 3 familles distinctes (figure 18). Cette situation (protéines ArsC différentes assurant la même fonction) a souvent été comparée aux ailes de papillons et d'oiseaux qui assurent la même fonction mais qui résultent d'une évolution convergente (Messens et Silver, 2006 ; Mukhopadhyay *et al.*, 2002).

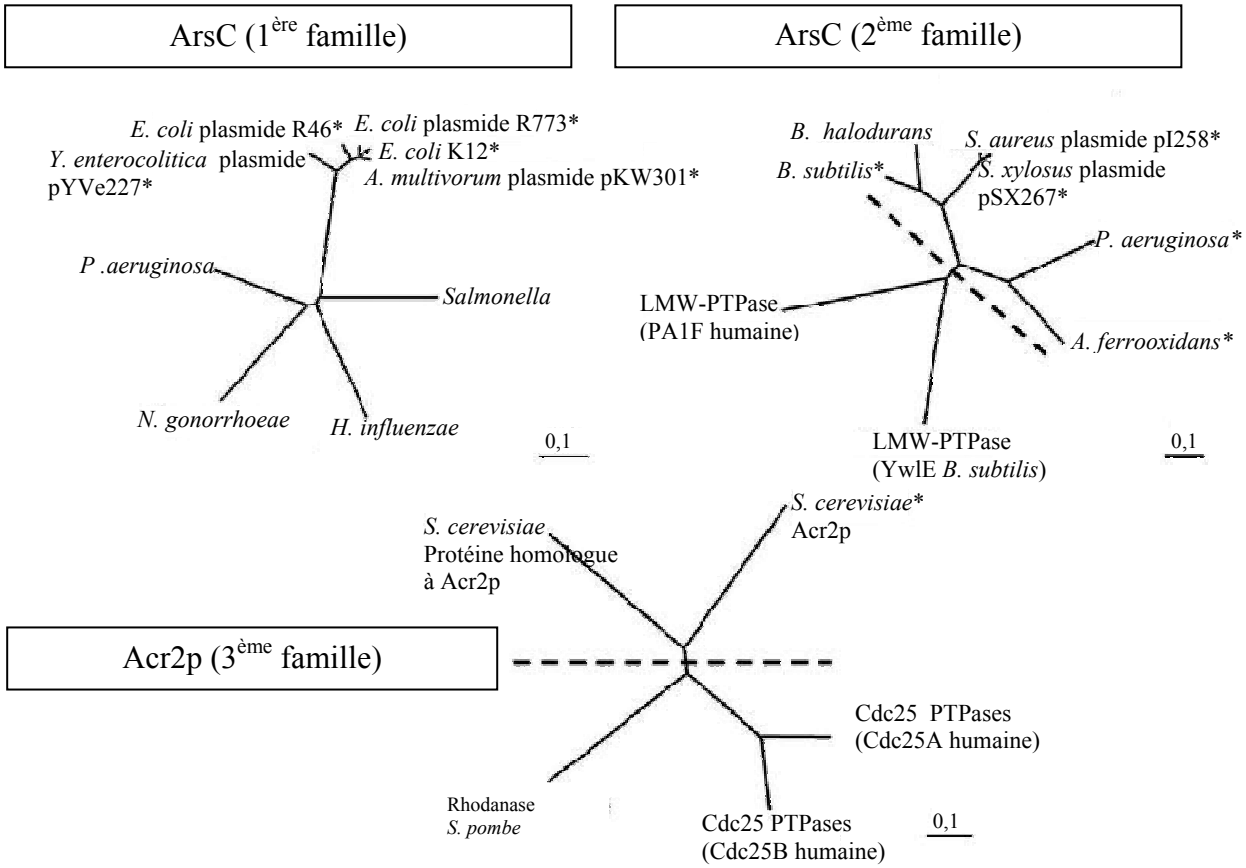


Figure 18. Familles des arséniate réductases (source : Mukhopadhyay *et al.*, 2002).
Les arséniate réductases de la 2ème famille sont homologues aux phosphotyrosine phosphatases de faible poids moléculaire (LMW-PTPase). Les arséniate réductases de la 3ème famille (représentées par Acr2p de *S. cerevisiae*) sont homologues aux protéines phosphotyrosine phosphatases de type Cdc25 (Cdc25 PTPases) et aux rhodanases.
* : l'activité arséniate réductase a été démontrée expérimentalement. Les séquences nucléotidiques ont été utilisées pour construire les arbres phylogénétiques.

La première famille est représentée par ArsC du plasmide R773 d'*E. coli.* L'activité arséniate réductase de cette enzyme dépend de la présence de la glutarédoxine (Grx) et du glutathion (GSH) (Gladysheva *et al.*, 1994 ; Oden *et al.*, 1994). Une cystéine (Cys12) localisée au niveau de l'extrémité N-terminale intervient dans l'activité catalytique de l'enzyme (Liu *et al.*, 1995). Deux autres cystéines sont nécessaires, la première provient du glutathion et l'autre de la glutarédoxine. Les différents intermédiaires de la réaction de réduction d'As(V) par l'arséniate réductase de R773 d'*E. coli* sont indiqués dans la figure 19 (Messens et Silver, 2006).

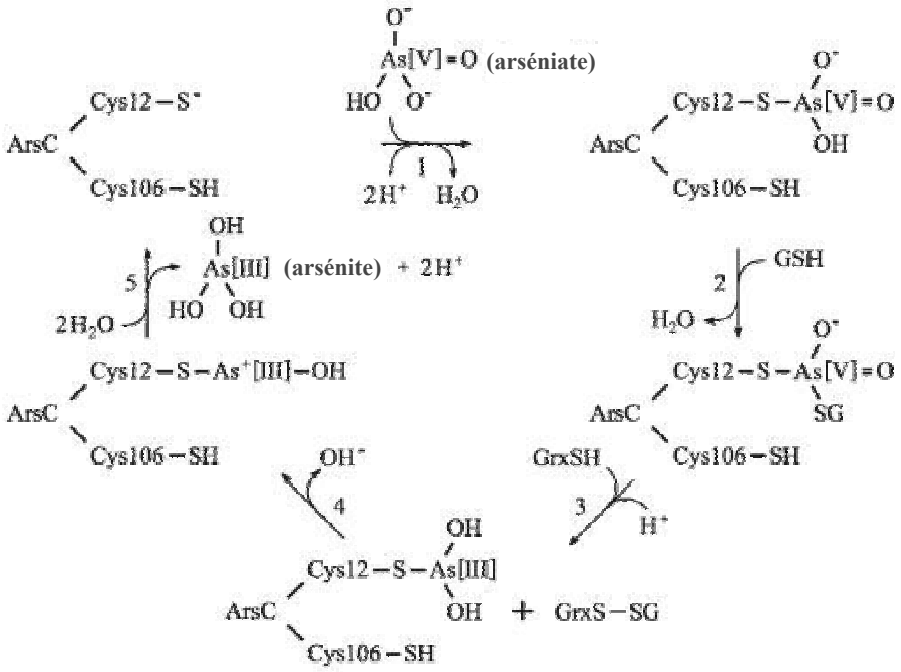


Figure 19. Mécanisme réactionnel d'ArsC de R773 d'*E. coli* (source : Messen et *al*, 2006).
(1) Le groupe thiolate de Cys12 d'ArsC réagit avec l'arséniate pour former un intermédiaire covalent. (2) Le glutathion déplace le groupement hydroxyle pour former un intermédiaire ArsC-S-As(OH)-SG. (3) La glutarédoxine (Grx) attaque l'arséniate d'où la formation d'un intermédiaire dihydroxy arsénite et la libération de GrxS-SG. (4) Formation d'un intermédiaire monohydroxy arsénite chargé positivement. (5) L'arsénite est hydroxylé et libéré et l'enzyme ArsC est régénérée.

La deuxième famille est représentée par ArsC du plasmide pI258 de *S. aureus* (Ji et Silver, 1992a). Cette famille comprend majoritairement des ArsC de bactéries Gram+ mais peut également contenir des ArsC de bactéries Gram-, par exemple celles de *Pseudomonas*

aeruginosa (Cai *et al.*, 1998) et de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Butcher *et al.*, 2000) pour lesquelles la présence d'une activité arséniate réductase a été démontrée (figure 18).

La réduction d'As(V) par ces enzymes nécessite l'intervention de la thiorédoxine (Trx) qui permet de régénérer une ArsC active à la fin du cycle catalytique (Ji et Silver, 1992b ; Ji *et al.*, 1994). Comme dans le cas d'ArsC de R773 d'*E. coli*, l'activité catalytique d'ArsC de pI258 nécessite 3 résidus cystéines. Cependant ces 3 cystéines proviennent de l'enzyme elle-même (Cys10, Cys82 et Cys89) (Messens *et al.*, 1999). Le mécanisme réactionnel est donc différent de celui observé pour ArsC de R773. Les différentes étapes de ce mécanisme sont présentées dans la figure 20 (Messens et Silver, 2006).

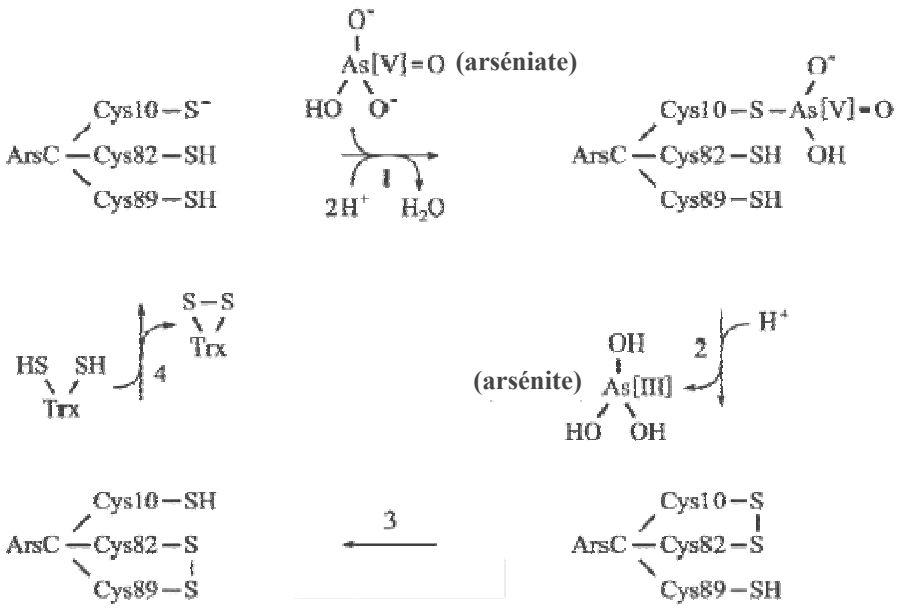


Figure 20. Mécanisme de réaction d'ArsC de pI258 de *S. aureus* (source : Messen et *al*, 2006).

(1) Le groupe thiolate de Cys10 d'ArsC réagit avec l'arséniate pour former un intermédiaire covalent ArsC-S-$AsHO^-_3$. (2) Cys82 attaque la Cys10 d'où la formation d'un pont disulfure Cys10-Cys82 et la libération de l'arsénite. (3) Cys89 attaque la Cys82 d'où la formation d'un pont disulfure Cys82-Cys89 et la régénération du groupe thiolate de la Cys10. (4) Réduction du pont disulfure Cys82-Cys89 par la thiorédoxine et régénération de la forme active de l'enzyme ArsC.

Les ArsC de la deuxième famille se différencient des ArsC de la première famille par leur homologie avec les protéines phosphotyrosine phosphatases à faible poids moléculaire (LMW-PTPases) (Ramponi et Stefani, 1997). Les LMW-PTPases sont présentes aussi bien chez les microorganismes que chez les animaux y compris les humains (figure 18). Le motif

CX_5R caractéristique des phosphotyrosine phosphatases (PTPases) est retrouvé au niveau des ArsC de cette deuxième famille. L'arséniate réductase de pI258 présente également une faible activité phosphatase (Zegers *et al.*, 2001). Cependant il n'existe pas encore de données solides permettant de montrer laquelle des deux activités de l'enzyme est apparue la première au cours de l'évolution (Messens et Silver, 2006 ; Mukhopadhyay *et al.*, 2002).

La troisième famille est représentée par l'arséniate réductase de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Acr2p), qui nécessite le glutathion réduit et la glutarédoxine pour son activité catalytique (Mukhopadhyay *et al.*, 2000). La cystéine Cys76 d'Acr2p intervient dans un processus de réduction d'As(V) semblable à celui observé avec ArsC d'*E. coli* (figure 19) (Messens et Silver, 2006). Par ailleurs, Acr2p est homologue aux protéines phosphotyrosine phosphatases de type Cdc25 (Cdc25 PTPases) qui interviennent dans la régulation du cycle cellulaire chez les eucaryotes (figure 18). Ces Cdc25 PTPases différent des LMW-PTPases auxquelles les ArsC de la deuxième famille sont homologues (Zhang, 1998). Acr2p de *S. cerevisiae* contient également le motif conservé CX_5R, mais ne présente pas d'activité phosphatase (Mukhopadhyay *et al.*, 2000 ; Mukhopadhyay et Rosen, 2001).

Une arséniate réductase qualifiée d'hybride (Messens et Silver, 2006) a été identifiée chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Li *et al.*, 2003). Cette SynArsC est similaire aux ArsC de la deuxième famille et présente une faible activité phosphatase. Cependant pour réduire As(V), SynArsC nécessite le glutathion réduit et la glutarédoxine.

2.4.6 Répresseurs transcriptionnels : ArsR et ArsD

La majorité des opérons *ars* contiennent un gène *arsR* codant un répresseur transcriptionnel de la famille ArsR/SmtB (Pennella et Giedroc, 2005). Ce répresseur contrôle le niveau basal de l'expression de l'opéron. En absence d'inducteur, le répresseur se fixe au niveau de la région promotrice empêchant la transcription de l'opéron *ars*. En présence d'inducteur, ArsR se dissocie de l'ADN et les gènes de l'opéron *ars* sont exprimés.

In vivo, l'expression de l'opéron *ars* du plasmide R773 d'*E. coli* est inductible par l'arsénite, l'arséniate, l'antimoine et le bismuth. Cependant *in vitro* l'arséniate n'est pas capable de dissocier le complexe ArsR-ADN ce qui indique qu'il n'est pas un vrai inducteur et qu'il doit d'abord être réduit en As(III) pour induire l'expression de l'opéron *ars* (Wu et Rosen, 1993a).

La protéine ArsR du plasmide R773 d'*E. coli* a été largement étudiée. Il s'agit d'un homodimère qui présente un motif conservé (EL**C**V**C**D) contenant deux résidus cystéines Cys34 et Cys36 impliqués dans la fixation de l'inducteur. Juste en aval de ce site EL**C**V**C**D

se trouve un domaine hélice-tour-hélice (HTH) permettant la fixation d'ArsR à l'ADN. La fixation de l'inducteur au site EL**C**V**C**D induit un changement de conformation du domaine HTH adjacent d'où la dissociation du complexe ArsR-ADN et la transcription de l'opéron (Shi *et al.*, 1994). Un modèle a été proposé pour le complexe arsenic-ArsR dans lequel As(III) est lié au groupement thiolate de 3 résidus cystéines Cys34, Cys36 et Cys37. Cependant bien que ces 3 résidus semblent impliqués dans la fixation d'As(III), seule l'interaction d'As(III) avec les groupements thiolates de Cys34 et Cys36 est indispensable pour induire le changement conformationnel (Shi *et al.*, 1996).

En 1993, Wu et Rosen ont réalisé des analyses d'empreinte à la DNase I afin de localiser le site de fixation d'ArsR au niveau du plasmide R773. La région de l'ADN protégée de la DNase I a été localisée entre le nucléotide -64 et -40, juste en amont de la région -35 du promoteur (figure 21). Une séquence spécifique TCAT-N7-TTTG a été identifiée comme le site de fixation du régulateur ArsR de R773. D'autre part, une séquence répétée et inversée (IR) a été également observée au niveau de la région protégée de la DNase I. Cette séquence, chevauchant le site (TCAT-N7-TTTG), jouerait un rôle important dans l'identification et la fixation du répresseur (Wu et Rosen, 1993a).



Figure 21. Région promotrice de l'opéron *ars* de R773 d'*E. coli* (source : Wu et Rosen, 1993a).
La région protégée de la DNase I est marquée en rouge. La séquence répétée et inversée est marquée en gras. Le site spécifique (TCAT-N7-TTTG) de fixation d'ArsR est encadré. Les régions -10 et -35 du promoteur sont indiquées.

Suite aux travaux de Wu et Rosen, d'autres séquences promotrices d'opérons *ars* ont été analysées. La séquence spécifique (TCAT-N7-TTTG) a été retrouvée au niveau de la région promotrice de l'opéron *ars* chromosomique d'*E. coli* (Xu et al., 1996) mais pas au niveau des régions promotrices d'autres opérons *ars* comme celui de *Bacillus subtilis* ou pKW301 d'*Acidiphilium multivorum* (Sato et Kobayashi, 1998 ; Suzuki *et al.*, 1998). La séquence TCAT-N7-TTTG n'est donc pas conservée dans les différents opérons *ars*. Par ailleurs, pour la majorité des opérons *ars*, une ou deux séquences répétées et inversées ont été retrouvées au niveau de la région promotrice. Bien que ces séquences soient différentes de celle observée

pour l'opéron *ars* de R773, leur rôle dans la fixation et l'identification du régulateur a été également suggéré (Ji et Silver, 1992a ; Ordonez *et al.*, 2005 ; Sato et Kobayashi, 1998).

La majorité des répresseurs ArsR identifiés présente le même site de fixation de l'inducteur (EL**C**V**C**D) que la protéine ArsR d'*E. coli*. Cependant un autre groupe de protéines ArsR ne contenant pas ce site a été identifié. Ce groupe est représenté par ArsR d'*Acidithiobacillus ferrooxidans* qui a été désigné comme un répresseur ArsR "atypique" (Butcher *et al.*, 2000 ; Butcher et Rawlings, 2002). Bien que ces ArsR atypiques ne contiennent pas le motif spécifique EL**C**V**C**D, ils présentent d'autres résidus conservés incluant 2 résidus cystéines à l'extrémité C-terminale (Cys95 et Cys96 au niveau du répresseur ArsR d' *A. ferrooxidans*). Qin et *al*., (2007) ont récemment montré que les 2 résidus Cys95 et Cys96 ainsi qu'un troisième résidu Cys102 d'ArsR d'*A. ferrooxidans* constituent le site de fixation de l'inducteur.

Certains opérons *ars* contiennent un gène *arsD* codant un second répresseur (ArsD) qui ne présente pas de similarité de séquence avec le répresseur ArsR. Chen et Rosen (1997) ont montré que la dissociation de la protéine ArsD de l'ADN nécessite 10 fois plus d'inducteur que la protéine ArsR. Ils ont également montré que le site de fixation du répresseur ArsD au niveau du promoteur *ars* est le même que celui du répresseur ArsR (TCAT-N7-TTTG). Cependant ArsR présente une plus grande affinité qu'ArsD et se fixe préférentiellement au niveau de ce site (Chen et Rosen, 1997).

ArsD contrôle le niveau d'expression maximal de l'opéron *ars*. En présence de l'inducteur, ArsR se dissocie de l'ADN ce qui permet l'expression des différents gènes de l'opéron y compris le gène *arsD*. Lorsque la concentration d'ArsD atteint un niveau critique, elle se fixe au niveau de l'opérateur stoppant ainsi la transcription de l'opéron. Cette régulation par la protéine ArsD permet d'éviter la surexpression du transporteur d'arsénite, qui serait toxique pour les bactéries. Lorsque la concentration de l'inducteur est élevée, la protéine ArsD se dissocie de l'ADN permettant ainsi la transcription de l'opéron (Chen et Rosen, 1997 ; Wu et Rosen, 1993b).

Il est remarquable qu'*arsD* soit toujours retrouvé dans les opérons *ars* contenant le gène *arsA*. Récemment, une explication a été trouvée pour cette association (Lin *et al.*, 2006). En effet, il a été montré qu'ArsD fonctionne également comme une protéine métallo-chaperonne qui transfère As(III) à ArsA. L'interaction avec ArsD augmente l'affinité d'ArsA à l'arsénite ce qui augmente l'activité ATPasique et diminue les concentrations d'As(III) intracellulaire. Plus récemment un mécanisme de transfert d'As(III) entre ArsD et ArsA a été proposé (voir section 2.4.4 : ATPase : ArsA) (Lin *et al.*, 2007).

Objectifs

Les bactéries ont développé différents mécanismes afin de s'adapter à la présence de l'arsenic dans leur environnement. Parmi ces mécanismes, le système *ars* de résistance à l'arsenic semble être le plus répandu. Les deux composants essentiels de ce système sont l'arséniate réductase qui catalyse la réduction d'As(V) en As(III) et le transporteur d'arsénite qui expulse As(III) hors du cytoplasme bactérien. Deux familles ArsB et Acr3p de transporteurs d'arsénite ont été décrites. Elles assurent la même fonction mais présentent des structures différentes. La famille ArsB a été plus largement étudiée que la famille Acr3p découverte plus récemment.

Dans quelques travaux récents, une approche PCR a été utilisée afin de détecter la présence des gènes du système *ars* dans des collections de bactéries résistantes à l'arsenic. Ces bactéries ont été isolées à partir d'échantillons environnementaux contaminés ou non par l'arsenic (sol, sédiments, eaux usées...). En 2002, Saltikov et Olson ont utilisé des amorces PCR, désignées sur la base de l'opéron *ars* du plasmide R773, afin de détecter la présence des gènes *arsA*, *arsB* et *arsC* dans des isolats bactériens résistants à l'arsenic provenant d'échantillons d'eaux usées et d'eaux naturelles. La majorité des résultats PCR positifs ont été observés pour des bactéries entériques. La présence de gènes *ars* dans les bactéries non entériques (ayant présenté un résultat PCR négatif) a pourtant été révélée par des analyses d'hybridation sur colonies dans des conditions de stringence modérée ou faible. Les auteurs ont conclu que les amorces utilisées ne sont pas adaptées à la détection des gènes *ars* des bactéries non entériques et que l'utilisation d'amorces dégénérées aurait probablement donné de meilleurs résultats (Saltikov et Olson, 2002).

Une approche analogue, a été utilisée par Ford et *al.,* (2005) également basée sur l'opéron *ars* du plasmide R773 pour définir des amorces permettant l'amplification, par "PCR nichée", des gènes *arsA*, *arsB* et *arsC* de 23 isolats bactériens résistants à As(V) provenant des sédiments du port de New Bedford. Des résultats PCR négatifs ont été obtenus pour quelques isolats, cependant l'affiliation phylogénétique de ces derniers n'a pas été déterminée (Ford *et al.*, 2005).

En 2004, Macur et *al,* ont conçu 4 couples d'amorces dans le but de détecter la présence du gène *arsC* dans 8 isolats du sol résistants à l'arsenic. Parmi ces couples d'amorces, trois sont dégénérés. Ils dérivent respectivement de gènes *arsC* de bactéries entériques, de gènes *arsC* de bactéries Gram positif et des gènes *arsC* de *Pseudomonas aeruginosa* et *P. putida*. Le quatrième couple d'amorce n'est pas dégénéré, il dérive du gène *arsC* d'*Agrobacterium tumefaciens*. Seul ce dernier couple d'amorce a permis d'amplifier les gènes *arsC* de 2 isolats identifiés comme *Agrobacterium tumefaciens*. Les auteurs ont conclu qu'étant donné la

diversité des gènes *arsC*, leur détection par des amorces conçues à partir d'organismes phylogénétiquement différents est probablement limitée (Macur *et al.*, 2004).
Les trois couples d'amorces dégénérées conçues par Macur et *al*. (2004) ont été également utilisés par Jackson et *al*, (2005) afin de détecter la présence du gène *arsC* dans 37 isolats résistants à As(V). Ces isolats appartiennent à des groupes phylogénétiques très variés et ont été isolés à partir d'un estuaire faiblement contaminé par l'arsenic. Aucun couple d'amorce n'a prouit d'amplification (Jackson *et al.*, 2005).

Dans ce travail, notre objectif est de se doter d'amorces dégénérées fiables qui permettent la détection des gènes de transporteurs d'arsénite de séquences différentes et appartenant aussi bien à la famille ArsB qu'Acr3p. Cette dernière n'a jamais été considérée auparavant dans la détection des gènes *arsB* dans des bactéries isolées de l'environnement. Pourtant, les analyses des séquences de génomes bactériens ont montré une large distribution des gènes des transporteurs Acr3p chez les bactéries.
Ces amorces seront utilisées pour analyser l'occurrence et la diversité des transporteurs d'arsénite dans des collections de bactéries isolées à partir d'échantillons environnementaux. Des réponses pourraient donc être fournies concernant l'existence d'éventuelles corrélations entre la présence des gènes *ars* ou leur niveau d'expression, le niveau de contamination par l'arsenic et l'affiliation phylogénétique des isolats. Des réponses pourraient également être fournies concernant la prédominance dans l'environnement de la famille Acr3p et ArsB.
Toutes ces réponses permettraient de mieux comprendre l'occurrence et le comportement dans l'environnement des bactéries possédant le système *ars*. Ces dernières étant particulièrement importantes puisqu'elles transforment As(V) en As(III) qui est une forme plus toxique pour les organismes vivants et plus mobile dans l'environnement.

Le deuxième objectif de ce travail découle des résultats que nous avons obtenus en essayant de répondre à notre premier objectif. Nous nous sommes en effet particulièrement intéressé à une souche bactérienne isolée à partir d'un échantillon de sol faiblement contaminé par l'arsenic. Cette souche, identifiée comme *Microbacterium* sp., présente un niveau de résistance remarquablement élevé pour As(III) et As(V). La détermination des gènes impliqués dans la résistance à l'arsenic chez cette souche, représente le deuxième objectif de notre travail doctoral.

Matériel & Méthodes

1 Souches et isolats bactériens

Les souches et les isolats bactériens utilisés dans ce travail sont listés dans le tableau 3.

Tableau 3. Souches et isolats bactériens utilisés

Souches/Isolats	Description	Référence
E. coli DH10B	Souche hôte pour la transformation par les plasmides recombinants, Str^R Contient un opéron *arsRBC* chromosomique	Gibco BRL
E. coli GM119	Souche déficiente pour l'adénine méthylase (Dam) et la cytosine méthylase (Dcm). Elle a été utilisée pour préparer de l'ADN non méthylé	(Arraj et Marinus, 1983)
E. coli MA1*	Dérivée de DH10B, sensible à l'arsenic et résistante à la tétracycline	Laboratoire LIEBE Université Paul Verlaine
E. coli W3110	Contient un opéron *arsRBC* chromosomique	(Bachmann, 1972)
E. coli AW3110	Dérivée d'*E. coli* W3110, délétée pour l'opéron *arsRBC*	(Carlin *et al.*, 1995)
Herminiimonas arsenicoxydans ULPAs1	β-protéobactérie capable d'oxyder As(III) en As(V)	(Weeger *et al.*, 1999)
Corynebacterium glutamicum RES 167	Dérivée de *C. glutamicum* ATCC13032, déficiente pour le système de restriction, utilisée comme souche hôte pour la transformation par les plasmides recombinants, Nal^R Contient deux opérons *ars* chromosomique *ars*1 et *ars*2 ainsi que deux gènes additionnels *arsB3* et *arsC4*	(Wehmeier *et al.*, 2001)
C. glutamicum RES 167 ArsB1-B2	Dérivée de *C. glutamicum* RES 167, sensible à l'arsenic, résistante à la kanamycine et à l'apramycine Contient un plasmide pKA1** intégré dans le gène *arsB1* et un plasmide pOJA2*** intégré dans le gène *arsB2*	(Ordonez *et al.*, 2005)
Cupriavidus metallidurans AE126	Dérivée de *C. metallidurans* CH34 (ancien nom *Alcaligenes eutrophus* puis *Ralstonia metallidurans* Contient un gène de transporteur d'arsénite putatif	(Mergeay *et al.*, 1985 ; Vandamme et Coenye, 2004)
Shewanella sp. ANA3	Contient un opéron *ars* de résistance à l'arsenic (*arsDABC)*	(Saltikov *et al.*, 2003)
S. oneidensis MR-1	Contient un gène de transporteur d'arsénite putatif	(Myers et Nealson, 1988)
Mycobacterium smegmatis $mc^2$155	Contient un gène de transporteur d'arsénite putatif	(Snapper *et al.*, 1990)
Isolats bactériens du sol	165 isolats bactériens ont été utilisés dans ce travail dont 114 isolés à partir d'un sol A (contenant 12,2 mg/kg d'arsenic) et 51 à partir d'un sol B (contenant 135 mg/kg d'arsenic)	Laboratoire LIEBE Université Paul Verlaine

* La souche *E. coli* MA1 a été obtenue par transduction de la fusion *arsB* ::*luxAB*-Tc^R de la souche *E. coli* LF20012 (Cai et DuBow, 1996) dans la souche *E. coli* DH10B à l'aide du bactériophage P1vir.
** pKA1: plasmide pK18 mob portant un fragment interne (310 pb) du gène *arsB1* de *C. glutamicum* et un gène de résistance à la kanamycine. *** pOJA2 : plasmide pOJ260 portant un fragment interne (370 pb) du gène *arsB2* de *C. glutamicum* et un gène de résistance à l'apramycine.
Nous remercions A. Cherif, L. M. Mateos, C. W. Saltikov, M. C. Lett and B. P. Rosen pour nous avoir fourni les souches bactériennes.

2 Plasmides

Les plasmides employés et leur utilisation respective sont listés ci-dessous :

pDM302 (Meletzus et *al*., 1993) : vecteur navette *E. coli-Clavibacter* (13,557 kb), il a été utilisé dans ce travail pour tester la capacité de transformation de l'isolat A33. Il comporte un gène de résistance au chloramphénicol et un gène de résistance à la néomycine.

pUM3 (Mobley *et al.*, 1983) : ce vecteur (figure 22a) a été construit en insérant un fragment *Hin*dIII de taille 4,3 kb contenant les gènes *arsR, arsB et arsC* du plasmide R773 d'*E. coli*, dans le site *Hin*dIII du vecteur pBR322 (4,361 kb). Le marqueur de sélection est un gène de résistance à l'ampicilline.

pUC19 : vecteur de clonage contenant un gène de résistance à l'ampicilline et des sites multiples de clonage qui se situent au niveau du gène *lacZ* codant la β-galactosidase (figure 22b).

pCR2.1 (Invitrogen) : vecteur de clonage linéaire additionné d'une thymidine non appariée à chaque extrémité 3' (figure 22c). Il est utilisé pour cloner les produits PCR qui sont produits par certaines Taq polymérases qui ajoutent une adénosine aux extrémités 3' des fragments amplifiés. Le vecteur pCR2.1 possède deux marqueurs de résistance à des antibiotiques, l'ampicilline et la kanamycine. De plus, il est linéarisé au niveau du gène *lacZ* permettant ainsi une sélection par α-complémentation des clones contenant un vecteur recombinant.

pSRK21 (Vesely et *al*., 2003) : vecteur navette *E. coli-Corynebacterium* (figure 22d), utilisé comme vecteur de clonage pour la construction de la banque d'ADN de l'isolat A33. Le vecteur pSRK21 a été construit à partir du pK19 (vecteur de clonage dans *E. coli*) et de pSR1 (plasmide de *C. glutamicum* ATCC 13058) (Archer et Sinskey, 1993 ; Pridmore, 1987). Le marqueur de sélection est un gène de résistance à la kanamycine. En amont de ce gène a été inséré un promoteur P-45, cloné à partir du chromosome de *C. glutamicum* (Patek et *al.*, 1996).

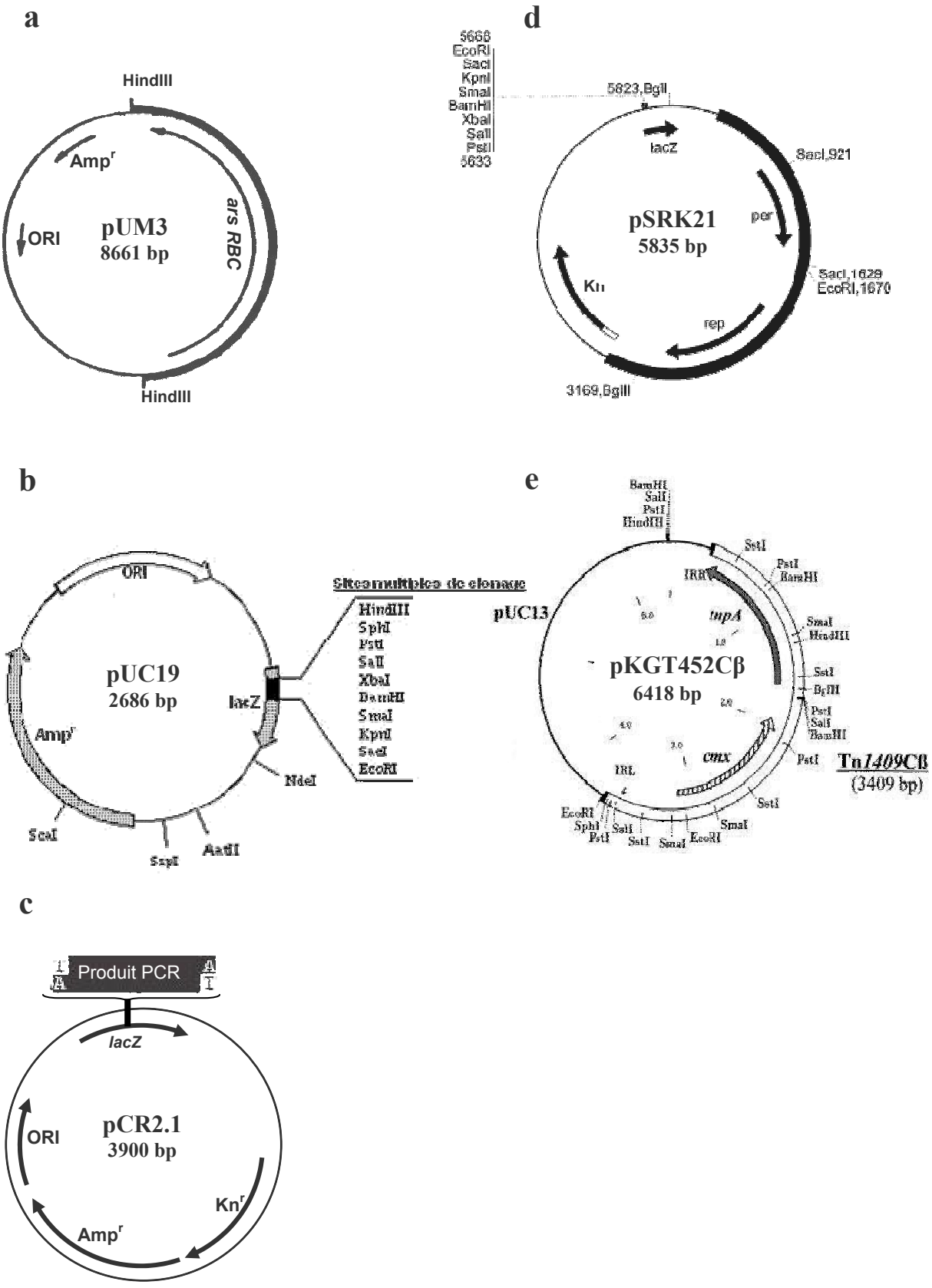


Figure 22. Carte des plasmides pUM3 (a), pUC19 (b), pCR2.1 (c), pSRK21 (d) et pKGT452Cβ (e).

pKGT452Cβ (Gartemann et Eichenlaub, 2001) : ce vecteur suicide a été construit à partir du vecteur pUC13 (portant un gène de résistance à l'ampicilline) et du transposon Tn1*409*C (contenant l'élément d'insertion IS*1406* d'*Arthrobacter* sp. TM1 et le gène *cmx* de résistance au chloramphénicol du Tn*5564* de *C. striatum*) (figure 22e). Le vecteur pKGT452Cβ a été utilisé dans ce travail pour construire le vecteur pSRK21-cmx.

pSRK21-cmx (cette étude) : ce vecteur a été construit afin de tester l'efficacité de transformation des cellules compétentes de *C. glutamicum* ArsB1-B2 qui sont résistantes à la kanamycine (marqueur de sélection du vecteur pSRK21). Le fragment *Sal*I de 2 kb du vecteur pKGT452Cβ portant le gène de résistance au chloramphénicol (figure 22e) a été ainsi inséré au niveau du site *Sal*I du vecteur pSRK21 (figure 22b). Le vecteur résultant est appelé pSRK21-cmx.

3 Milieux et conditions de culture

C. metallidurans a été cultivée à 30°C dans un milieu minimum TRIS-gluconate (Mergeay *et al.*, 1985) et *H. arsenicoxydans* ULPAs1 à 25°C dans un milieu CDM (Weeger *et al.*, 1999). Toutes les autres souches et isolats ont été cultivés dans un milieu LB (Sambrook *et al.*, 1989) sauf si indiqué autrement. *C. glutamicum* RES167, *C. glutamicum* ArsB1-B2, *Shewanella* sp. ANA3 et *S. oneidensis* MR-1 ont été cultivées à 30°C. *M. smegmatis mc*^{2}155, *E. coli* W3110, *E. coli* AW3110, *E. coli* DH10B et *E. coli* MA1 ont été cultivées à 37°C. Les milieux de culture SOC (Sambrook *et al.*, 1989) et LBS [van der Rest *et al.*, (1999) avec quelques modifications] ont été utilisés respectivement pour la régénération des cellules d'*E. coli* et de *C. glutamicum* après un choc thermique ou électrique. Le milieu Epo (van der Rest *et al.*, 1999) a été utilisé pour la préparation des cellules compétentes de *C. glutamicum* (voir section 6.8.1: Transformation de *C. glutamicum* ArsB1-B2). Le milieu TRIS-LP (low phosphate) a été utilisé pour tester la tolérance de l'isolat *Microbacterium* sp. A33 à l'arsenic. Quand nécessaire, des antibiotiques ont été ajoutés aux milieux de culture : streptomycine à 50 µg/ml pour *E. coli* DH10B*,* acide nalidixique à 50 µg/ml pour *C. glutamicum*, kanamycine et apramycine à 50 µg/ml pour *C. glutamicum* ArsB1-B2 et tétracycline à 10 µg/ml pour *E. coli* MA1.

Les cellules d'*E. coli* transformées par pUC19 ou pSRK21 ont été respectivement sélectionnées sur un milieu de culture additionné de 100 µg/ml d'ampicilline ou 25 µg/ml de kanamycine. Le X-gal (36 µg/ ml) et l'IPTG (43 µg/ml) ont été ajoutés pour la sélection des

transformants d'*E. coli* par α-complémentation. Les transformants de *C. glutamicum* et de l'isolat A33 ont été sélectionnés respectivement sur un milieu de culture additionné de 15 µg/ml de chloramphénicol (vecteur pDM302) ou 25 µg/ml de kanamycine (vecteur pSRK21). Les compositions pour des milieux Epo, LBS, TRIS-gluconate, CDM et TRIS-LP sont indiquées ci-dessous :

Milieu Epo (1 litre)

Tryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	10 g
Isoniazide (hydrazide de l'acide isonicotinique)	4 g
Glycine	20,5 g
Tween 80	1 ml

La tryptone, l'extrait de levure et le NaCl ont été stérilisés par autoclavage. L'isoniazide, la glycine et le tween 80 ont été stérilisés par filtration et ajoutés au milieu juste avant son utilisation.

Milieu LBS (1 litre)

Tryptone	5 g
Extrait de levure	2,5 g
NaCl	5 g
Sorbitol	91 g

Le sorbitol a été autoclavé séparément du mélange tryptone, extrait de levure et NaCl.

Milieu minimum TRIS-gluconate (1 litre)

Tris	6,06 g
NaCl	4,68 g
KCl	1,49 g
NH_4Cl	1,07 g
Na_2SO_4	0,43 g
$MgCl_2$	0,20 g
$CaCl_2$	0,03 g
Na_2HPO_4	0,23 g
Fe(III)NH_4citrate	0,0048 g
Gluconate de sodium	2 g
Solution d'oligo-éléments (SL7)	1 mL

Solution SL7 (1 litre) :	HCl 25 %	5,2 mL
	$MnCl_2.4H_2O$	0,1 g
	H_3BO_3	0,062 g
	$CoCl_2.6H_2O$	0,19 g
	$CuCl_2.2H_2O$	0,0168 g
	$NiCl_2$	0,024 g
	$NaMoO_4.2H_2O$	0,03 g

Le milieu TRIS-gluconate ainsi que la solution SL7 ont été stérilisés par autoclavage.

Milieu CDM (1 litre)

Solution A	100 mL
Solution B	2,5 mL
Solution C	10 mL
pH	7,2

Solution A (1 litre)

Na-lactate	50 g
$MgSO_4.7H_2O$	20 g
NH_4Cl	10 g
Na_2SO_4	10 g
K_2HPO_4	5 mg
$CaCl_2.2H_2O$	672 mg

Solution B (100 mL)

$FeSO_4$	160 mg

Solution C (50 mL)

$NaHCO_3$	4 g

La solution A a été stérilisée par autoclavage et les solutions B et C ont été stérilisées par filtration.

Milieu TRIS-LP (low phosphate)

NaCl	80 mM
KCl	20 mM
NH_4Cl	20 mM
Na_2SO_4	3 mM
$MgCl_2$	1 mM
K_2HPO_4	0,1 mM
Tris	120 mM
Glucose	0,2 %
Thiamine	0,01 %
Bactopeptone	0,5 %
$CaCl_2$	0,1 mM
pH	7

La thiamine et le glucose sont ajoutés après autoclavage à partir de solutions 100× stérilisées par filtration.

4 Détermination de la sensibilité à l'arsenic

Les concentrations minimales inhibitrices (CMIs) d'As(III), As(V) et Sb(III) pour les isolats bactériens du sol et les souches de référence (chapitre I) ont été déterminées sur milieu LB solide selon la méthode suivante: les densités optiques à 600 nm des cultures bactériennes en phase stationnaire ont été d'abord ajustées à 0,3 puis des spots de 5 µl de ces suspensions ont été déposés sur les géloses LB contenant des concentrations croissantes d'As(III), As(V) ou Sb(III). Les CMIs, définies comme la plus faible concentration du métalloïde qui inhibe la croissance bactérienne, ont été déterminées après 72 h d'incubation à 25°C pour les isolats et à 30°C ou 37°C pour les souches de référence.

La sensibilité de l'isolat A33 *Microbacterium* sp. à l'arsenic en milieu liquide a été déterminée selon l'approche suivante : 2 ml de milieu TRIS-LP contenant différentes concentrations d'arséniate ou d'arsénite ont été inoculés au 1/100 avec une préculture d'une nuit puis incubés sous agitation pendant 48 h. La croissance a ensuite été mesurée par spectrophotométrie à 600 nm.

5 Détection des activités arsénite oxydase et arséniate réductase

La présence d'une activité arsénite oxydase ou arséniate réductase chez les isolats bactériens a été détectée sur milieu CDM solide en utilisant le test au nitrate d'argent précédemment utilisé par Muller et *al.* (2003). Les densités optiques à 600 nm des cultures bactériennes en phase stationnaire ont été ajustées à 0,3, puis des spots de 20 µl ont été déposés sur la gélose CDM contenant 1 mM As(III) ou As(V). Après 48 h d'incubation à 25°C, la gélose a été inondée avec une solution d'$AgNO_3$ à une concentration finale de 0,1 M. L'apparition d'une coloration jaune ou rouge marron révèle respectivement la présence d'As(III) ou As(V) dans le milieu. La souche *H. arsenicoxydans* ULPAs1 a été utilisée comme témoin positif pour le test d'oxydation d'As(III).

Les activités arsénite oxydases et certaines activités arséniate réductases ont été vérifiées par chromatographie ionique (LIMOS UMR 7137, Université Henri Poincaré, Nancy). Les surnageants de culture analysés (culture en phase stationnaire en milieu CDM contenant 1 mM d'As(III) ou As(V)) ont été préalablement filtrés au moyen d'un filtre 0,22 µm.

6 Techniques de biologie moléculaire

Toutes les techniques qui ne sont pas décrites ou détaillées ci-dessous ont été réalisées en suivant les protocoles décrits par Sambrook *et al.* (1989).

6.1 Extraction des acides nucléiques

6.1.1 Extraction de l'ADN total

L'ADN a été extrait à partir des isolats bactériens selon le protocole employé par Pitcher et *al*., (1989) avec quelques modifications. Les cellules bactériennes ont été collectées à partir de 5 ml de culture par une centrifugation pendant 2 min à 11000 *g*. Le culot a été ensuite resuspendu dans 100 µL de tampon TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM [pH 8.0]) auxquels ont été ajoutés du lysozyme à une concentration finale de 50 mg/mL et de la RNase à une concentration finale de 50 µg/mL. Après 1 heure d'incubation à 37°C, les bactéries ont été lysées en ajoutant 500 µL de tampon de lyse (thiocyanate de guanidine 5M, EDTA 100 mM et sarkosyl 0,5 %). Après une incubation de 10 min dans la glace, les protéines ont été précipitées en ajoutant 250 µL d'acétate d'ammonium 7,5 M et en incubant le mélange dans la glace pendant 10 min. Un volume de 500 µL de chloroforme a été ajouté pour extraire les protéines et l'ADN a été ensuite précipité avec 0,6 volume d'isopropanol puis lavé à l'éthanol 70 %. L'ADN a été enfin resuspendu dans 100 µl de tampon Tris-HCl (10 mM, pH 8).

6.1.2 Extraction de l'ADN plasmidique d'*E. coli*

Pour les plasmides contenant un insert à séquencer, l'extraction a été réalisée avec un kit d'extraction (*Perfect Prep Mini Kit*, *Eppendorf*) basé sur le principe d'une lyse alcaline des bactéries suivie d'une purification de l'ADN sur colonne. Les plasmides ainsi extraits ne contiennent pas de traces de phénol ou chloroforme qui peuvent inhiber la réaction de séquençage.

6.1.3 Extraction de l'ADN plasmidique de *C. glutamicum* ArsB1-B2

L'ADN plasmidique de *C. glutamicum* ArsB1-B2 a été extrait selon le protocole d'extraction de l'ADN plasmidique d'*E. coli* par lyse alcaline (Sambrook *et al.*, 1989) avec la modification

suivante : le culot bactérien a été repris dans 100 µl d'une solution GTE/lysozyme (Glucose 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8 / lysozyme, 15 mg/ml) puis a été incubé à 37°C pendant 1 h.

6.1.4 Extraction des fragments d'ADN à partir du gel d'agarose

Les fragments d'ADN ont été récupérés à partir du gel d'agarose à l'aide du kit *NucleoSpin Extract II* (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fournisseur.

6.1.5 Extraction de l'ARN total

L'isolat A33 a été cultivé dans les milieux suivants : (i) milieu LB additionné de 5 mM As(III), (ii) milieu LB additionné de 5 mM As(V) et (iii) milieu LB sans arsenic. L'ARN total a été extrait avec le kit *Nucleospin RNA II* (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fournisseur. Afin d'éliminer les traces d'ADN génomique, l'ARN a ensuite été traité à la DNase à l'aide du kit RNase-Free DNase Set (Qiagen) puis purifié à l'aide du kit RNeasy MinElute Cleanup (Qiagen). Les quantités et qualités d'ARN extrait ont été déterminées respectivement par mesure de l'absorbance à 260 nm et du ratio A_{260}/A_{280}.

6.2 Restriction et modification de l'ADN

Toutes les enzymes de restriction et de modification de l'ADN (phosphatase alcaline CIAP et ligase) proviennent de MBI Fermentas. Elles ont été utilisées suivant les recommandations du fournisseur (durée, température d'incubation, tampon, concentrations).

