UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Microbiologie, Parasitologie

Ecole doctorale : Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosciences et Environnement (SIBAGHE)

Présentée et soutenue publiquement par

MAYNAUD Géraldine

Le 18 décembre 2012

Adaptation aux métaux lourds de populations de rhizobia impliquées dans la phytostabilisation de déblais miniers : Identification des mécanismes d'adaptation au Zn et au Cd, et structuration des populations de rhizobia adaptées aux sites miniers

---

JURY

Alain Givaudan	Directeur de Recherche INRA, Montpellier	Président du jury
Pascal Simonet	Directeur de Recherche CNRS, Lyon	Rapporteur
Wafa Achouak	Chargé de Recherche CNRS HDR, Cadarache	Rapporteur
Max Mergeay	Professeur Honoraire, Univ. Libre de Bruxelles	Examinateur
Jean-Claude Cleyet-Marel	Directeur de Recherche INRA, Montpellier	Co-directeur de thèse
Brigitte Brunel	Professeur Montpellier SupAgro, Montpellier	Directeur de thèse

Remerciements

En tout premier lieu, je souhaiterai exprimer mes plus sincères remerciements et toute ma reconnaissance à mes trois encadrants de thèse, qui pendant ces trois années m'ont orienté, épaulé et conseillé :

Brigitte Brunel, je te remercie pour ta grande disponibilité malgré ton emploi du temps de professeur très chargé ainsi que pour toute l'aide que tu m'as apportée notamment dans l'écriture des papiers et de la thèse (entre deux cours). Je trouve que nous avons formé ensemble une très belle équipe. Merci de m'avoir permis de faire du monitorat avec toi et ton équipe, une expérience qui a été très enrichissante.

Jean-Claude Cleyet-Marel, je te remercie de m'avoir fait découvrir le monde des *Mesorhizobium* métallicoles, un monde qui sincèrement m'a passionné. Je te remercie aussi d'avoir pris soin de moi pendant toutes ces années, d'avoir été toujours à l'écoute, toujours à me conseiller. Je me souviendrai aussi des nombreuses sorties sur le terrain toujours aussi enrichissantes les unes que les autres.

Antoine Le-Quéré, malgré le fait que tu aies changé de thématique et que tu sois parti au Maroc, tu ne m'as pas abandonné, tu es resté à mes cotés tout au long de mes trois années, pour cela je t'en suis très reconnaissante. Tu m'as beaucoup appris et je te remercie chaleureusement pour tout tes précieux conseils et toute l'aide que tu m'as apportée et plus particulièrement pour notre super manip RNAseq.

Merci à tout les trois de m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse et de m'avoir fait confiance pour ce travail.

Je voudrai ensuite remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci à **Alain Givaudan**, Directeur de Recherche INRA Montpellier, d'avoir accepté de présider ma soutenance ainsi que **Wafa Achouak**, Chargé de Recherche CNRS CEA Cadarache et **Pascal Simonet**, Directeur de Recherche CNRS Ecole Centrale de Lyon, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et **Max Mergeay**, Professeur Honoraire de l'Université Libre de Bruxelles et d'en être l'examinateur.

Merci aussi aux professeurs et chercheurs qui ont participé à mes comités de thèse : **Lionel Moulin** et **Agnieszka Klonowska**, Chargés de Recherche IRD au LSTM, **Sylvie Nazaret**, Chargé de Recherche CNRS au laboratoire d'Ecologie Microbienne de Lyon, **Tatiana Vallaeys**, Professeur UMII à Montpellier, **Alain Givaudan** et **Max Mergeay**, merci à vous tous pour ces échanges très fructueux et d'avoir partagé vos connaissances avec moi. J'adresse un merci tout particulier à **Lionel** pour sa grande disponibilité et son aide précieuse en phylogénie, génomique, transcriptomique … et aussi pour sa bonne humeur, à **Agnieszka** pour son aide dans mes premiers pas en qPCR mais aussi pour ses nombreux conseils dans la rédaction d'articles, merci aussi d'avoir partagé quelques anecdotes polonaises et à **Max**, avec qui j'ai beaucoup échangé et profité de ses connaissances en la matière. Merci pour ses analyses pointues et ses conseils avisés de grand Professeur, merci de m'avoir accordé du temps, du temps de « retraité ». Je tiens aussi à remercier **Damien Mornico,** Ingénieur bioinformaticien au Génoscope Evry, pour son aide dans le séquençage et l'analyse des génomes de *Mesorhizobium* ainsi que, **José Escarré**, Directeur de Recherche CNRS Montpellier, pour ses connaissances du site minier des Avinières.

Pendant ces trois années, l'enseignement a fait parti entièrement de mon travail de thèse, merci à toutes les personnes qui m'ont ouvert les portes du monitorat : **Marie-Hélène Boyer** (microbiologie), **Brigitte Brunel** (biologie moléculaire), **Christine Heinz** (biologie végétale) ainsi qu'à leurs équipes respectives pour leur aide indispensable.

Je voudrai aussi remercier toute l'équipe du Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM) pour son accueil chaleureux. Pendant toutes ces années, le LSTM a été pour moi une deuxième maison et les personnes que j'y ai rencontrées une deuxième famille. Je tiens à remercier en particulier **Michel Lebrun**, directeur du LSTM, de m'avoir acceptée dans son laboratoire et de m'avoir permis de réaliser cette thèse. En tant que chef de l'équipe AMOSCE à laquelle j'appartiens, merci d'avoir répondu présent à mes comités de thèse et d'avoir partagé avec moi ses connaissances en la matière. Merci aussi à **Natalie** et **Cathy** pour leur aide dans les taches administratives pas souvent évidentes et qui trouvent toujours une solution à tout, à **Naima** pour son aide précieuse dans les manip à **Fabienne** et **Djamel** pour m'avoir épaulée notamment en qPCR mais aussi pour nos innombrables discussions pas toujours scientifiques, à **Yves** et **Caroline** pour leur accompagnement dans mes débuts en microscopie, à **Lucette** et **Souhir**, pour leurs connaissances végétales pointues et leur assistance dans mes manip plantes, à **Nico**, **Eric**, **Joël** pour toutes nos discussions très techniques et bien d'autres, **Elisabeth Navarro** en tant que porteur de l'ANR APTITUDE pour nos échanges scientifiques.

A mes chers collègues et amis thésards, **Caroline**, **Rémy**, **Imene** et **Souhir**, je trouve que nous avons formé un bon cru. Toujours dans la bonne humeur nous avons avancé ensemble et j'espère que nos routes se recroiseront un jour. Je vous souhaite beaucoup de chance dans vos carrières respectives. **Khaled**, **Roba**, profitez à fond de vos années de thèse. Roba, je te remercie pour ton aide durant mes derniers mois de thèse et j'espère t'avoir transmis la motivation et l'envie de continuer. Merci aussi aux anciens thésards et Postdoc qui sont passés au labo et qui ont su nous montrer le chemin à suivre, en particulier **Céline, Cécile, Marie-Mathilde** et **Erika**. Erika, je ne te remercierai jamais assez, aussi bien que pour ton accueil pendant ces trois mois de stage dans ton labo à Madison (USA) que pour tous nos échanges.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans une pensée pour mes amis (**Claire, Sylvain, Jérôme, Magalie, Patrick, Anne, Anaïs, Marion, Benjamin, Anaïs** et bien d'autres) qui pendant toutes ces années se sont demandés pourquoi j'étais encore dans les études à mon âge. Ainsi qu'à ma famille : la **Bourdel family** de Capestang, merci pour votre soutien. Un merci en particulier à ma **maman** et mon frère **Pierre** qui a pris le temps de corriger mes fautes d'orthographe. Merci à vous deux pour tout l'amour que vous m'avez apporté, j'espère aujourd'hui vous savoir fiers de moi. Et je finirai par remercier **Fabrice,** car cette thèse c'est aussi un peu la sienne. Merci de m'avoir supportée pendant ces trois années, tu m'as fait travailler sans relâche mes cours ainsi que mes présentations, tu m'as poussée en permanence à m'améliorer et à me poser des questions. J'espère aujourd'hui être à la hauteur de tes attentes.