6.3 Transcription inverse

La transcription inverse a été réalisée avec l'enzyme MMLV (*Moloney Murine Leukemia Virus, Invitrogen*) à partir de 2 µg d'ARN selon les recommandations du fournisseur.

6.4 Réaction d'amplification en chaîne (PCR)

Les réactions de polymérisation en chaîne (PCR) ont été réalisées à l'aide de la Taq polymérase Eppendorf. Les amorces utilisées pour la PCR ont été sélectionnées avec le logiciel "Primer 3" et synthétisées par la compagnie Operon. Les amorces, livrées sous forme lyophilisée ont été solubilisées dans une solution de Tris 1 mM (pH 8), puis conservées à -20°C. Les séquences des amorces utilisées pour les réactions PCR sont répertoriées dans le tableau 4.

Les réactions d'amplification ont été réalisées dans un volume final de 25 µl contenant l'ADN matrice (50 à 100 ng), chaque amorce à une concentration finale de 0,2 µM, les dNTP à une concentration finale de 0,2 mM, la Taq polymérase (1 unité) et le tampon fourni avec la Taq polymérase (1 x).

Tableau 4. Séquences des amorces utilisées pour la PCR*

Nom	Séquence(5'-3')
darsB1F	GGTGTGGAACATCGTCtggaaygcnac
darsB3R	TCAGGATCAGGGCGGCrccrtcrtt
darsB1R	CAGGCCGTACACCACCAGrtacatncc
dacr1F	GCCATCGGCCTGATCGTnatgatgtaycc
dacr2F	CCTGGCCCGGTGCathgcnatggt
dacr1R	CGGCGATGGCCAGCtcraarttrtt
dacr5F	TGATCTGGGTCATGATCTTCccvatgmtgvt
dacr6F	CCTGCACCGCCATGGTsttygtstgg
dacr4R	CGGCCACGGCCAGytcraaraartt
w01	AGAGTTTGATCMTGGCTC
w02	GNTACCTTGTTACGACTT
Mars2F	CAGTCTTCGTAGCGCTTTC
Mars2R	CTGCATTGATCCCCTTGAC
Mars3F	GACGTGACAGACCCTCAGA
Mars4R	TCGGATACGGCTCCAAGTA
C3F	AGGTCGTGCAGTGGGAGTT
C3R	GACAGCGTCACGGAGTTCT
TF	CAGGACGCCCAGCACTAC
XR	GAGCGCCTCCATCTTCTCT
XF	CCCACGCTGGTCTTCTACA
ACR3F	GTACTTCGCCGTGATGTGGT
ACR3R	GAACGCCAGAGTGGAGGAT
RC2R	GTCGCACACACACGACTCTC
RC2F	CGGACATCGAAGGTGACAT
C1R	GTCGTCGAGCTTCCAGTCTT
A33-16SF	TAGCAGGGAAGAAGCGAAAG
A33-16SR	AACGTTTACGGGGTGGACTA

* : les amorces utilisées dans l'analyse RT-PCR sont soulignées.

Les PCR avec les amorces dégénérées ont été réalisées en utilisant le programme suivant : une dénaturation initiale de 5 min à 94°C, suivie de 35 cycles comportant une étape de dénaturation de 45 sec à 94°C, une étape d'hybridation de 45 sec à 57°C avec une réduction de la température de 0,5°C par cycle pendant les 10 premiers cycles et une étape d'élongation de 30 sec à 72°C. La réaction est terminée par une élongation finale de 7 min à 72°C.
Les autres PCR ont été réalisées selon la programmation suivante: une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 min suivie de 30 cycles comportant une étape de dénaturation de 94°C pendant 45 sec, une étape d'hybridation pendant 45 sec à 55°C et une étape d'élongation à 72°C pendant 30 sec. Une extension finale est réalisée pendant 5 min à 72°C.

6.5 Séquençage

Le séquençage de l'ADN a été réalisé par la société MWG Biotech. Les amorces utilisées pour les réactions de séquençages sont listées dans le tableau 5. Elles ont été sélectionnées avec le logiciel "Primer 3" et synthétisées par MWG Biotech ou Operon.

Tableau 5. Amorces utilisées pour le séquençage

Nom	Séquence (5'-3')	Utilisation
M13F M13R	TGTAAAACGACGGCCAGT CAGGAAACAGCTATGACC	Amorces universelles utilisées pour séquencer les extrémités d'un insert cloné dans pUC19, pSRK21 ou pCR2.1
39(a)	GAAGTCGGGTCGTGTGTTTG	Détermination de la séquence de l'insert 39
MF1	ACGATCGGGAGAACTTCTGT	Détermination de la séquence de l'insert(1)
MF2	GCAGAGTGGGATCACGAACT	
MF3	ATACGTGGCCATCGAGAGTT	
MF4	ATCGTGACAACCACATCTGC	
MF5	CGTAGACGAGTCCGACGAG	
MF7	GAGTTCGCGTTCCACTCC	
MF6	GAGACGCCAGGGATGAAG	
MR1	GAGATCTTCCGCGAGCTG	
MR2	CATGCAGGTCGTCTACAAGC	
MR3	GATCTCGTGGTCGAGGTCT	
MR4	GGTCGAGACACCGAGCAC	
MR5	TGATGACTACTGCCGTGACC	
MR6	GCGACCTCTACGGACAGC	
MR7	CCAGTCGAGGAGCGGTTC	
V6911 V6911(1)	ATACAACGTGCAAGCCTGGT GTCAGCACCCCGTCTTGTA	Vérification de la séquence de l'insert 1
V6680	GCATCGACTCCATCAACTCC	Vérification de la séquence de l'insert 1/3

6.6 Analyses des séquences et constructions des arbres phylogénétiques

Les séquences nucléotidiques ont d'abord été vérifiées manuellement en analysant le chromatogramme correspondant. Elles ont ensuite subi plusieurs analyses comme l'élimination de l'ADN vectoriel, l'assemblage des fragments d'ADN chevauchants, l'identification des ORF, la recherche de similitudes avec les séquences répertoriées dans les banques de données. Les programmes utilisés pour les analyses et les traitements des séquences sont listés dans le tableau 6.

Les arbres phylogénétiques ont été construits avec la méthode Neighbor-Joining en utilisant le logiciel MEGA 3.0. Le modèle *p*-distance a été appliqué pour calculer les distances entre les séquences et la robustesse de l'arbre a été évaluée par un test de *bootstrap* (250 réplicats).

Tableau 6. Programmes utilisés pour les analyses des séquences

Logiciel	Programme et utilisation
Blast[1]	**BlastX** : comparaison des 6 cadres de lecture d'une séquence nucléotidique à une banque de séquences protéiques **BlastN** : comparaison d'une séquence nucléotidique à une banque de séquences nucléiques **CDART :** recherche de protéines présentant la même "architecture de domaines" que la protéine analysée
Emboss[2]	**needle** : alignement global de 2 séquences nucléotidiques ou protéiques **water** : alignement local de 2 séquences nucléotidiques ou protéiques **merger** : assemblage des fragments d'ADN chevauchants **palindrome** : recherche de séquences répétées et inversées dans une séquence nucléotidique
FramePlot 2.3.2[3]	recherche des phases ouvertes de lecture
Softberry[4]	**FgenesB**: recherche des phases ouvertes de lecture et des opérons **BPROM** : recherche de promoteurs bactériens
Restriction Maps[5]	recherche des sites de restriction dans une séquence nucléotidique
Clustalw[6]	alignement multiple de séquences nucléotidiques ou protéiques
MEGA 3.0[7]	construction d'arbres phylogénétiques

1 : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi,
2 : http://bioweb.pasteur.fr/docs/EMBOSS/index.html
3 : http://www.nih.go.jp/~jun/cgi-bin/frameplot.pl,
4 : http://www.softberry.com/berry.phtml
5 : http://www.vivo.colostate.edu/molkit/mapper/index.html,
6 : http://bioinfo.hku.hk/Pise/clustalw.html
7 : http://www.megasoftware.net/

6.7 Southern blot

L'ADN total de l'isolat A33 a été hydrolysé par différentes enzymes de restriction puis les fragments de restriction ont été séparés par une électrophorèse en gel d'agarose 0,8 %. L'ADN a été ensuite transféré avec un appareil de transfert (VacuGene XL blotting system) sur une membrane de nylon (Zeta-Probe GT, Bio-Rad) puis a été fixé aux UV.
La sonde utilisée (désignée *ACR3(1)*/A33) correspond au produit PCR obtenu par amplification de l'ADN de l'isolat A33 au moyen des amorces dacr1F/dac1R. Elle a été marquée à la digoxigénine en utilisant un mélange d'hexanucléotides, un mélange de dNTP(s) (DIG DNA Labeling Mix) et le fragment de Klenow commercialisés par Roche.
La révélation a été réalisée en utilisant des anticorps anti-digoxigénine conjugués à la phosphatase alcaline (anti-DIG-AP, Roche). Le CDP-*Star* (Roche), a été utilisé comme substrat de la phosphatase alcaline.

6.8 Transformation bactérienne

6.8.1 Transformation de *C. glutamicum* ArsB1-B2

6.8.1.1 Préparation des cellules électrocompétentes

La préparation des cellules électrocompétentes de *C. glutamicum* a été réalisée selon van der Rest *et al.*, (1999). Un volume de 10 ml de milieu LB contenant 2 % de glucose a été inoculé avec une colonie de *C. glutamicum* ArsB1-B2 et a été incubé pendant 16 h à 30°C. Cette préculture a été diluée dans 100 ml de milieu Epo afin d'obtenir une DO_{600} de 0,3 puis a été incubée pendant 28 h à 18°C. Lorsque la DO_{600} a atteint une valeur approximative de 1, la culture a été placée dans la glace pendant 10 min puis les cellules bactériennes ont été récupérées par une centrifugation à 4000 *g* pendant 10 min à 4°C. Les cellules ont été lavées 4 fois avec 50 ml de glycérol 10 % froid et ont été resuspendues dans 0,5 ml de la même solution. Les bactéries ont été aliquotées par 50 µl et ont été conservées à -80°C. La compétence de ces cellules a été testée par une transformation avec le plasmide pSRK21-cmx.

6.8.1.2 Transformation par électroporation et choc thermique

L'électroporation a été réalisée avec 50 µl de cellules compétentes et 0,1 à 1 µg d'ADN plasmidique. Les cellules ont été soumises (dans une cuve d'électroporation de 0,2 cm) à une

décharge électrique de 25 µF, 600 Ω et 2,5 kV. Immédiatement après l'électroporation 950 µl de milieu LBS ont été ajoutés et le mélange a été incubé pendant 6 min à 46°C (van der Rest *et al.,* 1999). Après ce choc thermique les cellules ont été incubées pendant 1 h à 30°C puis ont été concentrées et étalées sur le milieu sélectif approprié.

6.8.2 Protocole utilisé pour tester la capacité de transformation de l'isolat A33

6.8.2.1 Préparation des cellules électrocompétentes

Les cellules compétentes de l'isolat A33 ont été préparées selon Dower *et al.*, (1988). Un volume de 100 ml de milieu LB a été inoculé au 1/100 avec une préculture d'une nuit préparée à partir d'une colonie isolée et fraîche. Les bactéries ont été cultivées jusqu'à une DO_{600} de 0,5 à 1 puis la culture a été incubée dans la glace pendant 3 h. Les cellules ont été ensuite concentrées par une centrifugation à 8000 g pendant 5 min à 4°C. Le culot a été lavé dans 100 ml d'eau stérile froide, les cellules ont été collectées par centrifugation à 8000 g pendant 5 min à 4°C et lavées à nouveau dans 50 ml d'eau stérile froide. Deux lavages ont été ensuite réalisés dans du glycérol 10 % froid (2 ml). Les cellules ont été reprises dans du glycérol 10 % (0,5 ml) puis ont été utilisées directement pour la transformation ou ont été conservées à -80°C.

6.8.2.2 Test de transformation par électroporation

L'électroporation a été réalisée selon Dower *et al.*, (1988). Environ 1 µg d'ADN du plasmide pDM302 a été ajouté à 50 µl de cellules de l'isolat A33 préparées précédemment. Le mélange a été transféré dans une cuve d'électroporation de 0,2 cm et a été soumis à une décharge électrique de 1,6 kV, 200 ou 400 Ω et 25 µF. Immédiatement après l'électroporation, 950 µl de milieu SOC ont été ajoutés et la suspension a été incubée pendant 1 h à 30°C. Après l'incubation, les cellules ont été concentrées par centrifugation et élimination du surnageant puis étalées sur du milieu LB-agar additionné de chloramphénicol (15 µg/ml).

6.9 Construction d'une banque d'ADN de l'isolat A33

6.9.1 Digestion partielle de l'ADN total

Afin de déterminer les conditions de digestion avec l'enzyme *Bsp*143I permettant d'obtenir le maximum de fragments d'ADN de taille 7 à 10 kb, des tests ont été réalisés en variant la concentration de l'enzyme. Ces tests ont été effectués dans un volume total de 10 µl avec 300 ng d'ADN de l'isolat A33 et 0,5 ; 0,25, 0,125 ou 0,0625 unité d'enzyme. Les mélanges ont été incubés à 37°C pendant 15 min puis la réaction a été stoppée par une incubation à 65°C pendant 20 min. Après une électrophorèse sur gel d'agarose, une estimation de la taille des fragments de digestion a permis de déterminer la concentration optimale de l'enzyme (0,25 U d'enzyme pour 300 ng d'ADN). Trois digestions partielles ont alors été réalisées dans un volume final de 420 µl en utilisant 12,5 µg d'ADN et 10,5 unités d'enzyme. Une électrophorèse sur gel d'agarose a confirmé que le résultat de ces trois digestions partielles est identique à celui obtenu dans les essais préalables. Les trois digestions ont été groupées et l'ADN a été concentré par passage sur colonne "Microcon YM-30" (Millipore).

6.9.2 Fractionnement de l'ADN hydrolysé avec *Bsp*143I par centrifugation en gradient de saccharose

L'ADN de l'isolat A33, partiellement digéré avec l'enzyme de restriction *Bsp*143I, a été fractionné par centrifugation sur gradient de saccharose. Des solutions contenant 10 %, 13 %, 16 %, 19 %, 22 %, 25 %, 28 %, 31 %, 34 %, 37 % et 40 % de saccharose ont été préparées dans un tampon NaCl 0,5 M, Tris-HCl 10 mM (pH 8), EDTA 1 mM (pH 8). Dans un tube à centrifuger de 12 ml, un gradient de saccharose (de 40 % à 10 %) a été créé par dépôt successif de 1 ml de chaque solution. L'ADN de l'isolat A33 hydrolysé par *Bsp*143I a été déposé au sommet de ce gradient. Après une centrifugation à 60000 *g* pendant 22 h à 20°C, 60 fractions de 200 µl ont été récupérées à l'aide d'une pompe péristaltique. Un échantillon (10 µl) de chaque fraction a été analysé par électrophorèse sur gel d'agarose. Les fractions contenant les fragments de la taille désirée ont été sélectionnées puis groupées et concentrées par passage sur colonne "Microcon YM-30" (Millipore) afin d'éliminer le saccharose.

6.9.3 Conservation de la banque

Des volumes de 1 à 5 ml de milieu LB additionné de 25 % de glycérol ont été ajoutés aux géloses contenant les transformants constituant la banque. Ces derniers ont été mis en suspension à l'aide d'un râteau stérile. Les suspensions ont été groupées puis concentrées par centrifugation et élimination du surnageant. La banque a été ensuite aliquotée et conservée à -80°C.

6.9.4 Criblage de la banque d'ADN chez *E. coli* MA1 et transfert dans *C. glutamicum* ArsB1-B2

Un volume de 100 µl du stock de la banque a été étalé sur milieu LB additionné de 2 mM As(III) ou 4 mM As(V). Les boites ont ensuite été incubées pendant 24 h à 37°C.
Pour le transfert de la banque dans *C. glutamicum* ArsB1-B2 nous avons d'abord extrait les plasmides recombinants à partir de 200 µl du stock de la banque. Cet ADN plasmidique (environ 1 µg) a été utilisé pour transformer des cellules compétentes de *C. glutamicum* ArsB1-B2. Les transformants ont été étalés sur milieu LB additionné de 14 mM As(III) et incubés pendant 48 h à 30°C.

Résultats & Discussion

Chapitre I : Diversité des gènes de transporteurs d'arsénite de bactéries du sol résistantes à l'arsenic

1 Introduction

Dans cette première partie du travail, nous avons entrepris de définir des amorces dégénérées qui permettent l'amplification des gènes de transporteurs d'arsénite appartenant aux deux familles ArsB et Acr3p. Ce chapitre comprend deux parties : d'une part la définition et la validation des couples d'amorces dégénérées et d'autre part l'identification, la caractérisation et l'analyse de la diversité des transporteurs d'arsénite d'isolats bactériens du sol résistants à l'arsenic.

2 Conception d'oligonucléotides dégénérés permettant la détection des gènes de transporteurs d'arsénite

Afin de définir des amorces dégénérées permettant la détection des transporteurs d'arsénite appartenant aux 2 familles connues (ArsB et Acr3p), nous avons commencé par réaliser une analyse phylogénétique de diverses séquences de transporteurs d'arsénite. Le programme CODEHOP a été ensuite utilisé pour dessiner les amorces dégénérées.

2.1 Analyse phylogénétique de 75 séquences protéiques de transporteurs d'arsénite

Soixante-quinze séquences protéiques de transporteurs d'arsénite (dont 65 de bactéries, 2 d'archaebactéries et 8 de champignons) ont été utilisées pour établir l'analyse phylogénétique. Parmi ces séquences, certaines sont celles de transporteurs d'arsénite connus pour être impliqués dans la résistance à l'arsenic, d'autres sont celles de transporteurs putatifs d'arsénite.

Les résultats de l'analyse phylogénétique (figure 23) confirment que les transporteurs d'arsénite sont divisés en 2 grands groupes qui correspondent aux deux familles ArsB et Acr3p. La famille Acr3p est elle-même divisée en 2 groupes, ce qui est cohérent avec les résultats de l'analyse phylogénétique de Wysocki et *al.* (2003), réalisée sur 45 séquences de transporteurs d'arsénite appartenant à la famille Acr3p. Nous avons attribué aux 2 groupes Acr3p les désignations suivantes : Acr3(1)p et Acr3(2)p. Le groupe Acr3(1)p comporte un sous-groupe contenant uniquement des transporteurs d'arsénite de champignons. Ce sous groupe n'a pas été considéré dans la suite de notre analyse.



Figure 23. Phylogénie de 75 séquences protéiques de transporteurs d'arsénite.
Les numéros d'accession des séquences sont présentés entre parenthèses. Les lettres A, B et C désignent respectivement archaebactéries, bactéries et champignons. Un même organisme peut présenter plusieurs gènes *arsB/ACR3*. Les valeurs de *bootstrap* sont indiquées sur les noeuds.

2.2 Conception des oligonucléotides dégénérés

Le programme CODEHOP a été utilisé afin de dessiner des amorces dégénérées à partir de l'alignement des séquences protéiques des transporteurs d'arsénite. Ces amorces présentent une structure hybride avec une extrémité 3' dégénérée (environ 11 bp) et une extrémité 5' non dégénérée (environ 17 pb) (Rose *et al.*, 2003). Étant donné qu'aucune région conservée commune aux différents groupes (ArsB, Acr3(1)p et Acr3(2)p) n'a pu être détectée, nous avons conçu un jeu d'amorce CODEHOP par groupe.

Les séquences en acides aminés utilisées pour dessiner les amorces sont encadrées sur les figures 24, 25 et 26. Pour chaque groupe de transporteurs, 3 amorces dont 2 externes et une interne ont été définies. Les couples d'amorces darsB1F/darsB3R, dacr2F/dacr1R et dacr6F/dacr4R ont été conçus dans le but de vérifier la spécificité des amplifiats obtenus respectivement avec les couples d'amorces darsB1F/darsB1R, dacr1F/dacr1R et dacr5F/dacr4R.

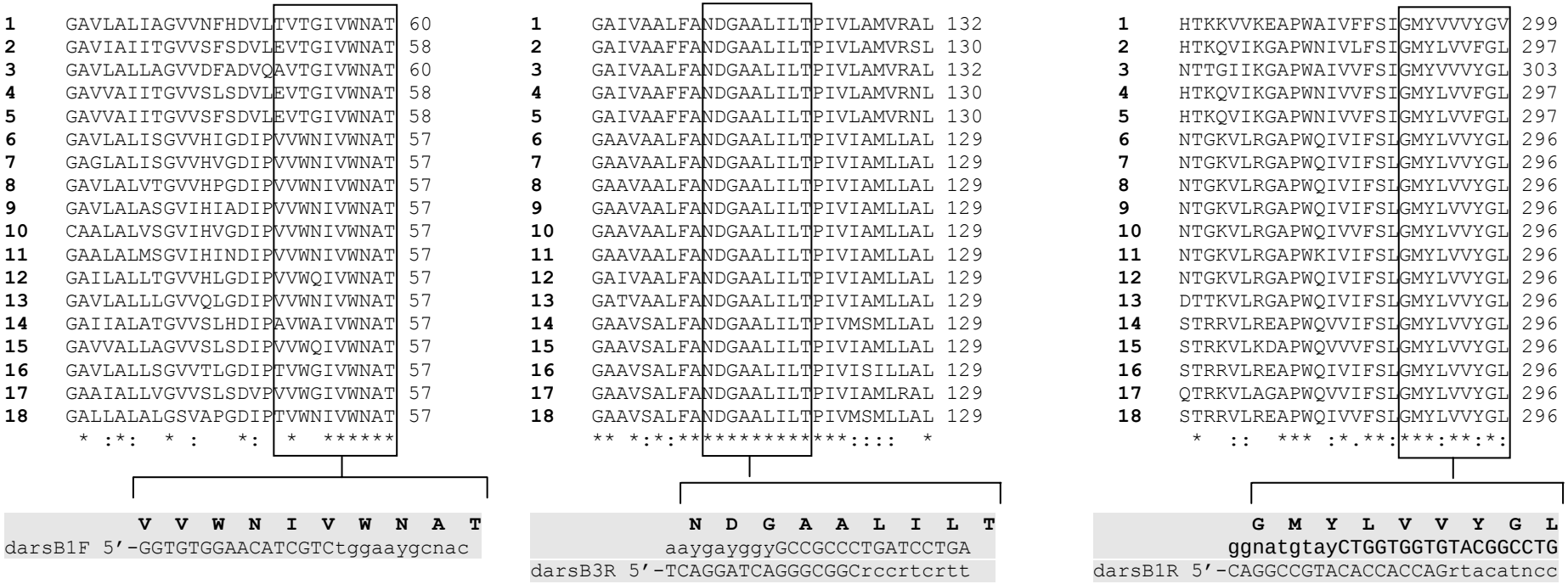


Figure 24. Alignement des séquences protéiques des transporteurs d'arsénite de la famille ArsB.
Les cadres noirs représentent les séquences d'acides aminés utilisées pour dessiner les amorces dégénérées darsB1F, darsB3R et darsB1R. L'alignement a été réalisé avec les séquences des transporteurs d'arsénite des bactéries suivantes : **1** : *B. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168, **2** : *S. epidermidis* ATCC 12228, **3** : *B. halodurans* C-125, **4** : pI258 *S. aureus*, **5** : *S. xylosus*, **6** : R46 *S. typhimurium*, **7** : *K. oxytoca*, **8** : *E. coli* K12, **9** : R773 *E. coli*, **10** : *Y. enterocolitica*, **11** : *E. cloacae*, **12** : *S. marcescens*, **13** : *Shewanella* sp. ANA-3, **14** : *P. putida* KT2440 (AAN68325), **15** : *P. putida* KT2440 (AAN67546), **16** : *P. fluorescens* PfO-1, **17** : *R. palustris* CGA009 et **18** : *P. aeruginosa* PAO1. Les autres chiffres indiquent les positions des acides aminés au niveau des séquences protéiques. La partie dégénérée de l'amorce est en lettres minuscules : y (c ou t), n (a, c, g ou t) et r (a ou g).

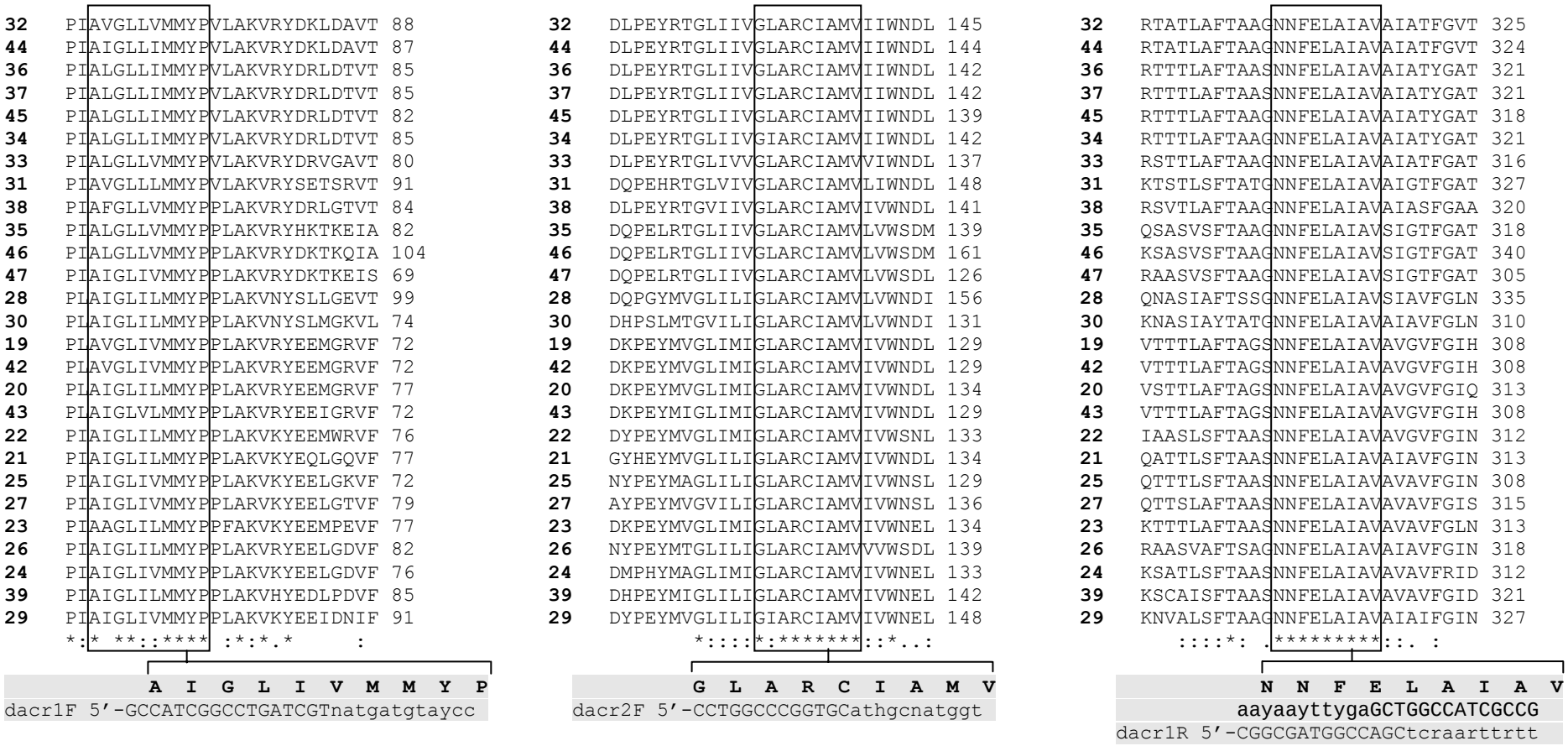


Figure 25. Alignement des séquences protéiques des transporteurs d'arsénite du groupe Acr3(1)p.
Les cadres noirs représentent les séquences d'acides aminés utilisées pour dessiner les amorces dégénérées dacr1F, dacr2F et dacr1R. L'alignement a été réalisé avec les séquences des transporteurs d'arsénite des bactéries suivantes: **19** : *B. cereus* G9241, **20** : *Sinorhizobium* sp. As4, **21** : *D. desulfuricans* G20, **22** : pli0039 *L. innocua*, **23** : *G. metallireducens*, **24** : *C. tepidum* TLS, **25** : *M. thermoacetica* ATCC 39073, **26** : *N. punctiforme*, **27** : *M. barkeri*, **28** : *V. vulnificus* YJ016, **29** : *C. hutchinsonii*, **30** : *P. profundum*, **31** : *K. radiotolerans* SRS30216, **32** : *S. coelicolor* A3(2), **33** : *M. magnetotacticum*, **34** : *R. erythropolis*, **35** : *C. efficiens* YS-314, **36** : *M. bovis* subsp. *bovis* AF2122/97, **37** : *M. tuberculosis* H37Rv, **38** : *T. fusca*, **39** : *M. thermautotrophicus*, **42** : *B. anthracis* str. Ames, **43** : *B. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168, **44** : *S. coelicolor* A3(2), **45** : *M. smegmatis* et **46** : *C. glutamicum* ATCC 13032 (CAF21519), **47** : *C. glutamicum* ATCC 13032 (CAF18833). Les autres chiffres indiquent les positions des acides aminés au niveau des séquences protéiques. La partie dégénérée de l'amorce est en lettres minuscules : n (a, c, g ou t), y (c ou t), h (a, c ou t) et r (a ou g).

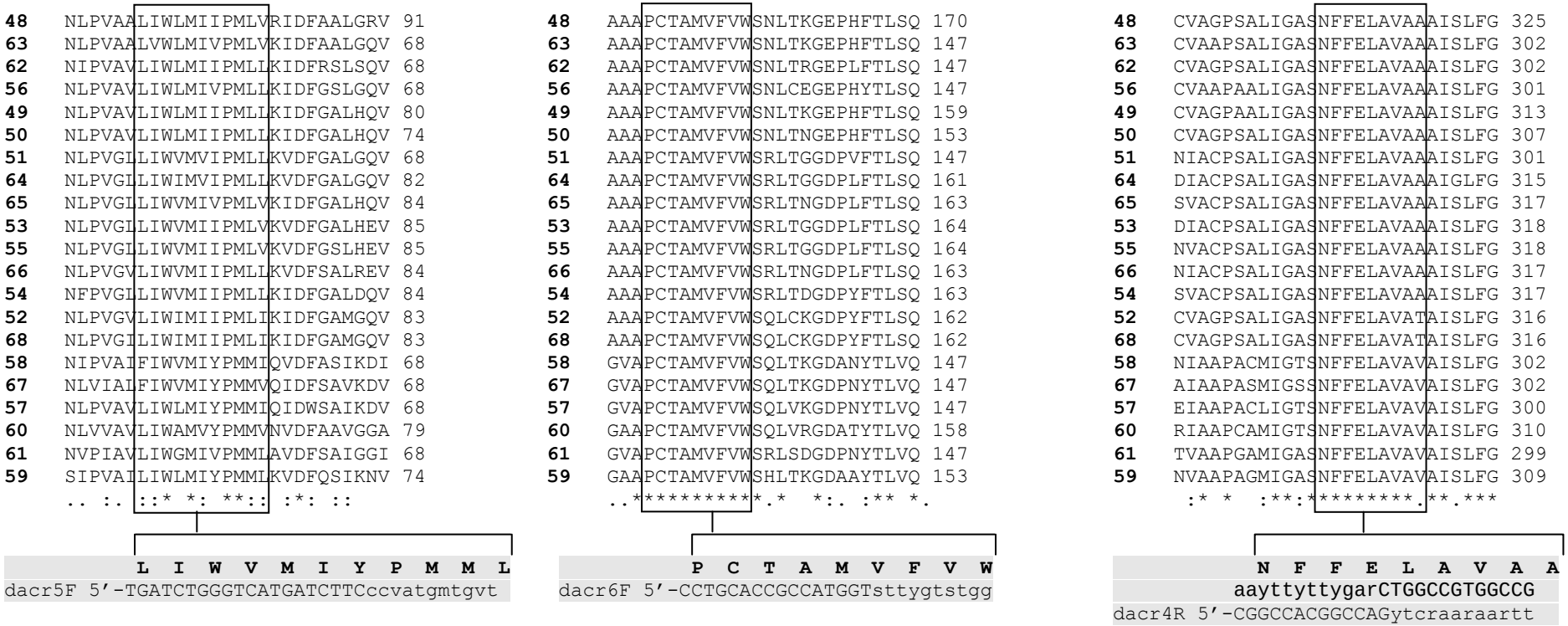


Figure 26. Alignement des séquences protéiques des transporteurs d’arsénite du groupe Acr3(2)p.
Les cadres noirs représentent les séquences d’acides aminés utilisées pour dessiner les amorces dégénérées dacr5F, dacr6F et dacr4R. L’alignement a été réalisé avec les séquences des transporteurs d’arsénite des bactéries suivantes: **48** : *R. palustris* CGA009, **49** : *M. magnetotacticum* (ZP_00054784), **50** : *M. magnetotacticum* (ZP_00054860), **51** : *R. gelatinosus*, **52** : *R. eutropha* JMP134, **53** : *B. cepacia* R18194 (ZP_00216494), **54** : *C. violaceum* ATCC 12472, **55** : *B. cepacia* R1808 (ZP_00221959), **56** : *B. japonicum* USDA 110, **57** : *A. pleuropneumoniae* serovar 1 str. 4074, **58** : *M. degradans* 2-40, **59** : *B. thetaiotaomicron* VPI-5482, **60** : *R. sphaeroides*, **61** : *A. tumefaciens* str. C58, **62** : *Mesorhizobium* sp. BNC1, **63** : *A. vinelandii* AvOP, **64** : *S. flexneri* 2a str. 2457T, **65** : *R. ferrireducens* DSM 15236, **66** : *S. oneidensis* MR-1 et **67** : *C. metallidurans* CH34. Les autres chiffres indiquent les positions des acides aminés au niveau des séquences protéiques. La partie dégénérée de l’amorce est en lettres minuscules : v (a, c ou g), m (a ou c), s (c ou g), y (c ou t) et r (a ou g).

2.3 Test de l'efficacité des jeux d'amorces dégénérées

Afin de vérifier l'efficacité des 3 jeux d'amorces dégénérées que nous avons conçues, des réactions PCR ont été réalisées en utilisant les ADN des souches de *Shewanella* sp. ANA-3, *M. smegmatis*, *C. metallidurans*, *S. oneidensis* MR-1 ainsi que l'ADN plasmidique pUM3. L'ADN génomique de la souche *E. coli* AW3110 (délétée pour l'opéron *ars*) a été utilisé comme témoin négatif. Comme précédemment révélé par l'analyse phylogénétique (figure 23), les transporteurs d'arsénite de *Shewanella* sp. ANA3 et du plasmide pUM3 appartiennent à la famille ArsB. Celui de *M. smegmatis* appartient au groupe Acr3(1)p et les transporteurs d'arsénite de *C. metallidurans* et *S. oneidensis* MR-1 appartiennent au groupe Acr3(2)p.
Les tailles attendues des fragments PCR sont indiquées dans le tableau 7. Les amplifications croisées ont été réalisées uniquement avec les couples d'amorces darsB1F/1R, dacr1F/1R et dacr5F/4R. Toutes les amplifications ont été réalisées avec un programme PCR "touchdown" (réduction de la température d'hybridation lors des premiers cycles, voir matériel et méthodes section 6.4).
Les résultats présentés dans la figure 27 montrent que chaque couple d'amorce a permis d'obtenir un amplifiat de la taille attendue.

Tableau 7. Tailles attendues (en pb) des produits PCR

	darsB1F/1R	**dacr1F/1R**	**dacr5F/4R**	**darsB1F/3R**	**dacr2F/1R**	**dacr6F/4R**
Shewanella sp. ANA-3	744	-	-	213	NR	NR
pUM3	744	-	-	213	NR	NR
E. coli AW3110	-	-	-	NR	NR	NR
M. smegmatis	-	753	-	NR	555	NR
C. metallidurans	-	-	741	NR	NR	510
S. oneidensis MR-1	-	-	738	NR	NR	507

NR : PCR non réalisée.
- : Pas de fragment PCR attendu.

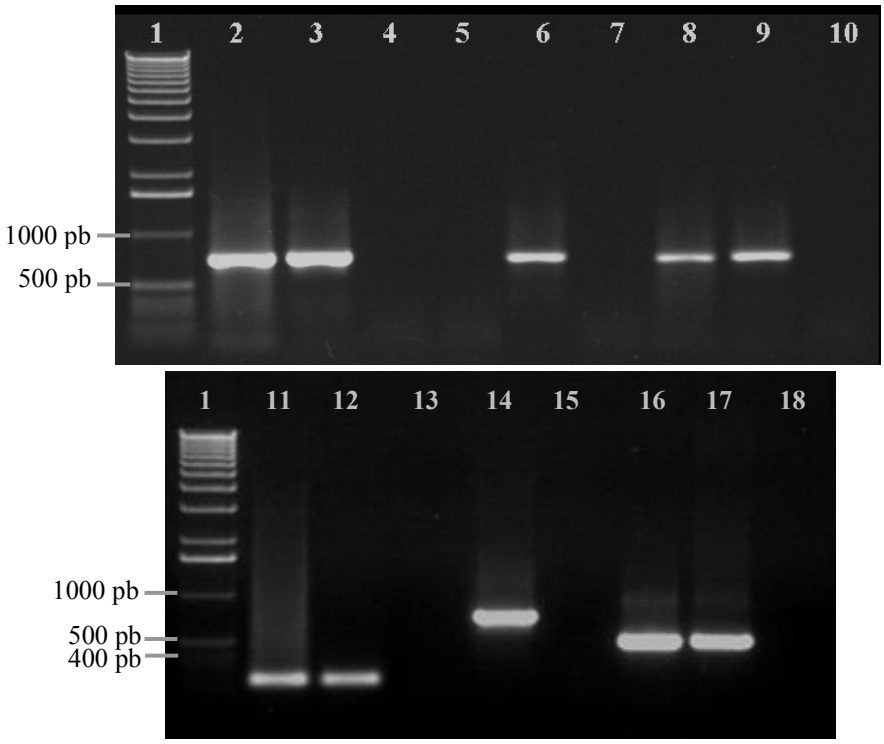


Figure 27. Test de la spécificité des amorces.
Gel d'agarose montrant les produits PCR obtenus avec les amorces darsB1F/darsB1R (puits 2, 3, 4 et 5), dacr1F/dacr1R, (puits 6 et 7), dacr5F/dacr4R (puits 8, 9 et 10), darsB1F/3R (puits 11, 12 et 13), dacr2F/1R (puits 14 et 15) et dacr6F/4R (puits 16, 17 et 18). Puits: 1, marqueur de taille (1 kb) ; 2 et 11, *Shewanella* sp. ANA-3 ; 3 et 12, plasmide pUM3 ; 4, *E. coli* AW3110 ; 6 et 14, *M. smegmatis* ; 8 et 16, *S. oneidensis* MR-1 ; 9 et 17, *C. metallidurans* AE126 ; 5, 7, 10, 13, 15 et 18 contrôle négatif de la PCR.

Les résultats obtenus pour les amplifications croisées correspondent également aux résultats attendus sauf dans le cas de l'amplification de l'ADN de *Shewanella* sp. ANA3 avec le couple d'amorce dacr5F/4R (spécifique aux transporteurs d'arsénite du groupe Acr3p(2)) où on obtient un amplifiat d'une taille approximative de 750 pb. Cet amplifiat correspondrait soit un gène putatif de transporteur d'arsénite du groupe Acr3p(2), soit à une amplification non spécifique.

A part cette dernière exception, les résultats des tests PCR réalisés valident dans un premier temps l'efficacité des couples d'amorces pour amplifier les gènes des transporteurs d'arsénite du groupe correspondant. Une autre étape de vérification a été réalisée dans la deuxième partie de cette étude.

3 Analyse de la diversité des gènes de transporteurs d'arsénite d'isolats bactériens du sol résistants à l'arsenic

Le laboratoire LIEBE dispose d'une collection de 165 isolats bactériens résistants à l'arsenic provenant de deux sols nommés A (114 isolats) et B (51 isolats). Les 2 échantillons de sols ont été prélevés à partir d'une même forêt située dans la commune de Longeville-les-St-Avold (Lorraine, France). Le sol A désigné comme "sol non contaminé" contient 12,2 mg/kg d'arsenic et 253 mg/kg de plomb. Le sol B désigné comme "sol contaminé", contient 135 mg/kg d'arsenic et 2880 mg/kg de plomb. Les fortes teneurs métalliques ne sont pas dûes à une contamination d'origine industrielle mais au fond géochimique naturel. Les caractéristiques physiques et chimiques des deux sols sont indiquées en annexe I. Les 165 isolats ont été sélectionnés sur milieu LB additionné soit de 7 mM As(III) soit de 20 mM As(V), puis ont été stockés à -80°C (Beyuki, 2004).

L'objectif de cette partie est double, d'une part la vérification de l'efficacité de chaque couple d'amorce à détecter spécifiquement les gènes de transporteurs d'arsénite du groupe correspondant et d'autre part l'analyse de la diversité des gènes de transporteurs d'arsénite des isolats des sols A et B.

Afin de limiter le nombre des isolats à analyser, des groupes morphologiques ont été déterminés et un représentant de chaque groupe a été choisi pour la suite de l'étude. Les isolats sélectionnés ont été caractérisés en déterminant leurs niveaux de résistance à As(III), As(V) et Sb(III) ainsi que leur capacité à oxyder As(III) et/ou à réduire As(V). Ils ont été également identifiés par séquençage de leur ADNr 16S.

Les couples d'amorces que nous avons définis dans la première partie de ce travail, ont été ensuite utilisés afin de détecter la présence de gène de transporteur d'arsénite dans les isolats sélectionnés.

3.1 Caractérisation morphologique des isolats

Les caractères morphologiques utilisés pour classer les différents isolats en groupes, sont l'aspect de la colonie (couleur, taille et forme) et la coloration de Gram. Quarante et un groupes ont été ainsi formés. Les caractéristiques morphologiques partielles de chaque groupe sont indiquées dans le tableau 8.

Tableau 8. Caractéristiques des 41 groupes morphologiques

Origine	Isolat représentant du groupe	Description de la colonie*	Coloration de Gram
Sol A			
	A01	petite, rouge-rose	Gram +
	A02	petite, jaune	Gram +
	A03	moyenne, jaune pâle	Gram +
	A04	moyenne, blanche crème	Gram -
	A05	moyenne, saumon	Gram +
	A06	petite, jaune-orangé	Gram +
	A07	grande, jaune-orangé	Gram -
	A08	moyenne, orangé	Gram +
	A09	petite, orangé-marron	Gram -
	A10	grande, jaunâtre	Gram -
	A11	petite, blanche crème	Gram +
	A12	moyenne, beige clair	Gram +
	A13	petite, beige clair	Gram +
	A14	grande, beige clair	Gram +
	A15	moyenne, pourtour fimbrié, beige clair	Gram +
	A16	moyenne, aspect laiteux, beige vert	Gram -
	A17	grande, pourtour fimbrié, beige vert	Gram +
	A18	moyenne, beige vert	Gram -
	A19	petite, jaune pâle	Gram +
	A20	moyenne, beige	Gram +
	A21	grande, pourtour lobé, beige clair	Gram +
	A22	grande, saumon clair	Gram +
	A23	moyenne, blanche, transparente	Gram -
	A24	petite, blanche	Gram +
	A25	petite, jaune-orangé clair	Gram -
	A26	moyenne, aspect laiteux, blanche	Gram -
	A27	petite, blanche crème	Gram -
	A28	petite, jaunâtre	Gram -
	A29	moyenne, jaune pâle, transparente	Gram -
	A30	grande, blanche crème à pourtour transparent	Gram -
	A31	moyenne, jaunâtre	Gram -
	A32	moyenne, blanche crème à pourtour transparent	Gram -
	A33	moyenne, jaunâtre	Gram +
Sol B			
	B01	petite, jaune	Gram +
	B02	moyenne, beige vert	Gram +
	B03	petite, blanche	Gram +
	B04	grande, aspect laiteux, beige vert	Gram -
	B05	grande, saumon clair	Gram +
	B06	grande, blanche crème, transparente	Gram -
	B07	moyenne, blanche crème	Gram -
	B08	moyenne, jaune pâle, transparente	Gram -

* Les petites colonies (< 1 mm), les moyennes (1 à 3 mm) et les grandes (> 3 mm).

3.2 Identification des 41 isolats sélectionnés

La méthode modifiée de Pitcher (Pitcher *et al.*, 1989) a été utilisée pour extraire aussi bien l'ADN total des isolats Gram positif que Gram négatif. L'ADNr 16S de chaque isolat a été ensuite amplifié au moyen des amorces w01 et w02 et le produit d'amplification a été cloné dans le vecteur pCR2.1. Selon le sens d'insertion du gène ADNr 16S, l'amorce M13F ou M13R a été utilisée pour le séquençage. Ce sens a été déterminé par une amplification du vecteur recombinant au moyen des amorces M13F et w02.

Les séquences obtenues sont de tailles variables allant de 564 à 912 pb. Elles ont été comparées aux séquences nucléotidiques des banques de données en utilisant le programme BlastN. Pour chaque isolat, la bactérie qui présente la séquence du gène ADNr 16S la plus proche ainsi que le pourcentage d'identité correspondant sont indiqués dans le tableau 9.

L'ensemble des séquences ADNr 16S a été ensuite utilisé afin d'établir une analyse phylogénétique. L'arbre phylogénétique résultant est représenté dans la figure 28.

Les résultats obtenus indiquent que les 41 isolats peuvent être classés en 22 genres bactériens dont 14 actinobactéries, 12 γ-protéobactéries, 8 firmicutes, 5 α-protéobactéries et 2 β-protéobactéries. A l'exception des β-protéobactéries, chaque groupe taxonomique est retrouvé aussi bien dans le sol A que dans le sol B. Le sol A présente cependant une diversité bactérienne plus importante avec 20 genres différents comparés à 7 genres isolés du sol B.

Tableau 9. Identification moléculaire des 41 isolats

Isolat	Bactérie présentant la séquence du gène ADNr 16S la plus proche	Identité (%)	Groupe taxonomique
A01	*Arthrobacter* sp.	99 %	actinobactérie
A02	*Micrococcus luteus*	99 %	actinobactérie
A03	*Arthrobacter* sp.	98 %	actinobactérie
A04	*Acinetobacter lwoffii*	99 %	γ-protéobactérie
A05	*Kocuria* sp.	99 %	actinobactérie
A06	*Pseudoclavibacter helvolus*	99 %	actinobactérie
A07	*Pseudomonas* sp.	99 %	γ-protéobactérie
A08	*Planococcus* sp.	98 %	firmicute
A09	*Stenotrophomonas* sp.	100 %	γ-protéobactérie
A10	*Paracoccus* sp.	99 %	α-protéobactérie
A11	*Zimmermannella faecalis*	99 %	actinobactérie
A12	*Bacillus* sp.	99 %	firmicute
A13	*Bacillus massiliensis*	97 %	firmicute
A14	*Bacillus* sp.	99 %	firmicute
A15	*Tsukamurella strandjordae*	99 %	actinobactérie
A16	*Sinorhizobium* sp.	99 %	α-protéobactérie
A17	*Bacillus* sp.	99 %	firmicute
A18	*Stenotrophomonas* sp.	99 %	γ-protéobactérie
A19	*Plantibacter agrosticola*	99 %	actinobactérie
A20	*Sporosarcina* sp.	99 %	firmicute
A21	*Streptomyces* sp.	99 %	actinobactérie
A22	*Bacillus* sp.	99 %	firmicute
A23	*Pseudomonas* sp.	99 %	γ-protéobactérie
A24	*Micrococcus luteus*	99 %	actinobactérie
A25	*Variovorax paradoxus*	99 %	β-protéobactérie
A26	*Phyllobacterium myrsinacearum*	99 %	α-protéobactérie
A27	*Aminobacter aminovorans*	99 %	α-protéobactérie
A28	*Stenotrophomonas* sp.	99 %	γ-protéobactérie
A29	*Pseudomonas fluorescens*	100 %	γ-protéobactérie
A30	*Pseudomonas putida*	100 %	γ-protéobactérie
A31	*Variovorax* sp.	99 %	β-protéobactérie
A32	*Acinetobacter* sp.	99 %	γ-protéobactérie
A33	*Microbacterium* sp.	99 %	actinobactérie
B01	*Micrococcus* sp.	99 %	actinobactérie
B02	*Arthrobacter* sp.	98 %	actinobactérie
B03	*Rhodococcus* sp.	99 %	actinobactérie
B04	*Ensifer adhaerens*	100 %	α-protéobactérie
B05	*Bacillus* sp.	99 %	firmicute
B06	*Pseudomonas* sp.	99 %	γ-protéobactérie
B07	*Acinetobacter lwoffii*	99 %	γ-protéobactérie
B08	*Pseudomonas* sp.	99 %	γ-protéobactérie

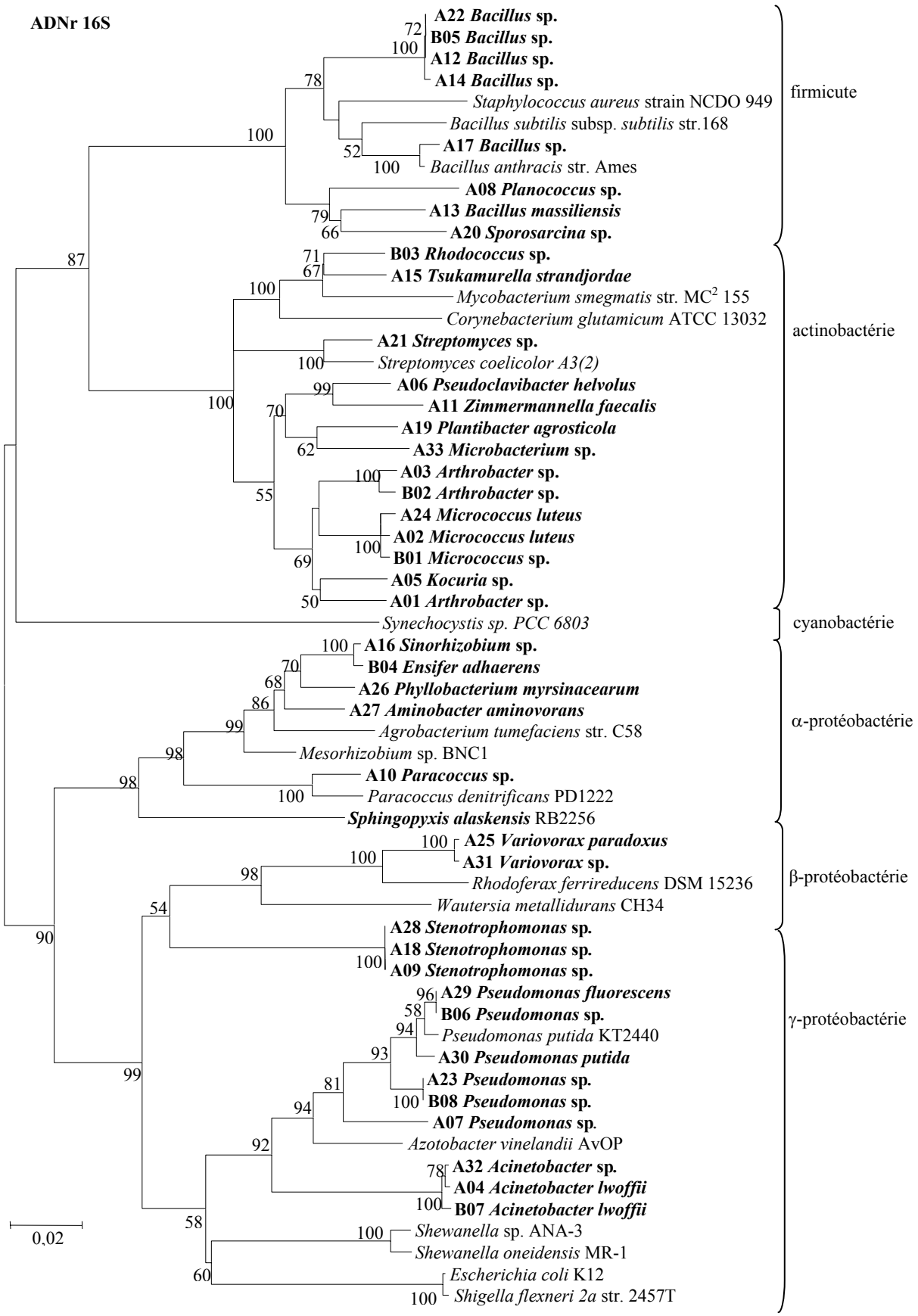


Figure 28. Phylogénie des séquences partielles d'ADNr 16S.
Les séquences des bactéries de cette étude sont en gras. Les valeurs de *bootstrap* supérieures à 50 % sont indiquées sur les noeuds.

3.3 Détermination des niveaux de résistance des 41 isolats à As(III), As(V) et Sb(III)

Le niveau de résistance de chaque isolat à As(III), As(V) et Sb(III) a été déterminé sur milieu LB additionné de 1,75 à 56 mM As(III), 20 à 640 mM As(V) ou 0,2 à 12,8 mM Sb(III). Le niveau de résistance à l'antimoine a été déterminé parce que certains transporteurs d'arsénite, par exemple celui d'*E. coli* (San Francisco *et al.*, 1990), sont capables d'expulser l'antimoine.
Afin de mieux analyser les résultats de ce test nous avons inclus des souches de référence résistantes à l'arsenic et contenant un système de résistance *ars* (par exemple *E. coli* W3110 et *C. glutamicum* RES 167), ainsi que des souches sensibles à l'arsenic comme *C. glutamicum* ArsB1-B2 (contenant 2 gènes *arsB* inactivés) et *E. coli* AW3110 (délétée pour l'opéron *ars*).
Les résultats présentés dans le tableau 10 indiquent que pour chaque métalloïde, les CMIs varient grandement d'une souche à l'autre. D'autre part, pour tous les isolats, la toxicité des 3 métalloïdes peut être classée selon l'ordre suivant : As(V) <As(III)< Sb(III).
Les CMIs les plus élevées ont été observées chez des bactéries Gram positif. L'isolat A08 (identifié comme *Planococcus* sp.) est en effet capable de se développer dans un milieu contenant 640 mM As(V). De même l'isolat A33 (identifié comme *Microbacterium* sp.) est particulièrement résistant à As(III). Enfin 3 isolats (identifiés comme *Bacillus* sp.) présentent une CMI pour Sb(III) supérieure à 12,8 mM.
On remarque également que toutes les souches sensibles à l'antimoine (CMI < 0,1 mM) sont des actinobactéries. Ce même groupe contient la majorité des souches résistantes à As(V).
A l'exception de ces 2 dernières observations, il n'y a pas de corrélation entre le niveau de résistance des isolats aux métalloïdes, leur affiliation phylogénétique et leur sol d'origine.

Tableau 10. CMI d'As(III), As(V) et Sb(III) pour les 41 isolats

Souches et isolat	CMI (mM)		
	As(V)	As(III)	Sb(III)
A01 *Arthrobacter* sp.	160	1,75	0,8
A02 *Micrococcus luteus*	640	7	0,1
A03 *Arthrobacter* sp.	320	14	0,1
A04 *Acinetobacter lwoffii*	320	14	1,6
A05 *Kocuria* sp.	640	7	0,1
A06 *Pseudoclavibacter helvolus*	640	3,5	0,1
A07 *Pseudomonas* sp.	320	7	1,6
A08 *Planococcus* sp.	> 640	14	1,6
A09 *Stenotrophomonas* sp.	320	14	0,8
A10 *Paracoccus* sp.	160	3,5	0,8

A11 *Zimmermannella faecalis*	640	14	0,4
A12 *Bacillus* sp.	40	7	>12,8
A13 *Bacillus massiliensis*	320	1,75	0,8
A14 *Bacillus* sp.	320	7	>12,8
A15 *Tsukamurella strandjordae*	160	1,75	0,1
A16 *Sinorhizobium* sp.	160	1,75	0,4
A17 *Bacillus* sp.	40	7	0,4
A18 *Stenotrophomonas* sp.	320	1,75	1,6
A19 *Plantibacter agrosticola*	80	1,75	0,1
A20 *Sporosarcina* sp.	160	14	1,6
A21 *Streptomyces* sp.	40	1,75	0,1
A22 *Bacillus* sp.	80	7	1,6
A23 *Pseudomonas* sp.	640	14	0,4
A24 *Micrococcus luteus*	640	3,5	0,1
A25 *Variovorax paradoxus*	160	7	0,8
A26 *Phyllobacterium myrsinacearum*	320	3,5	0,4
A27 *Aminobacter aminovorans*	160	3,5	1,6
A28 *Stenotrophomonas* sp.	320	3,5	1,6
A29 *Pseudomonas fluorescens*	160	7	1,6
A30 *Pseudomonas putida*	320	3,5	0,8
A31 *Variovorax* sp.	320	3,5	0,4
A32 *Acinetobacter* sp.	320	14	3,2
A33 *Microbacterium* sp.	640	56	3,2
B01 *Micrococcus* sp.	640	7	0,1
B02 *Arthrobacter* sp.	160	3,5	0,1
B03 *Rhodococcus* sp.	320	14	0,8
B04 *Ensifer adhaerens*	160	1,75	0,4
B05 *Bacillus* sp.	80	14	>12,8
B06 *Pseudomonas* sp.	320	1,75	0,8
B07 *Acinetobacter lwoffii*	40	3,5	1,6
B08 *Pseudomonas* sp.	320	14	0,4
E. coli W3110	160	7	> 12,8
E. coli AW3110	20	1,75	0,4
E. coli DH10B/pUM3	320	28	> 12,8
C. glutamicum RES167	> 640	28	0,2
C. glutamicum ArsB1-B2	20	3,5	0,2
Shewanella sp. ANA-3	640	14	0,8
S. oneidensis MR-1	80	1,75	0,8
M. smegmatis mc^2155	40	1,75	0,2

3.4 Recherche de gènes de transporteurs d'arsénite chez les 41 isolats

3.4.1 Criblage des isolats par PCR

Les couples d'amorces externes darsB1F/darsB1R, dacr1F/dacr1R et dacr5F/dacr4R ont été utilisés pour rechercher la présence de gènes de transporteurs d'arsénite au niveau de l'ADN des 41 isolats. Les résultats des amplifications PCR sont présentés dans le tableau 11. On

remarque que parmi les 41 isolats, 29 montrent une amplification positive avec un ou deux couples d'amorces. Parmi ces 29 isolats, 11 sont *arsB*+ (dont 4 firmicutes, 6 γ-protéobactéries et 1 actinobactérie), 16 sont *ACR3(1)*+ (dont 12 actinobactéries, 1 firmicute, 2 γ-protéobactéries et 1 α-protéobactérie) et 5 sont *ACR3*(*2*)+ (dont 4 α-protéobactéries et 1 γ-protéobactérie). Les 3 isolats suivant répondent positivement à deux couples d'amorces : A29 et B06 (*arsB*+ *ACR3(1)*+) et A07 (*arsB*+ *ACR3(2)*+). À l'exception de l'amplifiat obtenu avec l'ADN de l'isolat A01, tous les amplifiats présentent une taille approximative de 750 pb.

Une réponse PCR négative a été obtenue pour 12 isolats qui appartiennent à différents groupes taxonomiques et qui présentent des niveaux de résistance différents aux trois métalloïdes testés.

Tableau 11. Criblage des isolats par PCR en utilisant les 3 couples d'amorces darsB1F/darsB1R, dacr1F/dacr1R et dacr5F/dacr4R

Souches et isolats	***arsB*/*ACR3***		
	arsB	***ACR3(1)***	***ACR3(2)***
Bactéries Gram positif			
Faible % en G+C (firmicutes)			
A12 *Bacillus* sp. (99 %)	+		
A14 *Bacillus* sp. (99 %)	+		
A22 *Bacillus* sp. (99 %)			
A17 *Bacillus* sp. (99 %)		+	
A13 *Bacillus massiliensis* (97 %)			
A20 *Sporosarcina* sp. (99 %)	+		
A08 *Planococcus* sp. (98 %)			
B05 *Bacillus* sp. (99 %)	+		
Haut % en G+C (actinobactéries)			
A15 *Tsukamurella strandjordae* (99 %)		+	
A11 *Zimmermannella faecalis* (99 %)		+	
A06 *Pseudoclavibacter helvolus* (99 %)		+	
A19 *Plantibacter agrosticola* (99 %)			
A33 *Microbacterium* sp. (99 %)		+	
A01 *Arthrobacter* sp. (99 %)	+		
A03 *Arthrobacter* sp. (98 %)		+	
A05 *Kocuria* sp. (99 %)		+	
A24 *Micrococcus luteus* (99 %)		+	
A02 *Micrococcus luteus* (99 %)		+	
A21 *Streptomyces* sp. (99 %)		+	
B03 *Rhodococcus* sp. (99 %)		+	
B02 *Arthrobacter* sp. (98 %)		+	
B01 *Micrococcus* sp. (99 %)		+	
Bactéries Gram négatif			
α-protéobactéries			
A16 *Sinorhizobium* sp. (99 %)			+
A26 *Phyllobacterium myrsinacearum* (99 %)			+
A27 *Aminobacter aminovorans* (99 %)			+

A10 *Paracoccus* sp. (99 %)		+	
B04 *Ensifer adhaerens* (100 %)			+
β-protéobactéries			
A25 *Variovorax paradoxus* (99 %)			
A31 *Variovorax* sp. (99 %)			
γ-protéobactéries			
A23 *Pseudomonas* sp. (99 %)	+		
A30 *Pseudomonas putida* (100 %)	+		
A29 *Pseudomonas fluorescens* (100 %)	+	+	
A07 *Pseudomonas* sp. (99 %)	+		+
B06 *Pseudomonas* sp. (99 %)	+	+	
B08 *Pseudomonas* sp. (99 %)	+		
A04 *Acinetobacter lwoffii* (99 %)			
A32 *Acinetobacter* sp. (99 %)			
B07 *Acinetobacter lwoffii* (99 %)			
A28 *Stenotrophomonas* sp. (99 %)			
A18 *Stenotrophomonas* sp. (99 %)			
A09 *Stenotrophomonas* sp. (100 %)			
Souches de référence			
E. coli W3110	+		
E. coli AW3110			
E. coli DH10B/pUM3	+		
C. glutamicum RES167		+	
C. glutamicum ArsB1-B2			
Shewanella sp. ANA-3	+		+
S. oneidensis MR-1			+
M. smegmatis mc^2155		+	

3.4.2 Clonage, séquençage et phylogénie des séquences de transporteurs d'arsénite

Tous les fragments PCR obtenus ont été récupérés à partir du gel puis clonés dans le vecteur pCR2.1. Les produits de ligations ont été utilisés pour transformer des cellules compétentes d'*E. coli* DH10B. La présence d'un insert de taille correcte a été d'abord vérifiée par PCR sur colonies en utilisant les amorces M13F et M13R. Ces dernières ont été utilisées pour déterminer les séquences des 2 brins d'ADN de chaque insert. Nous avons ainsi obtenu les séquences complètes de tous les fragments PCR. La comparaison de ces séquences avec celles disponibles dans les banques de données protéiques (en utilisant le programme BlastX) a montré que tous les produits PCR obtenus sont homologues à des gènes de transporteurs d'arsénite. Les résulats du séquencage ont également confirmé que chaque couple d'amorce permet l'amplification du groupe de transporteur d'arsénite correspondant.

3.4.3 Analyse phylogénétique

L'ensemble des séquences protéiques obtenues des transporteurs d'arsénite a été utilisé afin d'établir une analyse phylogénétique. Les résultats de cette analyse (figure 29) montrent que les séquences ArsB sont divisées en 2 groupes contenant respectivement des ArsB de *γ*-protéobactéries et des ArsB de firmicutes. La seule exception est la séquence ArsB de l'isolat A01 (*Arthrobacter* sp.) qui semble être éloignée des ArsB connues. Les séquences *arsB*, les plus éloignées sont celles des isolats A01 et A14/A12. Elles présentent 46,9 % d'identité de séquences nucléotidiques.

Les séquences *ACR3(1)* ont été détectées chez 3 groupes taxonomiques : actinobactérie, firmicute et γ-protéobactérie. Cependant, le groupe majoritaire (75 %) est celui des actinobactéries. Les séquences Acr3(1)p des γ-protéobactéries (isolats A29, B06 et A10) forment un groupe distinct contenant également des Acr3(1)p d'*α*-protéobactéries. Les isolats A29 et B06 (identifiés comme *Pseudomonas*) sont celles contenant 2 séquences de transporteurs d'arsénites *arsB* et *ACR3(1)*. La séquence Acr3(1)p de l'isolat A17 (*Bacillus* sp.) est regroupée avec celles des Acr3(1)p d'autres *Bacillus.* Le troisième groupe des Acr3(1)p est formé par 11 séquences d'isolats appartenant au groupe des actinobactéries. Dans ce groupe on retrouve également des séquences de transporteurs d'arsénite d'autres actinobactéries comme *Streptomyces coelicolor* et *M. smegmatis*. Seule la séquence Acr3(1)p de l'isolat A06 (*Pseudoclavibacte*r *helvolus*) ne fait pas partie du groupe des actinobactéries. Les séquences *ACR3(1)* les plus éloignées sont celles des isolats A06 et A17, elles présentent 51,3 % d'identité de séquence.

Cinq séquences *ACR3(2)* ont été détectées chez des isolats Gram négatif. Les quatre séquences les plus proches sont celles d'α-protéobactéries. La séquence la plus éloignée est celle d'une γ-protéobactérie (isolat A07), qui possède en plus de la séquence *ACR3(2)*, une séquence *arsB*. Les séquences *ACR3(2)* des isolats A07 et A26 sont les plus éloignées, elles présentent 66,4 % d'identité de séquences nucléotidiques.

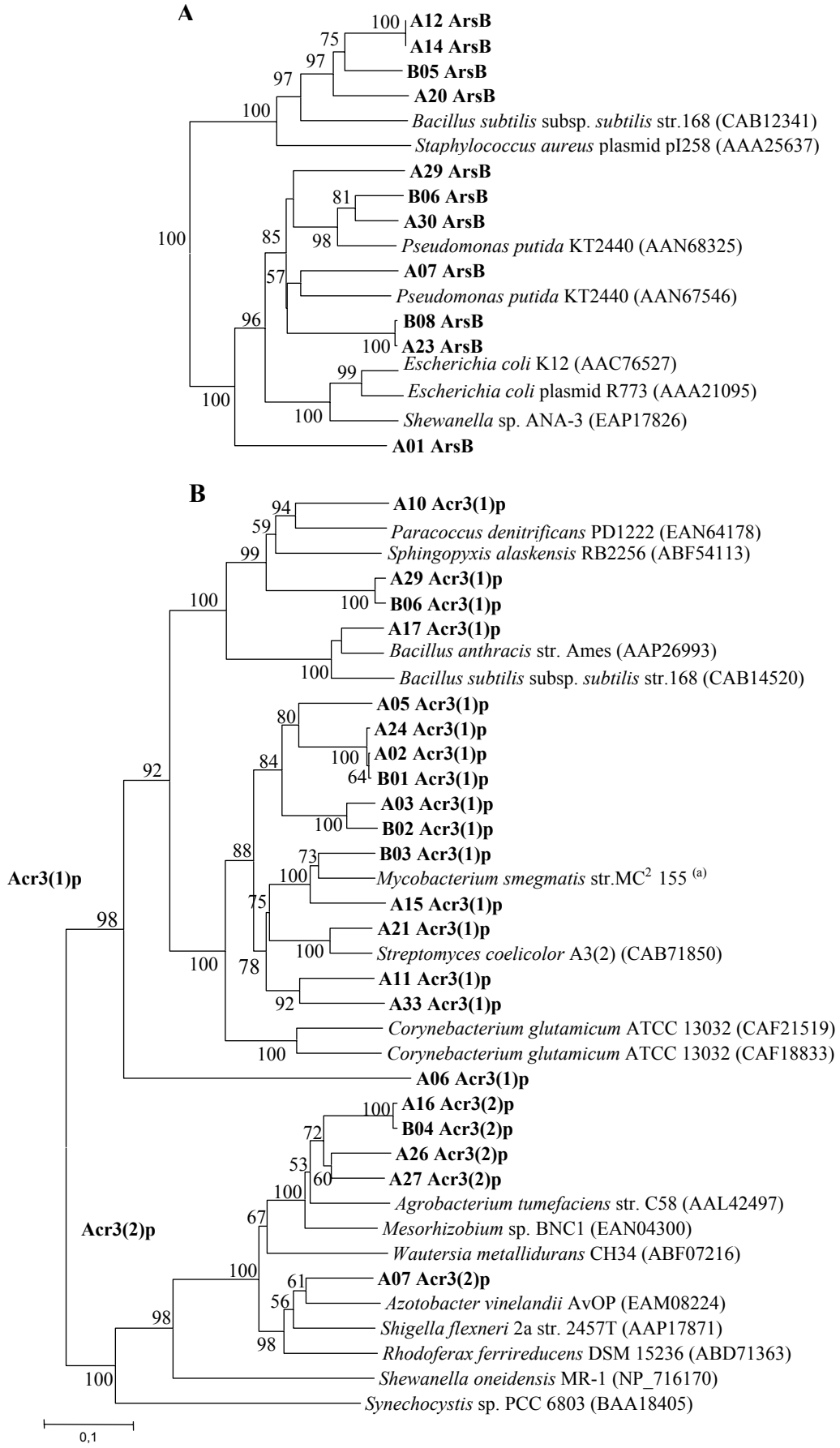


Figure 29. Phylogénie des séquences protéiques des transporteurs d'arsénite ArsB (A) et Acr3(1)p/Acr3(2)p (B). Les séquences de cette étude sont en gras. Les numéros d'accessions des séquences, obtenues à partir des banques de données, sont entre parenthèses. Les valeurs de *bootstrap* supérieures à 50 % sont indiquées sur les noeuds.

3.4.4 Recherche des isolats capables d'oxyder As(III) ou de réduire As(V)

En utilisant le test de précipitation au nitrate d'argent, nous avons recherché parmi les 41 isolats résistants à l'arsenic, ceux qui sont capables d'oxyder As(III) ou de réduire As(V). La présence d'As(III) ou As(V) dans le milieu est révélée respectivement par l'apparition d'une coloration jaune ou rouge marron.

Les résultats du test d'oxydation d'As(III) en As(V) sont présentés dans la figure 30. Ils montrent que 2 isolats (A04 et B07) sont capables d'oxyder As(III). Pour A33, les résultats obtenus sont ambigus puisqu'on n'observe pas de diffusion d'As(V) dans la gélose. Les résultats des tests de chromatographie ionique ont confirmé la présence d'une activité arsénite oxydase chez les isolats A04 et B07. Pour A33 le résultat est négatif, cet isolat n'est donc pas capable d'oxyder As(III).

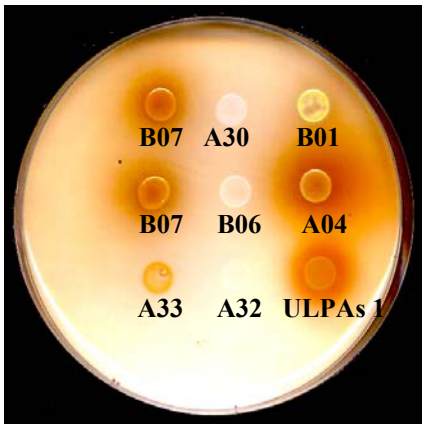


Figure 30. Recherche d'activité arsénite oxydase chez les isolats bactériens en utilisant le test de précipitation au nitrate d'argent sur milieu CDM solide.
La souche *H. arsenicoxydans* ULPAs1 est utilisée comme témoin positif.

Les résultats du test de réduction d'As(V) en As(III) ont montré qu'à l'exception d'A01 et A09, tous les isolats ont été capables de réduire As(V) en As(III). Les résultats négatifs ou ambigus sur boite de pétri ont été vérifiés par chromatographie ionique.

3.4.5 Récapitulation des résultats

Tous les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 12. Récapitulation des résultats

Souches et isolats	CMI (mM)			*arsB/ACR3*	Red/Oxy
	As(V)	As(III)	Sb(III)		
Bactéries Gram positif					
Faible % en G+C (firmicutes)					
A12 *Bacillus* sp. (99 %)	40	7	>12,8	*arsB*	Red
A14 *Bacillus* sp. (99 %)	320	7	>12,8	*arsB*	Red
A22 *Bacillus* sp. (99 %)	80	7	1,6	—	Red
A17 *Bacillus* sp. (99 %)	40	7	0,4	*ACR3(1)*	Red
A13 *Bacillus massiliensis* (97 %)	320	1,75	0,8	—	Red*
A20 *Sporosarcina* sp. (99 %)	160	14	1,6	*arsB*	Red
A08 *Planococcus* sp. (98 %)	> 640	14	1,6	—	Red
B05 *Bacillus* sp. (99 %)	80	14	>12,8	*arsB*	Red
Haut % en G+C (actinobactérie*s*)					
A15 *Tsukamurella strandjordae* (99 %)	160	1,75	0,1	*ACR3(1)*	Red*
A11 *Zimmermannella faecalis* (99 %)	640	14	0,4	*ACR3(1)*	Red
A06 *Pseudoclavibacter helvolus* (99 %)	640	3,5	0,1	*ACR3(1)*	Red
A19 *Plantibacter agrosticola* (99 %)	80	1,75	0,1	—	Red*
A33 *Microbacterium* sp. (99 %)	640	56	3,2	*ACR3(1)*	Red*
A01 *Arthrobacter* sp. (99 %)	160	1,75	0,8	*arsB*	—*
A03 *Arthrobacter* sp. (98 %)	320	14	0,1	*ACR3(1)*	Red
A05 *Kocuria* sp. (99 %)	640	7	0,1	*ACR3(1)*	Red
A24 *Micrococcus luteus* (99 %)	640	3,5	0,1	*ACR3(1)*	Red
A02 *Micrococcus luteus* (99 %)	640	7	0,1	*ACR3(1)*	Red
A21 *Streptomyces* sp. (99 %)	40	1,75	0,1	*ACR3(1)*	Red*
B03 *Rhodococcus* sp. (99 %)	320	14	0,8	*ACR3(1)*	Red
B02 *Arthrobacter* sp. (98 %)	160	3,5	0,1	*ACR3(1)*	Red
B01 *Micrococcus* sp. (99 %)	640	7	0,1	*ACR3(1)*	Red
Bactéries Gram négatif					
α-protéobactéries					
A16 *Sinorhizobium* sp. (99 %)	160	1,75	0,4	*ACR3*(*2*)	Red
A26 *Phyllobacterium myrsinacearum* (99 %)	320	3,5	0,4	*ACR3*(*2*)	Red
A27 *Aminobacter aminovorans* (99 %)	160	3,5	1,6	*ACR3*(*2*)	Red
A10 *Paracoccus* sp. (99 %)	160	3,5	0,8	*ACR3(1)*	Red
B04 *Ensifer adhaerens* (100 %)	160	1,75	0,4	*ACR3*(*2*)	Red
β-protéobactéries					
A25 *Variovorax paradoxus* (99 %)	160	7	0,8	—	Red
A31 *Variovorax* sp. (99 %)	320	3,5	0,4	—	Red
γ-protéobactéries					
A23 *Pseudomonas* sp. (99 %)	640	14	0,4	*arsB*	Red
A30 *Pseudomonas putida* (100 %)	320	3,5	0,8	*arsB*	Red

A29 *Pseudomonas fluorescens* (100 %)	160	7	1,6	*arsB ACR3(1)*	Red
A07 *Pseudomonas* sp. (99 %)	320	7	1,6	*arsB ACR3*(*2*)	Red
B06 *Pseudomonas* sp. (99 %)	320	1,75	0,8	*arsB ACR3(1)*	Red
B08 *Pseudomonas* sp. (99 %)	320	14	0,4	*arsB*	Red
A04 *Acinetobacter lwoffii* (99 %)	320	14	1,6	—	Oxy*Red*
A32 *Acinetobacter* sp. (99 %)	320	14	3,2	—	Red
B07 *Acinetobacter lwoffii* (99 %)	40	3,5	1,6	—	Oxy*Red*
A28 *Stenotrophomonas* sp. (99 %)	320	3,5	1,6	—	Red
A18 *Stenotrophomonas* sp. (99 %)	320	1,75	1,6	—	Red
A09 *Stenotrophomonas* sp. (100 %)	320	14	0,8	—	—*
Souches de référence					
E. coli W3110	160	7	> 12,8	*arsB*	
E. coli AW3110	20	1,75	0,4	—	
E. coli DH10B/pUM3	320	28	> 12,8	*arsB*	
C. glutamicum RES167	>640	28	0,2	*ACR3(1)*	
C. glutamicum ArsB1-B2	20	3,5	0,2	—	
Shewanella sp. ANA-3	640	14	0,8	*arsB ACR3*(*2*)	
S. oneidensis MR-1	80	1,75	0,8	*ACR3*(*2*)	
M. smegmatis mc^2155	40	1,75	0,2	*ACR3(1)*	

Red : présence d'activité arséniate réductase. Oxy: présence d'activité arsénite oxydase. * : résultat vérifié par chromatographie ionique —* : résultat négatif vérifié par chromatographie ionique.

4 Discussion

Dans cette partie, nous avons défini et validé des jeux d'amorces dégénérées qui permettent la détection des gènes de transporteurs d'arsénite appartenant aux groupes ArsB, Acr3(1)p et Acr3(2)p. Cette partie inclut également l'identification, la caractérisation ainsi que l'analyse de la diversité des transporteurs d'arsénite de 41 isolats bactériens provenant de 2 sols présentant des teneurs différentes en arsenic et plomb. Les résultats ont montré que la diversité de ces 41 isolats résistants à l'arsenic est relativement élevée. En effet, environ la moitié des 22 genres identifiés (par séquençage partiel du gène ADNr 16S) n'ont pas été précédemment décrits dans la littérature comme des genres bactériens résistants à l'arsenic ou transformant ce dernier. La majorité de ces genres bactériens ont été isolés à partir du sol A (sol peu contaminé). La faible diversité des bactéries résistantes à l'arsenic observée dans le sol B (sol contaminé) est peut être dûe à la concentration élevée en plomb au niveau de ce sol.

Dans le cadre d'une étude similaire, Jackson et *al.* (2005) ont isolé à partir d'un estuaire faiblement contaminé par l'arsenic, 37 bactéries résistantes à As(V) appartenant à 6 groupes taxonomiques différents. Ces résultats ainsi que ceux obtenus dans notre étude indiquent d'une part que les bactéries résistantes à l'arsenic appartiennent à divers groupes phylogénétiques et d'autre part qu'elles sont largement distribuées dans l'environnement, indépendamment de la teneur en arsenic du milieu.

Afin de caractériser les isolats étudiés, nous avons déterminé leur niveau de résistance à As(III), As(V) et Sb(III). Une comparaison directe des valeurs des CMIs de nos isolats avec celles obtenues dans d'autres études n'est pas pertinente. En effet la méthode de détermination du niveau de résistance est souvent différente d'une étude à l'autre notamment concernant le milieu utilisé [milieu liquide ou solide, composition du milieu (constituants organiques et concentration en phosphate)]. Ces variations peuvent modifier la biodisponibilité et par conséquent la toxicité du métalloïde testé. Cependant, dans tous nos tests, nous avons inclus des souches de référence résistantes ou sensibles à l'arsenic, ce qui nous a permis d'établir une estimation du niveau de résistance de nos isolats aux 3 métalloïdes.

Les couples d'amorce dégénérées darsB1F/darsB1R, dacr1F/dacr1R et dacr5F/4R ont été utilisés pour rechercher la présence des gènes de transporteurs d'arsénite chez les 41 isolats sélectionnés. Les couples d'amorces darsB1F/darsB3R, dacr2F/dacr1R et dacr6F/4R qui ont été conçus dans le but de vérifier la spécificité des amplifiats obtenus, n'ont pas été utilisés dans cette étude puisque cette vérification a été réalisée par séquençage. Cependant ces couples seraient utiles dans d'autres études où le séquençage des amplifiats n'est pas envisagé.

Les résultats du criblage par PCR des 41 isolats ont révélé que 29 d'entre eux (70,7 %) posséderaient un ou 2 gènes de transporteurs d'arsénite. Le séquençage de tous les amplifiats a confirmé la grande spécificité de notre approche PCR. En effet chaque couple d'amorce a permis l'amplification spécifique de gènes de transporteurs d'arsénite du groupe correspondant. Aucune amplification non spécifique ni amplification croisée (entre les 3 groupes de transporteurs d'arsénite) n'a été détectée.

Plusieurs raisons pourraient expliquer le résultat PCR négatif obtenu pour 12 isolats parmi les 41. Pour les isolats sensibles à As(III) (CMI < 1,75 mM) et présentant une activité arséniate réductase tels que A13, A18 et A19, l'absence d'amplifiat pourrait être dûe à l'absence de gènes de transporteurs d'arsénite. Dans ce cas, la résistance à As(V) pourrait faire intervenir un mécanisme analogue à celui trouvé chez *Sinorhizobium meliloti* 1021. Cette souche possède en effet un opéron *arsR-aqpS-CH* comprenant un gène d'aquaglycéroporine (*aqpS*) à la place du gène *arsB*. Cet opéron confère uniquement la résistance à As(V) (Yang *et al.*, 2005).

Dans le cas des isolats résistants à As(III), l'amplification négative peut être dûe à la présence d'un gène de transporteur d'arsénite dont la séquence est assez divergente de celles des transporteurs d'arsénite ciblés par nos amorces dégénérées. Des mécanismes, autres que celui de l'opéron *ars*, pourraient également être utilisés par ces isolats afin de résister aux effets toxiques de l'arsenic. De tels mécanismes pourraient inclure la méthylation d'As(III) (qui permet d'obtenir des produits volatils qui s'échappent de la cellule bactérienne) (Qin *et al.*, 2006) ou encore l'oxydation d'As(III) qui génère de l'As(V) moins toxique (Silver et Phung, 2005a). Cette dernière explication semble cohérente pour les 2 isolats A04 et B07 (identifiés comme *Acinetobacter*). En effet ces isolats résistants à l'arsenic, ne posséderaient pas de transporteurs d'arsénite mais présentent une activité arsénite oxydase. Une bactérie résistante

à l'arsenic, identifiée comme *Acinetobacter*, a également été isolée à partir d'un site contaminé par l'arsenic en Nouvelle-Zélande (Anderson et Cook, 2004). Cependant, sa capacité à oxyder l'arsenic n'a pas été étudiée. Les isolats A04 et B07 sont également capables de réduire As(V) en As(III). Il posséderait deux systèmes de résistance à l'arsenic.

Les résultats de notre étude ont montré que les gènes de transporteurs d'arsénite (*arsB* et *ACR3*) sont largement distribués parmi les 41 isolats résistants à l'arsenic. Comme les premières études des opérons *ars* ont révélé la présence de gène *arsB* (*arsB* d'*E. coli*, *S. aureus* …), il a été supposé que la majorité des bactéries utilisaient des transporteurs de la famille ArsB afin d'expulser As(III) de la cellule (Rosen, 2002a). Cependant, dans cette étude, nous avons constaté que le génotype *ACR3* est prédominant par rapport au génotype *arsB* (21 *ACR3*(+) et 11 *arsB*(+)). Ce résultat est en accord avec le nombre croissant de séquences homologues aux gènes *ACR3* retrouvées dans les banques de données. La famille des transporteurs Acr3p pourrait donc être beaucoup plus répandue que supposé initialement.

Une des limitations de l'approche PCR utilisée est liée au fait qu'elle ne permet pas de déterminer directement la présence de plusieurs gènes de transporteurs d'arsénite du même groupe dans une même bactérie. C'est pourtant le cas dans plusieurs souches comme *C. glutamicum* (3 gènes *ACR3*) ou *P. putida* KT2440 (2 gènes *arsB*). Une telle information pourrait cependant être facilement obtenue pour chaque isolat soit par le séquençage d'un nombre significatif de clones contenant le produit PCR ou encore par hybridation. Ces expériences n'ont pas été réalisées dans cette étude en raison du nombre élevé des isolats à analyser. Néanmoins, grâce à l'utilisation de 3 couples d'amorces différents, nous avons pu détecter chez 3 isolats du genre *Pseudomonas* (A07, A29 et B06), la présence à la fois d'un gène *arsB* et *ACR3*. Un seul cas similaire est retrouvé dans la littérature chez *B. subtilis* (Rosen, 1999a). Par ailleurs la présence chez *Shewanella* sp. ANA-3 d'une séquence homologue au gène *ACR3(2)*, en plus du gène *arsB* précédemment identifié, est maintenant confirmée par l'analyse de la séquence du génome de cette souche disponible depuis peu.

Les résultats de cette étude ont également révélé une corrélation positive entre le phénotype de sensibilité à l'antimoine et la présence d'un gène *ACR3(1)*. En effet nous avons constaté que 75 % des isolats qui présentent un génotype *ACR3(1)* appartiennent au groupe des actinobactéries et qu'une grande majorité de ces isolats (9 sur 12) sont sensibles à la plus faible concentration d'antimoine testée (CMI ≤ 0,1 mM). Cette corrélation pourrait

s'expliquer par le fait que les transporteurs Acr3(1)p de ces isolats sont fonctionnellement similaires à ceux de *B. subtilis* et *S. cerevisiae*, incapables d'expulser l'antimoine dans le milieu extracellulaire (Sato et Kobayashi, 1998 ; Wysocki *et al.*, 1997). Ces transporteurs ne confèrent donc pas aux souches qui les possèdent, une résistance à l'antimoine. Chez *C. glutamicum* l'inactivation, de 2 gènes de transporteurs d'arsénite qui appartiennent au groupe *ACR3(1*) (selon notre analyse phylogénétique ainsi que celle de Wysocki et *al.,* (2003)), a comme conséquence une sensibilité de la souche mutée à As(III) mais pas à Sb(III) (tableau 12). Ces résultats semblent donc en accord avec notre explication.

D'autre part le niveau de résistance élevé à l'antimoine, observé pour les autres isolats, pourrait être dû soit (i) à la capacité de leur transporteur d'arsénite à expulser l'antimoine (comme démontré pour ArsB d'*E. coli* et Acr3p(2) de *Synechocystis* sp., ou (ii) à un mécanisme permettant de réduire l'entrée de Sb(III) dans la cellule ou encore (iii) à un mécanisme de résistance à l'antimoine encore inconnu.

A l'exception de cette dernière observation, nous n'avons pas mis en évidence de corrélation entre les différents paramètres analysés c'est à dire l'affiliation phylogénétique, les niveaux de résistance aux métalloïdes et le génotypes *arsB*/*ACR3*. Plusieurs études portant sur des bactéries résistantes à l'arsenic isolées de l'environnement présentent des résultats similaires. Par exemple, Ford et *al.,* (2005) n'ont pas trouvé de corrélation entre le niveau de résistance à As(V) et le génotype *arsABC* de 23 isolats bactériens aérobies et anaérobies. De même, plusieurs auteurs ont constaté que des isolats relativement proches du point de vue taxonomique présentent des niveaux de résistance à l'arsenic différents (Jackson *et al.*, 2005 ; Macur *et al.*, 2004). Quelles que soient les raisons de ces variations, elles indiquent clairement que l'identité phylogénétique ou la présence de gènes *arsB*/*ACR3* ne peuvent pas être utilisées comme critères fiables permettant de prévoir le comportement des communautés bactériennes en présence d'arsenic, ni comme un indicateur de la présence d'arsenic dans le milieu.

Nous avons développé dans cette partie du travail, des couples d'amorces dégénérées hautement spécifiques qui ont permis de détecter diverses séquences de transporteurs d'arsénite appartenant aux trois groupes ArsB, Acr3(1)p et Acr3(2)p. Ces amorces peuvent donc être utilisées dans des études similaires afin d'analyser la diversité des transporteurs d'arsénite d'isolats bactériens ou à partir d'ADN extrait d'échantillons environnementaux.

Nous avons également caractérisé une collection de 41 isolats bactériens résistants à l'arsenic. Parmi ces isolats, certains mériteraient une étude approfondie afin de mieux comprendre leur système de résistance à l'arsenic. Le niveau de résistance à As(III) et As(V) de l'isolat A33 nous a particulièrement intrigué. L'étude de cet isolat a fait l'objet de la deuxième partie de ce travail.

Chapitre II : Recherche des gènes impliqués dans la résistance à l'arsenic chez l'isolat A33 Microbacterium sp.

1 Introduction

En comparaison avec les autres isolats, mais aussi avec des souches de référence résistantes à l'arsenic, l'isolat A33 affilié au genre *Microbacterium*, présente un niveau de résistance particulièrement élevé à As(III) et As(V). Ce chapitre décrit la recherche des gènes impliqués dans la résistance à l'arsenic chez l'isolat A33. Il comprend deux parties qui correspondent aux deux approches que nous avons adoptées pour identifier ces gènes :

- *Première approche* : elle consiste à isoler un fragment d'ADN de l'isolat A33 contenant le gène *ACR3(1)* par la technique de Southern blot. Ce fragment est cloné, séquencé puis introduit dans des souches sensibles à l'arsenic
- *Deuxième approche* : elle permet de détecter, sans à priori préalable, les gènes responsables de la résistance à l'arsenic chez l'isolat A33. Elle consiste à établir une banque d'ADN de l'isolat A33 dans une souche sensible à l'arsenic, puis à sélectionner les clones recombinants capables de résister à ce métalloïde

Les souches *E. coli* MA1 et *C. glutamicum ArsB1-B2* ont été choisies comme hôtes pour ce travail. Le vecteur navette *E. coli-Corynebacterium* pSRK21 a été utilisé comme vecteur de clonage.

D'autres tests ont été réalisés dans ce chapitre afin de :

- Déterminer le niveau de résistance de l'isolat A33 à As(V) et As(III) en milieu liquide
- Confirmer l'identification de l'isolat A33, par séquençage de la totalité de son ADNr 16S
- Déterminer la capacité de transformation de l'isolat A33

2 Résistance de l'isolat A33 à l'arsenic en milieu liquide

La résistance de l'isolat A33 à As(V) et As(III) a été déterminée en milieu liquide Tris-LP. Les résultats présentés dans la figure 31 montrent que l'isolat A33 résiste à des concentrations élevées d'As(III) et As(V) avec une diminution de la densité cellulaire de 50 % à 24 mM d'As(III) et 400 mM As(V). L'isolat A33 n'est plus capable de croître en présence de 50 mM As(III), cependant pour As(V) on observe encore une faible croissance à 800 mM.

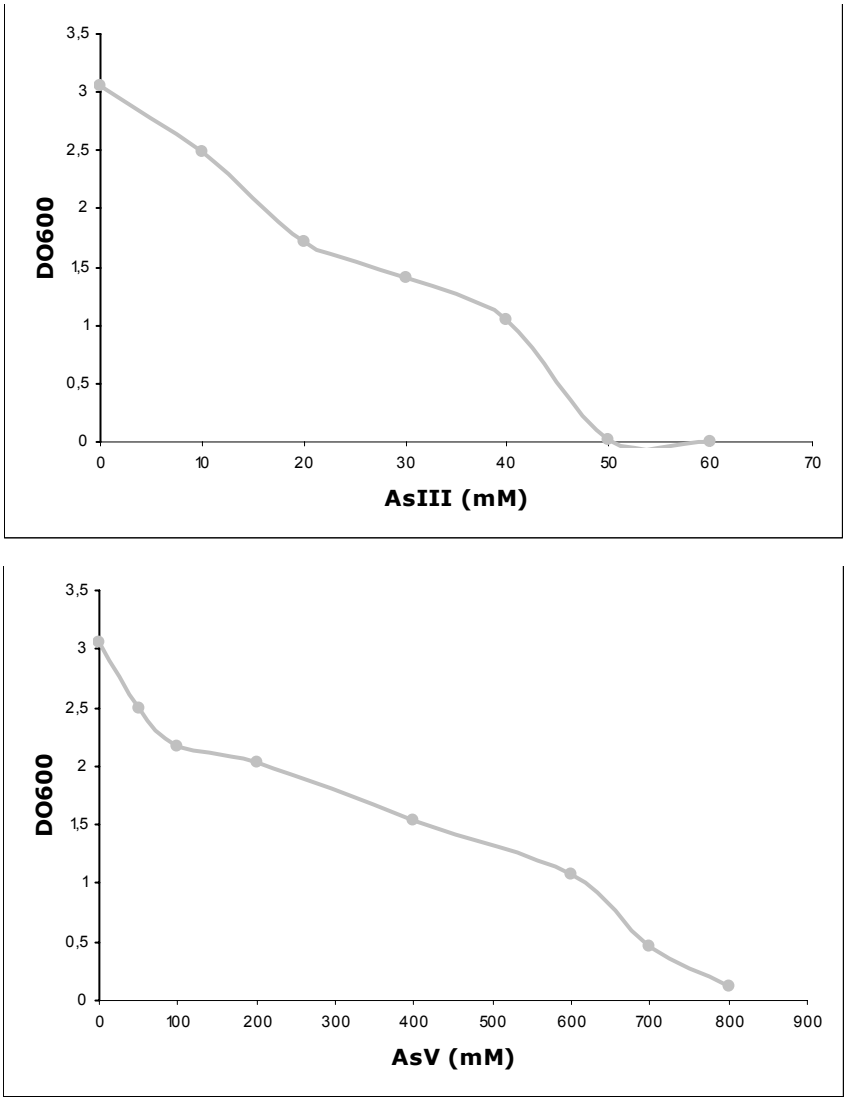


Figure 31. Résistance de l'isolat A33 à As(III) et As(V) en milieu TRIS-LP après 48 h d'incubation à 30°C.

3 Test de transformation génétique de l'isolat A33

Les souches du genre *Microbacterium* sont peu étudiées et aucune étude jusqu'ici n'a rapporté la transformation de bactéries de ce genre.

Afin de manipuler génétiquement l'isolat A33, et notamment d'envisager la construction de mutants sensibles à l'arsenic, nous avons d'abord testé ses capacités de transformation par de l'ADN exogène. Pour réaliser ce test, il nous fallait choisir un plasmide présentant une origine de réplication susceptible d'être fonctionnelle chez cette souche et un marqueur de sélection

adéquat. Notre démarche a consisté à (i) confirmer l'affiliation phylogénétique de l'isolat A33, (ii) définir sa résistance à différents antibiotiques (iii) rechercher des plasmides connus pour être fonctionnels dans des bactéries phylogénétiquement proches et (iv) mettre au point un protocole de transformation par électroporation.