J'en oublie certainement et je vous prie de bien vouloir m'en excuser d'avance mais merci à toutes les personnes qui ont contribué de loin comme de prêt à ce travail de thèse.

Sommaire

Liste des publications et communications scientifiques **6**
Avant-propos **9**
Liste des abréviations **10**
Liste des figures et tableaux **14**

Introduction générale

I- Introduction au sujet de thèse **21**
II- Contexte général et présentation du modèle d'étude **22**
III- Objectifs de la thèse **26**
IV- Plan de la thèse **26**

Chapitre I – Synthèse bibliographique

I-1- Les métaux lourds dans l'environnement **28**
I-1-1- Définition des métaux lourds **28**
I-1-2- Nutrition minérale des plantes **30**
I-1-3- Les sources de pollution métallique **31**
I-1-4- Les impacts de la pollution métallique sur la santé et l'environnement **34**
I-1-5- Le problème de la toxicité des métaux lourds **35**
I-1-6- Les méthodes de gestion des environnements contaminés **36**
I-2- Utilisation de la symbiose fixatrice d'azote légumineuses/rhizobia dans des stratégies de phytostabilisation **40**
I-2-1- Généralités sur la symbiose fixatrice d'azote légumineuses/rhizobia **40**
I-2-2- Impact des métaux lourds sur la symbiose légumineuses/rhizobia **44**
I-2-3- Exemples de symbioses fixatrices d'azote utilisées dans des stratégies de revégétalisation **45**
I-3- Réponse des bactéries au stress métallique **46**
I-3-1- Mécanismes d'adaptation aux métaux lourds **46**
I-3-2- Mécanismes d'adaptation aux métaux lourds : l'exemple des transporteurs d'efflux des métaux lourds **48**
I-3-3- Mécanismes d'adaptation aux métaux lourds : les systèmes de régulation **52**
I-3-4- Adaptation aux métaux lourds des rhizobia métallicoles **53**

Chapitre II - Caractérisation et description du gène *cad*A1 codant pour une P_{IB}-ATPase impliquée dans la résistance au Zn et au Cd chez *Mesorhizobium metallidurans*

II-1- Introduction **55**
II-2- Article en préparation **56**
II-3- Etude préliminaire de l'expression de *cad*A1 dans les nodosités d'*Anthyllis* soumises à un stress Zn **92**
II-4- Synthèse **104**

Chapitre III - Réponse transcriptionnelle au stress métallique (Zn/Cd) et analyse génomique de *Mesorhizobium* métallicoles isolés de sites miniers

III-1- Introduction **110**
III-2- Article en préparation pour *BioMed Central Genomics* **111**
III-3- Analyse complémentaire de comparaison de génomes de *Mesorhizobium* séquencés **166**
III-4- Synthèse **180**

Chapitre IV - Diversité génétique et répartition des symbiotes d'*Anthyllis vulneraria* sur sols miniers Zn/Cd et non contaminés

IV-1- Introduction **184**
IV-2- Article accepté dans *Systematic and Applied Microbiology* **185**
IV-3- Article en préparation **208**
IV-4- Synthèse **238**

Chapitre V – Discussion générale et perspectives 242

Références bibliographiques **253**

Liste des publications et communications scientifiques

- **Publications :**

Maynaud G., Brunel B., Yashiro E., Mergeay M., Cleyet-Marel J. C. and Le-Quéré A. CadA1 is a novel P_{IB}-type ATPase involved in Cd/Zn resistance in *Mesorhizobium metallidurans*, isolated from mining soil. *In prepapration*. (**Chapitre II**).

Maynaud G., Brunel B., Mornico D., Durot M., Severac D., Desvignes J. P., Navarro E., Cleyet-Marel J. C. and Le-Quéré A. Genome-wide transcriptional responses of two metal-tolerant symbiotic *Mesorhizobium* isolates to Zinc and Cadmium exposure. *In preparation*. (**Chapitre III**).

Maynaud G., Vidal C., Le Quéré A., Maure L., Mohamad R., Cleyet-Marel J. C. and Brunel B. Genetic diversity and repartition of *Anthyllis vulneraria* rhizobial symbionts in Zn-Pb mining soils. *In preparation*. (**Chapitre IV**).

Maynaud G., Willems A., Soussou S., Vidal C., Maure L., Moulin L., Cleyet-Marel J. C. and Brunel B. Molecular and phenotypic characterization of strains nodulating *Anthyllis vulneraria* in mine tailings, and proposal of *Aminobacter anthyllidis* sp. nov., the first definition of *Aminobacter* as legume-nodulating bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*. (**Chapitre IV**).

- **Communications scientifiques :**

Maynaud G., Le-Quéré A., Yashiro E., Cleyet-Marel J. C. et Brunel B. Mise en évidence d'une P-ATPase potentiellement impliquée dans la résistance au Cd chez *M. metallidurans.* 9èmes Rencontres Plantes-Bactéries, Aussois, France, 18-22/01/2010. (**Poster**).

Maynaud G., Le-Quéré A., Yashiro E., Cleyet-Marel J. C. et Brunel B. Résistance aux métaux lourds des populations de rhizobia impliquées dans la phytostabilisation de déblais miniers : recherche des mécanismes d'adaptation au Zn et Cd. 3ème édition du Printemps de Baillarguet, Montpellier, France, 29/04/2010 (**Communication orale**).

Maynaud G., Le-Quéré A., Yashiro E., Cleyet-Marel J. C. et Brunel B. Mise en évidence d'une P-ATPase potentiellement impliquée dans la résistance au Cd chez *M. metallidurans.* 3ème journées thématiques de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne (AFEM) « Les interactions microbiennes passées et présentes », Marseille, France, 04/05/2010. (**Poster**).

Maynaud G., Le-Quéré A., Yashiro E., Cleyet-Marel J. C. et Brunel B. Résistance aux métaux lourds des populations de rhizobia impliquées dans la phytostabilisation de déblais miniers : recherche des mécanismes d'adaptation au Zn et Cd. 2ème journées des doctorants du département Santé des Plantes et Environnement (SPE) de l'INRA, Sophia Antipolis, France, 02-04/06/2010. (**Communication orale**).

Maynaud G., Willems A., Soussou S., Vidal C., Maure L., Moulin L., Cleyet-Marel J. C. and Brunel B. *Aminobacter anthyllidis* sp. nov., nouvelle espèce bactérienne isolée de sols miniers et fixatrice d'azote avec la légumineuse *Anthyllis vulneraria.* 5èmes Colloque de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne (AFEM) organisé en collaboration avec l'Association Tunisienne de Biotechnologie (A.T. BIOTECH), Hammamet, Tunisie, 14-16/11/2011. (**Poster**).

Soussou S., **Maynaud G**., Brunel B., Mahieu S., Escarré J., Lebrun M., Mauré L., Banni M., Boussetta H. et Cleyet-Marel J. C. Adaptation de la symbiose légumineuses-bactéries symbiotiques à de fortes teneurs en métaux lourds pour l'aménagement de sites miniers. 5èmes Colloque de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne (AFEM) organisé en collaboration avec l'Association Tunisienne de Biotechnologie (A.T. BIOTECH), Hammamet, Tunisie, 14-16/11/2011. (**Communication orale**).

Maynaud G., Le-Quéré A., Yashiro E., Cleyet-Marel J. C. et Brunel B. Résistance aux métaux lourds des populations de mesorhizobia d'intérêt dans une démarche de phytostabilisation de déblais miniers : identification de mécanismes d'adaptation au zinc et cadmium. 10èmes Rencontres Plantes-Bactéries, Aussois, France, 30/01-03/02/2012. (**Communication orale**).

Maynaud G., Le-Quéré A., Yashiro E., Cleyet-Marel J. C. et Brunel B. Identification des gènes impliqués dans l'adaptation au Zn et Cd de populations de rhizobia isolées de sols

miniers. Rencontre du Réseau « Environnements Miniers Méditerranéens », Montpellier, France, 14-16/05/2012. (**Communication orale**).