3.1 Séquençage de l'ADNr 16S complet de l'isolat A33

Nous avons montré dans le chapitre précédent que la séquence partielle (853 pb) de l'ADNr 16S de l'isolat A33 présente 99 % d'identité avec l'ADNr 16S de *Microbacterium* sp. PHD-5. Afin d'affiner ces résultats, nous avons déterminé la séquence complète du gène (1535 pb). La comparaison de la séquence obtenue avec les séquences nucléotidiques répertoriées dans les banques de données a également montré 99 % d'identité avec l'ADNr 16S de *Microbacterium* sp. PHD-5. Ce résultat confirme l'appartenance de l'isolat A33 au genre *Microbacterium*.
Les bactéries appartenant à ce genre présentent la taxonomie suivante :

Phylum : *Actinobacteria*
Classe : *Actinobacteria*
Sous classe : *Actinobacteridae*
Ordre : *Actinomycetales*
Sous ordre : *Micrococcineae*
Famille : *Microbacteriaceae*
Genre : *Microbacterium*

3.2 Test de sensibilité aux antibiotiques de l'isolat A33

Nous avons déterminé la sensibilité de l'isolat A33 aux antibiotiques suivants : kanamycine (Kn), ampicilline (Amp), chloramphénicol (Cm), streptomycine (Str), néomycine (Neo) et apramycine (Apr). La gamme des concentrations testées est de 5 à 320 µg/ml (avec un facteur 2 entre chaque concentration). Les résultats des CMIs des différents antibiotiques sont rapportés dans le tableau 13. La CMI est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique capable d'inhiber la croissance bactérienne après une incubation de 72h sur milieu LB solide à 30°C.

Tableau 13. **CMIs de 6 antibiotiques pour l'isolat A33**

Antibiotiques	CMI (µg/ml)
Km	160
Amp	≤5
Cm	20
Neo	> 320
Str	320
Apr	320

L'isolat A33 est particulièrement résistant à la kanamycine, streptomycine, apramycine et néomycine. En revanche il est sensible à une concentration d'ampicilline de 5 µg/ml et une concentration de chloramphénicol de 20 µg/ml.

3.3 Choix du vecteur et transformation de l'isolat A33

En se basant sur les résultats ci-dessus, nous avons recherché des vecteurs possédant une origine de réplication d'une actinobactérie et un gène de résistance à l'ampicilline ou au chloramphénicol. Les vecteurs d'actinobactéries trouvés dans la littérature sont essentiellement des vecteurs navettes contenant deux origines de réplication: (i) une origine d'*E. coli* et (ii) une origine d'actinobactérie du genre *Rhodococcus*, *Corynebacterium* ou *Mycobacterium.* Cependant, la majorité de ces vecteurs contiennent un gène de résistance à la kanamycine, comme c'est le cas pour les plasmides pHLD69 (*E. coli*/*Mycobacterium*), pRESQ (*E. coli*/*Rhodococcus*) et pSRK21 (*E. coli*/*Corynebacterium*) (Houssaini-Iraqui *et al.*, 2001 ; van der Geize *et al.*, 2002 ; Vesely *et al.*, 2003).

Les vecteurs contenant un gène de résistance à l'ampicilline ou au chloramphénicol sont rarement utilisés pour les actinobactéries. Une recherche bibliographique n'a permis d'en trouver que trois, dont les caractéristiques sont présentées dans le tableau 14.

Tableau 14. **Caractéristiques des vecteurs navettes pDM302, pDA71 et pMVS301**

Vecteur	Caractéristiques	Référence
pDM302	-Vecteur navette *E. coli*/*Clavibacter* -Sélection des transformants de *Clavibacter* sur Cm (10 µg/ml)	(Meletzus *et al.*, 1993)
pDA71	-Vecteur navette *E. coli*/*Rhodococcus* -Sélection des transformants de *Rhodococcus* sur Cm (40 µg/ml)	(Dabbs, 1998)
pMVS301	-Vecteur navette *E. coli*/*Rhodococcus* -Sélection des transformants de *Rhodococcus* sur Amp (30 µg/ml)	(Singer et Finnerty, 1988)

Le vecteur navette *E. coli*/*Clavibacter* pDM302 a été utilisé pour déterminer l'efficacité de la transformation de l'isolat A33. Les bactéries du genre *Clavibacter* appartiennent, comme l'isolat A33, à la famille des *Microbacteriaceae* (les bactéries du genre *Rhodococcus*, *Corynebacterium* et *Mycobacterium* appartiennent à d'autres familles).

Des cellules compétentes de l'isolat A33 ont été préparées selon le protocole décrit dans la partie matériel et méthodes (section 6.8.2). Le vecteur pDM302 a été préparé dans la souche *E. coli* GM119 déficiente pour les méthylases Dam et Dcm. En effet, il a été montré que l'utilisation d'ADN plasmidique non méthylé augmente considérablement l'efficacité de la transformation de *C. michiganensis* par le vecteur pDM302 (Kirchner *et al.*, 2001). Pour l'électroporation, nous avons varié les paramètres électriques (résistance 400 et 600 Ω) et sélectionné les transformants sur chloramphénicol (15 µg/ml). Malheureusement, aucun transformant n'a été obtenu. Faute de pouvoir nous procurer les vecteurs pDA71 et pMVS301, nous n'avons pas poursuivi ces tests de transformation.

4 Première approche : clonage de l'opéron *ars* de *Microbacterium* sp. A33

Les résultats obtenus dans la première partie de cette thèse indiquent que l'isolat A33 contient un gène *ACR3(1)* codant pour un transporteur d'arsénite. Généralement, les gènes des transporteurs d'arsénite font partie d'un opéron contenant au minimum deux autres gènes (*arsR* et *arsC*). Nous nous sommes fixé comme objectif de cloner l'opéron *ars* de l'isolat A33 en suivant l'approche présentée ci-dessous :

→ Hydrolyse de l'ADN de l'isolat A33 avec diverses enzymes de restriction

→ Transfert des produits d'hydrolyse sur une membrane de nylon

→ Préparation d'une sonde qui correspond à une partie du gène *ACR3(1)* marqué à la digoxigénine (sonde *ACR3(1)*/A33)

→ Hybridation des produits d'hydrolyse avec la sonde

→ Clonage dans le vecteur pUC19, d'un fragment contenant le gène *ACR3(1)* et susceptible de contenir la totalité de l'opéron

→ Détermination de la séquence des gènes se trouvant à proximité du gène *ACR3(1)*

→ Introduction de l'insert séquencé dans *E. coli* MA1 et *C. glutamicum* ArsB1-B2 et détermination des niveaux de résistance à As(III) et As(V) des clones recombinants.

4.1 Hybridation de l'ADN de l'isolat A33 avec la sonde *ACR3(1)*/A33

L'ADN total de l'isolat A33 a été hydrolysé séparément avec six enzymes de restriction: *Bam*HI, *Xho*I, *Kpn*I, *Apa*I, *Sal*I, et *Sac*I (figure 32a). Le choix des enzymes est basé sur deux critères, d'une part l'absence du site de restriction de l'enzyme au niveau de la séquence connue du gène *ACR3(1)* et d'autre part, la présence de ce site parmi les sites multiples de clonage du vecteur pUC19.

Le résultat de l'hybridation avec la sonde *ACR3(1)*/A33 (figure 32b) montre que le gène *ACR3(1)* se trouve au niveau des fragments *Bam*HI (4,5 kb), *Apa*I (taille supérieure à 9 kb), *Sal*I (1 kb), *Xho*I (8 kb), *Sac*I (1,4 kb) et *Kpn*I (9 kb).

Les fragments *Sca*I et *Sal*I sont de petite taille, ils contiennent donc peu d'informations concernant les gènes qui se trouvent à proximité d'*ACR3(1)*. Nous avons choisi dans un premier temps de cloner le fragment *Bam*HI, dont la taille (4,5 kb) pourrait être à priori suffisante.

Nous avons également vérifié, en faisant varier les conditions de lavage (forte, moyenne et faible stringence), l'absence d'autres gènes *ACR3(1)* au niveau de l'ADN de l'isolat A33. Dans les conditions de forte stringence, la sonde ne s'apparie qu'à la séquence qui lui est parfaitement complémentaire alors que des appariements non-spécifiques sont tolérés en conditions de faible et moyenne stringence. Les résultats d'hybridation en conditions de moyenne et faible stringence sont comparables à ceux présentés dans la figure 32b (forte stringence). On peut donc conclure qu'au niveau de l'ADN de l'isolat A33, il n'existe pas d'homologue du gène *ACR3(1)* précédemment détecté.

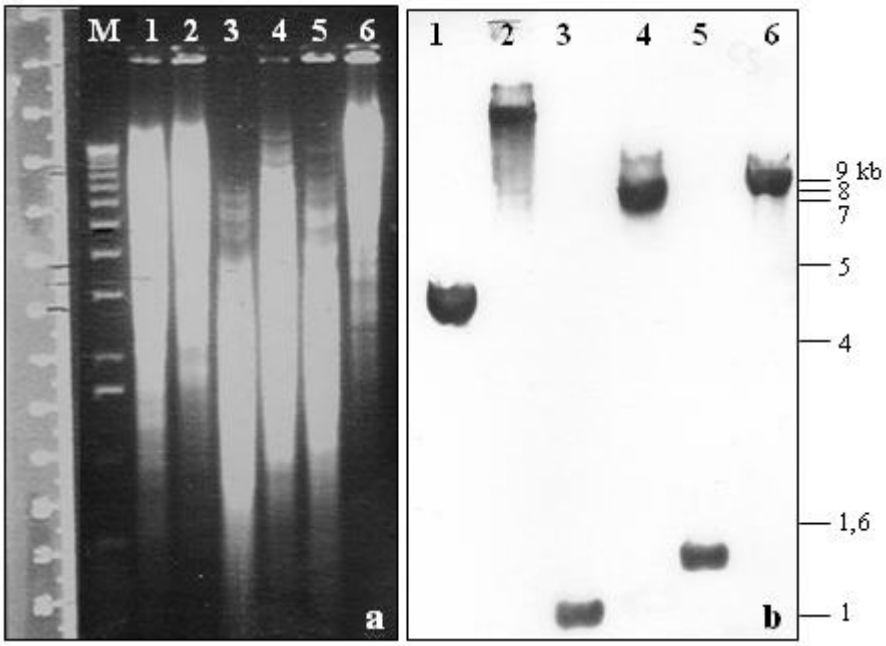


Figure 32. Séparation des produits de digestion de l'ADN de l'isolat A33 sur gel d'agarose 0,8 % (a). Résultat de l'hybridation avec la sonde *ACR3(1)*/A33 (b).
Puit 1: fragments *Bam*HI, 2: *Apa*I, 3: *Sal*I, 4: *Xho*I, 5: *Sac*I et 6: *Kpn*I. M: marqueur de taille (1 kb).

4.2 Clonage des fragments *Bam*HI (4,5 kb) dans le vecteur pUC19 et sélection des clones contenant le gène *ACR3(1)*

Les fragments *Bam*HI de taille 4,5 kb, obtenus après hydrolyse de l'ADN total de l'isolat A33 avec l'enzyme *Bam*HI, ont été récupérés à partir du gel d'agarose. Nous les avons cloné dans le vecteur pUC19 préalablement hydrolysé par *Bam*HI et déphosphorylé. Le produit de ligation a été utilisé pour transformer des cellules thermocompétentes d'*E. coli* DH10B. Deux cents clones résistants à l'ampicilline (marqueur de sélection du pUC19) ont été transférés sur membrane de

nylon puis hybridés avec la sonde *ACR3(1)*/A33. Un seul transformant (clone 39) a répondu positivement à l'hybridation avec cette sonde (figure 33). Le plasmide recombinant de ce clone a été désigné "p39" et le fragment contenant le gène *ACR3(1)* "insert 39".

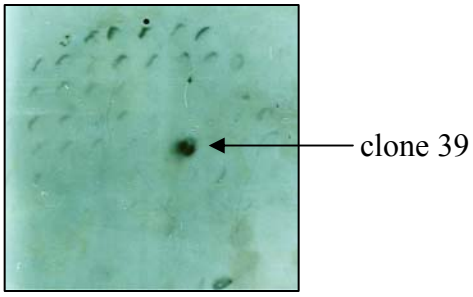


Figure 33. Résultat de l'hybridation de l'ADN du clone 39 avec la sonde *ACR3(1)*/A33.

4.3 Caractérisation de l'insert 39

4.3.1 Détermination de l'orientation de l'insert 39 dans le vecteur pUC19

L'ADN du plasmide p39 a été amplifié avec les 4 couples d'amorces suivants : M13F/dacr1R, dacr1F/M13R, M13F/dacr1F et M13R/dacr1R.

Les résultats attendus et les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 15. Un amplicon d'une taille approximative de 2 kb a été obtenu avec le couple d'amorce M13R/dacr1F, indiquant que le gène *ACR3(1)* est orienté dans le sens opposé au gène *lacZ* du vecteur pUC19. Nous avons estimé la taille du fragment PCR attendu avec le couple d'amorce M13F/dacr1R à 3,2 kb (figure 34). Le résultat PCR négatif avec ce couple d'amorce est probablement dû au fait que la Taq polymérase utilisée n'est pas adaptée à l'amplification des fragments de grande taille.

Tableau 15. Résultats PCR attendus et obtenus avec les 4 couples d'amorces utilisés

Résultats	**Couples d'amorces**			
	M13F/dacr1R	dacr1F/M13R	M13F/ dacr1F	dacr1R/M13R
Résultats PCR attendus				
ACR3(1) et *lacZ* (même sens)	-	-	+	+
ACR3(1) et *lacZ* (sens opposé)	+	+	-	-
Résultats PCR obtenus	-	+ (2 kb)	-	-

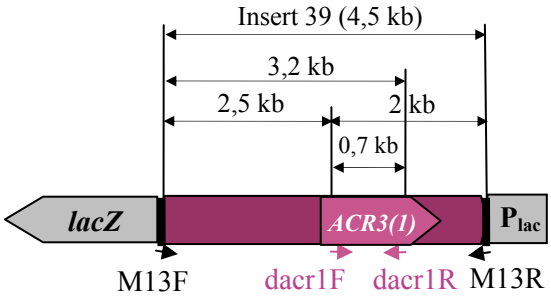


Figure 34. Position du gène *ACR3(1)* dans l'insert 39.

4.3.2 Profils de restriction de l'insert 39 et sous-clonage dans le vecteur pUC19

L'insert 39 présente une taille approximative de 4,5 kb. Pour faciliter le séquençage de cet insert, nous avons choisi de le sous-cloner dans le vecteur pUC19. La détermination du profil de restriction de l'insert 39 est nécessaire afin d'établir une stratégie de sous-clonage.

4.3.2.1 Profils de restriction de l'insert 39

Les enzymes *Hin*dIII, *Sal*I, *Xba*I, *Sma*I, *Kpn*I, *Sac*I, *Pst*I et *Eco*RI ont été utilisées pour hydrolyser le plasmide p39. Les profils de restriction obtenus sont présentés dans la figure 35. Les enzymes *Hin*dIII, *Xba*I, *Sma*I et *Eco*RI ne présentent pas de sites de restriction au niveau de l'insert 39 et les enzymes *Sac*I et *Sal*I génèrent plusieurs fragments. Par conséquent, les enzymes *Kpn*I et *Pst*I (générant respectivement 2 et 3 fragments d'hydrolyse) ont été choisies pour le sous-clonage de l'insert 39.

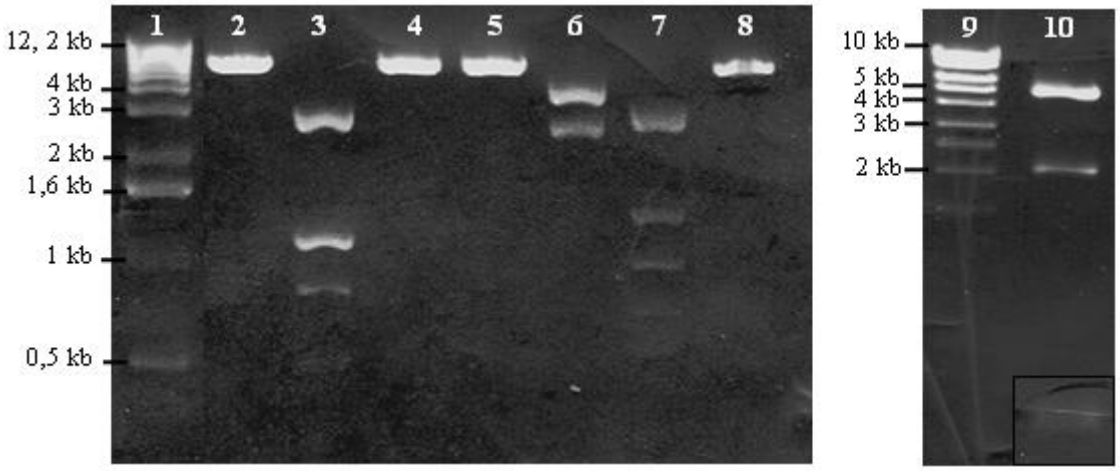


Figure 35. Profils de restriction du p39.
Puit 1: marqueur de taille (1 kb), 2 : *Hin*dIII, 3: *Sal*I, 4: *Xba*I, 5: *Sma*I, 6: *Kpn*I, 7: *Sac*I, 8: *Eco*RI, 9 : marqueur de taille (MassRuler^{TM}) et 10 : *Pst*I. L'hydrolyse avec *Pst*I donne 3 fragments de restriction, le 3ème fragment est peu visible sur la photographie du gel. La taille de ce fragment a été estimée à 0,4 kb.

4.3.2.2 Sous-clonage de l'insert 39 dans le plasmide pUC19

L'hydrolyse du plasmide p39 avec l'enzyme de restriction *Kpn*I donne 2 fragments de taille 4 et 2,8 kb (figure 35). Le fragment de 4 kb contient la séquence complète du pUC19 (2,69 kb) ainsi qu'un fragment de taille 1,31 kb qui correspond à la fin de l'insert 39 (figure 36a). Le fragment de 4 kb a été récupéré à partir du gel d'agarose, purifié sur colonne puis recircularisé. Le produit de ligation a été utilisé pour transformer des cellules thermocompétentes d'*E. coli* DH10B. Le plasmide recombinant obtenu a été désigné "p39(a)" (figure 36b) et l'insert de 1,31 kb a été désigné "insert 39(a)".

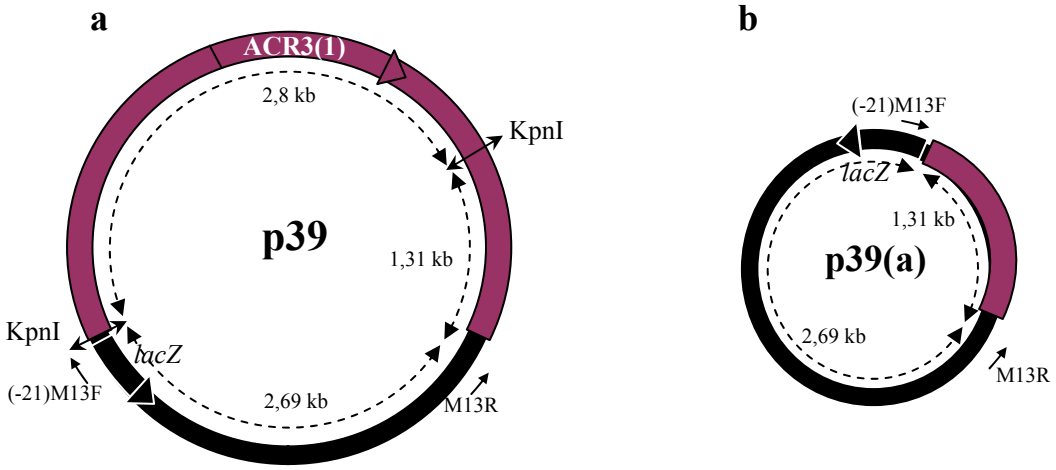


Figure 36. Représentation des sites de coupure de *Kpn*I au niveau du plasmide p39 (a). Représentation du plasmide p39(a) (b).
L'insert est représenté en violet et le vecteur pUC19 en noir.

L'hydrolyse du plasmide p39 avec l'enzyme *Pst*I génère 3 fragments de taille 2 , 4,5 et 0,4 kb. Le fragment de 4,5 kb contient le pUC19 (2,69 kb) et un fragment de 1,81 kb qui correspond au début de l'insert 39 (figure 35). L'enzyme *Pst*I coupe trois fois le plasmide p39. Le premier site de coupure se trouve au niveau du vecteur et le deuxième au niveau de la séquence connue de *ACR3(1)* (figure 37a). Le troisième site de coupure de *Pst*I peut se trouver soit à 0,4 kb du premier site soit à 0,4 kb du deuxième. Les 2 possibilités sont représentées dans la figure 37a (flèches discontinues). Le fragment de 4,5 kb a été récupéré à partir du gel d'agarose, purifié sur colonne puis recircularisé. Le produit de ligation a été utilisé pour transformer des cellules thermocompétentes d'*E. coli* DH10B. Le plasmide recombinant obtenu a été désigné "p39(b)" (figure 37b) et l'insert de 1,81 kb "insert 39(b)".

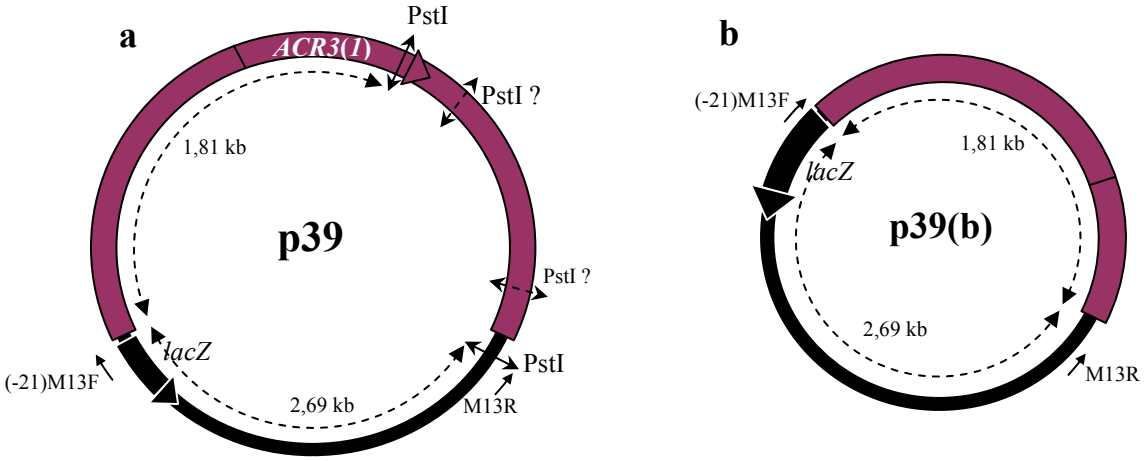


Figure 37. Représentation des sites de coupure de *Pst*I au niveau de p39 (a). Représentation du plasmide p39(b) (b).
L'insert est représenté en violet et le pUC19 en noir.

4.3.3 Séquençage de l'insert 39

Les inserts 39(a) et 39(b) ont été séquencés à l'aide des amorces M13F et M13R (figure 36b et 37b), générant des séquences de taille respective 1,697 et 2,004 kb. Pour l'insert 39 une séquence de taille approximative de 0,6 kb restait inconnue (figure 38). Nous avons donc désigné une amorce dénommée 39(a) pour compléter le séquençage de l'insert 39 à partir du plasmide p39.

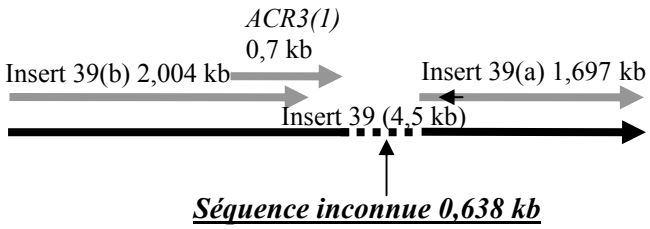


Figure 38. Séquence inconnue de l'insert 39.
Un chevauchement de 0,539 kb existe entre *ACR3(1)* et l'insert 39(b). La flèche représentée au niveau de l'insert 39(a) représente l'amorce"39(a)" désignée pour le séquençage.

4.3.4 Analyse de la séquence de l'insert 39

La taille exacte de l'insert 39 est de 4,328 kb. Cinq phases ouvertes de lecture ont été retrouvées au niveau de cet insert (figure 39). Leur agencement laisse supposer une organisation en opéron.

Les produits des 5 ORF ont été comparés aux protéines des banques de données. Les résultats indiquent qu'ils sont respectivement homologues aux protéines suivantes : thiorédoxine réductase, thiorédoxine, transporteur d'arsénite, protéine régulatrice ArsR/arséniate réductase et arséniate réductase. La thiorédoxine intervient dans le fonctionnement des arséniate réductases thiorédoxine dépendantes, cependant, le gène de la thiorédoxine n'est jamais présent dans les opérons *ars* connus. Le produit de l'ORF 4 serait une protéine de fusion entre une protéine ArsR et une ArsC, il s'agit d'une protéine atypique.

Les résultats du séquençage confirment notre hypothèse de départ concernant la présence d'autres gènes *ars* à proximité du gène *ACR3(1)*. Il s'agit probablement des gènes d'un même opéron. Cependant cet opéron diffère des opérons *ars* connus.

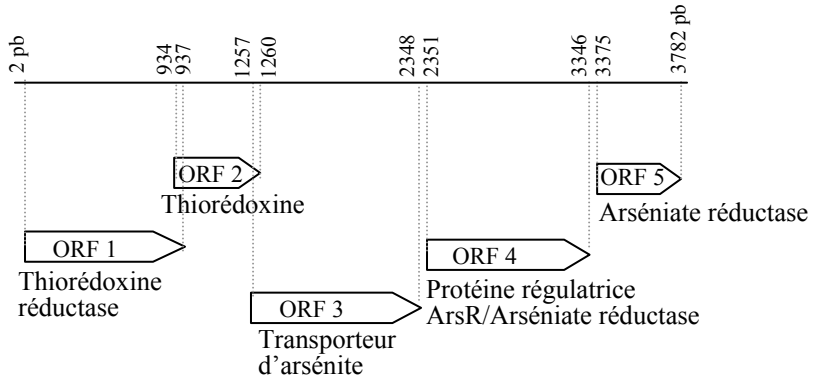


Figure 39. Représentation des phases ouvertes de lecture de l'insert p39.
Les protéines présentant les plus fortes identités de séquences avec les produits de ces ORF sont indiquées.

4.3.5 Transformation d'*E. coli* MA1 avec le plasmide p39

Afin de déterminer si les gènes de l'insert 39 confèrent la résistance à l'arsenic, nous avons transformé la souche *E. coli* MA1 (sensible à l'arsenic) avec le plasmide p39. Un transformant a été récupéré et son niveau de résistance à l'arsenic a été déterminé. Les résultats ont montré que l'insert 39 ne confère pas la résistance à l'arsenic à *E. coli* MA1. Deux hypothèses peuvent être émises :

(1) Les gènes de l'insert 39 ne sont pas fonctionnels dans une souche Gram négatif

(2) L'insert 39 ne contient pas la séquence promotrice permettant la transcription des gènes impliqués dans la résistance à l'arsenic

Pour tester cette seconde hypothèse, nous avons inversé le sens d'insertion de l'insert 39 dans pUC19 de manière à placer l'expression des gènes de l'opéron *ars* sous contrôle du promoteur P_{lac}. Ceci a été réalisé par hydrolyse du plasmide p39 par *Bam*HI, suivie d'une ligation des produits d'hydrolyse. Le mélange de ligation a été utilisé pour transformer *E. coli* MA1. La sélection des transformants a été réalisée dans un milieu LB additionné de 2 mM As(III) et d'IPTG. Des transformants ont été obtenus, et nous avons pu montrer par analyse de restriction par *Kpn*I que le sens d'insertion de l'insert 39 dans les plasmides correspondant était inversé par rapport à p39. Les transformants obtenus sont également résistants à 4 mM As(V).
Les gènes de l'insert 39 sont donc capables de conférer la résistance à As(III) et à As(V) chez *E. coli*, ce qui suggère que le transporteur d'arsénite (ORF 3) et au moins une arséniate réductase (ORF 4 ou ORF 5) sont fonctionnels dans cette bactérie.

4.3.6 Introduction de l'insert 39 dans le vecteur pSRK21 et transformation de *C. glutamicum* ArsB1-B2

Pour déterminer si les gènes que nous avons isolés confèrent la résistance à l'arsenic à *C. glutamicum* ArsB1-B2, l'insert 39 a été cloné dans le vecteur pSRK21 *E. coli*/*Corynebacterium* (Vesely *et al.*, 2003) préalablement hydrolysé par *Bam*HI et déphosphorylé. Le produit de ligation a été d'abord utilisé pour transformer la souche *E. coli* MA1. Des transformants résistants à As(III) et As(V) ont été obtenus. Le plasmide recombinant (pSRK21 + insert 39) de l'un des clones a été extrait puis utilisé pour transformer la souche *C. glutamicum* ArsB1-B2. La sélection des transformants de *C. glutamicum* ArsB1-B2 a été réalisée en présence de 14 mM As(III). Cependant aucun clone résistant à l'arsenic n'a été détecté.
Ce résultat n'est pas surprenant car d'une part, les résultats précédents (section 4.3.5) ont indiqué que l'opéron *ars* putatif porté par l'insert 39 ne comporte pas de promoteur et d'autre part (ii) le promoteur P_{lac} permettant l'expression de la résistance chez *E. coli* est probablement non fonctionnel dans *Corynebacterium*.

5 Deuxième approche: construction d'une banque d'ADN de l'isolat A33 chez *E. coli* MA1

La première approche a permis de détecter 5 ORF qui font probablement partie d'un même opéron de résistance à l'arsenic. Cependant cet opéron est incomplet. Il manquerait au moins la séquence promotrice qui permettrait l'expression des gènes que nous avons isolés.
Nous avons adopté une seconde approche pour isoler la totalité de cet opéron et/ou d'autres gènes impliqués dans la résistance à l'arsenic chez *Microbacterium* A33. La stratégie a consisté à :
→ hydrolyser partiellement l'ADN de l'isolat A33 et séparer les fragments obtenus sur gradient de saccharose afin de sélectionner des fragments de 7 à 10 kb
→ insérer les fragments sélectionnés dans le vecteur navette *E. coli/Corynebacterium,* pSRK21
→ transformer *E. coli* MA1 et sélectionner les transformants résistants à l'arsenic
→ transférer la banque dans *C. glutamicum* ArsB1-B2 et sélectionner les transformants résistants à l'arsenic

Cette approche nous permet de détecter aussi bien les gènes de l'opéron *ars* que d'autres gènes qui pourraient être impliqués dans la résistance à l'arsenic chez l'isolat A33.
Le transfert de la banque à *C. glutamicum* ArsB1-B2 devrait permettre l'expression d'éventuels gènes de résistance à l'arsenic qui ne seraient pas fonctionnels dans une bactérie Gram négatif.

5.1 Digestion de l'ADN de l'isolat A33 et sélection des fragments à cloner

L'enzyme *Bsp*143I (isoschizomère de *Sau*3AI) est couramment utilisée dans la construction de banques d'ADN. Elle coupe très fréquemment l'ADN au site GATC et produit des bouts cohésifs compatibles avec les extrémités générées par digestion du vecteur pSRK21 par *Bam*HI.
Des tests préalables ont été réalisés afin d'optimiser les conditions de digestion partielle de l'ADN de l'isolat A33 (voir partie matériel et méthode, section 6.9.1).
Parmi les fragments d'hydrolyse, nous avons choisi de récupérer ceux qui ont une taille de 7 à 10 kb, susceptibles de contenir l'opéron *ars* complet.
L'ADN total de l'isolat A33 a ainsi été partiellement hydrolysé par *Bsp*143I puis les fragments ont été séparés sur gradient de saccharose. Soixante fractions ont été obtenues et celles contenant

des fragments d'une taille de 7 à 10 kb ont été identifiées sur gel d'agarose (figure 40) puis mélangées.

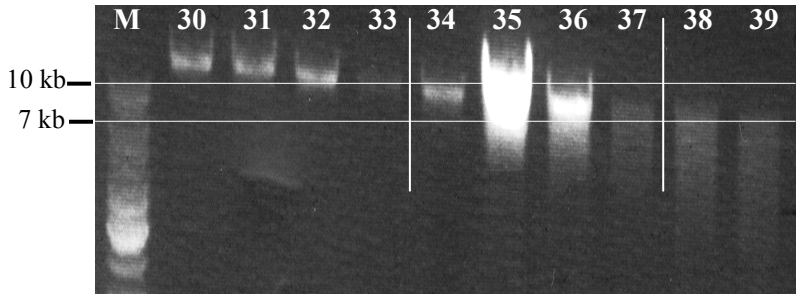


Figure 40. Migration électrophorétique des fractions 30 à 39 récupérées à partir du gradient de saccharose.
Les fractions 34 à 37 contiennent les fragments entre 7 et 10 kb. M : marqueur de taille (1 kb).

5.2 Insertion des fragments sélectionnés dans le vecteur pSRK21 et transformation d' *E. coli* MA1

En se basant sur une loi de distribution de Poisson, le nombre de transformants nécessaire pour couvrir le génome de l'isolat A33 a été estimé selon la formule suivante :

$$N = \ln(1-P)/\ln(1-I/G)$$

où P est la probabilité de couvrir le génome, N est le nombre de clones, I est la taille moyenne de l'insert et G est la taille estimée du génome.

La taille du génome de l'isolat A33 (*Microbacterium* sp.) est inconnue cependant celle du génome de *M. nematophilum* a été récemment estimée par une électrophorèse en champ pulsé (PFGE) à 2,8 Mb (Akimkina *et al.*, 2006). Par ailleurs, le séquençage des génomes de *Leifsonia xyli* (famille des *Microbacteriaceae*) et *C. glutamicum* ATCC 13032 a révélé qu'ils présentent respectivement une taille de 2,58 et 3,28 Mb (Monteiro-Vitorello *et al.*, 2004 ; Wehmeier *et al.*, 2001). En se basant sur ces valeurs, nous avons estimé une taille approximative de 3,5 Mb pour le génome de l'isolat A33.

Les fragments d'hydrolyse récupérés varient de 7 à 10 kb. Si on suppose que tous les inserts ont une taille de 7 kb, 2300 clones seraient donc nécessaires pour couvrir 99 % du génome de l'isolat A33.

Pour la réalisation de la banque, nous avons effectué quatre ligations de 20 µl au rapport vecteur/insert de 1/2 et nous avons obtenu 16000 clones résistants à la kanamycine. Ces clones ont été récupérés, mélangés puis stockés dans du glycérol à -80°C.
La sélection des clones résistants à l'arsenic a été réalisée sur milieu LB solide contenant 2 mM As(III) ou 4 mM As(V). Après une incubation de 24h à 37°C, 63 clones résistants ont été détectés sur As(III) et 28 sur As(V).

5.3 Transfert de la banque dans *C. glutamicum* ArsB1-B2

La préparation des cellules compétentes et la transformation de *C. glutamicum* ArsB1-B2 ont été réalisées selon un protocole qui permet d'obtenir une efficacité de transformation élevée (van der Rest *et al.*, 1999). Ce protocole consiste à cultiver les cellules de *C. glutamicum* à faible température en présence d'inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane et d'acide mycolique. Ces traitements fragilisent la paroi bactérienne et facilitent la pénétration de l'ADN plasmidique dans la cellule bactérienne. La transformation des cellules compétentes de *C. glutamicum* ArsB1-B2 a été réalisée par une électroporation suivie d'un choc thermique. Une efficacité de transformation de 3,7 10^6 UFC/µg d'ADN a été obtenue avec le plasmide pSRK21-cmx.
Les plasmides recombinants de la banque ont été extraits à partir des clones d'*E. coli* MA1, puis utilisés pour transformer *C. glutamicum* ArsB1-B2. Les transformants résistants à l'arsenic ont été directement sélectionnés sur milieu LB contenant 14 mM As(III). Trente-cinq clones de *C. glutamicum* ArsB1-B2 résistants à l'arsenic ont ainsi été obtenus.

5.4 Analyse des clones recombinants d'*E. coli* MA1 et de *C. glutamicum* ArsB1-B2 résistants à l'arsenic

5.4.1 Recherche par PCR du gène *ACR3(1)*

Nous avons sélectionné 91 clones d'*E. coli* MA1 résistants à l'arsenic (dont 63 résistants à As(III) et 28 à As(V)) ainsi que 35 clones de *C. glutamicum* ArsB1-B2 résistants à As(III). Ces 126 clones contiennent à priori des gènes de résistance à l'arsenic de l'isolat A33. Afin de distinguer ceux qui contiennent les gènes de l'opéron *ars,* nous avons recherché par PCR la présence du gène *ACR3(1)* en utilisant le couple d'amorce dacr1F/dacr1R. Il s'est avéré que tous les clones présentaient une amplification positive.

5.4.2 Profils de restriction de l'ADN plasmidique des clones résistants à l'arsenic

L'ADN plasmidique de chaque clone a été hydrolysé séparément avec les enzymes de restriction *Bam*HI, *Kpn*I et *Pst*I. Les 126 plasmides analysés ont été ainsi classés selon leur profil de restriction en six groupes différents, qui correspondraient à 6 inserts différents contenant le gène *ACR3(1)* (figure 41). Le tableau 16 indique pour ces 6 groupes, la taille des bandes obtenues avec chaque enzyme de restriction ainsi que le nombre de clones (*E. coli* et *C. glutamicum*). Nous avons voulu déterminer la taille de ces inserts sur la base des profils de restriction obtenus. Cependant pour un même insert les résultats sont parfois différents en fonction du profil de restriction considéré (*Bam*HI, *Kpn*I ou *Pst*I). Ces résultats ambigus peuvent être dûs à la présence de fragments de même taille qui migrent au même niveau dans le gel d'agarose ou encore à la présence de fragments de petites tailles qui ne sont pas visualisés sur gel d'agarose. Par ailleurs, le marqueur de taille que nous avons utilisé ne permet pas de déterminer la taille des fragments supérieurs à 10 kb.

Tableau 16. Classement des clones résistants à l'arsenic en fonction de leurs profils de restriction

Groupe	Taille des fragments de restriction (kb)			Nombre de clones		
				E. coli		*C. glutamicum*
	*Bam*HI	*Pst*I	*Kpn*I	As(III)^r	As(V)^r	As(III)^r
1	>10/4,5/0,6/0,5	7/4/3,3/1,2/0,4	> 10 et 4,5	57	28	2
2	8 /4,5 /0,6/0,5	9/3	9/ 4,3	1		
3	7/5/1,5	9/3,5	10 et 3,5	3		24
4	>10/4	7/3,5	>10/5,5/2,3	1		
5	>10/8	>10/7	>10/7	1		
6	10/1,5/1	6	>10			9

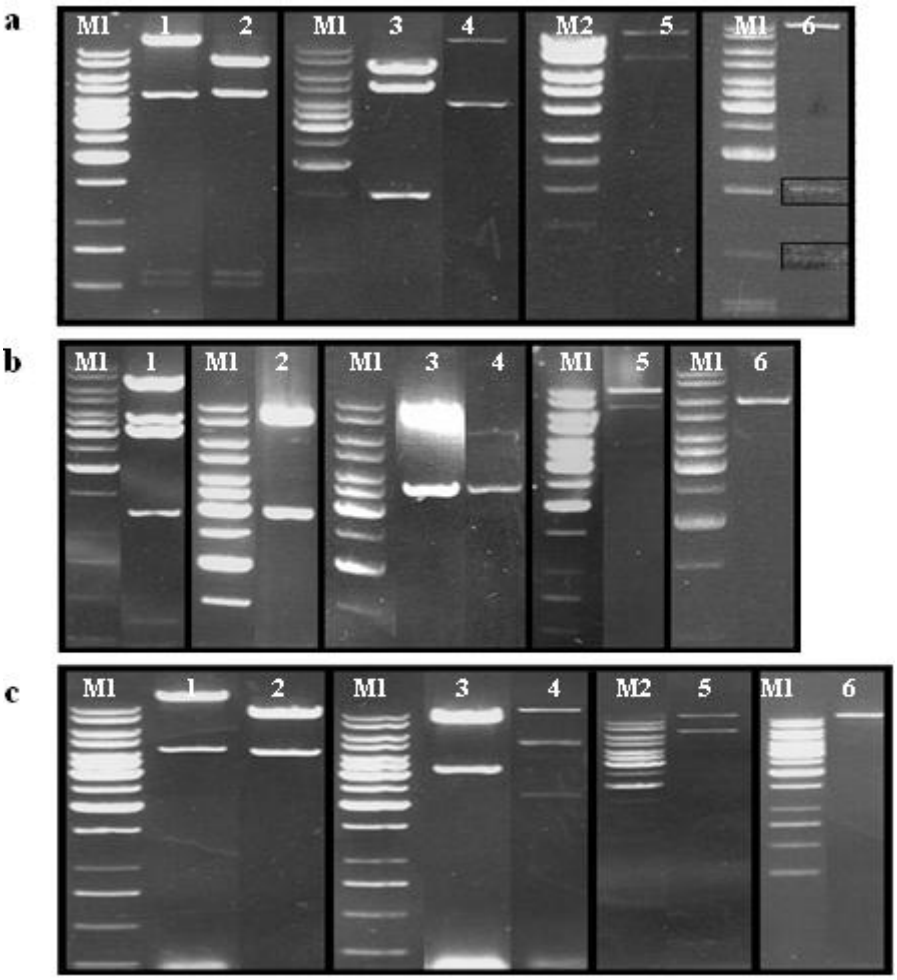


Figure 41. Profils de restriction des 6 groupes de plasmides conférant la résistance à l'arsenic avec *Bam*HI (a), *Pst*I (b) et *Kpn*I (c).
Puits 1 à 6 : ADN plasmidique hydrolysé d'un clone du groupe 1 à 6. M1 : marqueur de taille 1 kb (10 - 8 - 6 - 5 - 4 - 3,5 - 3 - 2,5 - 2 - 1,5 - 1 - 0,75 - 0,5 et 0,25 kb), M2 : marqueur de taille MassRuler^{TM} (10 - 8 - 6 - 5 - 4 - 3 - 2,5 - 2 et 1,5 kb).

5.5 Choix de l'insert à séquencer

D'après les résultats précédents, les 6 inserts différents contiennent le gène *ACR3(1)*. Par conséquent, le ou les gènes de l'isolat A33, qui ont conféré une résistance à l'arsenic aux 6 groupes de clones, sont probablement ceux d'un opéron *ars*. Une partie d'un opéron *ars* de l'isolat A33 a été précédemment séquencée. Notre objectif a donc été, dans un premier temps, de compléter la séquence de cet opéron à partir d'un des 6 inserts dont nous disposions. L'insert susceptible de contenir l'opéron *ars* complet devait répondre aux critères suivants : (i) contenir un fragment *Bam*HI de 4,328 kb qui correspond à l'opéron *ars* partiel précédemment caractérisé

et (ii) conférer la résistance à l'arsenic à *C. glutamicum* ArsB1-B2, c'est-à-dire contenir probablement la séquence promotrice nécessaire pour l'expression des gènes *ars* dans cette bactérie.

L'insert contenu dans les clones du groupe 1 répondait à ces deux critères et semblait donc le plus approprié pour compléter la séquence de l'opéron *ars* de l'isolat A33. Parmi les clones du groupe 1 nous avons choisi un clone d'*E. coli* MA1 que nous avons désigné clone(1). L'insert de ce clone a été désigné insert(1).

5.6 Séquençage de l'insert(1) et analyse de la séquence

Nous avons commencé par déterminer les séquences des extrémités de l'insert(1), en utilisant les amorces M13F et M13R. A partir de chaque séquence obtenue nous avons désigné une amorce qui a été utilisée pour poursuivre le séquençage. Nous avons procédé de la même manière jusqu'au recouvrement des séquences de deux brins d'ADN. L'analyse de la séquence de l'insert(1) a révélé la présence de 15 phases ouvertes de lecture (figure 42). Les protéines qui présentent les plus fortes identités de séquences avec les produits de ces ORF sont indiquées dans le tableau 17.

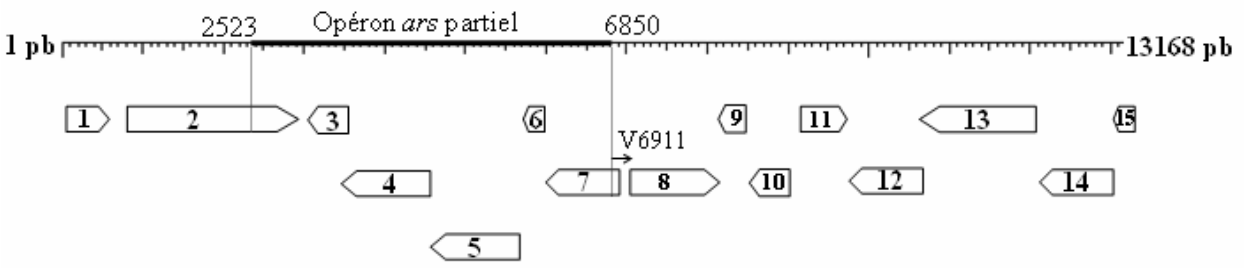


Figure 42. Représentation schématique des phases ouvertes de lecture de l'insert(1) et de la position de l'opéron *ars* partiel au niveau de cet insert.

Tableau 17. Analyse des 15 phases ouvertes de lecture de l'insert(1)

ORF	Cadre de lecture	Nombre d'acides aminés	Position	Protéine homologue
1	+1	183	1-552	Pas d'homologie significative
2	+3	699	777-2876	Protéine hypothétique
3	-3	135	3069-3476	**Arséniate réductase**
4	-2	331	3505-4500	**Arséniate réductase/Protéine régulatrice ArsR**
5	-3	363	4503-5594	**Transporteur d'arsénite**
6	-1	108	5591-5917	**Thiorédoxines**
7	-2	324	5914-6888	**Thiorédoxine réductase**
8	+3	339	6984-8003	**Arséniate réductase**/Protéine régulatrice
9	-1	122	8033-8401	Riboflavine kinase
10	-2	169	8419-8928	Oxydoréductase
11	+2	200	9032-9634	Protéine hypothétique
12	–3	294	9654-10538	Ribokinase
13	-2	459	10531-11910	Monooxygénase
14	-2	282	12019-12867	Protéine de transport ABC
15	-1	100	12860-13162	Protéine de transport ABC

Les résultats confirment la présence d'une séquence de 4,328 kb identique a celle de l'opéron *ars* partiel précédemment séquencé (figure 42).

Le produit de l'ORF 8 (6984 à 8003 pb) est une protéine atypique : la partie N-terminale (correspondant à 133 pb ; position 6984-7117) présente un fort pourcentage d'identité de séquence avec des arséniate réductases, tandis que la partie C-terminale (≈ 882 pb, position 7118-8004)) est homologue à des protéines régulatrices différentes des protéines ArsR. La présence d'un site *Bsp*431I à 7117 pb, laisse penser que cette ORF 8 est chimérique et résulterait de la ligation artéfactuelle de deux fragments d'ADN différents dans le même vecteur.

5.7 Vérification de la séquence de l'ORF 8

Afin de vérifier la séquence de l'ORF 8, nous avons désigné une amorce (V6911) complémentaire à la séquence qui se trouve en amont de l'ORF 8 (figure 42). Nous avons estimé que la probabilité que cette amorce puisse s'hybrider au niveau des inserts des clones du groupe 3 et du groupe 6 (tableau 16) était particulièrement élevée. En effet ces deux inserts confèrent la résistance à l'arsenic à *C. glutamicum* ArsB1-B2. Ils contiendraient alors la séquence promotrice qui permet aux gènes de l'opéron *ars* de s'exprimer dans cette souche Gram positif. Selon

l'arrangement des gènes de l'opéron cette séquence promotrice se trouverait en amont de l'ORF 7 de l'insert(1) entre 6888 et 6984 pb. L'amorce (V6911) ce trouve au niveau de cette éventuelle séquence promotrice.

Nous avons donc utilisé l'amorce (V6911) pour séquencer l'insert des clones du groupe 3. Cet insert a été désigné insert(3). Nous avons d'abord obtenu une séquence de 559 pb à partir de laquelle une autre amorce (V6911(1)) a été désignée pour poursuivre le séquençage. Au final, une séquence de 1231 pb de l'insert(3) a été ainsi obtenue.

Le résultat de la comparaison des séquences des inserts (1) et (3) est représenté dans la figure 43.

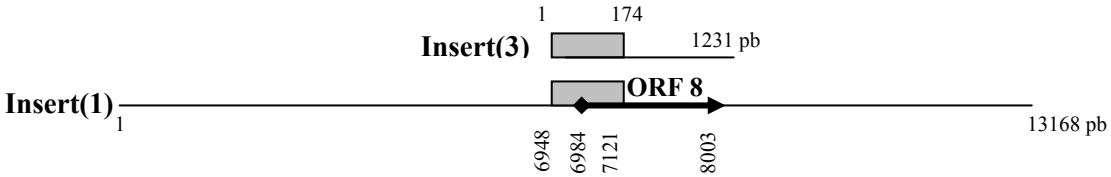


Figure 43. Représentation schématique de l'alignement entre les séquences des inserts (1) et (3).
Les séquences identiques sont représentées par des rectangles de couleur grise.

Les résultats montrent que les 174 premières paires de base de l'insert(3) présentent 100 % d'identité avec la séquence nucléotidique de l'insert(1) allant de 6984 à 7121 pb. Au niveau de cette dernière on retrouve les 133 premières paires de base de l'ORF 8 (de 6984 à 7121). En revanche on remarque que la suite de la séquence de l'ORF 8 diffère totalement de celle de l'insert(3). Ces résultats confirment donc que l'insert(1) est le résultat d'une ligation entre deux fragments *Bsp*431I non adjacents au niveau de l'ADN de l'isolat A33.

L'analyse de la séquence de l'insert(3) a révélé la présence de 3 phases ouvertes de lecture (figure 44). Le produit de l'ORF 1 est homologue à des protéines arséniate réductases.

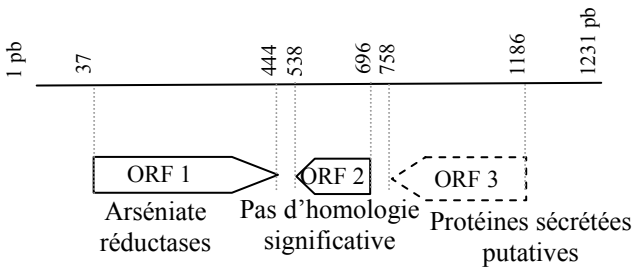


Figure 44. Représentation des phases ouvertes de lecture de l'insert(3).
Les protéines présentant les plus fortes homologies avec les produits de ces ORF sont indiquées.

5.8 Vérification par hybridation moléculaire de l'arrangement des gènes *ars* et des gènes avoisinants

D'après les résultats du séquençage des inserts (1) et (3), l'arrangement des gènes *ars* et des gènes avoisinants serait celui indiqué dans la figure 45. La séquence représentée dans cette figure a été désignée séquence 1/3. Les produits des ORF 3 à 8 ont été respectivement désignés ArsC1, ArsRC2, Acr3(1)p, ArsX, ArsT et ArsC3.

Afin de vérifier cet arrangement au niveau de l'ADN de l'isolat A33, nous avons réalisé un Southern blot en utilisant la sonde *ACR3(1)*/A33. Cette sonde correspond à une portion de l'ORF 5 (nucléotides 4686 à 5385). L'ADN de l'isolat A33 a été hydrolysé soit avec une seule enzyme de restriction (*Bam*HI, *Tat*I ou *Ppu*21I), soit avec deux enzymes (*Kpn*I/*Bam*HI, *Sca*I/*Hin*dIII et *Sca*I/*Kpn*I) (figure 46a). Les sites de restriction de ces enzymes sont représentés dans la figure 45. Les tailles attendues des fragments d'ADN révélés par la sonde sont indiquées dans le tableau 18.

Tableau 18. Tailles attendues des fragments révélés par la sonde *ACR3(1)*/A33

Enzymes de restriction	Taille attendue du fragment révélé par la sonde *ACR3(1)*/A33 (kb)
*Bam*HI	4,328
*Tat*I	5,901
*Ppu*21I	4,481
*Kpn*I/*Bam*HI	2,631
*Sca*I/*Hin*dIII	7,630
*Sca*I/*Kpn*I	3,430

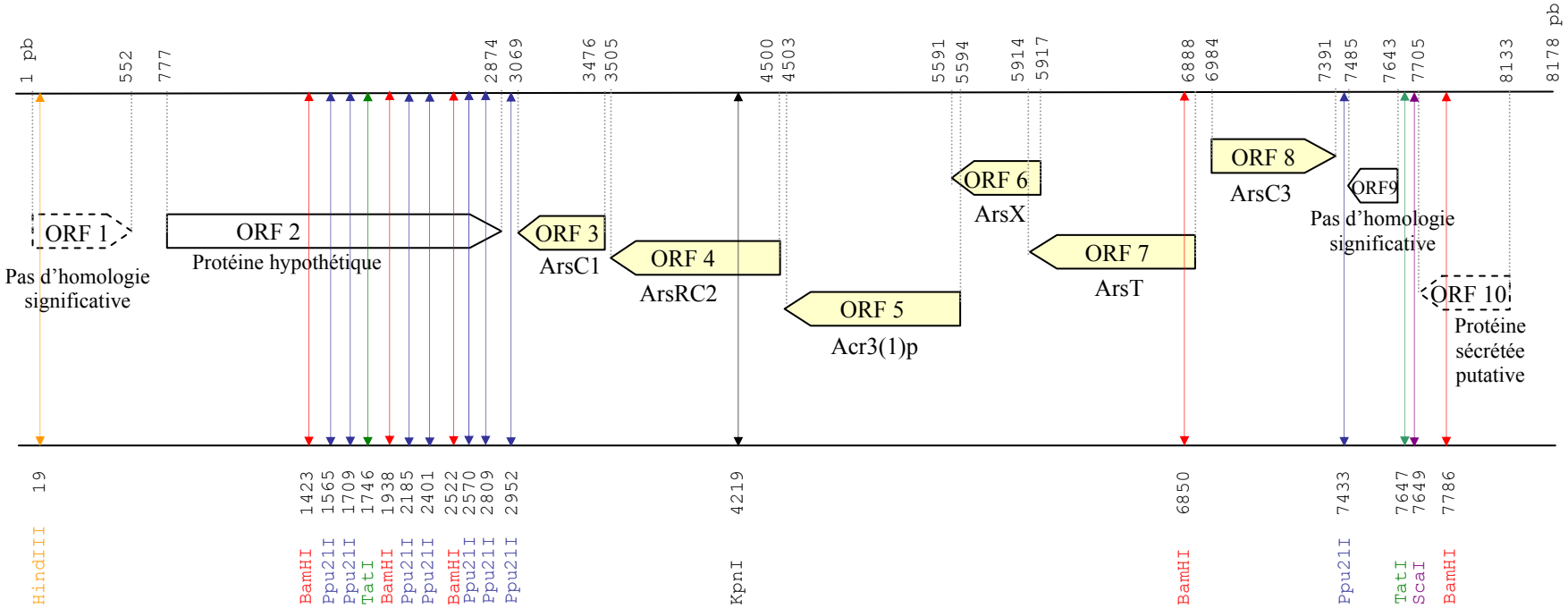


Figure 45. Séquence 1/3 : arrangement des gènes *ars* et des gènes avoisinants au niveau de l'ADN de l'isolat A33.
(Les sites de restriction des enzymes utilisées pour hydrolyser l'ADN total de l'isolat A33 sont indiqués).

Les résultats de l'hybridation (figure 46b) ont montré que tous les fragments révélés par la sonde *ACR3(1)/A33* sont de taille attendue. On en a donc conclu que l'arrangement des gènes *ars* et des gènes avoisinants de l'isolat A33 est le même que celui représenté dans la figure 45. Une analyse *in silico* des produits de ces ORF est présentée dans le paragraphe 6.

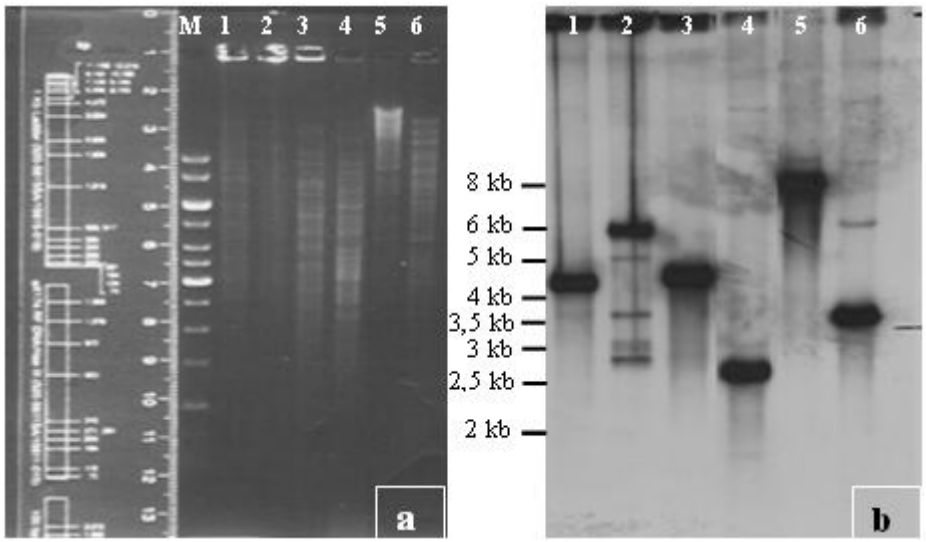


Figure 46. Séparation des produits de digestion de l'ADN de l'isolat A33 sur gel d'agarose 0,8 % (a). Résultat de l'hybridation avec la sonde *ACR3(1)*/A33 (b).
Puit 1: fragment(s) *Bam*HI, 2: *Tat*I, 3: *Ppu*21I, 4: *Kpn*I/*Bam*HI, 5: *Sca*I/*Hin*dIII et 6: *Sca*I/*Kpn*I. M: marqueur de taille (1 kb).

5.9 Recherche d'un insert contenant les ORF 3 à 8 de l'isolat A33

Nous avons recherché parmi les 5 groupes de clones (2 à 6) celui qui posséderait un insert contenant les ORF d'intérêts. Cette recherche a été réalisée par PCR en utilisant les 2 couples d'amorces suivants : Mars2F/Mars2R et Mars3R/Mars3F (figure 47). Le premier permet l'amplification d'un fragment de 806 pb qui contient une partie des ORF 3 et 4 et le deuxième un fragment de 524 pb contenant l'ORF 8 et une partie de l'ORF 9. L'insert contenant la totalité des ORF 3 à 8 devrait répondre positivement à l'amplification avec ces 2 couples d'amorces.

Les résultats (figure 48) ont montré qu'aucun clone ne présente de réponse positive avec les deux couples d'amorces. Par conséquent, aucun clone ne possède l'intégralité des ORF 3 à 8. Toutefois tous les clones présentent une réponse positive à un des deux couples d'amorces, ils possèdent donc tous une partie de la séquence 1/3.

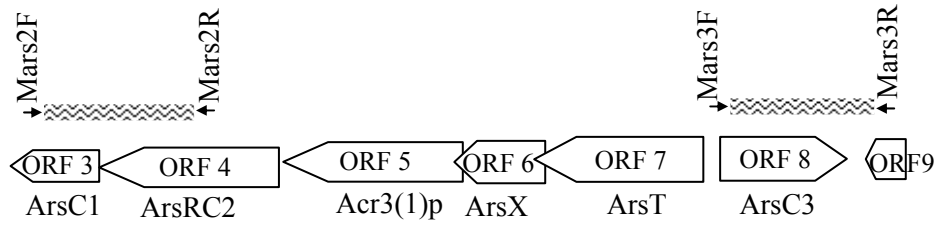


Figure 47. Représentation de la position des couples d'amorces Mars2F/Mars2R et Mars4R/Mars3F.

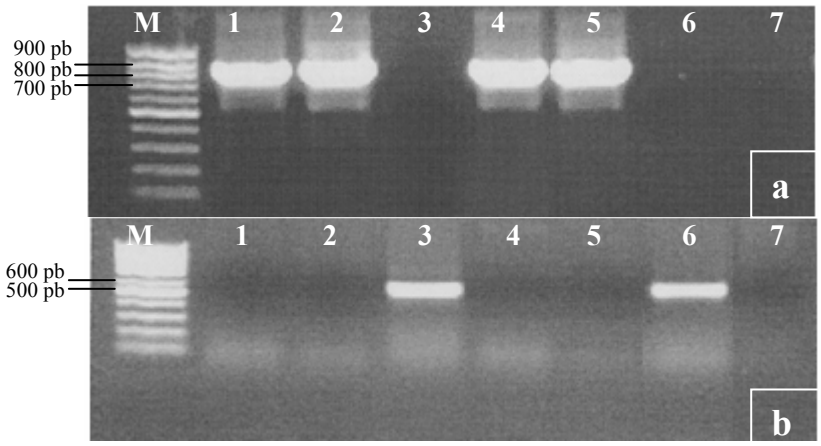


Figure 48. Résultats des amplifications des ADN plasmidiques des 5 groupes de clones avec les couples d'amorces Mars2F/Mars2R (a) et Mars3R/Mars3F (b).
Puits 1 à 6 : ADN plasmidique des groupes des clones 1 à 6. 7 : témoin négatif de la PCR. M : marqueur de taille (100 pb).

5.10 Construction d'un fragment d'ADN contenant les ORF 3 à 8

Afin de construire un fragment d'ADN contenant les ORF 3 à 8, un plasmide dénommé pA a été préalablement construit par ligation des 2 fragments suivants dans pSRK21:

- fragment *Sca*I/*Bam*HI de taille 799 pb, contenant une partie de l'ORF 7 et la totalité des ORF 8 et 9. Ce fragment correspond à la partie 6850 à 7649 pb de la séquence 1/3 (figure 49a).
- fragment *Bam*HI de taille 4328 pb qui correspond à l'opéron *ars* partiel obtenu par la première approche. Ce fragment contient les ORF 3 à 6 ainsi qu'une partie de l'ORF 7. Il correspond à la partie 2522 à 6850 pb de la séquence 1/3 (figure 49a).

La stratégie adoptée pour liguer ces 2 fragments est résumée dans la figure 49b :
- la première étape a consisté à insérer le fragment *Sca*I/*Bam*HI dans le vecteur pSRK21 préalablement hydrolysé par les enzymes *Sma*I et *Bam*HI.
- la deuxième étape a consisté à hydrolyser par *Bam*HI le vecteur recombinant (pSRK21 + fragment *Bam*HI/*Sca*I). Le fragment *Bam*HI de 4328 pb a été ensuite inséré au niveau de ce vecteur. Une vérification du sens d'insertion a été réalisée par hydrolyse avec l'enzyme *Kpn*I. Le vecteur recombinant retenu a été désigné plasmide pA et l'insert contenant les ORF 3 à 9, "insert A".
- la dernière étape a consisté à vérifier que la ligation des 2 fragments *Sca*I/*Bam*HI (799 pb) et *Bam*HI (4328 pb) a reconstitué une séquence correcte de l'ORF 7. Pour cela nous avons désigné une amorce V6680 à 170 pb du site de ligation *Bam*HI (figure 49a). Cette amorce a été utilisée pour séquencer le plasmide pA. Une séquence de 706 pb couvrant le site *Bam*HI a été obtenue. Elle présente 100 % d'identité avec la partie 6728 à 7434 pb de la séquence 1/3.

Le plasmide pA a été ensuite hydrolysé avec l'enzyme *Ppu*21I générant ainsi un fragment de taille 4481 pb (figure 49a) que nous avons désigné insert B. Cet insert a été introduit dans le vecteur pSRK21 hydrolysé par l'enzyme *Sma*I. Une vérification du sens d'insertion a été réalisée par hydrolyse avec l'enzyme *Bam*HI et le vecteur recombinant obtenu a été désigné plasmide pB (figure 50).

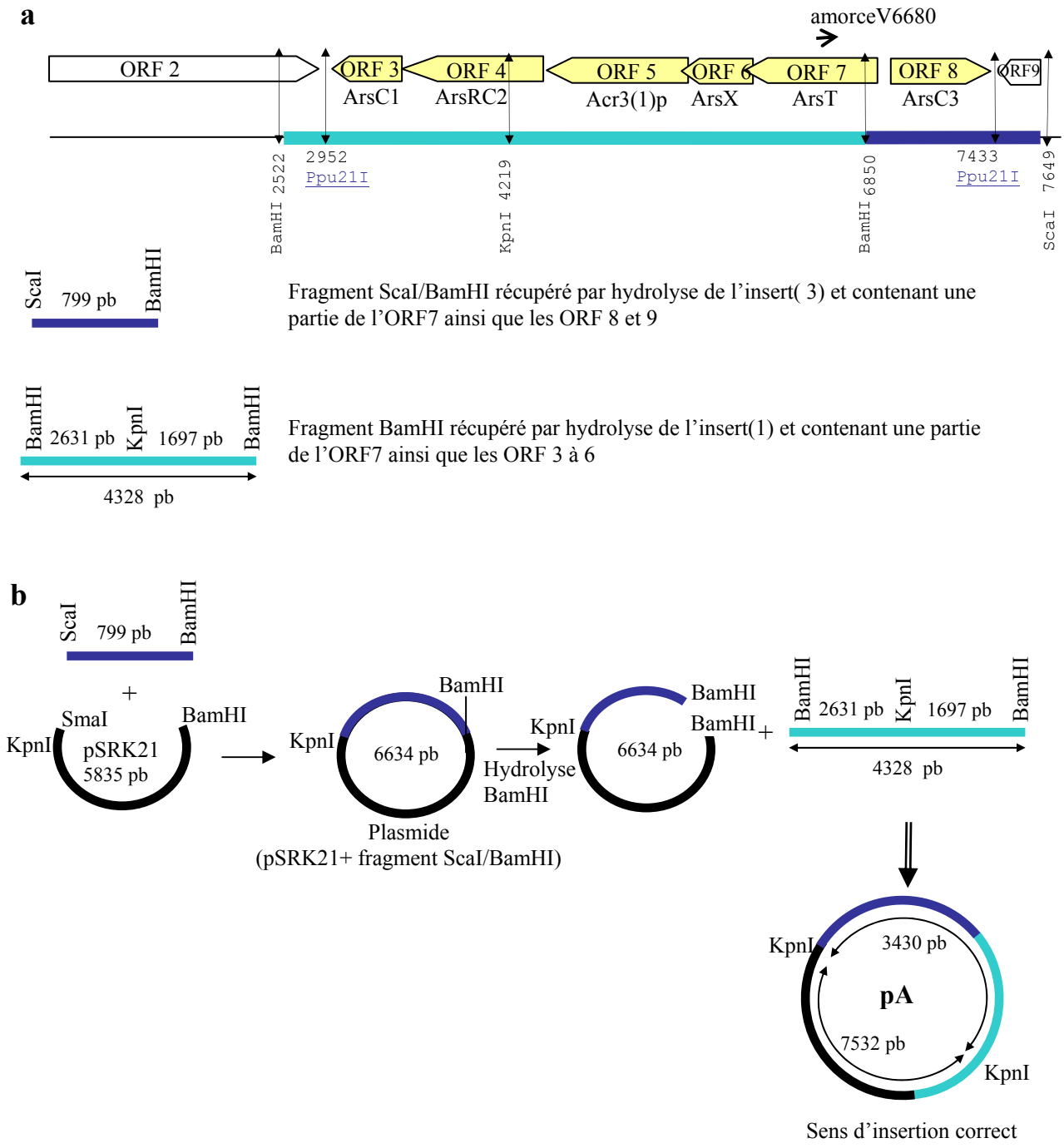


Figure 49. Position des fragments *Sca*I/*Bam*HI et *Bam*HI au niveau de la séquence 1/3 (a). Stratégie utilisée pour obtenir tous les gènes *ars* de l'isolat A33 au niveau d'un même fragment d'ADN (b).

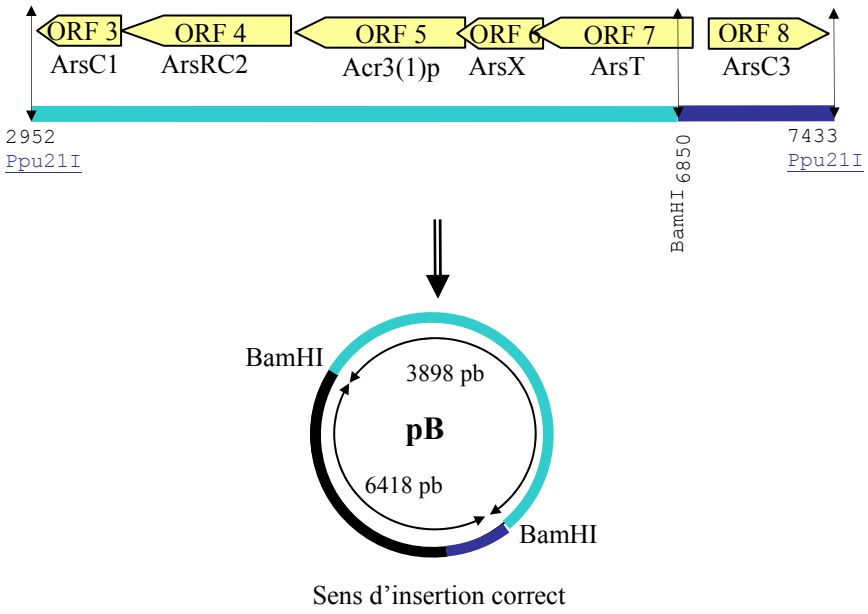


Figure 50. Sens d'insertion de l'insert B dans le vecteur pSRK21.

6 Analyse des produits des ORF 1 à 10 de la séquence 1/3

Les produits des 10 ORF de la séquence 1/3 ont été analysés et comparés aux séquences protéiques disponibles dans les banques de données. Les 10 ORF ont été respectivement désignées comme suit : "ORF 1", "ORF 2", *arsC1*, *arsRC2*, *ACR3(1)*, *arsT*, *arsX*, *arsC3*, "ORF 9" et "ORF 10".

L'analyse avec le programme "fgenesB" a révélé que les gènes de la séquence 1/3 feraient partie de 4 unités transcriptionnelles dont 3 opérons. Ainsi, les ORF 1 et 2 feraient partie d'un même opéron. De même pour *arsC1*, *arsRC2*, *ACR3(1)*, *arsT* et *arsX* et pour les ORF 9 et 10.

6.1 Produits des ORF 1, 2, 9 et 10

Les ORF 1 et 10 sont incomplètes. Les produits des ORF 2 et 10 présentent respectivement une homologie avec une protéine hypothétique d'une actinobactérie marine (*marine actinobacterium* PHSC20C1) et une protéine sécrétée putative de *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. Les produits des ORF 1 et 9 ne présentent aucune homologie significative avec les protéines répertoriées dans les banques de données.

Ces résultats indiquent que les produits des ORF 1, 2, 9 et 10 ne sont pas homologues à des protéines connues pour être impliquées dans la résistance à l'arsenic. Toutefois l'hypothèse de l'implication de ces ORF dans la résistance à l'arsenic chez l'isolat A33, n'est pas à rejeter et devrait être vérifiée expérimentalement.

6.2 Protéine ArsRC2

Le gène *arsRC2* est atypique car il semble être traduit comme une protéine de fusion de 331 acides aminés. La partie N-terminale de la séquence protéique (≈ 200 acides aminés) est homologue à des protéines régulatrices ArsR, tandis que la partie C-terminale présente une forte similarité de séquence avec des arséniate réductases. Afin de mieux analyser le produit du gène *arsRC2*, nous avons séparé théoriquement les 2 gènes *arsR* et *arsC* en ajoutant un codon stop fictif (TAA) à 348 nucléotides en 3' du codon start (ATG) du gène *arsRC2*. Les produits des gènes *arsR* (116 acides aminés) et *ars*C*2* (215 acides aminés) sont analysés séparément dans les paragraphes suivants.

Nous avons également recherché à l'aide du programme "CDART" (Conserved Domain Architecture Retrieval Tool) (Geer *et al.*, 2002) des protéines qui présentent la même architecture de domaines que la protéine ArsRC2. L'architecture de domaines d'une protéine est définie comme la suite ordonnée des domaines qui la composent (de N- vers C-terminal) (Geer et *al*., 2002). Cette recherche a mis en évidence l'existence de 39 protéines de type "ArsRC" (essentiellement d'α-protéobactéries et de bactéries Gram positif à haut GC%) et 13 protéines de type "ArsCR" (exclusivement de γ-protéobactéries). Parmi les protéines du type "ArsRC" se trouve la protéine ArsRC de *Leptospirillum ferriphilum* (Tuffin *et al.*, 2006). Cette dernière est codée par un gène *arsRC* faisant partie d'un opéron *arsRCB* chromosomique. Les protéines ArsRC de *L. ferriphilum* et de l'isolat A33 présentent 23,6 % d'identité en acides aminés. Les autres protéines de type "ArsRC" et "ArsCR" ne sont pas toutes codées par des gènes appartenant à des opérons *ars* putatifs.

6.3 Arséniate réductases putatives : ArsC1, ArsC2 et ArsC3

Les produits des gènes *arsC1*, "*arsC2*" et *arsC3* sont homologues à des arséniate réductases de bactéries Gram positif à haut GC% (figure 51). On remarque que les ArsC les plus proches

d'ArsC1 et ArsC2 sont respectivement ArsC (ZP_00377917) et ArsC (ZP_00377916) de *Brevibacterium linens* BL2 avec 80,4 % et 50 % d'identité en acides aminés.

Les trois ArsC de l'isolat A33 présentent un faible degré d'identité entre elles (23,4 % entre ArsC2 et ArsC3, 38,4 % entre ArsC1 et ArsC3 et 32,4 % entre ArsC1 et ArsC2).

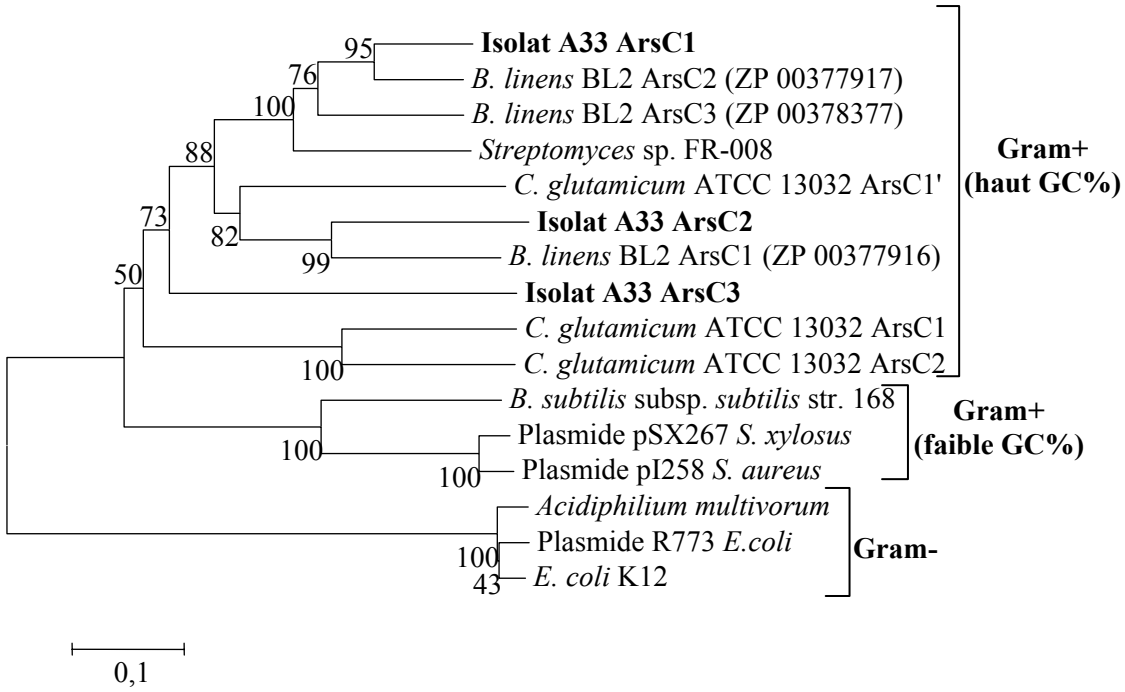


Figure 51. Phylogénie des séquences protéiques des arséniate réductases de différentes bactéries.

Les valeurs de *bootstrap* sont indiquées.

ArsC1 et ArsC2 présentent les caractéristiques des ArsC thiorédoxine-dépendantes représentées par ArsC du plasmide pI258 de *S. aureus* (voir analyse bibliographique, section 2.4.5). Elles contiennent le motif "CX_5R" typique des protéines tyrosine phosphatases ainsi que trois résidus cystéines dont un au niveau du motif "CX_5R" et deux en aval (figure 52). Ces trois résidus cystéines sont essentiels à l'activité catalytique des ArsC thiorédoxine dépendantes.

ArsC3 contient également un motif "CX_5R" cependant elle ne contient pas les deux résidus cystéines en aval. Ces caractéristiques suggèrent qu'ArsC3 diffère des ArsC bactériennes thiorédoxine- ou glutarédoxine-dépendantes. De même, ArsC1 et ArsC2 de *C. glutamicum* ne présentent qu'un seul résidu cystéine situé au niveau du motif "CX_5R" (figure 52).



Figure 52. Alignement multiple des séquences des arséniate réductases de bactéries Gram positif et Gram négatif.
Le motif conservé "CX_5R" est encadré et les résidus cystéines qui sont/seraient nécessaires pour l'activité catalytique de l'enzyme sont marqués en rouge.

6.4 Transporteur d'arsénite : Acr3(1)p

Le produit du gène *ACR3(1)* est homologue à des transporteurs d'arsénite de la famille Acr3(1)p (figure 53). Ce résultat, obtenu avec la séquence totale de Acr3(1)p de l'isolat A33, confirme les résultats du premier chapitre de la thèse. Acr3(1)p présente 58,2 %, 62,5 % et 66,3 % d'identités en acides aminés avec respectivement Acr3(1)p1 de *C. glutamicum*, Acr3(1)p2 de *C. glutamicum* et Acr3(1)p de *Streptomyces* sp. FR-008. Le pourcentage d'identité le plus élevé (81,7 %) est observé avec un transporteur d'arsénite de *B. linens* BL2 (ZP_00377915) (figure 53).

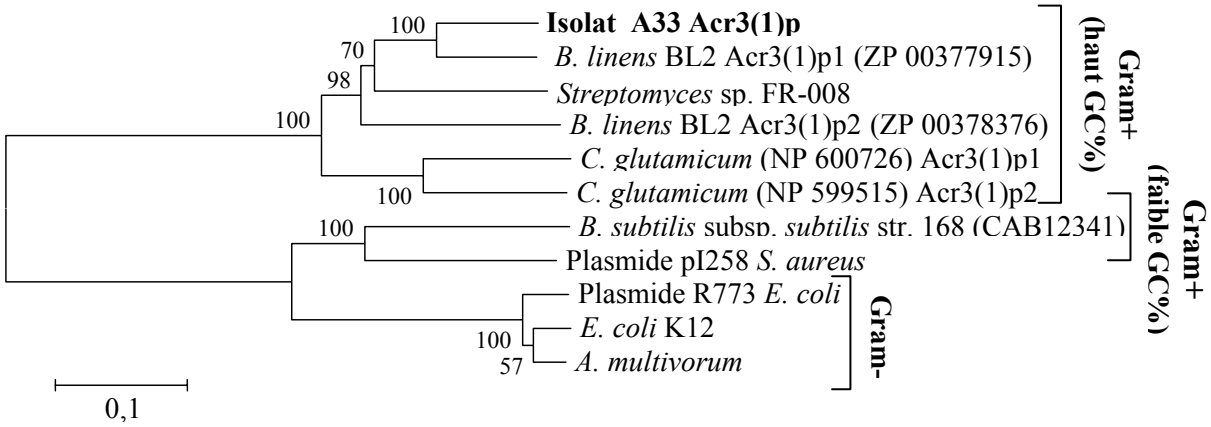


Figure 53. Phylogénie des transporteurs d'arsénite de diverses bactéries Gram+ et Gram-. Les valeurs de *bootstrap* sont indiquées.

6.5 Répresseur transcriptionnel : ArsR

Le produit du gène *arsR* est homologue à des régulateurs transcriptionnels de la famille ArsR, suggérant ainsi son rôle de répresseur de la transcription des gènes de résistance à l'arsenic. Il est regroupé avec des ArsR de bactéries Gram positif à haut GC% (figure 54).

Comme montré dans la figure 55, la protéine ArsR de l'isolat A33 contient le motif conservé (ES**C**V**C**D) contenant les deux résidus cystéines qui interviennent dans la fixation de l'inducteur (Shi *et al.*, 1994), ainsi qu'un motif "hélice tour hélice" "LAELADVSQPTVSHHLK" qui permet la fixation d'ArsR à l'ADN (voir analyse bibliographique section 2.4.6). Classiquement, la fixation de l'inducteur induit un changement conformationnel du domaine "hélice tour hélice" adjacent ce qui provoque une dissociation du complexe répresseur-ADN.

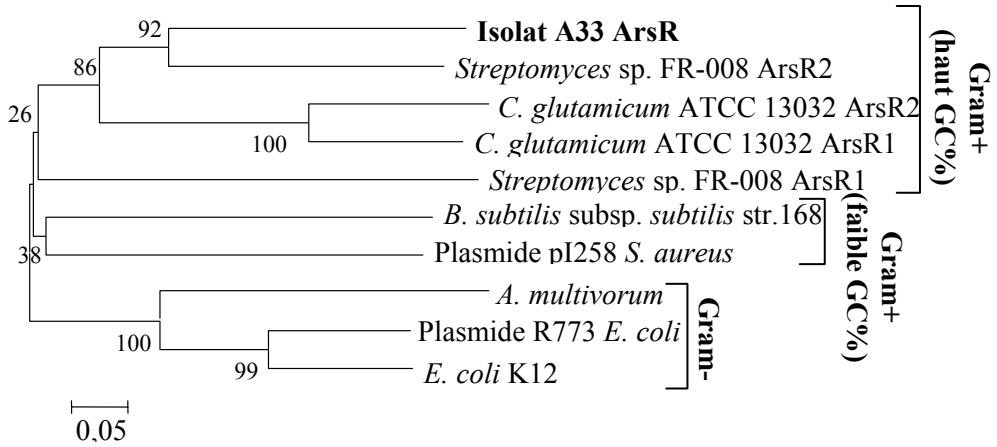


Figure 54. Phylogénie des protéines régulatrices ArsR de diverses bactéries Gram+ et Gram-. Les valeurs de *bootstrap* sont indiquées.

```
Isolat A33                1    ------MN-------VTLTTTGDTCSPVATHAIGVDAATSVAATLKALSDPLRLRMLSAI
Streptomyces sp. ArsR2    1    MCQHRRMSNTKVLPLLEPESVAPCCPPLTERPFTAEEAERTAKMFKALGDPVRLRLFSAV
C. glutamicum ArsR2       1    ------MT---APIHLPLINSAECCS-LAAEPLSVDDAERYAEIFKVLGEPVRLRILSHL
C. glutamicum ArsR1       1    ------MT---TLHTIQLANPTECCT-LATGPLSSDESEHYADLFKVLGDPVRLRILSQL
R773 E. coli              1    -----------------------------------MLQLTPLQLFKNLSDETRLGIVLLL
E. coli                   1    -----------------------------------MSFLLPIQLFKILADETRLGIVLLL
A. multivorum             1    -----------------------------------MPLTALKLFKNLSDETRLGIVLLL
pI258 S. aureus           1    -----------------------------------MSYKELSTILKILSDSSRLEILDLL
B. subtilis               1    ------------------------------MDETKSELLRKYEQKFKALADQKRLEIMYEL
Streptomyces sp. ArsR1    1    -----------------------------------MLTSVDPDVIRVLGDPLRLQIVTLL

                                                  Hélice tour hélice
Isolat A33               48    ASDPRGESCVCDLAELADVSQPTVSHHLKVLKDVDVLVSERRGTWVWYR-----------
Streptomyces sp. ArsR2   61    ASHPSGEACVCDISDVG-VSQPTVSHHLKKLKEAGLLGSERRGTWVYYR-----------
C. glutamicum ArsR2      51    AAEGCTPTTVNELTEIMGLSQPTISHHLKKMTDAGLLVRIPEGRTVFHQ-----------
C. glutamicum ArsR1      51    AAGGCGPVSVNELTDLMGLSQPTISHHLKKMTEAGFLDRVPEGRVVLHR-----------
R773 E. coli             26    R--EMGELCVCDLCMALDQSQPKISRHLAMLRESGILLDRKQGKWVHYRLSPHIPSWAAQ
E. coli                  26    S--ELGELCVCDLCTALDQSQPKISRHLALLRESGLLLDRKQGKWVHYRLSPHIPAWAAK
A. multivorum            25    R--ELGELCVCDFCTALDEIPAQD------LPSSGNAPGKRS------------------
pI258 S. aureus          26    S---CGELCACDLLEHFQFSQPTLSHHMKSLVDNELVTTRKDGNKHWYQLN--------H
B. subtilis              32    CQ--RGKTCVCDLTEIFEVTQSKLSYHLKILLDANLITKETKGTWSYYDLN-------DE
Streptomyces sp. ArsR1   26    AR---ETLCTTHLVEETGAKQTNLSNHMKVLREAGIVETEPCGRFTYYKLKP--------

Isolat A33               97   -INPNRRGAVTALLDSFAPAT-------------
Streptomyces sp. ArsR2   109  -VEASVLAAMGQLLTAR-----------------
C. glutamicum ArsR2      100  -VQPETFTNLRTILQIG-----------------
C. glutamicum ArsR1      100  -VRPELFAELRTVLQIGSMEL-------------
R773 E. coli             84   IIEQAWLSQQDDVQVIARKLASVNCSGSSKAVCI
E. coli                  84   IIDEAWRCEQEKVQAIVRNLARQNCSGDSKNICS
A. multivorum            59   -IAGSQAGEMGSLSLIP-AYSFLGCSGD------
pI258 S. aureus          75   AILDDIIQNLNIINTSNQRCVCKNVKSGDC----
B. subtilis              83   EVNGLLSEELCCIFRKKGEGDCC-----------
Streptomyces sp. ArsR1   75   EVLTGLSEQFADLAASARTAAENKRACP------
```

Figure 55. Alignement multiple des protéines régulatrices ArsR de diverses bactéries Gram+ et Gram-.
Le site de fixation de l'arsénite est encadré. Le motif hélice tour hélice est marqué en rouge.

6.6 Thiorédoxine réductase : ArsT

La protéine ArsT de l'isolat A33 est homologue aux thiorédoxine réductases de bactéries Gram positif à haut GC% (58,9 % d'identité en acides aminés avec ArsT de *Streptomyces* sp. FR-008) (Wang *et al.*, 2006). L'identité la plus importante (65,7 %) est cependant observée avec la thiorédoxine réductase putative de *Brevibacterium linens* BL2 (ZP_00377913) (figure 56). ArsT de l'isolat A33 présente une identité de séquence plus faible (moins de 50 %) avec des thiorédoxine réductases d'α-protéobactéries.

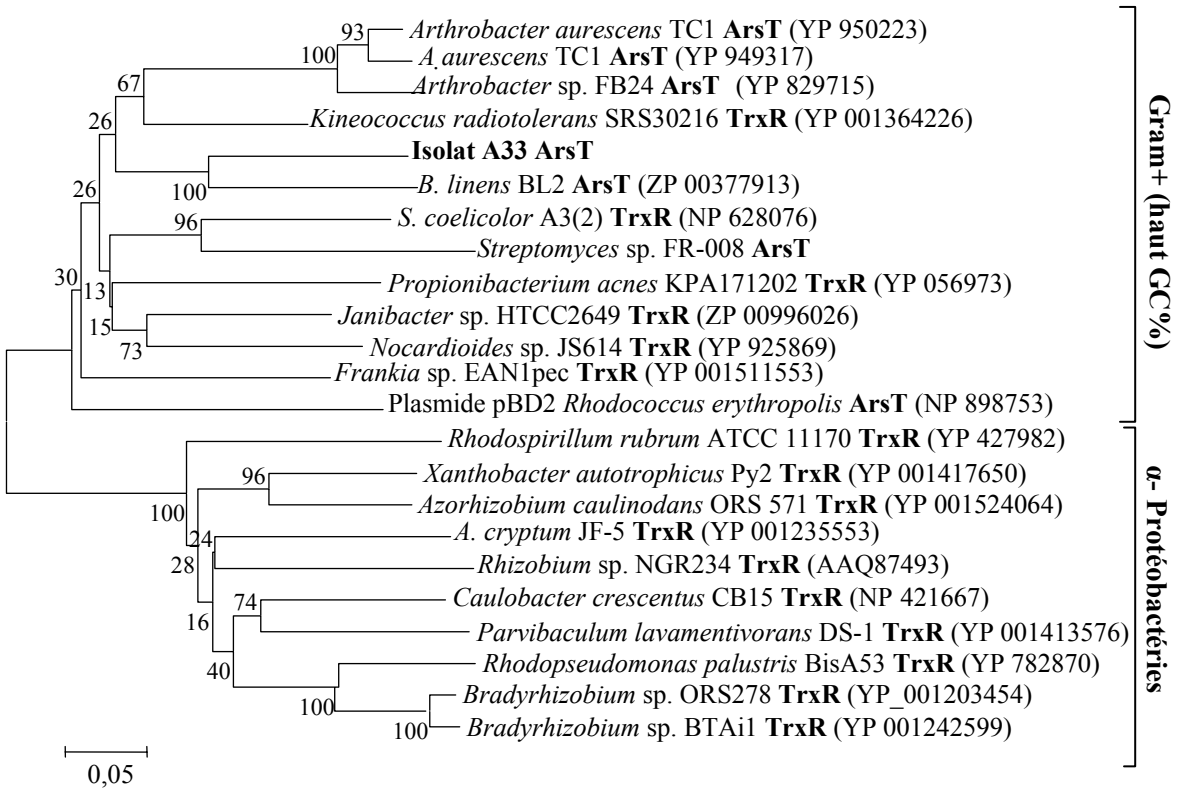
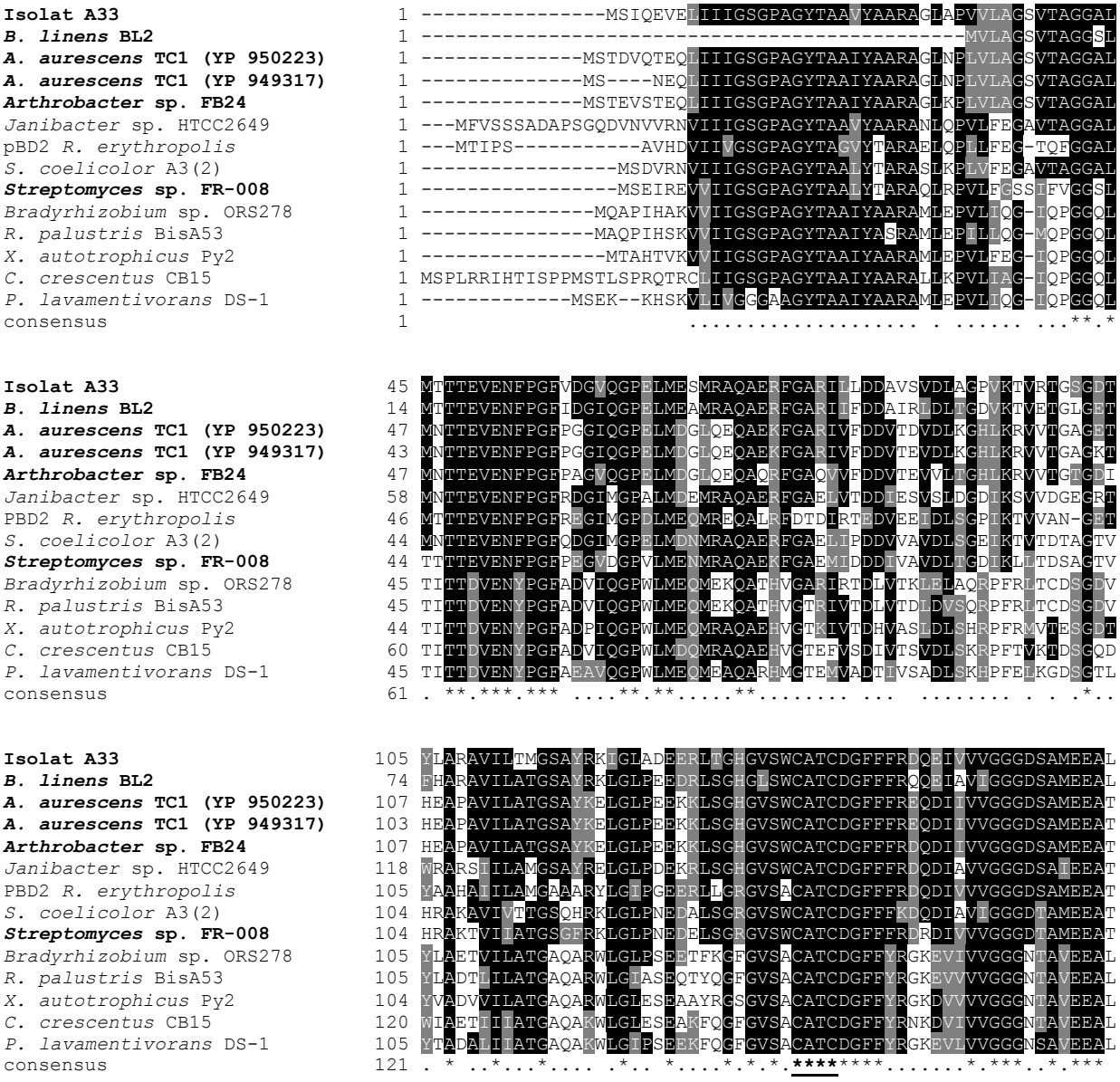


Figure 56. Phylogénie des séquences protéiques de thiorédoxine réductases homologues à ArsT de l'isolat A33.
Les valeurs de *bootstrap* sont indiquées.

Pour affiner l'analyse, nous avons recherché à proximité des gènes codant les 15 thiorédoxine réductases les plus proches d'ArsT de l'isolat A33, la présence de gènes *ars* putatifs. Ces 15 thiorédoxine réductases sont celles de bactéries Gram positif. Les résultats ont montré que quatre d'entre elles feraient partie d'un opéron *ars* putatif (thiorédoxine réductases de *B. linens* BL2, *A. aurescens* TC1 (YP 950223 et YP 949317) et *Arthrobacter* sp. FB24 (YP 829715). Nous les avons désigné ArsT pour les différencier des autres thiorédoxine réductases TrxR (figure 56).

Nous avons également remarqué qu'aucun gène de thiorédoxine réductase de bactérie Gram négatif ne présente de gène *ars* à sa proximité. Les ArsT semblent être une spécificité des bactéries Gram positif à haut GC%.

Comme montré dans l'alignement (figure 57), les ArsT ne présentent pas de motif spécifique qui les différencie des TrxR. Le site actif typique des thiorédoxine réductases est le "CATC".