Maynaud G., Le-Quéré A., Yashiro E., Mornico D., Durot M., Severac D., Desvignes J. P., Navarro E., Mergeay M., Cleyet-Marel J. C et Brunel B. Identification of genes involved in Zn and Cd adaptation in rhizobia isolated from heavy metal mine soil. 14th International Symposium on Microbial Ecology (ISME), Copenhagen, Denmark, 19-24/08/2012. (**Poster**).

Avant-propos

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés au **Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM)** à Montpellier, grâce à l'obtention d'une bourse du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

L'encadrement scientifique de cette thèse a été assuré par **Brigitte Brunel**, Professeur à SupAgro, Montpellier et **Jean-Claude Cleyet-Marel,** Directeur de Recherche INRA, Montpellier.

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'ANR APTITUDE (approches pluridisciplinaires d'évaluation des performances adaptatives des bactéries du sol soumises à des stress métalliques), appel à proposition ANR CES 2008.

Adresse du laboratoire d'accueil :

Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM)
Unité Mixte de Recherche (113) CIRAD/IRD/INRA/Université Montpellier 2/Montpellier SupAgro
Campus International de Baillarguet
TA-A82/J - 34398 Montpellier cedex 5
France

Liste des abréviations

Aa	acide aminé ou amino acid
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ADNr	Acide DésoxyriboNucléique Ribosomal
Ag	argent
Al	aluminium
ANR	Agence Nationale de la Recherche
Ap	Ampicilline
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messager
ARNt	Acide RiboNucléique de transfert
As	arsenic
ATP	Adénosine-TriPhosphate
Ba	baryum
BBH	Bidirectional Best Hits
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp (pb)	base pair (paire de base)
C	Cystéine
C-	domaine C-terminal
Ca	calcium
Cd	cadmium
CDF	Cation Diffusion Facilitor
CDS	Coding DNA Sequence
CEFE	Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive
CFU	Colony Forming Unit
CHR	Chromate Ion Transporter family
Chr	chromosome
CITEPA	Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
Co	cobalt
CO_2	dioxyde de carbone
COG	Cluster of Ortholog Groups
Cr	chrome
Cs	césium
Ct	treshold Cycle
Cu	cuivre
D	Aspartate
dNTP	déoxyriboNucléoside TriPhosphate
DTPA	Acide Diéthylène Triamine Penta acétique
E	Efficience
EC	Effective Concentration
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétraacétique
EPS	ExoPolysaccharide de Surface
ETM	Elément Trace Métallique
fCDS	fragmented Coding DNA Sequence
FDR	False Discovery Rate
Fe	fer

Fur	Ferric iron Uptake Regulator
G	Glycine
g	gramme
GFP	Green Fluorescence Protein
Gm	Gentamicine
H	hydrogène
h	heure ou hour
ha	hectar
HAD	HaloAcid Dehalogenase
Hg	mercure
HME-RND	Heavy Metal Efflux Resistance Nodulation and cell-Division
Id, ID	identity
IG	Introdction Générale
IPTG	IsoPropyl β-D-1-ThioGalactopyranoside
INERIS	Institut National de l'Environnement industriel et des rISques
IS	Séquence d'Insertion
K	potassium
K	lysine
kb	kilo-paire de base
kg	kilo-gramme
Km	Kanamycine
L	litre
LB	milieu de culture Luria Bertani
LPS	LipoPolysaccharide de Surface
Lrapmin	minimal lengh of the match with an interest protein
LSTM	Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes
min	minute
MA plots	distribution of the Median (M) plotted by the Average intensity (A)
MaGe	Magnifying Genomes
MBD	Metal Binding Domain
MDR	Multiple Drug Resistance
MEDDTL	Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable, des Transports et du Logement
MerTP	Mercuric ion permease (MerT) and binding (MerP) family
MFP	Membrane Fusion Protein
MFS	Major Facilitor Superfamily
Mg	magnesium
mg	milli-gramme
MIC	Minimum Inhibition Concentration
miscRNA	miscellaneous RNA
MIT	Metal Ion Transporter
ML	Maximum Likelihood (Maximum de vraisemblance)
ml	milli-litre
mM	milli-Molaire
mm	milli-mètre
µl	micro-litre
µM	micro-Molaire
µm	micro-mètre
µg	micro-gramme
Mn	manganèse

Mo	molybdène
N	azote
N	Asparagine
N-	domaine N-terminal
N_2	diazote
Na	sodium
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ND	Non Détecté
ng	nano-gramme
Ni	nickel
NiCoT	Ni^{2+}-Co^{2+} Transporter family
NJ	Neighbor Joining
nm	nano-mètre
Nod	facteur de nodulation
nt	nucleotide
OD, DO	Optical Density
OMF	Outer Membrane Factor
OMR	Outer Membrane Receptor
ORF	Open Reading Frame
P	Proline
padj	*p-value* ajustée
Pb	plomb
pb, bp	paire de base (base pair)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
pH	potentiel d'Hydrogène
Pl	plasmide
ppm	partie pour million
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
R^2	facteur de corrélation
Rb	rubidium
RIN	RNA Integrity Number
RNAseq	séquençage direct d'ARNm
RND	Resistance-Nodulation-Cell Division
rpm	rotation par minute
S	Sérine
s	seconde
Sb	antimoine
SD	Standard Deviation
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Se	sélénium
Sr	strontium
T	Thréonine
Tc	Tétracycline
TI	thallium
Ti	titanium
Tm	Température hybridation des amorces à l'ADN
TM	domaine TransMembranaire
Tn	transposon

TY	milieu de culture Tryptone Yeast extract
U	uranium
U	Unité
UFC	Unité Formant une Colonie
UMR	Unité Mixte de Recherche
V	Volume
V	Vanadium
W	Weight
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
ZIP	Zinc-Iron Permease family
Zn	zinc

Liste des figures et tableaux

- **Liste des figures de l'introduction générale :**

Figure IG-1 : Ancienne mine des Avinières à St-Laurent-le-Miner appartenant au district minier des Malines (date d'exploitation 1872-1914). **23**
Figure IG-2 : Déblais miniers à Petra Alba exploitée au Moyen-Age, revégétalisée naturellement par la poacée *Festuca arvernensis*..... **23**
Figure IG-3 : Répartition des différentes sous-espèces d'*Anthyllis vulneraria* et distinction des écotypes métallicoles (encadré en rouge) et non métallicoles (encadré en bleu) **24**

- **Liste des figures du chapitre I :**

Figure I-1 : Classification périodique des éléments..... **29**
Figure I-2 : Emissions atmosphériques totales en France métropolitaine estimées en tonne pour le Zn (A), Cd (B) et Pb (C) (données CITEPA / format SECTEN-Avril 2011)..... **33**
Figure I-3 : Les différentes stratégies de phytoremédiation utilisées pour dépolluer les environnements contaminés en métaux lourds..... **39**
Figure I-4 : Dialogue moléculaire de la symbiose fixatrice d'azote entre la légumineuse hôte et le rhizobium..... **41**
Figure I-5 : Arbre phylogénétique de 330 séquences du gène *mat*K de légumineuses selon la méthode bayésienne (Wojciechowski *et al.,* 2004)..... **43**
Figure I-6 : Effets des métaux lourds sur les différentes cibles métaboliques chez les deux partenaires de la symbiose légumineuses/rhizobia (Ahmad *et al.,* 2012). **45**
Figure I-7 : Représentation de la P_{IB}-ATPase ZntA (Rensing *et al.,* 2000)..... **49**
Figure I-8 : Modèle du mécanisme des protéines HME-RND (Nies, 2003). **50**
Figure I-9 : Représentation de l'antiport ZitB de type CDF..... **51**
Figure I-10 : Structure des protéines MFS (Bolhuis *et al.,* 1997)..... **51**