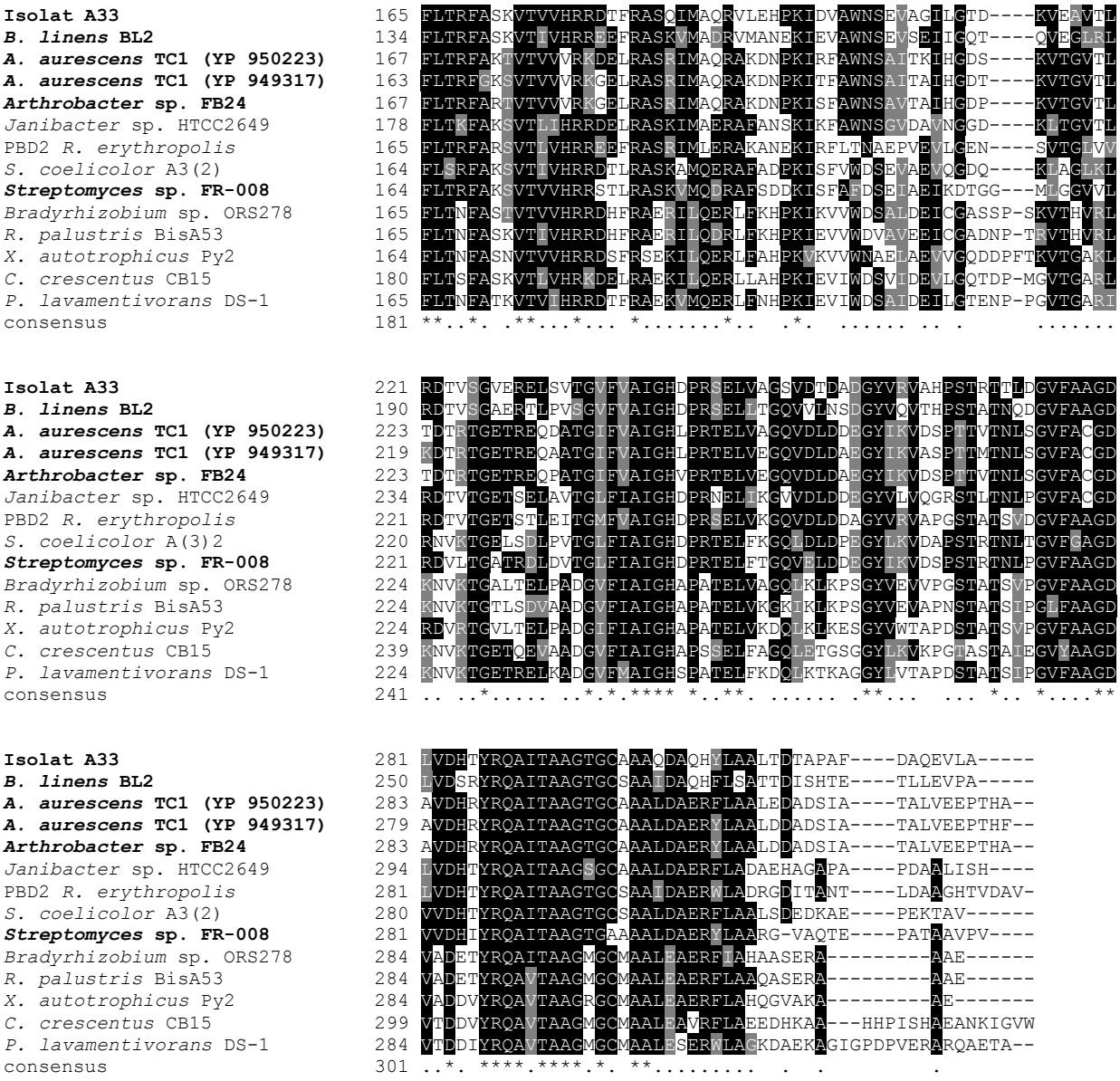


Figure 57. Alignement multiple des séquences de thiorédoxine réductases homologues à ArsT de l'isolat A33.
Le site actif de ces thiorédoxine réductases est souligné. Les bactéries possédant une thiorédoxine réductase de type ArsT sont indiquées en gras.

6.7 Thiorédoxine : ArsX

La thiorédoxine ArsX de l'isolat A33 présente 70,4 % d'identité à une thiorédoxine de *B. linens* BL2 (ZP_00377914). Ces deux thiorédoxines sont, contrairement à d'autres thiorédoxines de bactéries Gram positif à haut GC%, proches des thiorédoxines d'α-protéobactéries (figure 58). Nous avons également recherché des gènes *ars* putatifs à proximité de tous les gènes de

thiorédoxines dont le produit présente une homologie significative avec la thiorédoxine de l'isolat A33. Le résultat de l'analyse de 100 gènes de thiorédoxines montre que seul le gène de la thiorédoxine de *B. linens* BL2 fait partie d'un opéron *ars* putatif. Le site actif des thiorédoxines comporte le motif conservé "WCGPC" (figure 59).

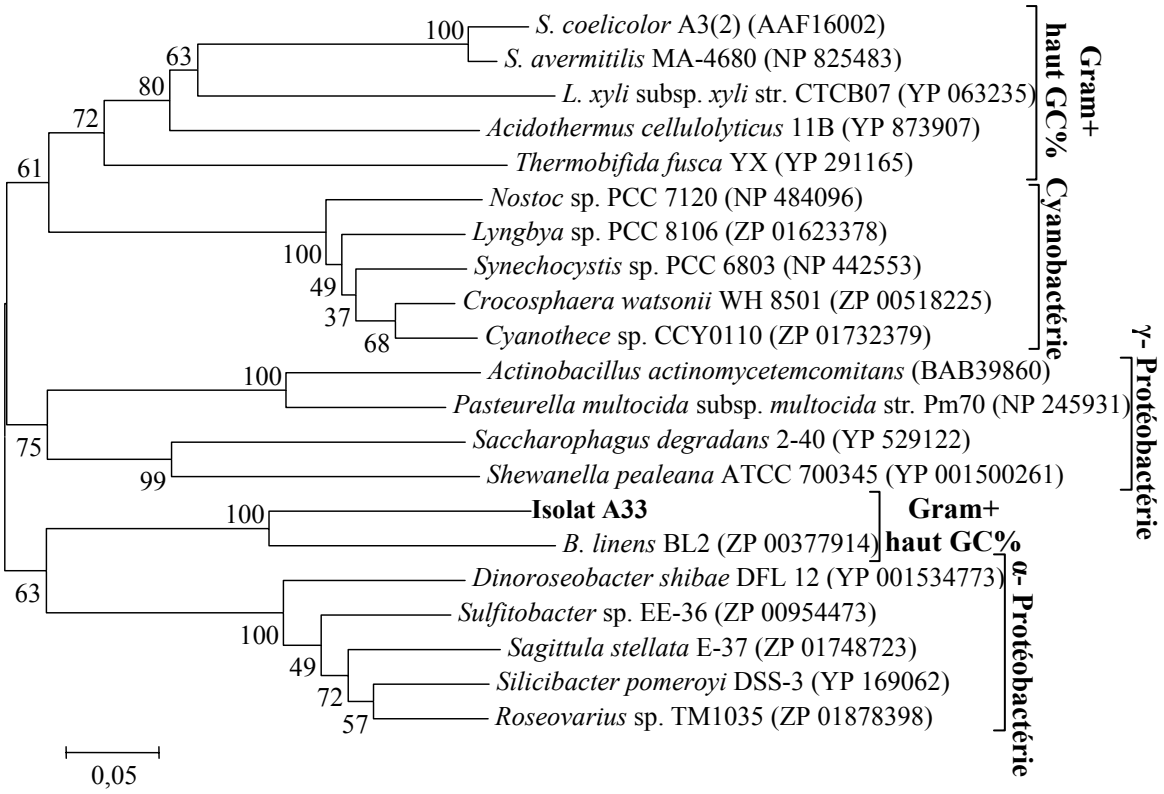


Figure 58. Phylogénie des séquences de thiorédoxines homologues à ArsX de l'isolat A33. Les valeurs de *bootstrap* sont indiquées.

```
Synechocystis sp. PCC 6803      1 MS-ATPQVSDASFKEDVLDSELPVLVDFWAPWCGPCRMVAPVVDEISQQYEGKVKVVKLN
Nostoc sp. PCC 7120             1 MS-AAAQVTDSTFKQEVLDSDVPVLVDFWAPWCGPCRMVAPVVDEIAQQYEGKIKVVKVN
S. coelicolor A3(2)             1 MAGTLKHVTDDSFEQDVLKNDKPVLVDFWAAWCGPCRQIAPSLEAIAAEYGDKIEIVKLN
T. fusca YX                     1 MA-TIQNVTDDTFEEVVLKSKLPVLVDFWAEWCAPCKMIAPVLEQIAEEQEGKLTVVKIN
P. multocida subsp. multocida   1 --MEVLHSTDATFTADVVNSDVPVLLDFWAPWCGPCRMISPILDEIAAEFSGKVKVVKIN
S. pealeana ATCC 700345        1 MSDKIVYLSDDSFENDVINSELPVLVDFWAEWCGPCKMIAPILDDVAEEYEGKIKIAKLN
Sulfitobacter sp. EE-36         1 --MATVAVTDATFDAEVKNSDIPVVVDFWAEWCGPCKQIGPALEELSSEMDGKVKIVKVN
D. shibae DFL 12                1 --MATVAVTDETFDTEVTKSDIPVVVDFWAEWCGPCKQIGPALEELSVTFDGKVKIAKVN
Isolat A33                      1 -MSVPIVVTDATFQNDVTDSEIPVVVDIWATWCGPCKQIAPLLDQLAVEYDGRVKIVKLD
B. linens BL2                   1 -MST-TTVTDATFTTEVIDSDIPVVVDIWATWCGPCKQIAPILDQLSDEYEGRVKVVKID
consensus                       1 .    . ..*..*. .*. ...**..*.** **.**. ..*...... .........*..

Synechocystis sp. PCC 6803     60 TDENPNTASQYGIRSIPTLMIFKGGQRVDMVVGAVPKTTLASTLEKYL--
Nostoc sp. PCC 7120            60 TDENPQVASQYGIRSIPTLMIFKGGQKVDMVVGAVPKTTLSQTLEKHL--
S. coelicolor A3(2)            61 IDENPGTAAKYGVMSIPTLNVYQGGEVAKTIVGANAKAAIVRDLEDFIAD
T. fusca YX                    60 ADQNPDTVRQYGVMGLPTLNLYKNGEVVKQLVGAKPKRVIEKELEEFL--
P. multocida subsp. multocida  59 IDENQATPAQLGVRSIPTLVLFKNGKAVATQVGALPKNQLANFINQNI--
S. pealeana ATCC 700345       61 VDQNNVSPAKYGVRGIPTLLLFKAGELAATKVGALSKTQLKEFIDAQL--
Sulfitobacter sp. EE-36        59 VDENPNSPAQMGVRGIPALFIFKNGEVVSNLAGARPKAALQGWIEESI--
D. shibae DFL 12               59 VDENPNAPAQMGVRGIPALFLFKNGEVVSNKVGAAPKAALQSWIEESL--
Isolat A33                     60 ADQNPATVTAIGVTSIPTLVFYNQGARVDMLIGAHAKPAIAEKMEALLA-
B. linens BL2                  59 ADTNPEAVTAAGVTSIPTLGFYRNGQRRDVLIGAHPRPDIVNKIEELLA-
consensus                      61 .*.*. . ...*....*.*.....*...  ..** ..  .   ... .
```

Figure 59. Alignement multiple des séquences des thiorédoxines homologues à ArsX de l'isolat A33.
Le site actif de ces thiorédoxines est souligné.

7 Comparaison des opérons *ars* de l'isolat A33 et *B. linens* BL2

Nous avons remarqué au cours des analyses précédentes que les protéines les plus proches d'ArsC1, "ArsC2", Acr3(1)p, ArsX et ArsT sont celles *B. linens* BL2. Aucune analyse fonctionnelle des gènes *ars* de cette bactérie n'est décrite dans la littérature. Cependant, l'annotation de son génome suggère la présence de 2 opérons *ars* putatifs dont un est semblable à l'opéron *ars* de l'isolat A33 (figure 60). Quelques différences sont toutefois observées comme la présence d'un gène *arsO* (codant une monooxygénase putative), l'absence du gène *arsC3* et la présence d'un gène *arsC* à la place du gène *arsRC2* au niveau de l'opéron *ars* de *B. linens* BL2.

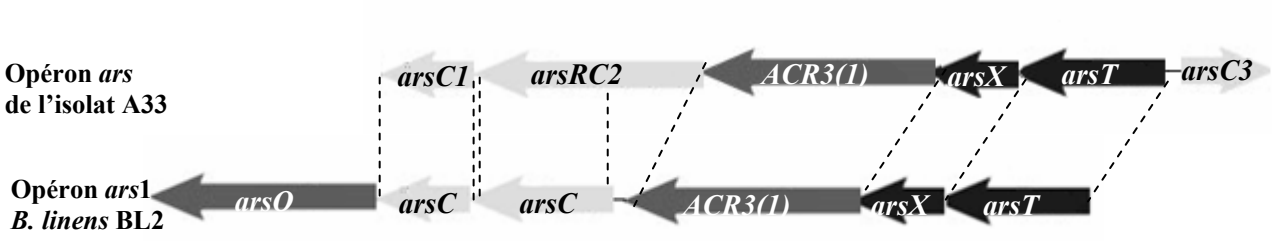


Figure 60. Comparaison des opérons *ars* de l'isolat A33 et *B. linens* BL2.

8 Recherche de séquences répétées et inversées et de séquences promotrices

Des séquences répétées et inversées ont été retrouvées au niveau de la région régulatrice de la majorité des opérons *ars*. Elles seraient impliquées dans la fixation d'ArsR (Ji et Silver, 1992a ; Lopez-Maury *et al.*, 2003 ; Ordonez *et al.*, 2005 ; Sato et Kobayashi, 1998).

Nous avons recherché à l'aide du programme "Palindrome", la présence de séquences répétées et inversées au niveau de la séquence 1/3. Trois répétitions inversées parfaites ont été détectées (figure 61). La première est située à 224 nucléotides en 3' du gène *arsC1* (gcctgcgggt-N_{29}-acccgcaggc) et la deuxième à 44 nucléotides en 3' d'*arsC3* (agggagcccgtcc-N_5-ggacgggctccct). Ces deux séquences répétées et inversées correspondraient plutôt à des sites de terminaison de transcription. La troisième séquence se trouve dans la région intergénique *arsC3-arsT* à 15 nucléotides en 5' d'*arsC3* (tccggcgggc-N_5-gcccgccgga) et pourrait constituer un site de fixation pour un régulateur transcriptionnel. Toujours dans cette région intergénique, une analyse à l'aide du programme "BPROM" a révélé la présence d'un promoteur probable (figure 61). Une séquence répétée et inversée imparfaite chevauchant ce promoteur a été également détectée (ttgtatcgataagtgtcaa-N_2-tagacacatgtcgattcaa).

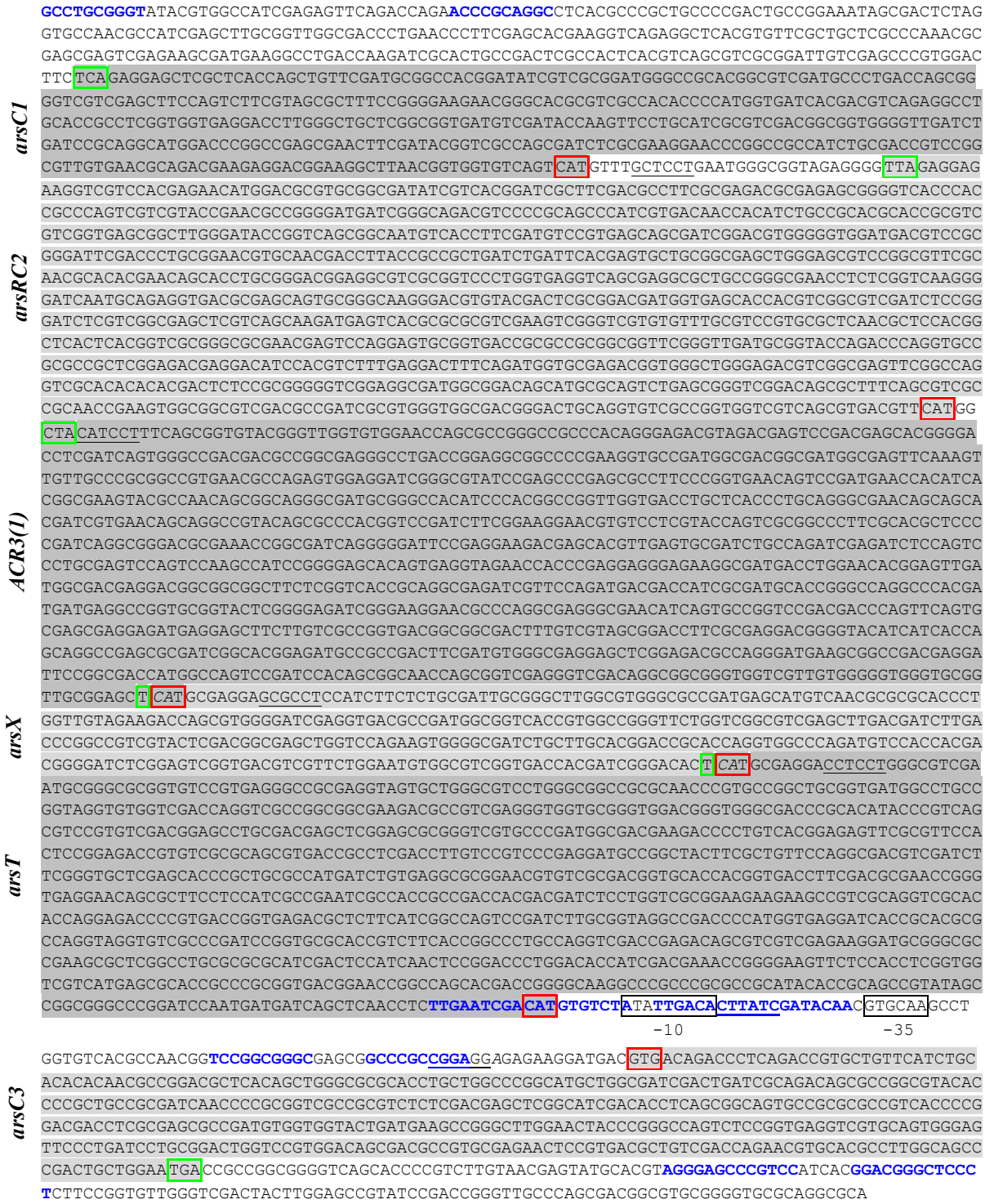


Figure 61. Séquence d'ADN de l'isolat A33 contenant les gènes *arsC1*, *arsRC2*, *ACR3(1)*, *arsT*, *arsX* et *arsC3*.

Les différents gènes sont indiqués en gris. Les codons stop et initiateurs sont respectivement encadrés en vert et en rouge. Les RBS probables (ribosome binding site) sont soulignés. Les régions -10 et -35 du promoteur putatif sont indiquées. Les séquences répétées et inversées sont marquées en bleu.

9 Analyse transcriptionelle d'*arsC1*, *arsRC2*, *ACR3(1)*, *arsT*, *arsX* et *arsC3* par RT-PCR

Afin de confirmer l'organisation en opéron des gènes *arsC1*, *arsRC2*, *ACR3(1)*, *arsX* et *arsT*, des paires d'amorces chevauchant ces différents gènes ont été désignées (figure 62). L'ARN total a été extrait après croissance de l'isolat A33 en absence et en présence d'arsenic et les RT-PCR ont été réalisées avec les différentes amorces. Les résultats montrent un fragment de la taille attendue avec chaque couple d'amorce, indiquant que les gènes *arsC1*, *arsRC2*, *ACR3(1)*, *arsX* et *arsT* sont co-transcrits et sont par conséquent organisés en opéron.

Par ailleurs, on constate que l'intensité des bandes obtenues à partir des ADNc issus de la culture réalisée en présence d'arséniate est toujours plus importante que celle des bandes obtenues à partir des ADNc issus de la culture réalisée en absence d'arsenic. Ce résultat n'est pas dû à des concentrations différentes d'ARN utilisés puisque l'intensité des bandes d'ADNr 16S est équivalente. L'expression de l'opéron *ars* de l'isolat A33 est donc probablement induite par l'arsenic.

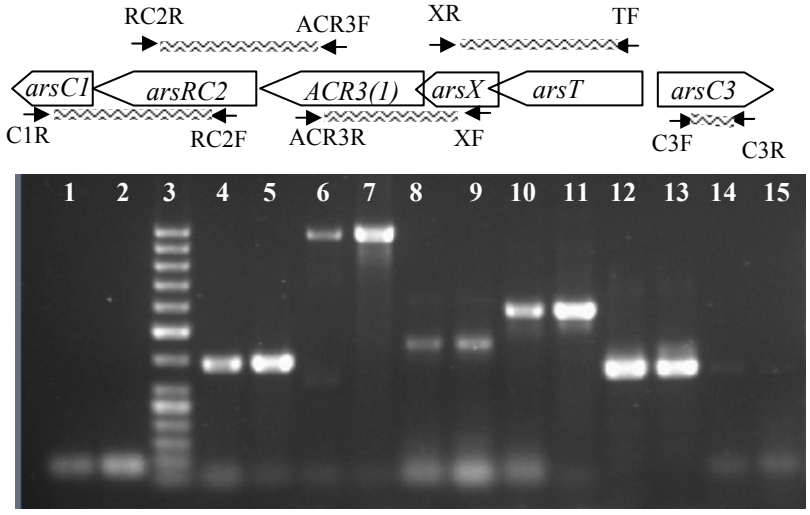


Figure 62. Analyse de la transcription des gènes *arsC1*, *arsRC2*, *ACR3(1)*, *arsT*, *arsX* et *arsC3* par RT-PCR.

Les RT-PCR ont été réalisées en utilisant les ARN extraits à partir des cellules de l'isolat A33 cultivées en absence d'arsenic (puits 1, 4, 6, 8, 10, 12 et 14) et en présence de 5 mM As(V)* (puits 2, 5, 7, 9, 11, 13 et 15). Amplification avec le couple d'amorce C3F/C3R (puits 1 et 2), TF/XR (puits 4 et 5), XF/ACR3R (puits 6 et 7), ACR3F/RC2R (puits 8 et 9) et RC2F/C1R (puits 10 et 11), A33-16SF/A33-16SR (permettant l'amplification de l'ADNr 16S de l'isolat A33) (puits 12 et 13). Marqueur de taille 50 bp (1 - 0,9 - 0,8 - 0,7 - 0,6 - 0,5 - 0,4 - 0,3 - 0,25 - 0,2 - 0,15 - 0,1 et 0,05 kb) (puit 3).

Pour vérifier l'absence de contamination de l'ARN par l'ADN, une PCR avec les amorces A33-16SF/A33-16SR a été effectuée directement avec l'ARN (puits 14 et 15).

* Des résultats analogues ont été obtenus en réalisant l'analyse RT-PCR avec de l'ARN extrait à partir de cellules de l'isolat A33 cultivées en présence de 5 mM As(III).

10 Discussion

L'isolat A33 a été identifié, par séquençage de la totalité de son ADNr 16S, comme une souche de *Microbacterium* sp. D'après les résultats du premier chapitre cet isolat est plus résistant à As(III) que la souche *C. glutamicum* ATCC 13032 qui est considérée comme l'un des microorganismes les plus résistants à l'arsenic (Ordonez *et al.*, 2005). Une résistance élevée de l'isolat A33 à As(V) et As(III) a été également observée en milieu liquide TRIS-LP (low phosphate).

Une autre souche du genre *Microbacterium* (*M. lacticum*) a été décrite pour sa résistance élevée à l'arsenic. Cette souche est également capable d'oxyder As(III) en As(V) (Mokashi et Paknikar, 2002). Ordonez et *al.*, (2005) ont par ailleurs montré, suite à une analyse du niveau de résistance à As(III) et à As(V) de plusieurs souches de référence dont *C. glutamicum*, que la souche *Rhodococcus fascians* est la plus résistante à As(III) et As(V). De même dans une récente étude de Drewniak *et al*., (2008), parmi 22 isolats résistants à l'arsenic, la souche *R. erythropolis* est la plus résistante à As(V).

Toutes les bactéries citées précédemment appartiennent au groupe des Gram positif à haut pourcentage en GC (actinobactéries). Cependant peu de systèmes de résistance à l'arsenic ont été étudiés dans ce groupe. Nous disposons uniquement des récents travaux d'Ordonez et *al.*, (2005) sur *C. glutamicum* 13032 et de Wang et *al.*, (2006) sur *Streptomyces* sp. FR-008. Chez *C. glutamicum*, deux opérons *ars* "classiques" (*arsRBC* et *arsRBCC*) sont responsables de la résistance à l'arsenic. Chez *Streptomyces* sp. FR-008, l'opéron responsable de la résistance à l'arsenic est porté par le plasmide pHZ227. Sa composition est atypique (*arsRBOCT*).

L'objectif de la deuxième partie de ce travail de thèse était d'isoler et de caractériser les gènes impliqués dans la résistance à l'arsenic chez l'isolat A33.

Dans un premier temps, nous avons testé les capacités de transformation de l'isolat *Microbacterium* sp. A33. Contrairement aux bactéries du genre *Mycobacterium* ou *Corynebacterium*, celles appartenant au genre *Microbacterium* sont très peu étudiées et par conséquent on ne dispose pas encore d'outils adaptés pour la manipulation génétique des bactéries de ce genre. D'autre part, l'isolat A33 est particulièrement résistant à la kanamycine et

le gène de résistance à cet antibiotique est le marqueur de sélection de la majorité des vecteurs de clonage utilisés chez les actinobactéries, ce qui a limité considérablement le nombre de vecteurs d'actinobactéries que nous pouvions tester chez l'isolat A33. L'unique vecteur que nous avons utilisé pour tenter de transformer l'isolat A33 est le vecteur navette *E. coli*/*Clavibacter* pDM302, qui porte un gène de résistance au chloramphénicol. Cette tentative a échoué ce qui pourrait être dû à plusieurs raisons :

(i) La méthode utilisée pour préparer les cellules compétentes de l'isolat A33, n'a pas été efficace. Il faudrait peut-être un traitement préalable des cellules (avec de la glycine, du lysozyme ou de la pénicilline G) afin de fragiliser la paroi bactérienne
(ii) Le vecteur pDM302 n'a pas pu se répliquer dans les cellules bactériennes de l'isolat A33. Ceci peut être dû soit à la non fonctionnalité de l'origine de réplication du vecteur chez les bactéries du genre *Microbacterium* ou encore à une dégradation du vecteur par un système de restriction-modification de l'isolat A33
(iii) Le gène de résistance au chloramphénicol n'est peut-être pas fonctionnel dans l'isolat A33.

A l'issue de ces tests, nous avons estimé que la mise au point d'outils génétiques pour étudier l'isolat A33 nécessiterait un temps considérable. D'autre part, dans tous les travaux trouvés dans la littérature concernant l'identification de gènes de *Microbacterium* (gène *pno* de *M. luteolum* ; gènes *mamIR* and *mamIM de M. ammoniaphilum* ; gène *levM* de *M. laevaniformans* et gènes *hyuP, hyuA, hyuH et hyuC* de *M. liquefaciens* AJ 3912), une souche d'*E. coli* a été utilisée comme hôte pour l'expression du ou des gènes analysés (Kaneda *et al.*, 2002 ; Song *et al.*, 2002 ; Striebel *et al.*, 1996 ; Suzuki *et al.*, 2005). Nous avons alors décidé dans un premier temps de nous contenter de travailler dans des hôtes hétérologues sensibles à l'arsenic (*E. coli* MA1 et *C. glutamicum* ArsB1-B2).

Peu de temps après, Akimaka et *al*., (2006) ont développé une méthode de transformation de la souche de *M. nematophilum* avec le plasmide pE194 de *S. aureus* (portant un gène de résistance à l'érythromycine). Plus récemment une autre étude (Miteva et *al.*, 2008) relate la transformation d'une souche psychrophile de *M. aurum* avec un vecteur navette *E. coli*/*Arthrobacter* pSVJ21 (portant un gène de résistance au chloramphénicol). Bien que dans ces deux études, les taux de transformation obtenus soient assez faibles (10^2 à 10^3 transformants/µg d'ADN), elles

représentent un premier pas vers l'acquisition d'outils et de techniques permettant la manipulation génétique de bactéries du genre *Microbacterium*.

Pour identifier les gènes de résistance à l'arsenic de l'isolat A33, nous nous sommes basés sur l'hypothèse selon laquelle l'éventuel gène *ACR3(1)* de cet isolat (détecté par PCR ; chapitre I) ferait partie d'un opéron de résistance à l'arsenic contenant au moins deux autres gènes *arsR* et *arsC*. Nous avons alors cherché à identifier les gènes qui se trouvent à proximité du gène *ACR3(1)*. Une analyse par Southern Blot de l'ADN de l'isolat A33 digéré avec diverses enzymes de restriction, a révélé que le gène *ACR3(1)* se trouve au niveau d'un fragment *Bam*HI de taille 4,5 kb. Ce fragment (désigné insert 39) a été cloné puis entièrement séquencé. Le résultat du séquençage a révélé la présence de 5 ORF (*arsT*, *arsX*, *ACR3(1)*, *arsRC2* et *arsC1*). Le chevauchement entre les codons stop et initiateurs des 3 premières ORF (*arsT/arsX* et *arsX*/*ACR3(1)*) laisse penser à une organisation en opéron. Un chevauchement semblable a été également observé au niveau du système de résistance à l'arsenic *arsRBOCT* de *Streptomyces* sp. FR-008 [*arsB* avec *arsO* et *arsT* (thiorédoxine réductase) avec *arsC*] (Wang *et al.*, 2006).

L'insert 39 portant les 5 ORF *arsT*, *arsX*, *ACR3(1)*, *arsRC2* et *arsC1* confère une résistance à As(III) et As(V) à *E. coli* MA1 mais uniquement lorsque leur expression est sous contrôle du promoteur P_{lac} du vecteur de clonage. Ce promoteur n'est probablement pas fonctionnel dans *C. glutamicum* ArsB1-B2 ce qui explique que les ORF portées par l'insert 39 ne peuvent pas conférer la résistance à l'arsenic chez cet hôte.

L'insert 39 contient une ORF atypique (*arsRC2*) dont le produit serait une protéine hybride entre d'une part, ArsR (comprenant un domaine hélice-tour-hélice et un motif de fixation d'arsénite) et d'autre part ArsC2 (appartenant à la famille des ArsC thiorédoxine dépendantes). La protéine ArsRC2 présente la même architecture de domaines que plusieurs protéines disponibles dans les banques de données protéiques dont la protéine ArsRC de *L. ferriphilum* (Tuffin et *al*., 2006). Cependant aucune de ces protéines ne présente une similarité de séquence avec la protéine ArsRC2.

L'explication d'une éventuelle fusion entre deux protéines ArsR et ArsC demeure inconnue. Cependant on peut supposer que la protéine ArsRC2 est impliquée dans la régulation de l'expression des gènes de l'opéron *ars.* En effet, il a été préalablement montré (Lopez-Maury *et al.*, 2003 ; Wu et Rosen, 1993a) qu'As(III) est l'inducteur qui se fixe au niveau de la protéine

ArsR (préalablement fixée au niveau de la région promotrice) provoquant ainsi une dissociation du complexe répresseur-ADN. En revanche, As(V) ne peut pas se fixer au niveau de la protéine ArsR et doit être réduit en As(III) afin d'induire le système de résistance à l'arsenic. On peut donc faire l'hypothèse qu'en absence d'inducteur, la protéine ArsRC2 se fixe par le domaine hélice-tour-hélice au niveau de la région promotrice de l'opéron *ars*. En présence d'As(V), la protéine ArsRC2 réduit As(V) en As(III) lequel sera directement fixé au niveau du motif de fixation de l'arsénite d'ArsRC2, permettant ainsi la dissociation de cette dernière de l'ADN. La protéine hybride ArsRC2 permettrait ainsi une induction rapide des gènes de l'opéron *ars* et par conséquent une résistance plus efficace de la bactérie à As(V).

En plus de l'ORF *arsRC2*, l'insert 39 contient deux autres ORF (*arsT* et *arsX*) qui ne sont pas habituellement présentes dans les opérons *ars* connus et codent respectivement une thiorédoxine réductase et une thiorédoxine. Ces dernières sont indispensables au fonctionnement des ArsC thiorédoxine-dépendantes. En effet, après chaque réaction de réduction d'As(V), l'arséniate réductase sous sa forme oxydée (inactive) doit être réduite par le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase afin de régénérer la forme active de l'enzyme (Messens et Silver, 2006). Cependant contrairement à l'opéron *ars* putatif de l'isolat A33, la majorité des opérons *ars* connus ne contiennent pas de gène de thiorédoxine et/ou de thiorédoxine réductase. En effet un système thiorédoxine/thiorédoxine réductase est déjà présent dans la majorité des bactéries. Ce système est impliqué dans la réduction de nombreuses protéines cytoplasmiques dont les ArsC thiorédoxine-dépendantes (Arner et Holmgren, 2000 ; Zeller et Klug, 2006). C'est ainsi que fonctionne l'arséniate réductase de *B. subtilis* 168 et du plasmide pI258 de *S. aureus* (Bennett *et al.*, 2001 ; Ji et Silver, 1992b ; Ordonez *et al.*, 2005).

Le système *arsRBOCT* porté par le plasmide pHZ227 de *Streptomyces* sp. FR-008 est le seul exemple de système *ars* trouvé dans la littérature qui contienne un gène de thiorédoxine réductase (Wang *et al.*, 2006). En revanche, ce système ne contient pas de gène de thiorédoxine.
Par ailleurs, nous avons cherché à savoir si les thiorédoxines et les thiorédoxine réductases, homologues à ArsX et ArsT de l'isolat A33 sont également codées par des gènes appartenant à un système *ars*. Il s'avère que certaines thiorédoxine réductases putatives sont codées par des gènes appartenant à des opérons *ars* putatifs (par exemple les thiorédoxine réductases de *B. linens* BL2, *A. aurescens* TC1 et *Arthrobacter* sp. FB24). En revanche, sur les 100 thiorédoxines analysées, une seule (thiorédoxine putative de *B. linens* BL2) est codée par un gène appartenant à un opéron *ars*. Il semble donc que la présence de gène de thiorédoxine et/ou de thiorédoxine

réductase au niveau d'un opéron *ars* soit une caractéristique spécifique aux bactéries Gram positif à haut pourcentage en GC.

Nous avons émis deux hypothèses pour expliquer la présence de gène *arsT* et/ou *arsX.* Selon la première, la présence dans la cellule bactérienne d'un système thiorédoxine/thiorédoxine réductase supplémentaire permettrait de diminuer la compétition qui existerait entre l'arséniate réductase et les autres protéines cytoplasmiques thiorédoxine-dépendantes. Ceci entraînerait alors une réduction plus rapide d'As(V) et par conséquent une résistance plus importante de la bactérie à ce dernier. Dans ce cas, ArsT et ArsX, ne seraient pas indispensables pour conférer la résistance à As(V) aux bactéries qui les possèdent, mais généreraient plutôt une meilleure résistance de la bactérie à As(V). Notre deuxième hypothèse est basée sur les résultats de Wang et *al.* (2006). Ces derniers ont montré que lorsque le gène de la thiorédoxine réductase ArsT du système *arsRBOCT* de *Streptomyces* sp. FR-008 est inactivé, le système ne confère plus de résistance à As(V) à la souche hôte *S. lividans* TK24. En revanche, il confère encore la résistance à As(V) à une autre souche hôte *S. griseus* IMRU3570. On peut ainsi supposer que la présence d'un gène de thiorédoxine réductase au niveau de l'opéron *ars* est indispensable pour conférer la résistance à As(V) à certaines bactéries. Les arséniate réductases de ces dernières ne peuvent peut-être pas fonctionner avec la thiorédoxine réductase présente dans la cellule bactérienne.

A l'issue de cette première partie du travail, nous avons confirmé l'hypothèse de la présence d'un opéron *ars* chez l'isolat A33. Cependant, seule une partie de cet opéron, ne contenant pas de séquence promotrice, a été détectée. L'opéron *ars* partiel contient 5 ORF et confère à *E. coli* MA1, une résistance à As(III) et As(V). Ceci laisse penser que le transporteur d'arsénite Acr3(1)p, ainsi qu'au moins une des deux arséniate réductases ArsC1 ou "ArsRC2" sont fonctionnels dans *E. coli*. Nous ne savons pas cependant si cette activité arséniate réductase est dépendante des produits respectifs d'*arsT* et *arsX* ou bien du système thiorédoxine/thiorédoxine réductase d'*E. coli.*

Afin de compléter la séquence de l'opéron *ars* et de détecter d'éventuels autres gènes de résistance à l'arsenic, notre démarche a consisté à établir une banque d'ADN de l'isolat A33 chez *E. coli* MA1 puis à rechercher les clones résistants à l'arsenic. Nous avons considéré que cette démarche était suffisante pour répondre à notre objectif consistant à compléter la séquence de l'opéron *ars* de l'isolat A33. En effet, les promoteurs des opérons *ars* des bactéries Gram positif sont généralement fonctionnels dans *E. coli*. C'est le cas par exemple des promoteurs des

opérons *ars* de *C. glutamicum* ATCC 13032 et du plasmide pI258 de *S. aureus* (Ji et Silver, 1992a ; Ordonez *et al.*, 2005). Cependant, comme nous recherchions d'autres gènes de résistance à l'arsenic, nous avons jugé utile de transférer la banque dans la souche Gram positif *C. glutamicum* ArsB1-B2. Ce transfert pouvant permettre l'expression des gènes qui seraient non fonctionnels ou non exprimés chez *E. coli.*

Le criblage de la banque d'ADN de l'isolat A33 chez *E. coli* a été réalisé sur milieu LB additionné d'As(III) ou As(V), il a permis de sélectionner 63 clones résistants à As(III) et 28 résistants à As(V). Le criblage de la banque d'ADN de l'isolat A33 chez *C. glutamicum* ArsB1-B2 a été réalisé uniquement sur milieu LB additionné d'As(III) et a permis de détecter 35 clones résistants.

L'analyse des 126 clones obtenus a montré qu'ils possèdent tous le gène *ACR3(1)*. Nous en avons conclu que le ou les gènes qui complémentent les mutations *ars* d'*E. coli* et *C. glutamicum* appartiennent au même opéron *ars* que nous avons précédemment détecté. En effet, l'hypothèse de la présence de plusieurs opérons *ars* chez l'isolat A33 est à écarter puisque une hybridation de son ADN avec la sonde *ACR3(1)*/A33 a révélé la présence d'une seule bande. Par ailleurs, bien que le système *ars* soit l'unique mécanisme de résistance à l'arsenic qui ait pu être détecté chez l'isolat A33, l'hypothèse de la présence d'autres mécanismes de résistance n'est pas à écarter. En effet, l'approche que nous avons adoptée (taille des fragments récupérés, souche hôte ou criblage) n'était peut être pas adéquate pour l'isolement de gènes impliqués dans d'éventuels autres mécanismes.

Six inserts différents (que nous avons désignés insert 1 à 6) ont été isolés dans l'ensemble des 126 clones recombinants obtenus. L'insert(1) a été entièrement séquencé (13168 kb), son analyse a révélé qu'il correspondait à deux fragments *Bsp*431I qui ne sont pas adjacents au niveau de l'ADN de l'isolat A33. Malheureusement, avec une hydrolyse partielle de l'ADN génomique, nous ne disposions d'aucune méthode qui permettait de vérifier, avant de procéder à l'étape du séquençage, la présence d'un ou plusieurs inserts dans le vecteur de clonage. Malgré cet imprévu, en se basant sur les données de séquence des inserts (1) et (3), la séquence complète du système *ars* (séquence 1/3) a pu être déterminée. Nous avons ainsi identifié, en plus des 5 gènes putatifs (*arsT*, *arsX*, *ACR3(1)*, *arsRC2* et *arsC1*), un sixième gène (*arsC3*) dont le produit est homologue aux arséniate réductases. ArsC3 contient le motif "CX_5R" typique des protéines tyrosine phosphatases, cependant elle ne contient pas du côté C-terminal les deux résidus cystéines

indispensables à l'activité catalytique de cette famille d'arséniate réductase. ArsC3 pourrait donc correspondre à une protéine tyrosine phosphatase sans activité arséniate réductase ou à une arséniate réductase présentant un mécanisme réactionnel différent de ceux des ArsC bactériennes. ArsC1 et ArsC2 de *C. glutamicum* ATCC 13032 présentent les mêmes caractéristiques qu'ArsC3 de l'isolat A33 (figure 52), cependant dans les travaux d'Ordonez et *al.,* (2005), il n'existe pas de preuves directes de l'implication d'ArsC1 ou ArsC2 dans la réduction d'As(V) chez *C. glutamicum* ATCC 13032.

Par ailleurs, le gène putatif *arsC3* est transcrit dans le sens opposé des autres gènes *ars* de l'isolat A33. Des organisations semblables, comportant deux ou trois groupes de gènes *ars* transcrits de façon divergente, ont été observées dans les systèmes *ars* suivants : *arsCR-arsBH* de *T. ferrooxidans, arsBC-arsRH* du plasmide R478 de *S. marcescens* et *arsR2-arsR1BO-arsCT* du plasmide pHZ227 de *Streptomyces* sp. FR-008 (Butcher *et al.*, 2000 ; Ryan et Colleran, 2002 ; Wang *et al.*, 2006).

Les inserts 1 et 3, contenant la séquence en amont d'*arsT*, étaient capables, contrairement à l'insert 39 ne contenant pas cette séquence, de conférer la résistance à As(III) à la souche *C. glutamicum* ArsB1-B2. Nous en avons conclu que la région promotrice se trouve en amont d'*arsT*. Un promoteur putatif a été en effet détecté au niveau de cette région (figure 61). Par ailleurs, aucune séquence promotrice n'a pu être détectée, par le logiciel de recherche de promoteur, en amont du gène *arsC3*. Deux séquences répétées et inversés ont été mises en évidence au niveau de la région intergénique *arsT*/*arsC3* (figure 61). Ces deux séquences correspondent probablement à des sites de fixation de régulateurs transcriptionnels différents. Elles différent des sites de fixation d'ArsR décrits dans la littérature (Ji et Silver, 1992a ; Ordonez *et al.*, 2005 ; Sato et Kobayashi, 1998).
Nous avons également conclu d'après ces résultats que le gène *ACR3(1)* est exprimé et est fonctionnel dans la souche hôte *C. glutamicum*. Les travaux à venir permettront de vérifier la fonctionnalité des autres gènes du système *ars* de l'isolat A33 aussi bien chez *C. glutamicum* que chez *E. coli* (voir perspectives).

Par ailleurs, nous avons remarqué au cours de cette étude que les produits des gènes *ars* de l'isolat A33 (à l'exception d'ArsC3) présentent de fortes homologies avec ceux des gènes *ars* putatifs de *B. linens* BL2. L'organisation de l'opéron "*ars*1" de cette dernière est également

semblable à celle du système *ars* de l'isolat A33 (figure 60). Une recherche dans les séquences des génomes bactériens, d'autres systèmes *ars* putatifs semblables à celui de l'isolat A33 a par ailleurs révélé que seule *B. linens* BL2 posséderait un tel système.

A l'issue de cette partie de notre travail, nous avons identifié chez l'isolat A33, un système *ars* de résistance à l'arsenic qui présente des particularités originales méritant des études plus approfondies. L'analyse préliminaire de ce système, basée essentiellement sur des données de séquences, ne nous renseigne pas davantage sur la résistance élevée de l'isolat A33 à As(III). Elle indique plutôt une adaptation originale de la bactérie pour résister à des niveaux élevés d'As(V). Notre première perspective sera de confirmer par des délétions partielles, le rôle de chaque gène *ars* de l'isolat A33 dans la résistance à As(III) et As(V). Ce travail a été initié par la construction de l'insert B contenant la totalité des gènes *ars* de l'isolat A33.

Conclusions générales & Perspectives

Au commencement de ce travail, notre objectif était de mettre au point des amorces dégénérées permettant l'analyse des gènes bactériens des transporteurs d'arsénite. Nous avons réussi à définir 3 jeux d'amorces permettant l'amplification spécifique des gènes des transporteurs d'arsénite appartenant aux deux familles ArsB et Acr3p (Acr3(1)p et Acr3(2)p). Ces jeux d'amorces ont été utilisés pour détecter la présence des gènes des transporteurs d'arsénite de 41 isolats bactériens résistants à l'arsenic (dont 8 isolés à partir d'un sol non contaminé et 33 d'un sol contaminé par l'arsenic).

Les résultats de cette analyse ont révélé que les gènes *ACR3* sont majoritaires par rapport aux gènes *arsB* ce qui indique que la famille Acr3p serait beaucoup plus répandue que ce que l'on a initialement pensé. Par ailleurs, à l'exception d'une corrélation positive entre la présence du gène *ACR3(1)* et le phénotype de sensibilité à l'antimoine (qui laisse penser que les transporteurs Acr3(1)p ne seraient pas impliqués dans le transport de l'antimoine), aucune autre corrélation entre l'affiliation phylogénétique, les niveaux de résistance aux métalloïdes et le génotype *arsB*/*ACR3* n'a été détectée.

Les résultats ont également montré que les gènes des transporteurs d'arsénite sont largement distribués parmi les bactéries résistantes à l'arsenic (70,7 % des bactéries analysées) indépendamment du niveau de contamination du sol d'origine. La présence des gènes des transporteurs d'arsénite ne peut donc pas être utilisée comme indicateur d'une contamination par l'arsenic. Cependant, comme l'expression des gènes *ars* est généralement inductible par l'arsenic, les amorces conçues dans cette étude pourraient être utilisées à terme pour quantifier l'expression des gènes *arsB/ACR3* bactériens dans des milieux naturels. La détermination du rapport entre le nombre de copies de transcrits et de gènes *arsB*/*ACR3* dans une communauté bactérienne pourrait constituer un indicateur de la biodisponibilité de l'arsenic dans le milieu.

La collection des 41 isolats résistants à l'arsenic a été largement caractérisée : identification par séquençage de l'ADNr 16S, détermination des CMIs à As(III), As(V) et Sb(III), recherche de gène de transporteur d'arsénite et recherche des activités arsénite oxydase et arséniate réductase. Parmi ces isolats, 12 ont répondu négativement aux 3 jeux d'amorces dégénérées. Ces isolats mériteraient une étude moléculaire plus approfondie (réalisation d'une banque d'ADN dans une souche sensible à l'arsenic et sélection des transformants résistants à ce métalloïde) afin de détecter les gènes impliqués dans la résistance à l'arsenic.

L'isolat A33 (*Microbacterium* sp.) se différencie des autres isolats par son niveau de résistance particulièrement élevé à As(III) et As(V). Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons identifié chez l'isolat A33, un système *ars* composé de 6 gènes. Ce système est atypique, il comprend : un gène *ACR3(1)* codant un transporteur d'arsénite appartenant à la famille Acr3p, un gène *arsC1* codant une arséniate réductase homologue aux ArsC thiorédoxine dépendantes et un gène *arsC3* codant une arséniate réductase putative qui présente des caractéristiques différentes des ArsC bactériennes thiorédoxine ou glutarédoxine dépendantes. Le système *ars* de l'isolat A33 comprend également 2 gènes *arsT* et *arsX* codant respectivement une thiorédoxine réductase putative et une thiorédoxine putative. Ces gènes ne sont pas habituellement présents dans les opérons *ars* connus, ils seraient probablement impliqués dans le fonctionnement des ArsC thiorédoxine dépendantes. De plus le système *ars* de l'isolat A33 contient un gène *arsRC2* codant une protéine de fusion ArsR-ArsC2 qui serait impliquée dans la régulation du système *ars* et/ou la résistance à As(V).