- **Liste des figures du chapitre II :**

Figure II-1 : Zn (A) and Cd (B) resistance of *Escherichia coli* XL1-Blue MR strain containing the MPCdR2 cosmid clone and *E. coli* DH10B strain containing the CdE1 plasmid sub-clone. **65**

Figure II-2 : Alignment of *Mesorhizobium metallidurans* STM 2683^T CadA1 Metal Binding Domains (MBDs) with 12 P_{IB}-type ATPases of rhizobia and relative strains, ZntA of *Escherichia coli* and CadA of *Staphylococcus aureus* using ClustalX. **68**

Figure II-3 : Effect of *cad*A1 deletion on Zn and Cd resistance in *M. metallidurans*. **70**

Figure II-4 : Effect of various Zn and Cd concentrations on *cad*A1 transcription using the cadA1 promoter fused to a *gfp* construct (pGT-*cad*A1p). **72**

Figure II-5 : Time-course of the survival of the mutated strain *Mesorhizobium metallidurans* STM 2683^T (Δ*cad*A1), the complemented strain (Δ*cad*A1-*cad*A1), the *M. metallidurans* STM 2683^T wild-type and the sensitive STM 2682 strain in sterilized tailing pond soil over a 15-days period. **73**

Figure II-6 : Plants d'*Anthyllis vulneraria* inoculés avec *Mesorhizobium metallidurans* STM 2683 pNT-*cad*A1p (A) et STM 2683 (B) après 7 semaines de croissance en chambre de culture dans de l'attapulgite et arrosés avec une solution nutritive sans Kanamycine (à gauche) et contenant 12,5 µg.ml^{-1} de Kanamycine (à droite). **102**

Figure II-7 : Plants d'*Anthyllis vulneraria* inoculés avec les souches de *Mesorhizobium metallidurans* (STM 2683 pNT-*cad*A1p, STM 2683 pNT et STM 2683) et non inoculés, après 5 semaines de croissance en hydroponie dans une solution nutritive contenant 12,5 µg.ml^{-1} de Kanamycine, sans ajout de Zn (A) et avec ajout de Zn (B). **103**

Figure II-8 : Cellules infectées d'*Anthyllis vulneraria* visualisées au microscope confocal montrant, (A) une cellule végétale infectée, (B) la forme en bâtonnet des bacteroides et (C) le réseau intercellulaire de bactéries, après coloration au syto 13 des acides nucléiques (en vert) et au calcofluor des parois cellulaires (en bleu). **104**

Figure II-9 : Comparaison des coupes de nodosités d'*Anthyllis vulneraria* avec STM 2683 pGT-*cad*A1p dans la condition avec Zn (A et B) et dans la condition sans Zn (C et D), visualisées sous microscope optique. **105**

Figure II-10 : Comparaison des coupes de nodosités d'*Anthyllis vulneraria* avec STM 2683 pGT-*cad*A1p dans la condition avec Zn (A) et dans la condition sans Zn (B), visualisées au microscope confocal après coloration des parois cellulaires par le calcofluor (en bleu). **105**

Données supplémentaires :

Figure II-S1 : Cd resistance of five *Escherichia coli* XL1-Blue MR cosmid clones containing an insert of *Mesorhizobium metallidurans* STM 2683^T type strain (MPCdR2, BOCdR1, BOCdR4, BOZnR8 and MPZnR7) compared with the insert-free negative control (pCPP47) (white). **86**

Figure II-S2 : Maximum likelihood tree of putative CadA1 of *Mesorhizobium metallidurans* STM 2683^T, showing the phylogenetic relationships of 12 P_{IB}-type ATPases from rhizobia and relative strains, ZntA of *Escherichia coli* and CadA of *Staphylococcus aureus*..... **86**
Figure II-S3 : Cd (A) and Zn (B) resistance of four *Escherichia coli* EC100 clones containing MPCdR2::ΩKm and four complemented clones, compared with the EC100 MPCdR2 wild-type and a negative control (EC100 containing an empty pCPP47). **87**
Figure II-S4 : Relevant features of the *cad*A1 promoter sequence of *Mesorhizobium metallidurans* STM 2683^T. **87**
Figure II-S5 : The mean relative expression of *cad*A1 in STM 2683^T (black bars) or in the Δ*cad*A1 strain (grey bars) grown on various Zn and Cd mixes (A) was calculated from three replicates..... **87**
Figure II-S6 : Expression of STM 2683^T pGT-*cad*A1p compared with STM 2683^T containing an empty pGT (A) and growth of *M. tianshanense* ORS 2740 compared with two *M. metallidurans* STM 2683^T constructions (B) in the presence of water-extracted soil from a tailing pond of the Avinières mine. **88**

- **Liste des figures du chapitre III :**

Figure III-1 : Relative growth of *Mesorhizobium* strains STM 2683, 4661, 2682 and *M. tianshanense* in TY medium complemented with various concentrations of Zinc (A) or Cadmium (B)..... **115**
Figure III-2 : Distributions of the RNAseq datasets using box plot representations including mild and extreme outliers (empty circles and stars, respectively) and whiskers corresponding to + and – 1.5 of the interquartile values (bars). **120**
Figure III-3 : Functional composition of *Mesorhizobium metallidurans* transcriptomes. ... **125**
Figure III-4 : Histograms representing mean read numbers per COG class for STM 2683 (A) and 4661 (B) in the three treatments (Zinc, control and Cadmium). **127**
Figure III-5 : Histograms representing the percentages of CDSs classified by functional COG category for STM 2683 (A) and 4661 (B) in the total set of CDSs (black bars), in the Zinc or Cadmium treatments when compared to the control treatment (respectively light and dark gray bars). **128**
Figure III-6 : Effect of Zinc and Cadmium on the transcriptional activitiy of *znu*C..... **143**
Figure III-7 : Diagramme de Venn réalisé avec les génomes des sept souches de *Mesorhizobium*. **175**

Données supplémentaires :

Figure III-S1 : Qualitative analysis of RNA samples and effect of the rRNA subtractions. **155**

Figure III-S2 : Histogram representing the log10 transformed read count number per CDS for all treatments..... **156**

Figure III-S3 : Histogram representing the log-2 fold changes obtained for all CDSs and all comparisons..... **156**

Figure III-S4 : Scatter plot representations of RNAseq data from STM 2683 (A and C) and 4661 (B and D)..... **157**

Figure III-S5 : MA plot representations of RNAseq data. **158**

Figure III-S6 : Comparison between quantitative PCR and RNAseq data..... **159**

Figure III-S7 : Estimation of the biological variations..... **160**

Figure III-S8 : Global effect of the metal treatment on the regulation of genes as classified by COG functional categories. **161**

- **Liste des figures du chapitre IV :**

Figure IV-1 : Maximum-likelihood phylogenetic trees on *rec*A (A) and *atp*D (B) gene sequences showing the relationships between *A. vulneraria* isolates obtained in this study, and reference strains..... **193**

Figure IV-2 : Maximum-likelihood phylogenetic tree based on *nod*A gene sequences (435 nt) showing the relationships between *A. vulneraria* isolates obtained in this study, and reference strains. **197**

Figure IV-3 : Zn (A) and Cd (B) MIC assays of the 114 *Anthyllis* rhizobia studied, depending on the original sites **220**

Figure IV-4: Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences, showing the relationships between isolates from *Anthyllis vulneraria* and reference strains **223**

Figure IV-5: Maximum-likelihood phylogenetic trees of the *rec*A (A) and *atp*D (B) gene sequences showing the relationships between the *Anthyllis vulneraria* isolates obtained in this study and reference strains **226**

Figure IV-6 : Presence (black bars) or absence (grey bars) of the *cad*A1 gene by PCR amplification in our *Mesorhizobium* isolates and *Aminobacter* strains from *A. vulneraria* nodules isolated from eight soils displaying different degrees of metal pollution..... **228**

Figure IV-7 : Maximum-likelihood phylogenetic tree based on partial CadA1 protein sequences (202 amino acids) showing the relationships between the *Anthyllis vulneraria* isolates obtained in this study and reference strains **228**

Figure IV-8 : Maximum-likelihood phylogenetic tree based on partial *nod*A gene sequences (424 nt) showing the relationships between the *Anthyllis vulneraria* isolates obtained in this study and reference strains... ..... **230**

Données supplémentaires :

Figure IV-S1 : Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences, showing the relationships between isolates from *A. vulneraria* subspecies and reference strains. **205**

Figure IV-S2 : Maximum-likelihood phylogenetic tree based on *dna*K gene sequences (261 nt) showing the relationships between *A. vulneraria* isolates obtained in this study, and reference strains..... **206**

- **Liste des tableaux du chapitre I :**

Tableau I-1 : Les différentes sources de pollution métallique (Lone *et al.,* 2008)..... **32**

Tableau I-2 : Sources naturelles et anthropogéniques des émissions atmosphériques des métaux lourds dans le monde (en millier de tonnes par an) (Clark *et al.,* 2001). **32**

- **Liste des tableaux du chapitre II :**

Table II-1 : Genomic information about the six genes encoding heavy metal P_{IB}-type ATPases sharing at least 30 % identity with *cadA1* in the genome of *Mesorhizobium metallidurans* STM 2683^T..... **74**

Tableau II-2 : Traitements appliqués (Kanamycine et/ou Zn) aux divers plants d'*Anthyllis vulneraria,* inoculés avec ou sans les souches de *Mesorhizobium metallidurans* STM 2683, en hydroponie..... **96**

Tableau II-3 : Mesure des paramètres de nodulation et de fixation de l'azote chez les plants d'*Anthyllis vulneraria* inoculés avec les souches de *Mesorhizobium metallidurans* STM 2683, STM 2683 pNT-*cad*A1p, STM 2683 pNT et non inoculés, après 5 semaines en hydroponie dans une solution nutritive sans Kanamycine et avec 1 mM de Zn (+Zn) ou sans Zn (-Zn). **101**

Données supplémentaires :

Table II-S1 : Strains, plasmids, cosmids and primers used. **89**

Table II-S2 : Comparison of CadA1 from *Mesorhizobium metallidurans* STM 2683^T with 12 P_{IB}-type ATPases of rhizobia and relative strains and three reference strains (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Cupriavidus metallidurans*). **92**

Table II-S3 : Characteristics of the response of STM 2683^T and of the Δ*cadA1* mutant to Zn and Cd and parameters estimated from the best-fitted sigmoidal dose-response curve using a non linear regression analysis..... **93**
Table II-S4 : Chemical contents of the water-soil extract obtained from the tailing pond of the Avinières mine (gram soil per ml water: 1/5). **94**

- **Liste des tableaux du chapitre III :**

Table III-1 : Genome overview after automated annotation in MaGe. **116**
Table III-2 : RNAseq overview **118**
Table III-3 : COG functional assignment of CDSs detected in the genomes of *M. metallidurans* STM 2683^T and *Mesorhizobium* sp. STM 4661..... **123**
Table III-4 : List of putative STM 2683 CDSs with a FDR < 0.1 after DESeq analysis in at least one metal treatment when compared to the control treatment **130**
Table III-5 : List of putative STM 4661 CDSs with a FDR < 0.1 after DESeq analysis in at least one metal treatment when compared to the control treatment. **133**
Tableau III-6 : Caractéristiques des sept génomes des souches de *Mesorhizobium* actuellement séquencés. **174**
Tableau III-7 : Identification des gènes spécifiques aux trois souches de *Mesorhizobium* métallicoles (*M. metallidurans* STM 2683, *M. amorphae* et *Mesorhizobium* sp. STM 4661).**176**
Tableau III-8 : Présence (+) ou absence (-) des 13 gènes identifiés dans les transcriptomes des souches *M. metallidurans* STM 2683 et *Mesorhizobium* sp. STM 4661 (homologues entre les deux souches et significativement induit par le Zn et/ou Cd) au sein des séquences génomes des souches de *Mesorhizobium*. **178**
Tableau III-9 : Nombre de systèmes d'efflux annotés comme transporteurs de métaux lourds chez les génomes des sept souches de *Mesorhizobium* actuellement séquencés et chez *Cupriavidus metallidurans* CH34 pour référence. **179**

Données supplémentaires :

Table III-S1 : Descriptive statistics of the RNAseq Data. **162**
Table III-S2 : Correlation matrix of total read number *per* COG class and mean read number *per* COG class in our transcriptomic datasets. **163**
Table III-S3 : Strains, plasmids and primers used. **164**
Table III-S4 : Primers used for quantitative PCR assays. **165**

- **Liste des tableaux du chapitre IV :**

Table IV-1 : % GC and DNA:DNA hybridization values between four *Aminobacter* strains isolated from *A. vulneraria* and *A. aminovorans* LMG2122^T and *A. lissarensis* CIP 108661^T **194**

Table IV-2 : Differential phenotypic characteristics among *Aminobacter anthyllidis* (STM4645^T, 4640-41, 4643-44, 4646, 4653, 6499), another *Aminobacter* strain isolated from *A. vulneraria* and reference strains. **195**

Table IV-3 : Nodulation and nitrogen fixation parameters (means ± standard deviation (n = 10 plants)) on two *A. vulneraria* subspecies inoculated with *Aminobacter anthyllidis* isolates, reference strains and two nitrogen- or uninoculated controls. **199**

Table IV-4 : Description of the isolates and reference strains used in this study **212**

Table IV-5 : Physico-chemical characteristics of the soils we studied **218**

Table IV-6 : Number of isolates from *Anthyllis* nodules (n=114) belonging to each phylogenetic group defined by 16S rRNA, *rec*A, *atp*D, CadA1 and *nod*A typing **222**

Données supplémentaires :

Table IV-S1 : Chemical characteristics of mine soils used for bacterial isolation with *A. vulneraria.* **207**

Table IV-S2 : Bacterial isolates used in this study, growth characteristic and heavy-metal sensitivity. **207**

Introduction générale

I- Introduction au sujet de thèse :

Les éléments traces métalliques (ETMs) ou plus communément appelés « métaux lourds » sont des composants essentiels de la Terre car ils participent aux cycles biogéochimiques et sont pour certains d'entre eux essentiels au bon fonctionnement de la biosphère. Par définition, un cycle biogéochimique est le processus de circulation cyclique d'un élément chimique entre différents réservoirs (atmosphère, géosphère, hydrosphère et biosphère) grâce à l'intervention de processus biologiques, chimiques et géologiques. Les cycles biogéochimiques font alterner des formes minérales et organiques à travers des processus de biosynthèse et de minéralisation de la matière organique, et des formes oxydées et réduites dans le cadre de processus énergétiques. Ils confèrent alors à la biosphère une certaine stabilité dans la disponibilité des éléments minéraux essentiels à la vie, maintenant ainsi la pérennité des écosystèmes. En l'absence d'activités humaines, les métaux lourds sont relâchés dans l'environnement au rythme de l'érosion ou des activités biologiques (Gadd, 2010). Ce rythme est considérablement perturbé par l'anthropisation avec l'industrialisation, qui mobilise de très grandes quantités d'éléments chimiques en modifiant les flux entre les différents réservoirs, provoquant ainsi un profond déséquilibre des cycles biogéochimiques globaux (Vitousek *et al.,* 1997). Les perturbations des cycles biogéochimiques modifient fortement la dynamique et le fonctionnement des écosystèmes avec des conséquences parfois irréversibles sur la biodiversité et peuvent aller jusqu'à des changements climatiques (Vitousek *et al.,* 1997; Sala *et al.,* 2000). Après l'arrêt des activités minières et la fermeture des sites industriels, la plupart des exploitations minières sont laissées à l'abandon et les déblais fortement chargés en métaux lourds sont alors facilement érodés. Des particules potentiellement toxiques sont transportées sous l'action de l'eau et du vent dans les milieux environnants, modifiant considérablement les activités biologiques (Peplow, 2000). Il est désormais important d'élaborer des stratégies efficaces de gestion des environnements miniers pour limiter les effets délétères des matériaux issus d'anciennes activités industrielles et ainsi mieux prendre en compte les problèmes environnementaux et de santé publique.