L'analyse du système *ars* de l'isolat A33 a été réalisée en se basant essentiellement sur des données de comparaisons de séquences. Une des premières perspectives de ce travail est la confirmation fonctionnelle (par des délétions partielles) du rôle de chaque gène *ars* dans la résistance à As(III) et As(V). Ce travail a déjà été engagé en suivant la stratégie résumée dans le tableau 19 et la figure 63.

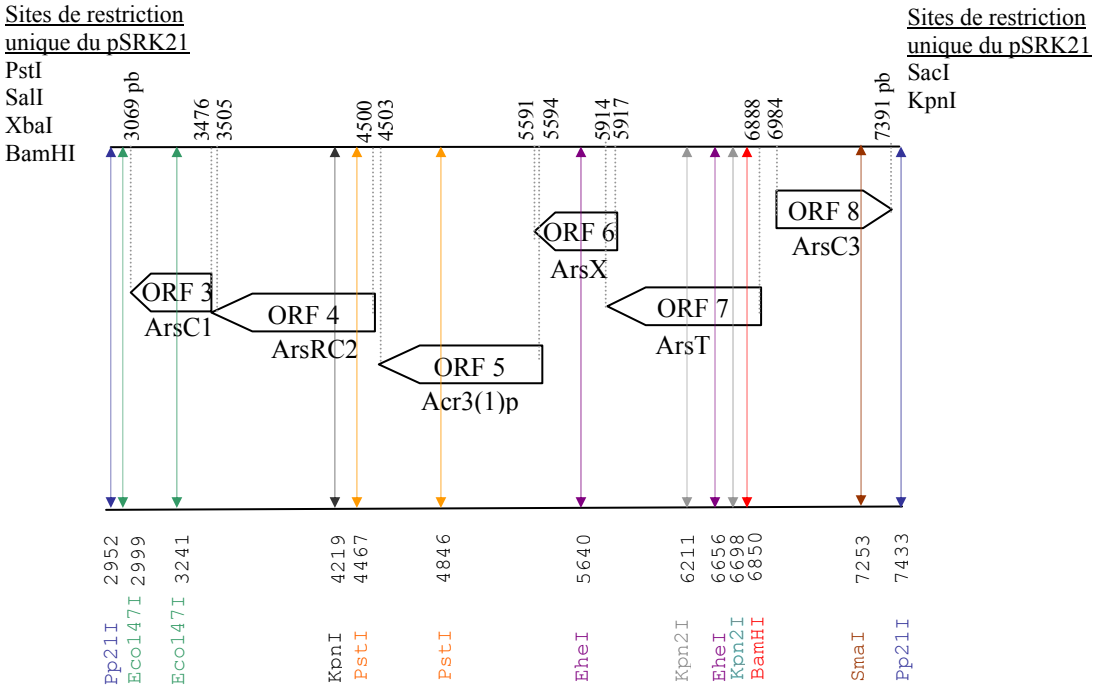


Figure 63. Carte de restriction de l'insert B

Tableau 19. Stratégie de sous clonages du plasmide pB

Sous clones	Stratégie*
pBΔORF8	Hydrolyse du plasmide pB avec *Sma*I et *Xba*I Clonage du fragment de taille 4301 pb dans le vecteur pSRK21 (hydrolysé par *Sma*I et *Xba*I)
pBΔORF7	Hydrolyse du plasmide pB avec *Kpn*2I Recircularisation du fragment de taille 9825 pb
pBΔORF6/7	Hydrolyse du plasmide pB avec *Ehe*I Recircularisation du fragment de taille 9296 pb
pBΔORF3	Hydrolyse du plasmide pB avec *Eco*147I Recircularisation du fragment de taille 10070 pb
pBΔORF3/4	Hydrolyse du plasmide pB avec *Kpn*I Clonage du fragment de taille 3214 pb dans le vecteur pSRK21 (hydrolysé par *Kpn*I) → La partie de l'ORF 4 qui sera délétée est celle homologue aux arséniate réductases
pBΔORF3/4/5	Hydrolyse du plasmide pB avec *Pst*I Recircularisation du fragment de taille 8418 pb
pBΔORF3/8	Hydrolyse du plasmide pBΔORF8 avec *Eco*147I Recircularisation du fragment obtenu

* Les sites de restriction des enzymes sont indiqués dans la figure 63.
- *E. coli* MA1 (ou AW3110) et *C. glutamicum* ArsB1-B2 seront transformées avec les différents plasmides préparés et leurs niveaux de résistance à As(III) et As(V) seront déterminés en milieu TRIS-LP.
- Pour mieux étudier la fonction des ORF 6 et 7, les souches *E. coli* UC844 (délétée pour le gène *trxA* codant une thiorédoxine) et *E. coli* UC1369 (délétée pour le gène *trxA* et le gène *gshA* responsable de la synthèse du glutathion) (Prieto-Alamo *et al.*, 2000) seront transformées avec les plasmides pBΔORF7 et pBΔORF6/7 et leurs niveaux de résistance à As(III) et As(V) seront déterminés.

La compréhension du fonctionnement de l'opéron *ars* nécessite également une étude fine de la régulation de son expression. Pour ce faire nous envisageons de :

- Préciser le rôle de la protéine ArsRC2 dans le contrôle transcriptionnel de l'opéron. Il s'agira tout d'abord de cloner le gène *arsRC2* dans un vecteur d'expression sous contrôle d'un promoteur inductible puis de mesurer sa capacité à réguler l'expression du gène rapporteur codant la GFP (green fluorescent protein) placé sous le contrôle de la région promotrice probable de l'opéron *ars* de l'isolat A33. Les fusions *arsT*::*gfp* et *arsC3*::*gfp* seront construites dans un plasmide de type "promoter probe" chez *E. coli*.
En parallèle, l'expression d'ArsRC2 dans une souche d'*E. coli* mutée pour le gène *arsC* devrait permettre de déterminer si cette protéine possède une activité arséniate réductase.

- Quantifier l'expression de chaque gène de l'opéron *ars* chez *Microbacterium* sp. A33 cultivé en présence ou non d'arsenic par RT-PCR quantitative.

En conclusion et dans un cadre plus large, les caractéristiques de l'isolat A33 nous invitent à nous poser des questions importantes sur la contribution de telles bactéries dans la mobilité et la toxicité de l'arsenic dans les sols, les eaux souterraines et les eaux de surface.

Annexe I

Propriétés physiques et chimiques des sols A et B

	Sol A	Sol B
Argile (g/kg) (<2 µm)	142	93
Limon fin (g/kg) (2 to 20 µm)	80	50
Limon grossier (g/kg) (20 to 50 µm)	52	33
Sable fin (g/kg) (50 to 200 µm)	333	255
Sable grossier (g/kg) (200 to 2000 µm)	393	569
Carbone organique (g/kg)	35,36	25,84
Matières organiques (g/kg)	60,8	44,4
Azote (g/kg)	2,86	1,76
Rapport carbone organique sur azote total	12,36	14,68
pH de l'eau	7,9	6,1
As (mg/kg)	12,2 +/- 7,4	135,4 +/- 23,9
Pb (mg/kg)	253 +/- 8,3	2880 +/- 30
Fe (mg/kg)	4908,8 +/- 89,6	4118.4 +/- 88,5
Cr (mg/kg)	68,9 +/- 45,4	99,6 +/- 51,9
Zn (mg/kg)	76 +/- 10,1	80 +/- 8,3

Annexe II

ELSEVIER

INSTITUT PASTEUR

Research in Microbiology 158 (2007) 128–137

www.elsevier.com/locate/resmic

Diversity of arsenite transporter genes from arsenic-resistant soil bacteria

Asma Rokbani Achour [a,*], Pascale Bauda [a], Patrick Billard [a,b]

[a] *Laboratoire Ecotoxicité et Santé Environnementale (ESE), UMR7146, CNRS, Université Paul Verlaine, Campus Bridoux, rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France*

[b] *Laboratoire des Interactions Microorganismes Minéraux Matière Organique dans les Sols (LIMOS), UMR 7137, CNRS, Université Henri-Poincaré Nancy I, Faculté des Sciences, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France*

Received 20 July 2006; accepted 23 November 2006
Available online 22 December 2006

Abstract

A PCR approach was developed to assess the occurrence and diversity of arsenite transporters in arsenic-resistant bacteria. For this purpose, three sets of degenerate primers were designed for the specific amplification of approximately 750 bp fragments from *arsB* and two subsets of *ACR3* (designated *ACR3(1)* and *ACR3(2)*) arsenite carrier gene families. These primers were used to screen a collection of 41 arsenic-resistant strains isolated from two soil samples with contrasting amounts of arsenic. PCR results showed that 70.7% of the isolates contained a gene related to *arsB* or *ACR3*, with three of them carrying both *arsB* and *ACR3*-like genes. Phylogenetic analysis of the protein sequences deduced from the amplicons indicated a prevalence of *arsB* in *Firmicutes* and *Gammaproteobacteria*, while *ACR3(1)* and *ACR3(2)* were mostly present in *Actinobacteria* and *Alphaproteobacteria*, respectively. In addition to validating the use of degenerate primers for the identification of arsenite transporter genes in a taxonomically wide range of bacteria, the study describes a novel collection of strains displaying interesting features of resistance to arsenate, arsenite and antimonite, and the ability to oxidize arsenite.
© 2006 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Arsenic; Anion transporter; Arsenic resistance; Soil bacteria; *ACR3*; *arsB*; 16S rDNA; Diversity

1. Introduction

Arsenic is a ubiquitous toxic metalloid released in the environment either from natural weathering of rocks or through anthropogenic inputs such as mining and agricultural applications. The two most common oxidation states for soluble arsenic in nature are As(V) and As(III), present as the oxyanions arsenate (AsO_4^{3-}) and arsenite ($As(OH)_3$), respectively. Although both forms are toxic to biological systems, they induce distinct types of cellular damage. Because of its structural analogy to inorganic phosphate, arsenate can enter a cell via phosphate membrane transport systems and disrupt metabolic reactions that require phosphorylation. In contrast, arsenite is transported into the cell by aquaglyceroporins in bacteria, yeasts and mammals, and exerts its toxicity by binding thiol groups in proteins, thereby impairing their function. Arsenite is much more toxic than arsenate (for reviews, see [14,18,22]).

To counteract the deleterious effects of arsenic, microorganisms have evolved several resistance strategies, including arsenite oxidation or methylation into less toxic species, as well as active extrusion of arsenite from the cell [22]. The genes encoding the arsenite detoxification machinery (*ars* genes) are widely distributed in bacteria and archaea and can be found on plasmids or chromosomes. They most commonly consist of either three (*arsRBC*) or five (*arsRDABC*) genes arranged in a single transcriptional unit. ArsB, an integral membrane protein that pumps arsenite out of the cell, is often associated with an ATPase subunit, ArsA. ArsC is an arsenate reductase that converts arsenate to arsenite prior to efflux. ArsR is a trans-acting repressor involved in the basal regulation of the *ars* operon, while ArsD is a second repressor controlling the upper levels of *ars* genes expression [14,28].

* Corresponding author. Tel.: +33 3 87 37 85 13; fax: +33 3 87 37 85 12.
E-mail address: asma.rokbani@umail.univ-metz.fr (A.R. Achour).

0923-2508/$ - see front matter © 2006 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.
doi:10.1016/j.resmic.2006.11.006

Two unrelated families of arsenite transporters have been described in bacteria [14,23]. The well-characterized ArsB family includes membrane proteins of *Escherichia coli* plasmid R773 and *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. The ArsB permease functions as a uniporter using the membrane potential to extrude arsenite. When associated with ArsA, the permease is converted to a more efficient ATP-driven arsenite pump that provides enhanced arsenite resistance. In addition to arsenite, proteins of the ArsB family actively expel antimonite oxyanions [11].

Much less is known about the second family of arsenite carriers, Acr3p (also called Arr3p). Members of this family are found in bacteria, archaea and fungi [22,36], but have been functionally characterized in only a few species including *Bacillus subtilis*, *Synechocystis* sp., *Corynebacterium glutamicum* and *Saccharomyces cerevisiae* [9,17,27,35]. The Acr3p proteins in *B. subtilis* and *S. cerevisiae* have been reported to specifically transport arsenite, whereas the *Synechocystis* sp. Acr3p homologue appears to promote both arsenite and antimonite extrusion.

Recently, different studies have focused on the detection of *ars* genes in environmental samples, to correlate their presence with the arsenic resistance phenotype and/or arsenic-transforming capacities of bacterial isolates [1,7,10,25] or to use these genes as potential molecular biomarkers of arsenic contamination [5,30]. Depending on the purpose, *arsA*, *arsB* and/or *arsC* were chosen as the target genes in these studies. However, the *ACR3* gene family has never been taken into account in such analyses, even though it appears to be widespread among bacteria [36]. In this study, we chose to focus on arsenite transporter genes, since their presence is observed in most *ars* operons [23]. For this purpose we designed different sets of degenerate primers that allow for the specific amplification of the two bacterial arsenite carrier gene families. These primers were used to investigate the occurrence and diversity of *arsB*- and *ACR3*-related genes in arsenic-resistant bacteria isolated from soils.

2. Materials and methods

2.1. Isolation of arsenic-resistant strains

The sampling site was a forest in the commune of Longeville-les-St-Avold, France that exhibits variable local background levels of arsenic and lead. Using a field portable X-ray fluorescence apparatus (Niton) (kindly provided by BRGM Nancy), two soil samples that differ in their contamination levels were selected from this site. After removal of the litter, soil samples were collected in sterile polyethylene bottles and stored at 4 °C until microbiological analysis (within 16 h), or further desiccated at 45 °C overnight before soil characterization. Soil A, referred to as "uncontaminated soil", contained 12.2 mg/kg (SD = 7.4) of arsenic (As) and 253 mg/kg (SD = 8.3) of lead (Pb), whereas soil B, referred to as "contaminated soil", had higher levels of As [135 mg/kg (SD = 23.9)] and Pb [2880 mg/kg (SD = 30)].

One gram of each soil was shaken for 30 min at 150 rpm in 9.5 ml of 0.1% (wt./vol.) sodium pyrophosphate solution. The mixture was centrifuged at 500 × *g* and 0.1 ml of serial dilutions of the supernatant were plated separately onto Luria–Bertani (LB) agar plates supplemented with 20 mM arsenate As(V) or 7 mM arsenite As(III). After 96 h of incubation at 25 °C, colonies were picked and streak-purified at least twice on the same medium. Purified single colonies were inoculated in LB broth, cultured for 24–48 h and stored in 25% glycerol at −80 °C. Bacterial colonies were grouped on the basis of colony morphology and Gram stain. For each soil, one representative isolate of each group was selected to test the primer sets designed.

2.2. Bacterial strains and growth conditions

Alcaligenes eutrophus AE126 (later called *Ralstonia metallidurans* and now *Cupriavidus metallidurans* [32]), was cultivated at 30 °C in a Tris-buffered minimal medium supplemented with 0.2% sodium gluconate [12]. *Cenibacterium arsenoxidans* ULPAs1 was grown at 25 °C in CDM medium [33]. All the other reference strains were grown in Luria–Bertani (LB) medium at 30 °C (*C. glutamicum* RES167 [34], *C. glutamicum* ArsB1-B2 [17], *Shewanella* sp. ANA-3 [24] and *Shewanella oneidensis* MR-1 [16]) or 37 °C (*Mycobacterium smegmatis* mc^2155 [29], *Escherichia coli* W3110 [2], *E. coli* AW3110 [4] and *E. coli* DH10B (Gibco BRL)).

Resistance to arsenic and antimonite was determined on solid medium (LB agar). Stationary phase cultures of the isolates or reference strains were adjusted to an OD_{600} of 0.3. Five microliters of these suspensions were spotted on LB plates supplemented with increasing concentrations of sodium arsenite (1.75–112 mM), sodium arsenate (20–640 mM) or potassium antimonyl tartrate (0.1–12.8 mM). The MICs, defined as the lowest metalloid concentration that inhibited growth on plates, were determined after 72 h incubation at 25 °C for isolates and at 30 or 37 °C for reference strains. Arsenite oxidase activity was detected in CDM agar plates after 48 h of incubation at 25 °C using the $AgNO_3$ method [15]. The *C. arsenoxidans* ULPAs1 strain was used as positive control [33].

2.3. DNA preparation

DNA was extracted from the isolates by a modification of the method of Pitcher et al. [19]. Briefly, freshly isolated colonies were inoculated in 5 ml LB and incubated at 25 °C. Bacterial pellets were resuspended in TE buffer (10 mM Tris–HCl, 1 mM EDTA [pH 8.0]) containing lysozyme (50 mg/ml) and RNase (50 µg/ml). After incubation at 37 °C for 1 h, the bacteria were lysed by the addition of the GES reagent (guanidine thiocyanate, EDTA, sarcosyl). Ammonium acetate was added to the solution, followed by 10 min of incubation on ice. Chloroform was added to extract the proteins, and then the DNA was precipitated with isopropanol and washed with 70% ethanol. The DNA was resuspended in Tris–HCl buffer [10 mM, pH 8.0].

2.4. Degenerate primer design

Three sets of primers were designed to probe arsenite carrier-related genes in bacterial isolates. A total of 75 bacterial, archaeal and fungal protein sequences known to be responsible for arsenite efflux and putative homologues obtained from genome sequencing projects were acquired from GenBank and aligned using Clustal W. A preliminary phylogenetic analysis (not shown) confirmed previous observations by Wysocki et al. [36], i.e. arsenite transporters could be classified into two broad categories corresponding to the ArsB and Acr3p families, and the Acr3p-like proteins could be further divided into two branches which we designated as the Acr3(1)p and Acr3(2)p subgroups. The Acr3(1)p branch contains a fungal subgroup which was excluded from the analysis. Conserved regions in each of the three subgroups (ArsB, Acr3(1)p and Acr3(2)p) were identified using Block Maker and used to design COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primers (CODEHOP) [21]. The three degenerate primer pairs, darsB1F/darsB1R (5′-GGTGTGGAACATCGTCTGGAAYGCNAC/5′-CAGGCCGTACACCACCAGRTACATNCC), dacr1F/dacr1R (5′-GCCATCGGCCTGATCGTNATGATGTAYCC/5′-CGGCG ATGGCCAGCTCYAAYTTY TT) and dacr5F/dacr4R (5′-TGA TCTGGGTCATGATCTTCCCVATGMTGVT/5′-CGGCCACG GCCAGYTCRAARAARTT), were selected for the detection of *arsB*, *ACR3(1)* and *ACR3(2)* genes, respectively. Degenerate nucleotide sites are indicated by standard ambiguity codes as follows: N = A, C, G, or T; R = A or G; V = A, C, or G and Y = C or T.

2.5. PCR amplification and sequencing

Purified plasmid pUM3 [13] and genomic DNA from reference strains listed in Table 1 were used as templates to optimize amplification conditions and to test the specificity of the degenerate primers. For PCR amplification of nearly full-length 16S rDNA gene, we used universal primers w01 (5′-AGAGTTTGATCMTGGCTC) and w02 (5′-GNTACCTTG TTACGACTT). All PCR reaction mixtures contained approximately 50 ng DNA template, 1 × PCR buffer, 0.2 mM of each deoxyribonucleoside triphosphates, 0.2 μM of each primer and 1 U Taq DNA polymerase (Eppendorf) in 25 μl volume. Amplifications were performed in a 2700 thermal cycler (Applied Biosystems). Cycling conditions for all PCRs consisted of 5 min of denaturation at 94 °C followed by 35 cycles of 45 s of denaturation at 94 °C, 45 s of annealing at 57–52 °C with a 0.5 °C decrement per cycle during the first 10 cycles and 30 s of primer extension at 72 °C. This was followed by a final extension reaction at 72 °C for 7 min. PCR products were purified with a Nucleospin gel extraction kit (Macherey-Nagel). Purified *arsB/ACR3* amplicons and 16S rDNA genes were ligated into a TA cloning vector (pCR2.1, Invitrogen). The products were used to transform *E. coli* DH10B competent cells. White colonies were screened for the presence of the correct size insert by colony PCR using vector specific primers and selected recombinant plasmids were purified (Perfectprep Plasmid Mini kit, Eppendorf) for sequencing analysis. DNA sequencing was performed by MWG-Biotech (Ebersberg, Germany), *arsB/ACR3* nucleotide sequences were determined on both strands.

2.6. Sequence analysis and phylogenetic tree

16S rDNA and *arsB/ACR3* gene sequences were compared to the entire GenBank nucleotide and amino acid databases using BlastN and BlastX programs, respectively (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/). Phylogenetic analysis of 16S rDNA sequences and ArsB/Acr3p deduced amino acid sequences were performed using MEGA version 3.0 software [8]. The neighbor-joining distance method based on *p*-distance was used to construct phylogenetic trees and the validity of the branches was ascertained with 250 bootstrap replicates.

2.7. Nucleotide sequence accession numbers

The nucleotide sequences determined in this study are available in EMBL database under accession no. AM283001–AM283032 (partial *arsB/ACR3* genes) and AM284983–AM285023 (partial 16S rDNA genes).

3. Results

3.1. Identification and characterization of arsenic-resistant isolates

The abundance and diversity of arsenic-resistant bacteria was investigated in two soil samples with different levels of arsenic contamination. Resistance to arsenic was defined as the ability to grow on LB plates containing either 7 mM As(III) or 20 mM As(V) at 25 °C. Both culturable bacterial counts and percentage of arsenate-resistant bacteria were comparable between the uncontaminated (9.5×10^4 CFU/g soil and 10.5%, respectively) and contaminated (6.2×10^4/g soil and 8.3%, respectively) soil samples. The percentage of arsenite-resistant bacteria in the uncontaminated soil was 1.1%, while no arsenite-resistant colonies could be recovered from the contaminated soil. One representative of each phenotypic group was selected for further characterization, yielding a total of 41 arsenic-resistant strains (33 from soil A and 8 from soil B), of which 22 were Gram-positive and 19 were Gram-negative (Table 1).

These isolates were identified by partially sequencing the 16S rDNA gene and classified into 22 genera distributed between five major bacterial lineages (Fig. 1.): *Actinobacteria* (14 isolates), γ-*Proteobacteria* (12 isolates), *Firmicutes* (8 isolates), α-*Proteobacteria* (5 isolates) and β-*Proteobacteria* (2 isolates). Even though the low number of isolates in soil B does not allow for accurate statistical analysis, the relative abundance of each clade in the two soils appeared to be similar. Most genera recovered from the arsenic-contaminated soil B (i.e. *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter* and *Micrococcus*) were also found in the uncontaminated soil A. The latter sample, however, displayed higher bacterial

Table 1
Bacterial isolate characteristics

Strains and isolates[a]	MIC (mM)			*arsB/ACR3*[b]		
	As(V)	As(III)	Sb(III)	*arsB*	*ACR3(1)*	*ACR3*(2)
Gram-positive bacteria						
Low G + C (*Firmicutes*)						
A12 *Bacillus* sp. (99%)	40	7	>12.8	+		
A14 *Bacillus* sp. (99%)	320	7	>12.8	+		
A22 *Bacillus* sp. (99%)	80	7	1.6			
A17 *Bacillus* sp. (99%)	40	7	0.4		+	
A13 *Bacillus massiliensis* (97%)	320	1.75	0.8			
A20 *Sporosarcina* sp. (99%)	160	14	1.6	+		
A08 *Planococcus* sp. (98%)	>640	14	1.6			
B05 *Bacillus* sp. (99%)	80	14	>12.8	+		
High G + C (*Actinobacteria*)						
A15 *Tsukamurella strandjordae* (99%)	160	1.75	0.1		+	
A11 *Zimmermannella faecalis* (99%)	640	14	0.4		+	
A06 *Pseudoclavibacter helvolus* (99%)	640	3.5	0.1		+	
A19 *Plantibacter agrosticola* (99%)	80	1.75	0.1			
A33 *Microbacterium* sp. (99%)	640	56	3.2		+	
A01 *Arthrobacter* sp. (99%)	160	1.75	0.8	+		
A03 *Arthrobacter* sp. (98%)	320	14	0.1		+	
A05 *Kocuria* sp. (99%)	640	7	0.1		+	
A24 *Micrococcus luteus* (99%)	640	3.5	0.1		+	
A02 *Micrococcus luteus* (99%)	640	7	0.1		+	
A21 *Streptomyces* sp. (99%)	40	1.75	0.1		+	
B03 *Rhodococcus* sp. (99%)	320	14	0.8		+	
B02 *Arthrobacter* sp. (98%)	160	3.5	0.1		+	
B01 *Micrococcus* sp. (99%)	640	7	0.1		+	
Gram-negative bacteria						
Alphaproteobacteria						
A16 *Sinorhizobium* sp. (99%)	160	1.75	0.4			+
A26 *Phyllobacterium myrsinacearum* (99%)	320	3.5	0.4			+
A27 *Aminobacter aminovorans* (99%)	160	3.5	1.6			+
A10 *Paracoccus* sp. (99%)	160	3.5	0.8		+	
B04 *Ensifer adhaerens* (100%)	160	1.75	0.4			+
Betaproteobacteria						
A25 *Variovorax paradoxus* (99%)	160	7	0.8			
A31 *Variovorax* sp. (99%)	320	3.5	0.4			
Gammaproteobacteria						
A23 *Pseudomonas* sp. (99%)	640	14	0.4	+		
A30 *Pseudomonas putida* (100%)	320	3.5	0.8	+		
A29 *Pseudomonas fluorescens* (100%)	160	7	1.6	+	+	
A07 *Pseudomonas* sp. (99%)	320	7	1.6	+		+
B06 *Pseudomonas* sp. (99%)	320	1.75	0.8	+	+	
B08 *Pseudomonas* sp. (99%)	320	14	0.4	+		
A04 *Acinetobacter lwoffii* (99%)	320	14	1.6			
A32 *Acinetobacter* sp. (99%)	320	14	3.2			
B07 *Acinetobacter lwoffii* (99%)	40	3.5	1.6			
A28 *Stenotrophomonas* sp. (99%)	320	3.5	1.6			
A18 *Stenotrophomonas* sp. (99%)	320	1.75	1.6			
A09 *Stenotrophomonas* sp. (100%)	320	14	0.8			
Strains used as reference						
E. coli W3110	160	7	>12.8	+		
E. coli AW3110	20	1.75	0.4			
E. coli DH10B/pUM3	320	28	>12.8	+		
C. glutamicum RES167	>640	28	0.2		+	
C. glutamicum ArsB1-B2	20	3.5	0.2			
Shewanella sp. ANA-3	640	14	0.8	+		+
S. oneidensis MR-1	80	1.75	0.8			+
M. smegmatis mc^2155	40	1.75	0.2		+	

[a] Isolates were identified based on 16S rDNA sequence analysis. For each isolate, we indicated: (i) the bacterial strain having the closest 16S rDNA gene sequences, as determined by the Blast program, and (ii) the corresponding percentage of identities (in brackets). The size of 16S rDNA sequences used in the analysis is variable (564 -912 bp). A01-A33 isolates are from soil A and B01-B08 are from soil B.
[b] Arsenite transporter sequences were detected by PCR using the relevant group-specific primer pair.

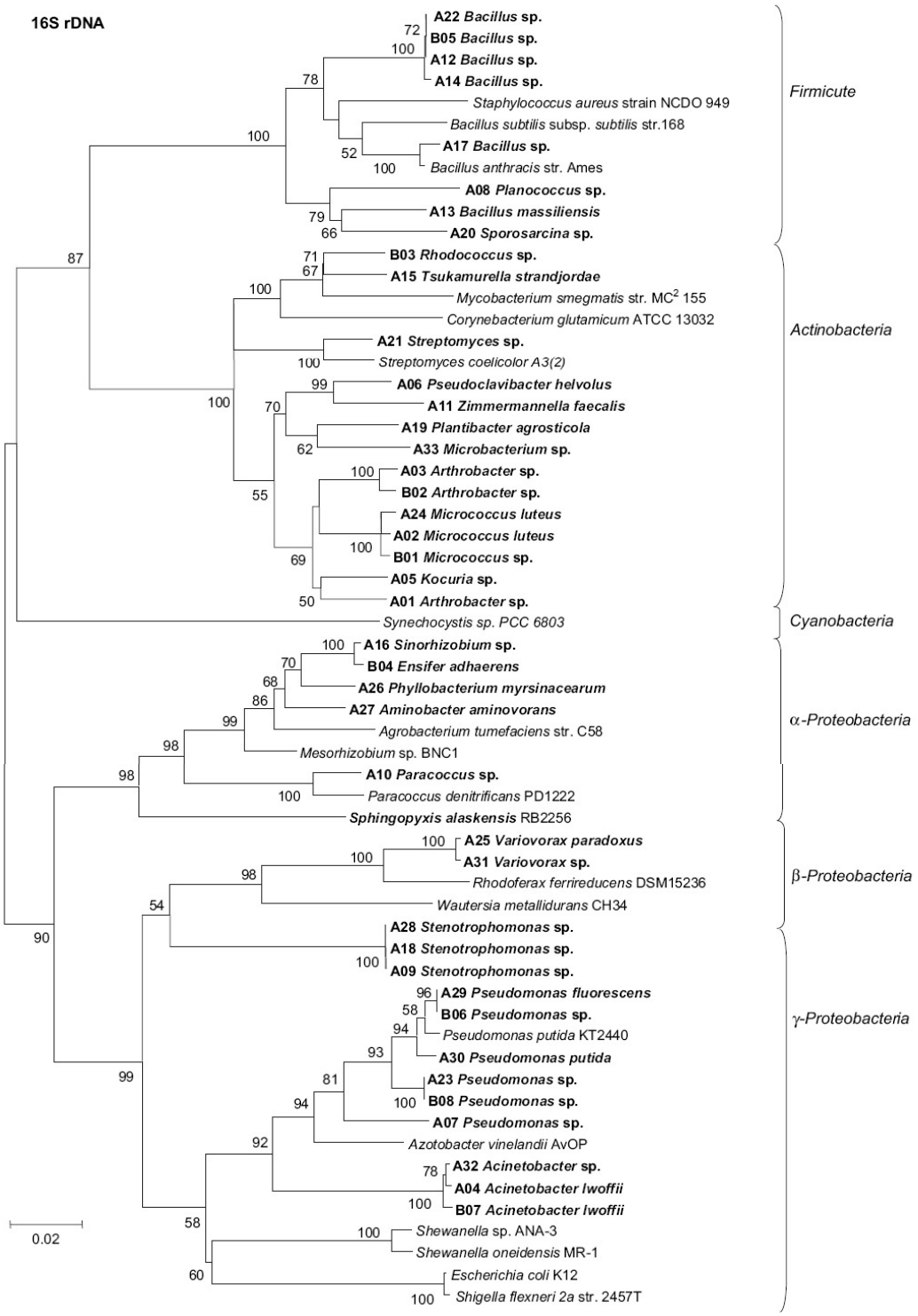


Fig. 1. Phylogeny of partial 16S rDNA genes (433 bp). Sequences from this study are in bold type. Bootstrap values over 50% are shown. The scale bars indicate substitutions per site.

diversity, with 20 different genera compared to the seven genera isolated from soil B.

The isolates were examined for their sensitivity/resistance to arsenate, arsenite and antimonite using a growth inhibition plate assay. For each metalloid, the range of minimum inhibitory concentrations (MIC) was rather large among the 41 isolates (Table 1), with relative toxicity ranking in the following order: arsenate < arsenite < antimonite.

The highest overall MICs for the three metalloid species were observed for Gram-positive isolates: A08, phylogenetically identified as *Planococcus* sp., displayed growth up to 640 mM arsenate; isolate A33, a close relative of *Microbacterium* sp., was still able to grow in the presence of 28 mM arsenite; and three isolates (A12, A14 and B05) identified as *Bacillus* sp. showed a MIC for antimonite higher than 12.8 mM. Interestingly, all the antimonite-sensitive isolates (MIC $\leq$ 0.1 mM) were found to belong to the *Actinobacteria* group. Conversely, this group contained the majority of arsenate-resistant isolates (7 out of 14 isolates with MIC up to 640 mM). Except for the latter findings, there was no apparent correlation between the metalloid resistance level of the isolates and either their phylogenetic affiliation or sample origin.

The isolates were also screened for arsenite oxidase activity. A reference arsenite-oxidizing bacterial strain (*C. arsenoxidans* ULPAs1) was included in the experiment for comparison purpose. Only three isolates responded positively to the assay, including highly arsenite-resistant *Microbacterium* isolate A33 and isolates A04 and B07 identified as *Acinetobacter*. Relative arsenite oxidase activity in these bacteria ranked in the following order: A33 < B07 = ULPAs1 < A04 (not shown).

3.2. Arsenite transporter gene sequences from arsenic-resistant isolates

Three sets of degenerate primers targeting the *arsB* and *ACR3* gene families of arsenite transporters were designed with the CODEHOP program. The specificity of the primers for *arsB* sequences was tested with purified pUM3 plasmid and genomic DNA from *Shewanella* sp. ANA-3. The ability of the primers to target *ACR3(1)* genes was tested by amplification from an *M. smegmatis* DNA extract. Genomic DNA from *C. metallidurans* AE126 as well as from *S. oneidensis* MR-1 were used as templates to check primer specificity for *ACR3(2)* genes. Genomic DNA from *E. coli* AW3110, a mutant strain lacking the *ars* genes [4], was used as a negative control. A single amplicon of the expected size (approximately 750 bp) was obtained with positive controls (data not shown). Cross-amplification of *Shewanella* sp. ANA-3 genomic DNA with the dacr5F/dacr4R primer pair generated a single PCR product, indicating that this strain contains an *ACR3(2)*-like gene in addition to the previously characterized *arsB* gene [24].

To assess the efficiency of our primers, the arsenic-resistant isolates characterized above were screened for the presence of *arsB*/*ACR3*-like genes. Of the 41 isolates, 29 showed successful amplifications with either one or two of the three specific primer sets (Table 1), with the following distribution: 11 *arsB*+ isolates (*Firmicutes* (4), γ-*Proteobacteria* (6) and *Actinobacteria* (1)); 16 *ACR3(1)*+ isolates (*Actinobacteria* (12), *Firmicute* (1), γ-*Proteobacteria* (2) and α-*Proteobacteria* (1)); five *ACR3(2)*+ isolates (α-*Proteobacteria* (4) and γ-*Proteobacteria* (1)). Both *arsB* and *ACR3* sequences were amplified from three isolates, A29 and B06 (*arsB*+, *ACR3(1)*+) and A07 (*arsB*+, *ACR3(2)*+), that are closely related to *Pseudomonas* sp. All PCR-positive isolates produced a single amplicon with an approximate length of 750 bp, except in the case of the A01 isolate from which a single PCR product of about 850 bp was reproducibly obtained. Negative PCR responses were obtained for the 12 remaining isolates which do not represent a specific taxonomic group and displayed variable levels of resistance to As(V), As(III) or Sb(III) (Table 1).

3.3. Phylogenetic analysis

Identity of the *arsB*/*ACR3* PCR products was confirmed by cloning and sequencing. The phylogenetic analysis (Fig. 2) placed the deduced ArsB amino acid sequences into two distinct clusters containing the well-characterized ArsB proteins of γ-*Proteobacteria* and *Firmicutes*, respectively. The only exception was the ArsB sequence of *Arthrobacter* isolate A01 that appeared unrelated to previously known ArsB sequences. The most distant *arsB* sequences (A01 and A14/A12) displayed 46.9% nucleotide sequence identity.

ACR3(1) sequences were detected in *Actinobacteria*, *Firmicutes* and γ-*Proteobacteria* (Table 1). However, a large majority (75%) were *Actinobacteria* representatives. The Acr3(1)p sequences of isolates A29 and B06 identified as *Pseudomonas*, and the *Paracoccus* related isolate A10, formed a distinct cluster which also contained Acr3(1)p sequences of α-*Proteobacteria* strains. It is noteworthy that the two latter *Pseudomonas* isolates also possessed an *arsB* gene. The Acr3(1)p sequence of *Bacillus* A17 was clustered with those of other *Bacillus* strains. The third cluster was formed by 11 Acr3p sequences of *Actinobacteria* isolates and contained other Acr3(1)p of *Actinobacteria* strains such as *Streptomyces coelicolor* and *M. smegmatis*. Only the Acr3(1)p sequence of A06 (*Pseudoclavibacter*) branched outside of the *Actinobacteria* cluster. There was 51.3% nucleotide sequence identity between the most distant *ACR3(1)* sequences A06 and A17.

Five *ACR3(2)* sequences were detected in Gram-negative isolates (Table 1). Four closely related sequences were from α-*Proteobacteria*, and a more distant sequence was present in the *Pseudomonas* isolate A07, which also contained an *arsB* sequence. The nucleotide sequence identity between A07 and A26 *ACR3(2)* sequences was 66.4%.

4. Discussion

The diversity of arsenic-resistant bacteria obtained from the two screened soil samples was high. To our knowledge, about one half of the 22 genera identified based on 16S rDNA sequence data were not previously reported in the literature as either arsenic-resistant or arsenic-transforming genera. Most of them were recovered from the less contaminated sample. The lower diversity of arsenic-resistant bacteria in the

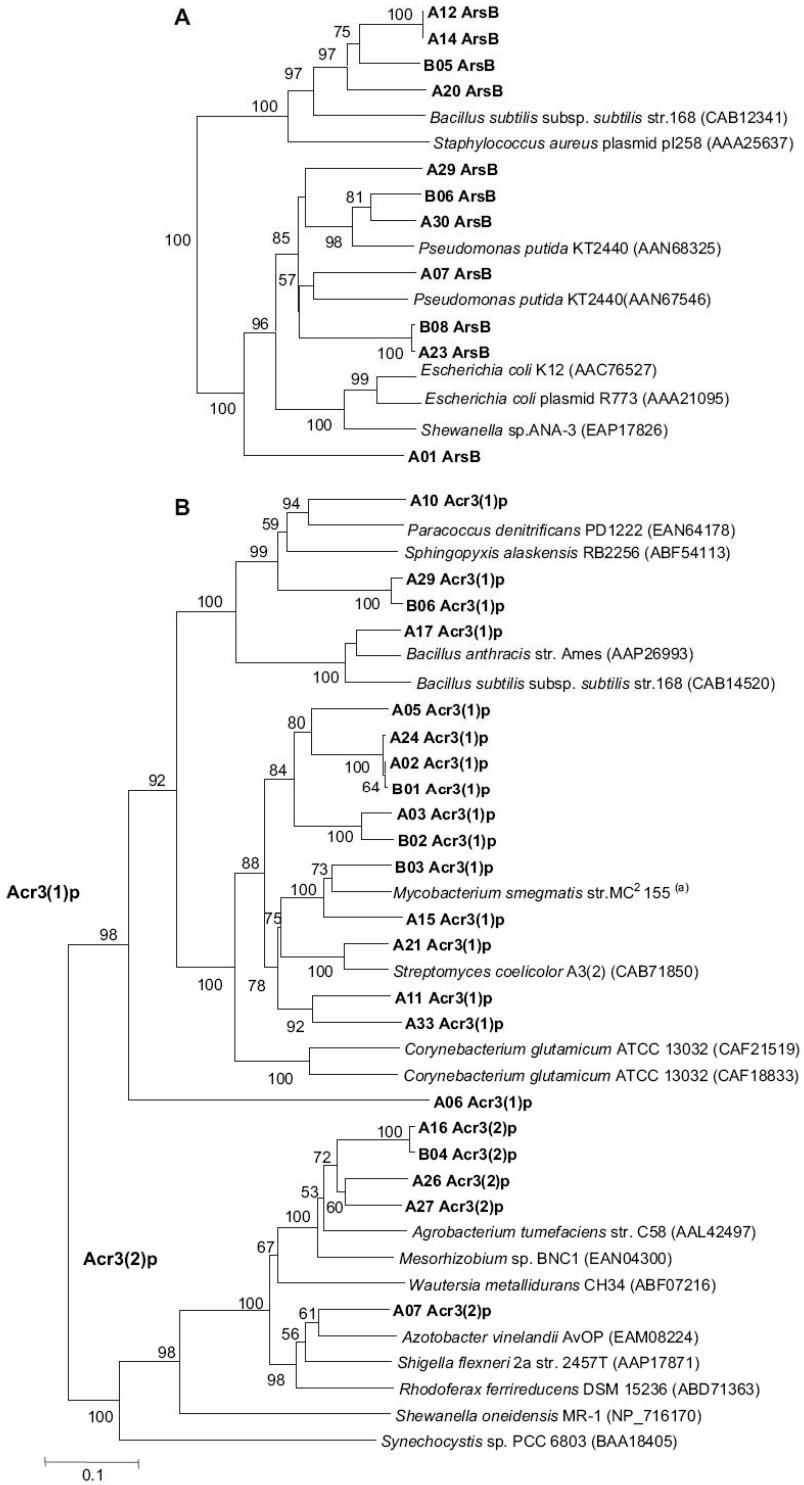


Fig. 2. Phylogeny of deduced amino acid sequences (212 amino acids) from *arsB* (A), and *ACR3(1)/ACR3(2)* (B) sequences. Sequences from this study are in bold type and the GenBank accession numbers for sequences obtained from the NCBI database are shown in parentheses. Bootstrap values over 50% are shown. The scale bars indicate substitutions per site. (a) *M. smegmatis* Acr3(1)p sequence was obtained from the Institute for Genomic Research (TIGR) (gnl|TIGR_246196 contig:3563: m_smegmatis).

contaminated sample was not unexpected, since high levels of metallic pollutants are likely to exert a strong selective pressure and thus reduce overall microbial diversity. In a recent study conducted on an estuary with an insignificant level of arsenic, Jackson et al. [7] isolated 37 different arsenate-resistant bacteria belonging to six major bacterial clades. These results, together with those obtained in the present study, indicated that arsenic-resistant bacteria appear to be phylogeneticaly diverse and widely distributed in the natural environment, regardless of the level of arsenic contamination. In addition to arsenate and arsenite, MICs were determined for antimonite, since tolerance to this metalloid is mediated by the *ars* operon in a variety of bacteria. A direct comparison of MIC values to those from other studies was not attempted, as differences in the method of resistance determination (growth inhibition on solid vs. liquid medium) and in the medium composition (e.g. organic constituents and phosphate concentration) may affect metalloid bioavailability and toxicity, resulting in discrepancies in the MIC values. Nevertheless, *E. coli* and other strains whose tolerance to arsenic has been previously characterized (e.g. *C. glutamicum* [17]) were included in the analysis for comparison purpose.

We found that 29 out of the 41 (70.7%) arsenic-resistant isolates contained a gene or genes related to *arsB*/*ACR3*. The sequencing of all amplicons confirmed the high selectivity of the PCR approach, with each primer pair allowing specific amplification of the targeted arsenite carrier group. Several reasons can explain the PCR failure for the 12 remaining isolates. First, if we hypothesize that the *arsB*/*ACR3* genes are the primary determinants in arsenite resistance, their absence in arsenite-sensitive (MIC $\leq$ 1.75 mM) isolates such as *Bacillus* A13, *Plantibacter* A19 and *Stenotrophomonas* A18 is not surprising. A similar situation has recently been reported for *Sinorhizobium meliloti* 1021, whose *ars* operon includes an aquaglyceroporin gene (*aqpS*) in place of *arsB* and confers resistance to environmental arsenate only [37]. In the case of isolates that exhibited an arsenite resistance phenotype, unsuccessful amplification may be due to the presence of an arsenite transporter gene homologue with a highly divergent DNA sequences. Finally, alternative mechanisms could be used by these isolates to cope with arsenite toxicity. Such mechanisms could include arsenite methylation that results in volatile products that escape from the cells [20] or arsenite oxidation to produce the less toxic arsenate [28]. The latter explanation may be valid for two *Acinetobacter* isolates (A04 and B07) which apparently lacked the *arsB*/*ACR3* gene while exhibiting arsenite oxidase activity. It is noteworthy that a Blast search in the genome of *Acinetobacter baylyi* ADP1 (http://www.genoscope.cns.fr/externe/English/Projets/Projet_DY/organisme_DY.html) did not reveal the presence of any arsenite carrier gene homologue, while the *Acinetobacter baumanii* strain AYE genome was recently shown to possess an atypical *ars* operon (*arsCRCBH*) located within a genomic resistance island presumably acquired by lateral gene transfer [6]. An arsenite-resistant bacteria identified as *Acinetobacter* has also been isolated from an arsenic-contaminated site in New Zealand. However, its ability to oxidize arsenite was not tested [1].

Phylogenetic analysis showed that *arsB*/*ACR3* genes were broadly distributed among our arsenic-resistant isolates. Because early studies on *ars* operons revealed the presence of the *arsB* gene, it was previously assumed that the largest fraction of bacteria employed transporters of the ArsB family to expel arsenite from the cells. In this study, however, we found that the *ACR3* genotype was predominant over *arsB* (21 *ACR3*(+) *versus* 11 *arsB*(+)). This result is consistent with the growing number of *ACR3*-like sequences retrieved from microbial genome data and suggests that this gene family of arsenite transporters might be much more widespread than initially thought.

One limitation in the PCR approach we used lies in its inability to directly show the presence of multiple alleles of an arsenite transporter gene in single strain, as is the case in several bacteria such as *C. glutamicum* [17] or *Pseudomonas putida* KT2440 [3]. Such information can be easily obtained for individual strains via sequencing a significant number of cloned PCR products or by DNA hybridization. These experiments were not undertaken here because of the large number of isolates to be analyzed. Nevertheless, the use of group-specific primer pairs revealed the presence of both *arsB* and *ACR3* genes in three *Pseudomonas* isolates (A07, A29 and B06), a case that has been reported only in *B. subtilis* up to now [23]. The presence in *Shewanella* sp. ANA-3 of an *ACR3*(2)-like gene in addition to the previously characterized *arsB* gene [24] is now confirmed by analysis of the draft genome sequence data (http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/pub/main.cgi).

Another observation that merits further investigations is the positive correlation between the antimonite sensitivity phenotype and the presence of the *ACR3*(*1*) genes. We found that 75% of *ACR3*(*1*)+ isolates belonged to the *Actinobacteria* lineage. Of these, a large majority (9 out of 12) were sensitive to the lowest tested antimonite concentration (MIC $\leq$ 0.1 mM). One possible explanation is that the Acr3(1)p proteins in these isolates are functionally similar to those of *B. subtilis* and *S. cerevisiae*, which are unable to expel antimonite out of the cell and thus provide sensitivity to this metalloid [27,35]. Consistently, disruption of the two arsenite transporter genes in *C. glutamicum*, which belong to the *ACR3*(*1*) group according to our phylogenetic analysis and that of Wysocki et al. [36], resulted in hypersensitivity to arsenite [17] but not antimonite (Table 1). Higher antimonite resistance levels observed in the other isolates may result either from the ability of the arsenite transporter to carry out antimonite export, as recognized early for the *E. coli* ArsB protein [31] and more recently for the *Synechocystis* sp. Acr3(2)p-related protein [9], from reduced antimonite uptake [26], or from a still unknown resistance mechanism.

Except for the above observation, there was no clear relationship between the different analyzed parameters, i.e. phylogenetic affiliation, metalloid resistance levels and *arsB*/*ACR3* genotype. This observation is not unprecedented and has been reported in various studies dealing with bacterial arsenic resistance in the environment. For example, Ford et al. [5] failed to correlate the level of arsenate resistance with the prevalence of *ars* genes in a set of aerobic and anaerobic

bacteria. Similarly, several authors found that closely related isolates based on their 16S rDNA sequences exhibited variable tolerance to arsenicals [7,10]. Whatever the possible reasons for such variations, they preclude the use of either phylogenetic identity or the presence of *arsB*/*ACR3* genes alone as reliable criteria to predict the behavior of bacterial communities towards arsenicals.