II- Contexte général et présentation du modèle d'étude :

Depuis le XIXe et jusqu'à la fin du XXe, la bordure sud du Massif Central a été le siège d'importantes activités d'extraction et d'exploitation de métaux lourds avec en tout premier lieu du zinc (Zn) car ce métal était très demandé de part ces nombreuses et diverses applications dans la vie courante. Le district minier des Malines dans les Cévennes constituait à l'époque la plus importante zone d'exploitation de Zn et de plomb (Pb) en France. Les Cévennes apparaissaient alors comme l'« Eldorado Européen ». Aujourd'hui, ces déblais miniers sont abandonnés depuis plusieurs décennies et représentent des cas exemplaires de pollution élevée en métaux lourds, notamment en Zn, Pb et cadmium (Cd). Une étude épidémiologique réalisée en 2005 par l'Institut National de l'Environnement industriel et des rISques (INERIS) a permis de mettre en évidence des cas cliniques de saturnisme dans le hameau de la Papèterie sur la commune de St-Laurent-le-Minier (Gard). Le saturnisme est une pathologie grave due à une intoxication au Pb entraînant des effets irréversibles notamment sur le système nerveux chez l'enfant (Needleman, 2004). Sur ces sites miniers très fortement contaminés en métaux lourds et déficients en éléments fertilisants comme l'azote, le Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM) et le Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (CEFE) sont impliqués dans des recherches visant à développer des stratégies de revégétalisation. Ces statégies s'appuient sur l'utilisation des espèces végétales locales pour recréer une couverture végétale afin de limiter la dispersion par voies aériennes ou hydriques des particules métalliques. L'objectif est donc d'accélérer le processus de revégétalisation des sites miniers abandonnés depuis plusieurs décennies, actuellement peu couverts par la végétation et donc soumis à une forte érosion (Figure IG-1). Pour développer une stratégie de revégétalisation, il est important d'avoir une bonne connaissance de l'adaptabilité aux conditions environnementales extrêmes des espèces végétales natives du site ainsi que de leurs partenaires microbiens avec qui elles ont la capacité d'améliorer la qualité du milieu édaphique pour permettre l'installation d'une couverture végétale dense et durable. Il a été observé sur le site minier de Petra Alba situé dans le district des Malines et datant du Moyen-Age, une végétalisation naturelle par la poacée *Festuca arvernensis* (Figure IG-2). Par ailleurs, des travaux récents ont mis en évidence que la population d'*Anthyllis vulneraria* présente sur le site des Avinières (St-Laurent-le-Minier) était associée à une nouvelle espèce bactérienne appartenant au genre *Mesorhizobium*, nommée *M. metallidurans* (Vidal *et al.,* 2009). Il a été démontré à plusieurs reprises que cette bactérie a un rôle crucial

dans cette symbiose car elle apporte à la plante l'azote nécessaire à son développement ce qui lui permet d'enrichir le sol en azote et de favoriser l'installation d'autres espèces végétales présentes sur le site pour recréer une couverture végétale stable et durable (Frérot *et al.,* 2006).



Figure IG-1 : Ancienne mine des Avinières à St-Laurent-le-Miner appartenant au district minier des Malines (date d'exploitation 1872-1914).



Figure IG-2 : Déblais miniers à Petra Alba exploitée au Moyen-Age, revégétalisée naturellement par la poacée *Festuca arvernensis*.

C'est dans ce contexte d'étude que mon travail de thèse s'inscrit. *M. metallidurans* ayant un rôle primordial pour la croissance d'*Anthyllis* et la réussite de l'installation d'un couvert végétal sur des sols contaminés en métaux lourds, il est important d'avoir une bonne connaissance de l'adaptabilité aux métaux lourds de cette bactérie, afin de pourvoir l'utiliser efficacement avec le partenaire végétal dans des stratégies de revégétalisation. Mon travail de thèse vise donc à déterminer les fonctions clés de l'adaptation de Mesorhizobia métallicoles dans des milieux fortement contaminés en Zn, Pb et Cd.

A. vulneraria appartient à la sous-famille des Papilionoideae, clade des Eurosidés 1 et tribu des Lotoidés (Markmann *et al.,* 2008). Elle a une aire de répartition très large (Europe, Asie Occidentale et Afrique Septentrionale), elle est polymorphe, bisannuelle et comprend une trentaine de sous-espèces (www.tela-botanica.org). Trois sous-espèces ont été identifiées sur le pourtour cévenol ainsi qu'en Allemagne (Figure IG-3): (i) la **sous-espèce *carpatica,*** native du site minier des Avinières et du site minier de Breinic en Allemagne, (ii) la **sous-espèce *boscii,*** native du site minier d'Eylie dans les Pyrénées ariégeoises et (iii) la **sous-espèce *praepropera*** native des sites non métallicoles du Col du Vent et de La Prunarède. Les sous-espèces *carpatica* et *boscii* sont des **écotypes** potentiellement **métallicoles** (tolérants aux métaux lourds) alors que la sous-espèce *praeopera* est un **écotype non métallicole** (non tolérant aux métaux lourds) (Mahieu *et al.,* sous presse). De plus, les travaux menés au laboratoire ont montré que la sous-espèce *carpatica* était une plante accumulatrice du Zn, car elle accumule moins de 1 % de Zn par rapport aux plantes hyperaccumulatrices (Baker, 1981) et accumule quasiment autant de Zn dans les parties aériennes que dans les parties racinaires (Soussou *et al.,* soumis) contrairement aux plantes hyperaccumulatrices qui accumulent beaucoup plus de métaux dans les parties aériennes que dans les parties racinaires.

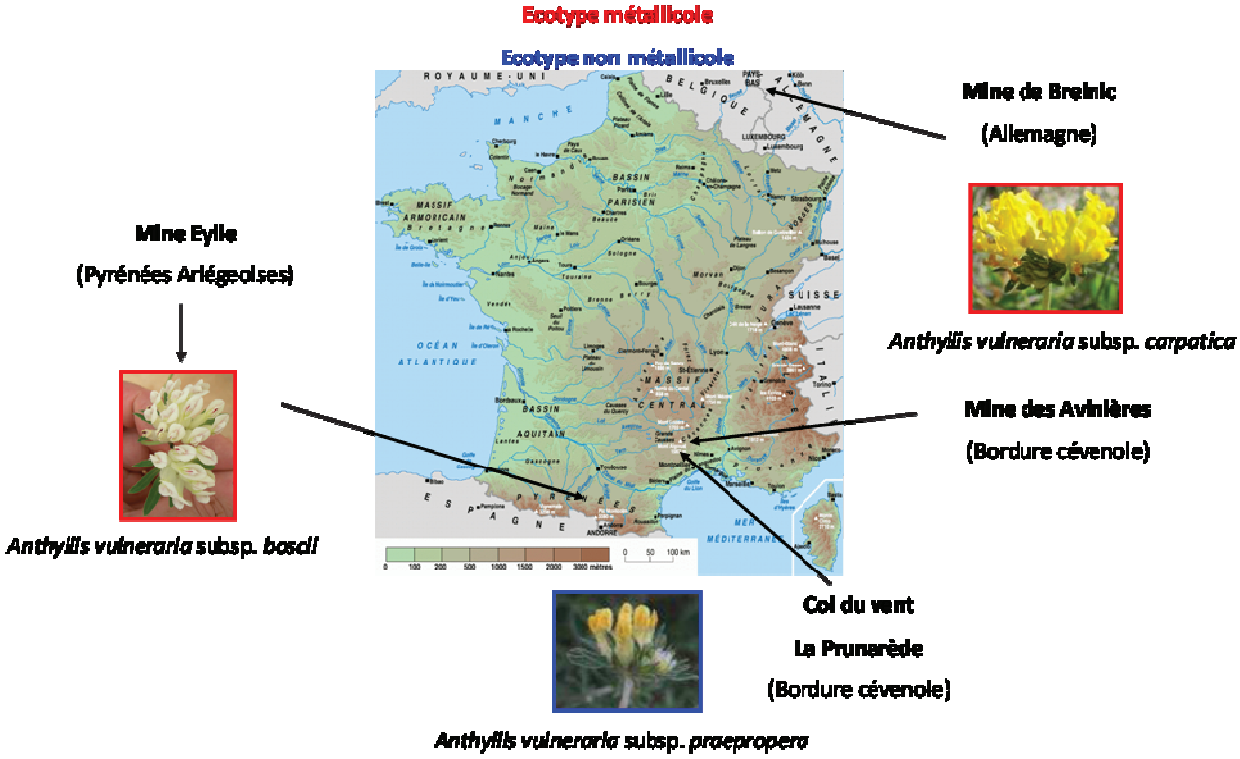


Figure IG-3 : Répartition des différentes sous-espèces d'***Anthyllis vulneraria*** et distinction des écotypes métallicoles (encadré en rouge) et non métallicoles (encadré en bleu).

M. metallidurans est une bactérie fixatrice d'azote décrite phylogénétiquement proche de *M. tianshanense* et isolée des nodosités d'*A. vulneraria* subsp. *carpatica*, provenant du site minier des Avinières à St-Laurent-le-Minier dans les Cévennes. Outre ses capacités symbiotiques, elle a la particularité de tolérer de fortes concentrations en Zn et en Cd (Vidal *et al.,* 2009). Les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMIs) mesurées en milieu de culture Yeast Extract Manitol (YEM) sont de 16-32 mM de Zn et 0.3-0.5 mM de Cd pour *M. metallidurans* contrairement à *M. tianshanense* (CMI de 0.05 mM de Zn et Cd en YEM). Actuellement 23 espèces de *Mesorhizobium* sont décrites comme symbiotes fixateurs d'azote (*M. albiziae, M. alhagi, M. amorphae, M. australicum, M. camelthorni, M. caraganea, M. chacoense, M. ciceri, M. gobiense, M. huakuii, M. loti, M. mediterraneum, M., metallidurans, M. opportunistum, M. plurifarium, M. robiniae, M. septentrionale, M. shangrilense, M. silamurunense, M. tarimense, M. temperatum, M. thiogangeticum et M. tianshanense,* d'après www.bacterio.cict.fr/m/mesorhizobium.html, actualisé à septembre 2012). Une seule espèce, *M. thiogangeticum,* est non symbiotique. Diverses publications rapportent le fait que les bactéries appartenant au genre *Mesorhizobium* sont capables de s'adapter à des conditions environnementales extrêmes : salinité, pH, température, intrants chimiques, métaux lourds (Zahran, 1999; Vidal *et al.,* 2009; Laranjo and Oliveira, 2010). Au sein du genre *Mesorhizobium*, les gènes accessoires comme les gènes symbiotiques sont portés majoritairement sur le chromosome au sein d'îlots génomiques et non sur des plasmides symbiotiques comme c'est le cas chez la plupart des bactéries appartenant aux genres *Rhizobium* ou *Ensifer* (Galibert *et al.,* 2001; Sullivan *et al.,* 2002; Gonzalez *et al.,* 2003). Par ailleurs, le transfert d'îlot symbiotique de *Mesorhizobium* symbiotiques vers des *Mesorhizobium* non symbiotiques a été mis en évidence et décrit chez *M. loti* (Sullivan *et al.,* 1995) et chez des souches de *Mesorhizobium* isolées de la légumineuse *Biserrula pelecinus* (Nandasena *et al.,* 2006). Peu de rhizobia ont été décrits dans la tolérance aux métaux. *M. metallidurans* représente alors un nouveau modèle pour étudier l'adaptation aux métaux lourds car c'est une bactérie fixatrice d'azote en symbiose avec les légumineuses et tolérante à de trés fortes concentrations en Zn et en Cd.

III- Objectifs de la thèse :

Ce projet de thèse est centré sur l'étude des bactéries métallicoles en interaction avec le partenaire végétal. Les objectifs sont donc de mieux connaître *M. metallidurans* en :

(1) analysant les mécanismes d'adaptation aux métaux lourds. Deux approches ont été mises en oeuvre : ***(a) une approche de génétique moléculaire*** qui consiste en un criblage fonctionnel d'une banque cosmidique de la souche type de *M. metallidurans* (STM 2683^T) transformée dans un hôte hétérologue *Escherichia coli*, sur milieu riche additionné de Zn ou de Cd et ***(b) une approche de transcriptomie basée sur la méthode RNaseq*** qui consiste en un séquençage partiel des transcrits de la souche STM 2683^T et d'une autre souche métallicole de *Mesorhizobium* sp. (STM 4661) provenant du site minier Eylie (Pyrénées ariégeoises), suite à une exposition modérée au Zn ou au Cd,

(2) étudiant la diversité et la répartition des rhizobia métallicoles isolées des nodosités d'*A. vulneraria* provenant de différents sites miniers, modérément contaminés ou non contaminés en métaux lourds, en utilisant des analyses phénotypiques de tolérance au Zn et au Cd et des analyses phylogénétiques sur des marqueurs moléculaires (chromosomiques, symbiotiques et de résistance aux métaux lourds).

IV- Plan de la thèse :

Ce manuscrit de thèse se compose de cinq chapitres :

- Le **chapitre I** correspond à une **synthèse bibliographique** qui porte sur (i) l'origine et l'impact des métaux lourds sur l'environnement ainsi que sur les solutions développées pour faire face à la pollution engendrée, (ii) l'intérêt de l'utilisation de la symbiose fixatrice d'azote légumineuses/rhizobia dans des stratégies de revégétalisation des sites pollués et (iii) la réponse des bactéries au stress métallique.

- Le **chapitre II** s'intitule « **Caractérisation et description du gène *cad*A1 codant pour une P_{IB}-ATPase impliquée dans la résistance au Zn et au Cd chez *Mesorhizobium metallidurans*** ». Il comprend : (i) la caractérisation fonctionnelle d'un système d'efflux de type P_{IB}-ATPase (CadA1) impliqué dans la résistance au Zn et au Cd chez *M. metallidurans*, mis en évidence par une approche de génétique

moléculaire suite au criblage fonctionnel d'une banque cosmidique de la souche type de *M. metallidurans* sur milieu de culture additionné de Zn ou de Cd et (ii) une étude de l'expression du gène *cad*A1 dans les nodosités d'*Anthyllis* soumises à un stress Zn par des approches microscopiques.

- Le **chapitre III** s'intitule « **Réponse transcriptionnelle au stress métallique (Zn/Cd) et analyse génomique de *Mesorhizobium* métallicoles isolés de sites miniers** ». Il comprend : (i) la comparaison des transcriptomes suite à un stress métallique et des génomes de deux souches de *Mesorhizobium* métallicoles phylogénétiquement proches et isolées de nodosités d'*A. vulneraria* sur des sites géographiquement distincts (*M. metallidurans* STM 2683^T provenant de la mine des Avinières (Cévennes) et *Mesorhizobium* sp. STM 4661 de la mine d'Eylie (Pyrénées ariégeoises)) et (ii) une analyse de génomique comparative avec cinq autres génomes de *Mesorhizobium* métallicoles et non métallicoles, disponibles dans les bases de données.

- Le **chapitre IV** s'intitule « **Diversité génétique et répartition des symbiotes d'*Anthyllis vulneraria* sur sols miniers Zn/Cd et sur sols non contaminés** ». Il comprend : (i) la description d'une nouvelle espèce d'*Aminobacter* capable de noduler *A. vulneraria* sur sols miniers, à l'aide d'hybridations ADN-ADN, de la détermination du phénotype de tolérance au Zn et au Cd (CMI) et de l'analyse génétique de marqueurs moléculaires (le gène de l'ARNr 16S, *rec*A, *atp*D et *dna*K) et symbiotiques (gène de nodulation *nod*A) et (ii) l'analyse de la diversité et de la répartition des symbiotes métallicoles d'*A. vulneraria* en comparaison avec des symbiotes non métallicoles, provenant de divers sites miniers et non contaminés, avec la détermination de la CMI en Zn et en Cd et l'analyse génétique de marqueurs moléculaires, symbiotiques et de résistance aux métaux lourds (*cad*A1).