The primers we developed in this work proved to be highly specific, yet enabled the isolation of diverse sequences in each of the targeted arsenite transporter gene group, indicating that they could be useful to further explore the diversity of key arsenic resistance genes in a variety of bacteria. Furthermore, given that expression of most *ars* operons described to date is inducible by arsenicals, the quantification of the *ars*B/*ACR3* mRNA level would serve as a sensitive biomarker of arsenic stress and provide a means to assess the impact of arsenic contamination on bacterial communities in natural environments.

Acknowledgements

We thank P. Poupin for helpful suggestions and valuable discussions, H. Beyuki, P. Solfato and M.A. Dollard for laboratory assistance, and F. Arhin for correcting the English version of the manuscript. Thanks are due to A. Cherif, L.M. Mateos, C.W. Saltikov, M.C. Lett and B.P. Rosen for kindly providing bacterial strains and GISFI (Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles) and ZAM (Zone Atelier Moselle) for supporting this work. A. Rokbani gratefully acknowledges the support of the Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche Scientifique et de la Technologie Tunisien and of Région Lorraine (France).

References

[1] C.R. Anderson, G.M. Cook, Isolation and characterization of arsenate-reducing bacteria from arsenic-contaminated sites in New Zealand, Curr. Microbiol. 48 (2004) 341–347.
[2] B.J. Bachmann, Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12, Bacteriol. Rev. 36 (1972) 525–557.
[3] D. Canovas, I. Cases, V. de Lorenzo, Heavy metal tolerance and metal homeostasis in *Pseudomonas putida* as revealed by complete genome analysis, Environ. Microbiol. 5 (2003) 1242–1256.
[4] A. Carlin, W. Shi, S. Dey, B.P. Rosen, The *ars* operon of *Escherichia coli* confers arsenical and antimonial resistance, J. Bacteriol. 177 (1995) 981–986.
[5] T. Ford, J. Jay, A. Patel, M. Kile, P. Prommasith, T. Galloway, R. Sanger, K. Smith, M. Depledge, Use of ecotoxicological tools to evaluate the health of New Bedford Harbor sediments: a microbial biomarker approach, Environ. Health Perspect. 113 (2005) 186–191.
[6] P.E. Fournier, D. Vallenet, V. Barbe, S. Audic, H. Ogata, L. Poirel, H. Richet, C. Robert, S. Mangenot, C. Abergel, P. Nordmann, J. Weissenbach, D. Raoult, J.M. Claverie, Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*, PLoS Genet. 2 (2006) e7.
[7] C.R. Jackson, K.G. Harrison, S.L. Dugas, Enumeration and characterization of culturable arsenate resistant bacteria in a large estuary, Syst. Appl. Microbiol. 28 (2005) 727–734.
[8] S. Kumar, K. Tamura, M. Nei, MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment, Brief Bioinform. 5 (2004) 150–163.
[9] L. Lopez-Maury, F.J. Florencio, J.C. Reyes, Arsenic sensing and resistance system in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, J. Bacteriol. 185 (2003) 5363–5371.
[10] R.E. Macur, C.R. Jackson, L.M. Botero, T.R. McDermott, W.P. Inskeep, Bacterial populations associated with the oxidation and reduction of arsenic in an unsaturated soil, Environ. Sci. Technol. 38 (2004) 104–111.
[11] Y.L. Meng, Z. Liu, B.P. Rosen, As(III) and Sb(III) uptake by GlpF and efflux by ArsB in *Escherichia coli*, J. Biol. Chem. 279 (2004) 18334–18341.
[12] M. Mergeay, D. Nies, H.G. Schlegel, J. Gerits, P. Charles, F. Van Gijsegem, *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals, J. Bacteriol. 162 (1985) 328–334.
[13] H.L. Mobley, C.M. Chen, S. Silver, B.P. Rosen, Cloning and expression of R-factor mediated arsenate resistance in *Escherichia coli*, Mol. Gen. Genet. 191 (1983) 421–426.
[14] R. Mukhopadhyay, B.P. Rosen, L.T. Phung, S. Silver, Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes, FEMS Microbiol. Rev. 26 (2002) 311–325.
[15] D. Muller, D. Lievremont, D.D. Simeonova, J.C. Hubert, M.C. Lett, Arsenite oxidase *aox* genes from a metal-resistant beta-proteobacterium, J. Bacteriol. 185 (2003) 135–141.
[16] C.R. Myers, K.H. Nealson, Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor, Science 240 (1988) 1319–1321.
[17] E. Ordonez, M. Letek, N. Valbuena, J.A. Gil, L.M. Mateos, Analysis of genes involved in arsenic resistance in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, Appl. Environ. Microbiol. 71 (2005) 6206–6215.
[18] R.S. Oremland, J.F. Stolz, The ecology of arsenic, Science 300 (2003) 939–944.
[19] D.G. Pitcher, N.A. Saunders, R. Owen, Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate, Lett. Appl. Microbiol. 8 (1989) 151–156.
[20] J. Qin, B.P. Rosen, Y. Zhang, G. Wang, S. Franke, C. Rensing, Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103 (2006) 2075–2080.
[21] T.M. Rose, J.G. Henikoff, S. Henikoff, CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design, Nucleic Acids Res. 31 (2003) 3763–3766.
[22] B.P. Rosen, Biochemistry of arsenic detoxification, FEBS Lett. 529 (2002) 86–92.
[23] B.P. Rosen, Families of arsenic transporters, Trends Microbiol. 7 (1999) 207–212.
[24] C.W. Saltikov, A. Cifuentes, K. Venkateswaran, D.K. Newman, The *ars* detoxification system is advantageous but not required for As(V) respiration by the genetically tractable *Shewanella* species strain ANA-3, Appl. Environ. Microbiol. 69 (2003) 2800–2809.
[25] C.W. Saltikov, B.H. Olson, Homology of *Escherichia coli* R773 *arsA*, *arsB*, and *arsC* genes in arsenic-resistant bacteria isolated from raw sewage and arsenic-enriched creek waters, Appl. Environ. Microbiol. 68 (2002) 280–288.
[26] O.I. Sanders, C. Rensing, M. Kuroda, B. Mitra, B.P. Rosen, Antimonite is accumulated by the glycerol facilitator GlpF in *Escherichia coli*, J. Bacteriol. 179 (1997) 3365–3367.
[27] T. Sato, Y. Kobayashi, The *ars* operon in the *skin* element of *Bacillus subtilis* confers resistance to arsenate and arsenite, J. Bacteriol 180 (1998) 1655–1661.
[28] S. Silver, L.T. Phung, Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic, Appl. Environ. Microbiol. 71 (2005) 599–608.
[29] S.B. Snapper, R.E. Melton, S. Mustafa, T. Kieser, W.R. Jacobs Jr., Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*, Mol. Microbiol. 4 (1990) 1911–1919.
[30] Y. Sun, E.A. Polishchuk, U. Radoja, W.R. Cullen, Identification and quantification of *arsC* genes in environmental samples by using real-time PCR, J. Microbiol. Methods 58 (2004) 335–349.
[31] L.S. Tisa, B.P. Rosen, Molecular characterization of an anion pump. The ArsB protein is the membrane anchor for the ArsA protein, J. Biol. Chem. 265 (1990) 190–194.

[32] P. Vandamme, T. Coenye, Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54 (2004) 2285–2289.
[33] W. Weeger, D. Lievremont, M. Perret, F. Lagarde, J.C. Hubert, M. Leroy, M.C. Lett, Oxidation of arsenite to arsenate by a bacterium isolated from an aquatic environment, Biometals 12 (1999) 141–149.
[34] L. Wehmeier, O. Brockmann-Gretza, A. Pisabarro, A. Tauch, A. Puhler, J.F. Martin, J. Kalinowski, A *Corynebacterium glutamicum* mutant with a defined deletion within the *rplK* gene is impaired in (p)ppGpp accumulation upon amino acid starvation, Microbiology 147 (2001) 691–700.
[35] R. Wysocki, P. Bobrowicz, S. Ulaszewski, The *Saccharomyces cerevisiae ACR3* gene encodes a putative membrane protein involved in arsenite transport, J. Biol. Chem. 272 (1997) 30061–30066.
[36] R. Wysocki, S. Clemens, D. Augustyniak, P. Golik, E. Maciaszczyk, M.J. Tamas, D. Dziadkowiec, Metalloid tolerance based on phytochelatins is not functionally equivalent to the arsenite transporter Acr3p, Biochem. Biophys. Res. Commun. 304 (2003) 293–300.
[37] H.C. Yang, J. Cheng, T.M. Finan, B.P. Rosen, H. Bhattacharjee, Novel pathway for arsenic detoxification in the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*, J. Bacteriol. 187 (2005) 6991–6997.

Références

Aaltonen E. K. and Silow M. Transmembrane topology of the Acr3 family arsenite transporter from *Bacillus subtilis*. (2008) Biochim Biophys Acta. 1778: 963-973.

Afkar E., Lisak J., Saltikov C., Basu P., Oremland R. S. and Stolz J. F. The respiratory arsenate reductase from *Bacillus selenitireducens* strain MLS10. (2003) FEMS Microbiol Lett. 226: 107-112.

Ahmann D., Roberts A. L., Krumholz L. R. and Morel F. M. Microbe grows by reducing arsenic. (1994) Nature. 371: 750.

Akimkina T., Yook K., Curnock S. and Hodgkin J. Genome characterization, analysis of virulence and transformation of *Microbacterium nematophilum*, a coryneform pathogen of the nematode *Caenorhabditis elegans*. (2006) FEMS Microbiol Lett. 264: 145-151.

Anderson C. R. and Cook G. M. Isolation and characterization of arsenate-reducing bacteria from arsenic-contaminated sites in New Zealand. (2004) Curr. Microbiol. 48: 341-7.

Anderson G. L., Williams J. and Hille R. The purification and characterization of arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis*, a molybdenum-containing hydroxylase. (1992) J Biol Chem. 267: 23674-23682.

Archer J. A. and Sinskey A. J. The DNA sequence and minimal replicon of the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pSR1: evidence of a common ancestry with plasmids from *C. diphtheriae*. (1993) J Gen Microbiol. 139: 1753-1759.

Arner E. S. and Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. (2000) Eur J Biochem. 267: 6102-9.

Arraj J. A. and Marinus M. G. Phenotypic reversal in dam mutants of *Escherichia coli* K-12 by a recombinant plasmid containing the dam+ gene. (1983) J Bacteriol. 153: 562-565.

Bachmann B. J. Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. (1972) Bacteriol Rev. 36: 525-57.

Battaglia-Brunet F., Dictor M. C., Garrido F., Crouzet C., Morin D., Dekeyser K., Clarens M. and Baranger P. An arsenic(III)-oxidizing bacterial population: selection, characterization, and performance in reactors. (2002) J Appl Microbiol. 93: 656-667.

Battaglia-Brunet F., Joulian C., Garrido F., Dictor M. C., Morin D., Coupland K., Barrie Johnson D., Hallberg K. B. and Baranger P. Oxidation of arsenite by *Thiomonas* strains and characterization of *Thiomonas arsenivorans* sp. nov. (2006) Antonie Van Leeuwenhoek. 89: 99-108.

Bennett M. S., Guan Z., Laurberg M. and Su X. D. *Bacillus subtilis* arsenate reductase is structurally and functionally similar to low molecular weight protein tyrosine phosphatases. (2001) Proc Natl Acad Sci U S A. 98: 13577-13582.

Bentley R. and Chasteen T. G. Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony, and bismuth. (2002) Microbiol Mol Biol Rev. 66: 250-271.

Beyuki H. Analyse moléculaire de la biodiversité des mécanismes de résistance à l'arsenic chez des bactéries du sol. (2004) Rapport de maîtrise de biologie des populations et des écosystèmes mention environnement

Bobrowicz P., Wysocki R., Owsianik G., Goffeau A. and Ulaszewski S. Isolation of three contiguous genes, ACR1, ACR2 and ACR3, involved in resistance to arsenic compounds in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. (1997) Yeast. 13: 819-828.

Bruhn D. F., Li J., Silver S., Roberto F. and Rosen B. P. The arsenical resistance operon of IncN plasmid R46. (1996) FEMS Microbiol Lett. 139: 149-153.

Bun-ya M., Shikata K., Nakade S., Yompakdee C., Harashima S. and Oshima Y. Two new genes, PHO86 and PHO87, involved in inorganic phosphate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. (1996) Curr Genet. 29: 344-351.

Butcher B. G., Deane S. M. and Rawlings D. E. The chromosomal arsenic resistance genes of *Thiobacillus ferrooxidans* have an unusual arrangement and confer increased arsenic and antimony resistance to Escherichia coli. (2000) Appl Environ Microbiol. 66: 1826-1833.

Butcher B. G. and Rawlings D. E. The divergent chromosomal *ars* operon of *Acidithiobacillus ferrooxidans* is regulated by an atypical ArsR protein. (2002) Microbiology. 148: 3983-92.

Cai J. and DuBow M. S. Expression of the *Escherichia coli* chromosomal ars operon. (1996) Can J Microbiol. 42: 662-671.

Cai J., Salmon K. and DuBow M. S. A chromosomal *ars* operon homologue of *Pseudomonas aeruginosa* confers increased resistance to arsenic and antimony in *Escherichia coli*. (1998) Microbiology. 144 (Pt 10): 2705-2713.

Carlin A., Shi W., Dey S. and Rosen B. P. The *ars* operon of *Escherichia coli* confers arsenical and antimonial resistance. (1995) J Bacteriol. 177: 981-986.

Chen C. M., Misra T. K., Silver S. and Rosen B. P. Nucleotide sequence of the structural genes for an anion pump. The plasmid-encoded arsenical resistance operon. (1986) J Biol Chem. 261: 15030-15038.

Chen Y. and Rosen B. P. Metalloregulatory properties of the ArsD repressor. (1997) J Biol Chem. 272: 14257-14262.

Coupland K., Battaglia-Brunet F., Hallberg K. B., Dictor M. C., Garrido F. and Johnson D. B. Oxidation of iron, sulfur and arsenic in mine waters and mine wastes: an important role for novel Thiomonas spp. (2003) In Biohydrometallurgy; a Sustainable Technology in Evolution. Tsezos, M., Hatzikioseyian, A., and Remoudaki, E. (eds). Athens, Greece: National Technical University of Athens, Zografou, Greece. 639-646.

Dabbs E. R. Cloning of genes that have environmental and clinical importance from rhodococci and related bacteria. (1998) Antonie Van Leeuwenhoek. 74: 155-167.

Dey S. and Rosen B. P. Dual mode of energy coupling by the oxyanion-translocating ArsB protein. (1995) J Bacteriol. 177: 385-389.

Dower W. J., Miller J. F. and Ragsdale C. W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. (1988) Nucleic Acids Res. 16: 6127-6145.

Drewniak L., Styczek A., Majder-Lopatka M. and Sklodowska A. Bacteria, hypertolerant to arsenic in the rocks of an ancient gold mine, and their potential role in dissemination of arsenic pollution. (2008) Environ Pollut.

Duquesne K., Lieutaud A., Ratouchniak J., Muller D., Lett M. C. and Bonnefoy V. Arsenite oxidation by a chemoautotrophic moderately acidophilic *Thiomonas* sp.: from the strain isolation to the gene study. (2008) Environ Microbiol. 10: 228-237.

Duval S., Ducluzeau A.-L., Nitschke W. and Schoepp-Cothenet B. Enzyme phylogenies as markers for the oxidation state of the environment: The case of respiratory arsenate reductase and related enzymes. (2008) BMC Evolutionary Biology. 8: 206.

Ellis P. J., Conrads T., Hille R. and Kuhn P. Crystal structure of the 100 kDa arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis* in two crystal forms at 1.64 A and 2.03 A. (2001) Structure. 9: 125-132.

Ford T., Jay J., Patel A., Kile M., Prommasith P., Galloway T., Sanger R., Smith K. and Depledge M. Use of ecotoxicological tools to evaluate the health of New Bedford Harbor sediments: a microbial biomarker approach. (2005) Environ Health Perspect. 113: 186-191.

Francesconi K. A. and Edmonds J. S. Arsenic and marine organisms (1997) Adv Inorg Chem. 44: 147-189 in Francesconi K. A., Goessler W., Panutrakul S. and Irgolic K.J. A novel arsenic containing riboside (arsenosugar) in three species of gastropod (1998) Sci Total Environ. 221: 139-148.

Gartemann K. H. and Eichenlaub R. Isolation and characterization of IS1409, an insertion element of 4-chlorobenzoate-degrading *Arthrobacter* sp. strain TM1, and development of a system for transposon mutagenesis. (2001) J Bacteriol. 183: 3729-3736.

Geer L. Y., Domrachev M., Lipman D. J. and Bryant S. H. CDART: protein homology by domain architecture. (2002) Genome Res. 12: 1619-1623.

Ghosh M., Shen J. and Rosen B. P. Pathways of As(III) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. (1999) Proc Natl Acad Sci U S A. 96: 5001-6.

Gihring T. M., Druschel G. K., McCleskey R. B., Hamers R. J. and Banfield J. F. Rapid arsenite oxidation by *Thermus aquaticus* and *Thermus thermophilus*: field and laboratory investigations. (2001) Environ Sci Technol. 35: 3857-3862.

Gladysheva T. B., Oden K. L. and Rosen B. P. Properties of the arsenate reductase of plasmid R773. (1994) Biochemistry. 33: 7288-7293.

Green H. H. Description of a bacterium which oxidizes arsenite to arsenate, and one of which reduces arsenate to arsenite, isolated from a cattle-dipping tank. (1918) S Afr J Sci. 14: 465-467.

Hoeft S. E., Kulp T. R., Stolz J. F., Hollibaugh J. T. and Oremland R. S. Dissimilatory arsenate reduction with sulfide as electron donor: experiments with mono lake water and Isolation of strain MLMS-1, a chemoautotrophic arsenate respirer. (2004) Appl Environ Microbiol. 70: 2741-2747.

Hopenhayn C. Arsenic in Drinking Water: Impact on Human Health. (2006) ELEMENTS. 2: 103-107.

Houssaini-Iraqui M., Khamlichi N., El Yamani J. and Rastogi N. Response of *Escherichia coli* Containing Mycobacterial Carotene Genes to UV Radiation. (2001) J Biomed Biotechnol. 1: 79-84.

Huber R., Sacher M., Vollmann A., Huber H. and Rose D. Respiration of arsenate and selenate by hyperthermophilic archaea. (2000) Syst Appl Microbiol. 23: 305-14.

Hughes M. F., Kenyon E. M. and Kitchin K. T. Research approaches to address uncertainties in the risk assessment of arsenic in drinking water. (2007) Toxicology and Applied Pharmacology. 222: 399-404.

Ilialetdinov A. N. and Abdrashitova S. A. [Autotrophic arsenic oxidation by a *Pseudomonas arsenitoxidans* culture]. (1981) Mikrobiologiia. 50: 197-204.

Inskeep W. P., Macur R. E., Hamamura N., Warelow T. P., Ward S. A. and Santini J. M. Detection, diversity and expression of aerobic bacterial arsenite oxidase genes. (2007) Environ Microbiol. 9: 934-943.

Jackson C. R., Harrison K. G. and Dugas S. L. Enumeration and characterization of culturable arsenate resistant bacteria in a large estuary. (2005) Syst Appl Microbiol. 28: 727-734.

Ji G. and Silver S. Regulation and expression of the arsenic resistance operon from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. (1992a) J Bacteriol. 174: 3684-94.

Ji G. and Silver S. Reduction of arsenate to arsenite by the ArsC protein of the arsenic resistance operon of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. (1992b) Proc Natl Acad Sci U S A. 89: 9474-9478.

Ji G., Garber E. A., Armes L. G., Chen C. M., Fuchs J. A. and Silver S. Arsenate reductase of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. (1994) Biochemistry. 33: 7294-7299.

Kaneda Y., Ohnishi K. and Yagi T. Purification, molecular cloning, and characterization of pyridoxine 4-oxidase from *Microbacterium luteolum*. (2002) Biosci Biotechnol Biochem. 66: 1022-1031.

Kashyap D. R., Botero L. M., Franck W. L., Hassett D. J. and McDermott T. R. Complex regulation of arsenite oxidation in *Agrobacterium tumefaciens*. (2006) J Bacteriol. 188: 1081-1088.

Kirchner O., Gartemann K. H., Zellermann E. M., Eichenlaub R. and Burger A. A highly efficient transposon mutagenesis system for the tomato pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. (2001) Mol Plant Microbe Interact. 14: 1312-8.

Kotze A. A., Tuffin I. M., Deane S. M. and Rawlings D. E. Cloning and characterization of the chromosomal arsenic resistance genes from *Acidithiobacillus caldus* and enhanced arsenic resistance on conjugal transfer of *ars* genes located on transposon TnAtcArs. (2006) Microbiology. 152: 3551-3560.

Krafft T. and Macy J. M. Purification and characterization of the respiratory arsenate reductase of *Chrysiogenes arsenatis*. (1998) Eur J Biochem. 255: 647-653.

Laperche V., Bodénan F., Dictor M. C. and Baranger P. Guide méthodologique de l'arsenic, appliqué à la gestion des sites et sols pollués. BRGM/RP-52066-FR, 90 p., 5 fig., 10 tabl., 3 ann. (2003).

Li R., Haile J. D. and Kennelly P. J. An arsenate reductase from *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 exhibits a novel combination of catalytic characteristics. (2003) J Bacteriol. 185: 6780-6789.

Lin Y. F., Walmsley A. R. and Rosen B. P. An arsenic metallochaperone for an arsenic detoxification pump. (2006) Proc Natl Acad Sci U S A. 103: 15617-15622.

Lin Y. F., Yang J. and Rosen B. P. ArsD residues Cys12, Cys13, and Cys18 form an As(III)-binding site required for arsenic metallochaperone activity. (2007) J Biol Chem. 282: 16783-16791.

Liu J., Gladysheva T. B., Lee L. and Rosen B. P. Identification of an essential cysteinyl residue in the ArsC arsenate reductase of plasmid R773. (1995) Biochemistry. 34: 13472-13476.

Liu Z., Shen J., Carbrey J. M., Mukhopadhyay R., Agre P. and Rosen B. P. Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. (2002) Proc Natl Acad Sci U S A. 99: 6053-6058.

Liu Z., Boles E. and Rosen B. P. Arsenic trioxide uptake by hexose permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. (2004) J Biol Chem. 279: 17312-17318.

Liu Z., Sanchez M. A., Jiang X., Boles E., Landfear S. M. and Rosen B. P. Mammalian glucose permease GLUT1 facilitates transport of arsenic trioxide and methylarsonous acid. (2006) Biochem Biophys Res Commun. 351: 424-430.

Lopez-Maury L., Florencio F. J. and Reyes J. C. Arsenic sensing and resistance system in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. (2003) J Bacteriol. 185: 5363-5371.

Macur R. E., Jackson C. R., Botero L. M., McDermott T. R. and Inskeep W. P. Bacterial populations associated with the oxidation and reduction of arsenic in an unsaturated soil. (2004) Environ Sci Technol. 38: 104-111.

Macy J. M., Nunan K., Hagen K. D., Dixon D. R., Harbour P. J., Cahill M. and Sly L. I. *Chrysiogenes arsenatis* gen. nov., sp. nov., a new arsenate-respiring bacterium isolated from gold mine wastewater. (1996) Int J Syst Bacteriol. 46: 1153-1157.

Malasarn D., Saltikov C. W., Campbell K. M., Santini J. M., Hering J. G. and Newman D. K. *arrA* is a reliable marker for As(V) respiration. (2004) Science. 306: 455.

Malasarn D., Keeffe J. R. and Newman D. K. Characterization of the arsenate respiratory reductase from *Shewanella* sp. strain ANA-3. (2008) J Bacteriol. 190: 135-142.

Mandal B. K. and Suzuki K. T. Arsenic round the world: a review. (2002) Talanta. 58: 201-235.

Matschullat J. Arsenic in the geosphere--a review. (2000) Sci Total Environ. 249: 297-312.

McBride B. C. and Wolfe R. S. Biosynthesis of dimethylarsine by *Methanobacterium*. (1971) Biochemistry. 10: 4312-4317.

Meletzus D., Bermphol A., Dreier J. and Eichenlaub R. Evidence for plasmid-encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. (1993) J Bacteriol. 175: 2131-2136.

Meng Y. L., Liu Z. and Rosen B. P. As(III) and Sb(III) uptake by GlpF and efflux by ArsB in *Escherichia coli*. (2004) J Biol Chem. 279: 18334-18341.

Mergeay M., Nies D., Schlegel H. G., Gerits J., Charles P. and Van Gijsegem F. *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. (1985) J Bacteriol. 162: 328-334.

Messens J., Hayburn G., Desmyter A., Laus G. and Wyns L. The essential catalytic redox couple in arsenate reductase from *Staphylococcus aureus*. (1999) Biochemistry. 38: 16857-16865.

Messens J. and Silver S. Arsenate reduction: thiol cascade chemistry with convergent evolution. (2006) J Mol Biol. 362: 1-17.

Michalke K., Wickenheiser E. B., Mehring M., Hirner A. V. and Hensel R. Production of volatile derivatives of metal(loid)s by microflora involved in anaerobic digestion of sewage sludge. (2000) Appl Environ Microbiol. 66: 2791-2796.

Miteva V., Lantz S. and Brenchley J. Characterization of a cryptic plasmid from a Greenland ice core *Arthrobacter* isolate and construction of a shuttle vector that replicates in psychrophilic high G+C Gram-positive recipients. (2008) Extremophiles. 12: 441-449.

Mobley H. L., Chen C. M., Silver S. and Rosen B. P. Cloning and expression of R-factor mediated arsenate resistance in *Escherichia coli*. (1983) Mol. Gen. Genet. 191: 421-6.

Mokashi S. A. and Paknikar K. M. Arsenic (III) oxidizing *Microbacterium lacticum* and its use in the treatment of arsenic contaminated groundwater. (2002) Lett Appl Microbiol. 34: 258-262.

Monteiro-Vitorello C. B., Camargo L. E., Van Sluys M. A., Kitajima J. P., Truffi D., do Amaral A. M., Harakava R., de Oliveira J. C., Wood D., de Oliveira M. C., Miyaki C., Takita M. A., da Silva A. C., Furlan L. R., Carraro D. M., Camarotte G., Almeida N. F., Jr., Carrer H., Coutinho L. L., El-Dorry H. A., Ferro M. I., Gagliardi P. R., Giglioti E., Goldman M. H., Goldman G. H., Kimura E. T., Ferro E. S., Kuramae E. E., Lemos E. G., Lemos M. V., Mauro S. M., Machado M. A., Marino C. L., Menck C. F., Nunes L. R., Oliveira R. C., Pereira G. G., Siqueira W., de Souza A. A., Tsai S. M., Zanca A. S., Simpson A. J., Brumbley S. M. and Setubal J. C. The genome sequence of the gram-positive sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. (2004) Mol Plant Microbe Interact. 17: 827-836.

Mukherjee A. B. and Bhattacharya P. Arsenic in groundwater in the Bengal Delta Plain: Slow Poisoning in Bangladesh (2001) Environmental Reviews. 9: 189-220.

Mukhopadhyay R., Shi J. and Rosen B. P. Purification and characterization of ACR2p, the *Saccharomyces cerevisiae* arsenate reductase. (2000) J Biol Chem. 275: 21149-21157.

Mukhopadhyay R. and Rosen B. P. The phosphatase C(X)5R motif is required for catalytic activity of the *Saccharomyces cerevisiae* Acr2p arsenate reductase. (2001) J Biol Chem. 276: 34738-34742.

Mukhopadhyay R., Rosen B. P., Phung L. T. and Silver S. Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. (2002) FEMS Microbiol Rev. 26: 311-325.

Muller D., Lievremont D., Simeonova D. D., Hubert J. C. and Lett M. C. Arsenite oxidase *aox* genes from a metal-resistant beta-proteobacterium. (2003) J Bacteriol. 185: 135-141.

Muller D., Medigue C., Koechler S., Barbe V., Barakat M., Talla E., Bonnefoy V., Krin E., Arsene-Ploetze F., Carapito C., Chandler M., Cournoyer B., Cruveiller S., Dossat C., Duval S., Heymann M., Leize E., Lieutaud A., Lievremont D., Makita Y., Mangenot S., Nitschke W., Ortet P., Perdrial N., Schoepp B., Siguier P., Simeonova D. D., Rouy Z., Segurens B., Turlin E., Vallenet D., Van Dorsselaer A., Weiss S., Weissenbach J., Lett M. C., Danchin A. and Bertin P. N. A tale of two oxidation states: bacterial colonization of arsenic-rich environments. (2007) PLoS Genet. 3: e53.

Myers C. R. and Nealson K. H. Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. (1988) Science. 240: 1319-1321.

Newman D. K., Kennedy E. K., Coates J. D., Ahmann D., Ellis D. J., Lovley D. R. and Morel F. M. Dissimilatory arsenate and sulfate reduction in *Desulfotomaculum auripigmentum* sp. nov. (1997) Arch Microbiol. 168: 380-388.

Neyt C., Iriarte M., Thi V. H. and Cornelis G. R. Virulence and arsenic resistance in *Yersiniae*. (1997) J Bacteriol. 179: 612-619.

O'Day P. A. Chemistry and Mineralogy of Arsenic. (2006) ELEMENTS. 2: 77-83.

Oden K. L., Gladysheva T. B. and Rosen B. P. Arsenate reduction mediated by the plasmid-encoded ArsC protein is coupled to glutathione. (1994) Mol Microbiol. 12: 301-306.

Ordonez E., Letek M., Valbuena N., Gil J. A. and Mateos L. M. Analysis of genes involved in arsenic resistance in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. (2005) Appl Environ Microbiol. 71: 6206-6215.

Oremland R. S., Blum J. S., Culbertson C. W., Visscher P. T., Miller L. G., Dowdle P. and Strohmaier F. E. Isolation, Growth, and Metabolism of an Obligately Anaerobic, Selenate-Respiring Bacterium, Strain SES-3. (1994) Appl Environ Microbiol. 60: 3011-3019.

Oremland R. S., Hoeft S. E., Santini J. M., Bano N., Hollibaugh R. A. and Hollibaugh J. T. Anaerobic oxidation of arsenite in Mono Lake water and by a facultative, arsenite-oxidizing chemoautotroph, strain MLHE-1. (2002) Appl Environ Microbiol. 68: 4795-4802.

Oremland R. S. and Stolz J. F. The ecology of arsenic. (2003) Science. 300: 939-944.

Oremland R. S., Kulp T. R., Blum J. S., Hoeft S. E., Baesman S., Miller L. G. and Stolz J. F. A microbial arsenic cycle in a salt-saturated, extreme environment. (2005) Science. 308: 1305-1308.

Patek M., Eikmanns B. J., Patek J. and Sahm H. Promoters from *Corynebacterium glutamicum*: cloning, molecular analysis and search for a consensus motif. (1996) Microbiology. 142 (Pt 5): 1297-1309.

Pennella M. A. and Giedroc D. P. Structural determinants of metal selectivity in prokaryotic metal-responsive transcriptional regulators. (2005) Biometals. 18: 413-428.

Perez-Jimenez J. R., DeFraia C. and Young L. Y. Arsenate respiratory reductase gene (*arrA*) for *Desulfosporosinus* sp. strain Y5. (2005) Biochem Biophys Res Commun. 338: 825-829.

Pitcher D. G., N. A. Saunders and R. Owen. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. (1989) Lett. Appl. Microbiol. 8: 151-156.

Pongratz R. Arsenic speciation in environmental samples of contaminated soil. (1998) The Science of The Total Environment. 224: 133-141.

Pridmore R. D. New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker. (1987) Gene. 56: 309-312.

Prieto-Alamo M. J., Jurado J., Gallardo-Madueno R., Monje-Casas F., Holmgren A. and Pueyo C. Transcriptional regulation of glutaredoxin and thioredoxin pathways and related enzymes in response to oxidative stress. (2000) J Biol Chem. 275: 13398-133405.

Prithivirajsingh S., Mishra S. K. and Mahadevan A. Detection and analysis of chromosomal arsenic resistance in *Pseudomonas fluorescens* strain MSP3. (2001) Biochem Biophys Res Commun. 280: 1393-1401.

Qin J., Rosen B. P., Zhang Y., Wang G., Franke S. and Rensing C. Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase. (2006) Proc Natl Acad Sci U S A. 103: 2075-2080.

Qin J., Fu H. L., Ye J., Bencze K. Z., Stemmler T. L., Rawlings D. E. and Rosen B. P. Convergent evolution of a new arsenic binding site in the ArsR/SmtB family of metalloregulators. (2007) J Biol Chem. 282: 34346-55.

Quemeneur M., Heinrich-Salmeron A., Muller D., Lievremont D., Jauzein M., Bertin P., Garrido F. and Joulian C. Diversity surveys and evolutionary relationships of *aoxB* genes in aerobic arsenite-oxidizing bacteria. (2008) Appl Environ Microbiol. AEM.02851-07.

Ramponi G. and Stefani M. Structural, catalytic, and functional properties of low M(r), phosphotyrosine protein phosphatases. Evidence of a long evolutionary history. (1997) Int J Biochem Cell Biol. 29: 279-292.

Ravault C., Fabres B. and Ledrans M. Exposition chronique à l'arsenic hydrique et risques pour la santé, bilan des données épidémiologiques. Evaluation quantitative des risques sanitaires en Auvergne. InVS. (2003) 108p.

Rhine E. D., Phelps C. D. and Young L. Y. Anaerobic arsenite oxidation by novel denitrifying isolates. (2006) Environ Microbiol. 8: 899-908.

Rhine E. D., Ni Chadhain S. M., Zylstra G. J. and Young L. Y. The arsenite oxidase genes (*aroAB*) in novel chemoautotrophic arsenite oxidizers. (2007) Biochem Biophys Res Commun. 354: 662-667.

Rose T. M., Henikoff J. G. and Henikoff S. CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design. (2003) Nucleic Acids Res. 31: 3763-6.

Rosen B. P. Families of arsenic transporters. (1999a) Trends Microbiol. 7: 207-212.

Rosen B. P., Bhattacharjee H., Zhou T. and Walmsley A. R. Mechanism of the ArsA ATPase. (1999b) Biochim Biophys Acta. 1461: 207-215.

Rosen B. P. Biochemistry of arsenic detoxification. (2002a) FEBS Lett. 529: 86-92.

Rosen B. P. Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eukaryotic and prokaryotic microbes. (2002b) Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 133: 689-693.

Rosenstein R., Peschel A., Wieland B. and Gotz F. Expression and regulation of the antimonite, arsenite, and arsenate resistance operon of *Staphylococcus xylosus* plasmid pSX267. (1992) J Bacteriol. 174: 3676-3683.

Ryan D. and Colleran E. Arsenical resistance in the IncHI2 plasmids. (2002) Plasmid. 47: 234-240.

Salmassi T. M., Venkateswaren K., Satomi M., Nealson K. H., Newman D. K. and Hering J. G. Oxidation of arsenite by Agrobacterium albertimagni, AOL15, sp. nov., isolated from Hot Creek, California. (2002) Geomicrobiol J. 19: 53-66.

Saltikov C. W. and Olson B. H. Homology of *Escherichia coli* R773 *arsA*, *arsB*, and *arsC* genes in arsenic-resistant bacteria isolated from raw sewage and arsenic-enriched creek waters. (2002) Appl Environ Microbiol. 68: 280-288.

Saltikov C. W., Cifuentes A., Venkateswaran K. and Newman D. K. The *ars* detoxification system is advantageous but not required for As(V) respiration by the genetically

tractable *Shewanella species* strain ANA-3. (2003) Appl Environ Microbiol. 69: 2800-2809.

Saltikov C. W. and Newman D. K. Genetic identification of a respiratory arsenate reductase. (2003) Proc Natl Acad Sci U S A. 100: 10983-10988.

Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New York, USA (1989)

San Francisco M. J., Hope C. L., Owolabi J. B., Tisa L. S. and Rosen B. P. Identification of the metalloregulatory element of the plasmid-encoded arsenical resistance operon. (1990) Nucleic Acids Res. 18: 619-624.

Sanders O. I., Rensing C., Kuroda M., Mitra B. and Rosen B. P. Antimonite is accumulated by the glycerol facilitator GlpF in *Escherichia coli*. (1997) J Bacteriol. 179: 3365-3367.

Santini J. M., Sly L. I., Schnagl R. D. and Macy J. M. A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies. (2000) Appl Environ Microbiol. 66: 92-97.

Santini J. M., Sly L. I., Wen A., Combrie D., De Wulf-Durand P. and Macy J. M. New arsenite-oxidizing bacteria isolated from Australian gold mining environments-phylogenetic relationships. (2002) Geomicrobiol J 19: 67-76.

Santini J. M. and vanden Hoven R. N. Molybdenum-containing arsenite oxidase of the chemolithoautotrophic arsenite oxidizer NT-26. (2004) J Bacteriol. 186: 1614-1619.

Santini J. M., Kappler U., Ward S. A., Honeychurch M. J., vanden Hoven R. N. and Bernhardt P. V. The NT-26 cytochrome c552 and its role in arsenite oxidation. (2007) Biochim Biophys Acta. 1767: 189-96.

Sato T. and Kobayashi Y. The *ars* operon in the skin element of *Bacillus subtilis* confers resistance to arsenate and arsenite. (1998) J Bacteriol. 180: 1655-1661.

Sehlin H. M. and Lindstrom B. E. Oxidation and reduction of arsenic by *Sulfolobus acidocaldarius* strain BC. (1992) FEMS Microbiol Lett. 93: 87-92.

Shariatpanahi M., Anderson A. C., Abdelghani A. A. and Englande A. J. Microbial metabolism of an organic arsenical herbicide, p. 268-277. In T. A. Oxley and S. Barry (ed.), Biodeterioration, vol. 5. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom. 3268-3274. (1983).

Shi W., Wu J. and Rosen B. P. Identification of a putative metal binding site in a new family of metalloregulatory proteins. (1994) J Biol Chem. 269: 19826-19829.

Shi W., Dong J., Scott R. A., Ksenzenko M. Y. and Rosen B. P. The role of arsenic-thiol interactions in metalloregulation of the *ars* operon. (1996) J Biol Chem. 271: 9291-9297.

Silver S. and Phung L. T. Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. (2005a) Appl Environ Microbiol. 71: 599-608.

Silver S. and Phung L. T. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. (2005b) J Ind Microbiol Biotechnol. 32: 587-605.

Singer M. E. and Finnerty W. R. Construction of an *Escherichia coli-Rhodococcus* shuttle vector and plasmid transformation in *Rhodococcus* sp. (1988) J Bacteriol. 170: 638-645.

Smedley P. L. and Kinniburgh D. G. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. (2002) Appl Geochem 17: 517–568.

Smith A. H., Lingas E. O. and Rahman M. Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency. (2000) Bull World Health Organ. 78: 1093-1103.

Snapper S. B., Melton R. E., Mustafa S., Kieser T. and Jacobs W. R., Jr. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. (1990) Mol Microbiol. 4: 1911-9.

Song E. K., Kim H., Sung H. K. and Cha J. Cloning and characterization of a levanbiohydrolase from *Microbacterium laevaniformans* ATCC 15953. (2002) Gene. 291: 45-55.

Stolz J. F., Ellis D. J., Blum J. S., Ahmann D., Lovley D. R. and Oremland R. S. *Sulfurospirillum barnesii* sp. nov. and *Sulfurospirillum arsenophilum* sp. nov., new members of the *Sulfurospirillum* clade of the *epsilon Proteobacteria*. (1999) Int J Syst Bacteriol. 49 Pt 3: 1177-1180.

Stolz J. F., Basu P., Santini J. M. and Oremland R. S. Arsenic and selenium in microbial metabolism. (2006) Annu Rev Microbiol. 60: 107-130.

Striebel H. M., Seeber S., Jarsch M. and Kessler C. Cloning and characterization of the *MamI* restriction-modification system from *Microbacterium ammoniaphilum* in *Escherichia coli*. (1996) Gene. 172: 41-46.

Styblo M., Drobna Z., Jaspers I., Lin S. and Thomas D. J. The role of biomethylation in toxicity and carcinogenicity of arsenic: a research update. (2002) Environ Health Perspect. 110 Suppl 5: 767-771.

Suzuki K., Wakao N., Kimura T., Sakka K. and Ohmiya K. Expression and regulation of the arsenic resistance operon of *Acidiphilium multivorum* AIU 301 plasmid pKW301 in *Escherichia coli*. (1998) Appl Environ Microbiol. 64: 411-418.

Suzuki S., Takenaka Y., Onishi N. and Yokozeki K. Molecular cloning and expression of the *hyu* genes from *Microbacterium liquefaciens* AJ 3912, responsible for the conversion of 5-substituted hydantoins to alpha-amino acids, in *Escherichia coli*. (2005) Biosci Biotechnol Biochem. 69: 1473-1482.

Switzer Blum J., Burns Bindi A., Buzzelli J., Stolz J. F. and Oremland R. S. *Bacillus arsenicoselenatis*, sp. nov., and *Bacillus selenitireducens*, sp. nov.: two haloalkaliphiles from Mono Lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic. (1998) Arch Microbiol. 171: 19-30.

Takai K., Hirayama H., Sakihama Y., Inagaki F., Yamato Y. and Horikoshi K. Isolation and metabolic characteristics of previously uncultured members of the order aquificales in a subsurface gold mine. (2002) Appl Environ Microbiol. 68: 3046-3054.

Takai K., Kobayashi H., Nealson K. H. and Horikoshi K. *Deferribacter desulfuricans* sp. nov., a novel sulfur-, nitrate- and arsenate-reducing thermophile isolated from a deep-sea hydrothermal vent. (2003) Int J Syst Evol Microbiol. 53: 839-846.

Thomas D. J., Waters S. B. and Styblo M. Elucidating the pathway for arsenic methylation. (2004) Toxicol Appl Pharmacol. 198: 319-326.

Tuffin I. M., de Groot P., Deane S. M. and Rawlings D. E. An unusual Tn21-like transposon containing an *ars* operon is present in highly arsenic-resistant strains of the biomining bacterium *Acidithiobacillus caldus*. (2005) Microbiology. 151: 3027-3039.

Tuffin I. M., Hector S. B., Deane S. M. and Rawlings D. E. Resistance determinants of a highly arsenic-resistant strain of *Leptospirillum ferriphilum* isolated from a commercial biooxidation tank. (2006) Appl Environ Microbiol. 72: 2247-2253.

Turpeinen R., Pantsar-Kallio M. and Kairesalo T. Role of microbes in controlling the speciation of arsenic and production of arsines in contaminated soils. (2002) The Science of The Total Environment. 285: 133-145.

van der Geize R., Hessels G. I., van Gerwen R., van der Meijden P. and Dijkhuizen L. Molecular and functional characterization of *kshA* and *kshB*, encoding two components of 3-ketosteroid 9alpha-hydroxylase, a class IA monooxygenase, in *Rhodococcus erythropolis* strain SQ1. (2002) Mol Microbiol. 45: 1007-1018.

van der Rest M. E., Lange C. and Molenaar D. A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. (1999) Appl Microbiol Biotechnol. 52: 541-545.

Vandamme P. and Coenye T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. (2004) Int J Syst Evol Microbiol. 54: 2285-9.

vanden Hoven R. N. and Santini J. M. Arsenite oxidation by the heterotroph *Hydrogenophaga* sp. str. NT-14: the arsenite oxidase and its physiological electron acceptor. (2004) Biochim Biophys Acta. 1656: 148-155.

Vaughan D. J. Arsenic. (2006) ELEMENTS. 2: 71-75.

Verkman A. S. and Mitra A. K. Structure and function of aquaporin water channels. (2000) Am J Physiol Renal Physiol. 278: F13-28.

Vesely M., Patek M., Nesvera J., Cejkova A., Masak J. and Jirku V. Host-vector system for phenol-degrading *Rhodococcus erythropolis* based on *Corynebacterium* plasmids. (2003) Appl Microbiol Biotechnol. 61: 523-527.

Wang G., Kennedy S. P., Fasiludeen S., Rensing C. and DasSarma S. Arsenic resistance in *Halobacterium* sp. strain NRC-1 examined by using an improved gene knockout system. (2004) J Bacteriol. 186: 3187-3194.

Wang L., Chen S., Xiao X., Huang X., You D., Zhou X. and Deng Z. *arsRBOCT* arsenic resistance system encoded by linear plasmid pHZ227 in *Streptomyces* sp. strain FR-008. (2006) Appl Environ Microbiol. 72: 3738-42.

Waters S. B., Devesa V., Fricke M. W., Creed J. T., Styblo M. and Thomas D. J. Glutathione modulates recombinant rat arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase-catalyzed formation of trimethylarsine oxide and trimethylarsine. (2004) Chem Res Toxicol. 17: 1621-1629.

Weeger W., Lievremont D., Perret M., Lagarde F., Hubert J. C., Leroy M. and Lett M. C. Oxidation of arsenite to arsenate by a bacterium isolated from an aquatic environment. (1999) Biometals. 12: 141-149.

Wehmeier L., Brockmann-Gretza O., Pisabarro A., Tauch A., Puhler A., Martin J. F. and Kalinowski J. A *Corynebacterium glutamicum* mutant with a defined deletion within the *rplK* gene is impaired in (p)ppGpp accumulation upon amino acid starvation. (2001) Microbiology. 147: 691-700.

WHO. (World Health Organization) Arsenic and arsenic compounds (2001) Environmental Health Criteria 224, Geneva.

Wu J., Tisa L. S. and Rosen B. P. Membrane topology of the ArsB protein, the membrane subunit of an anion-translocating ATPase. (1992) J Biol Chem. 267: 12570-12576.

Wu J. and Rosen B. P. Metalloregulated expression of the *ars* operon. (1993a) J Biol Chem. 268: 52-58.

Wu J. and Rosen B. P. The *arsD* gene encodes a second trans-acting regulatory protein of the plasmid-encoded arsenical resistance operon. (1993b) Mol Microbiol. 8: 615-623.

Wysocki R., Bobrowicz P. and Ulaszewski S. The *Saccharomyces cerevisiae ACR3* gene encodes a putative membrane protein involved in arsenite transport. (1997) J. Biol. Chem. 272: 30061-6.

Wysocki R., Chery C. C., Wawrzycka D., Van Hulle M., Cornelis R., Thevelein J. M. and Tamas M. J. The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*. (2001) Mol Microbiol. 40: 1391-1401.

Xu C., Shi W. and Rosen B. P. The chromosomal *arsR* gene of *Escherichia coli* encodes a trans-acting metalloregulatory protein. (1996) J Biol Chem. 271: 2427-32.

Yang H. C., Cheng J., Finan T. M., Rosen B. P. and Bhattacharjee H. Novel pathway for arsenic detoxification in the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. (2005) J Bacteriol. 187: 6991-6997.

Yompakdee C., Bun-ya M., Shikata K., Ogawa N., Harashima S. and Oshima Y. A putative new membrane protein, Pho86p, in the inorganic phosphate uptake system of *Saccharomyces cerevisiae*. (1996a) Gene. 171: 41-47.

Yompakdee C., Ogawa N., Harashima S. and Oshima Y. A putative membrane protein, Pho88p, involved in inorganic phosphate transport in *Saccharomyces cerevisiae*. (1996b) Mol Gen Genet. 251: 580-590.

Zegers I., Martins J. C., Willem R., Wyns L. and Messens J. Arsenate reductase from *S. aureus* plasmid pI258 is a phosphatase drafted for redox duty. (2001) Nat Struct Biol. 8: 843-7.

Zeller T. and Klug G. Thioredoxins in bacteria: functions in oxidative stress response and regulation of thioredoxin genes. (2006) Naturwissenschaften. 93: 259-266.

Zhang Z. Y. Protein-tyrosine phosphatases: biological function, structural characteristics, and mechanism of catalysis. (1998) Crit Rev Biochem Mol Biol. 33: 1-52.