Les **chapitres II, III et IV** comportent chacun une présentation du travail, le ou les article(s) scientifique(s) publiés ou en préparation (en anglais), les travaux complémentaires pour les chapitres II et III et une synthèse de la discussion.

- Le **chapitre V** correspond à une **discussion générale** de l'ensemble des résultats obtenus dans mon travail de thèse et aux **perspectives** qui en découlent.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

I-1- Les métaux lourds dans l'environnement :

I-1-1- Définition des métaux lourds :

Le terme de **« métaux lourds »** reste aujourd'hui mal défini par la communauté scientifique car il comprend certains métaux non particulièrement lourds (< 5 000 kg m^{-3}, par exemple l'Al qui a une masse volumique de 2 700 kg m^{-3}) et d'autres éléments non métalliques comme le Se ou appartenant au groupe des métalloïdes comme l'As (Figure I-1). Les métaux lourds sont présents dans tous les compartiments de l'environnement mais généralement en faible quantité (< 1 %) ou à l'état de trace, d'où le terme d' « Eléments Traces Métalliques (ETMs) » aussi employé à la place de « métaux lourds ». J'emploierai au cours de ma thèse, le terme de « métaux lourds » afin de désigner des éléments métalliques, non métalliques ou métalloïdes ayant une masse volumique supérieure à 5 000 kg m^{-3}. Cette appellation sans fondement scientifique, ni application juridique reste cependant courante d'après le rapport d'information au Sénat français N° 261 datant du 5 avril 2001. Le tableau périodique des éléments compte 46 éléments répondant à l'appellation « métaux lourds » ou « ETM » (Figure I-1). La majorité des métaux lourds tels que le Zn, Cu, Mn, Co, Ni, Fe, Se sont essentiels à la vie sous forme d'oligoéléments, mais peuvent s'avérer toxiques à de fortes concentrations. D'autres métaux lourds tels que le Cd, Pb, Hg sont exclusivement toxiques car, même en faibles quantités, ils n'ont aucun rôle biologique connu.

Au cours de ma thèse, je m'appuierai principalement sur des exemples biologiques en relation principalement avec le Zn, Cd et Pb puisque mon travail de thèse se rapporte à l'étude de bactéries isolées d'anciens sites miniers contaminés en Zn, Cd et Pb.

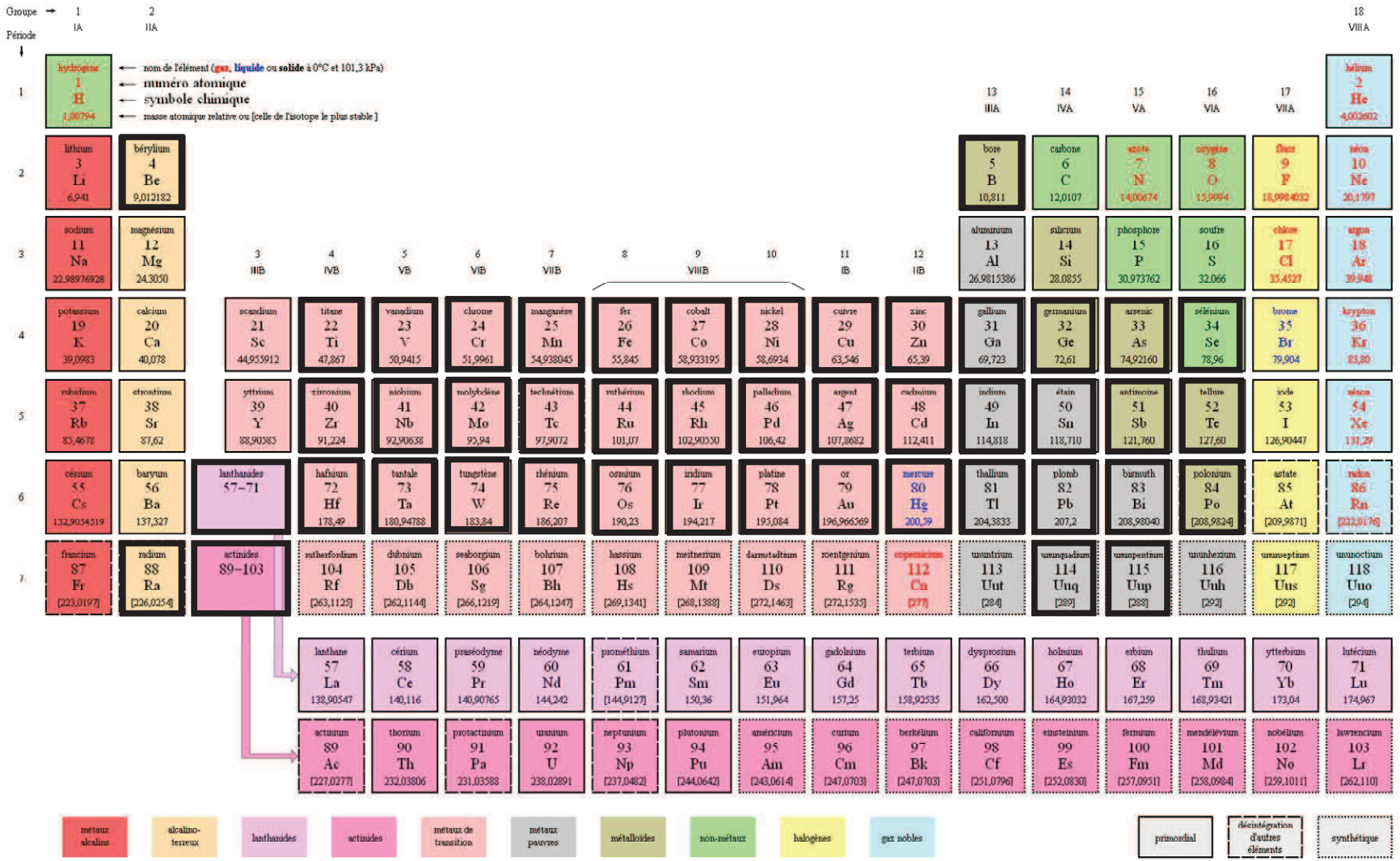


Figure I-1 : Classification périodique des éléments. Les éléments répondant à la définition de « métaux lourds » (masse volumique > 5000 kg m^{-3}) sont encadrés.

I-1-2- Nutrition minérale des plantes :

Les plantes ont besoin d'assimiler des éléments nutritifs nécessaires pour leur développement, leur croissance et leur reproduction. Les éléments nutritifs se composent à la fois de macroéléments (> 0,1 % de matière sèche) tels que l'azote, le potassium ou le phosphore et de microéléments ou oligoéléments (< 0,1 % de matière sèche) tels que le fer, le zinc ou le cuivre. Ces derniers participent aux activités enzymatiques, à la synthèse des protéines, à la régulation de la pression osmotique et au maintien de la balance ionique. Gad (2006) a démontré que l'application de 8 ppm de Co dans le sol permettait d'augmenter la croissance végétale et de favoriser la nodulation et la nutrition chez la légumineuse *Pisum sativum* L. lorsqu'elle est en association symbiotique avec des rhizobia. En effet le Co est un élément de la cobalamine (vitamine B12) requis pour le fonctionnement d'enzymes impliquées dans la fixation d'azote chez les rhizobia (Gad, 2006). Hanson *et al.* (2003) ont démontré que le Se protégeait *Brassica juncea* contre l'herbivorie et contre les infections fongiques grâce à l'émission de diméthylsélénide, correspondant à la forme volatile du Se, qui est toxique pour ces nuisibles. Une carence en ces oligoéléments pourrait entraîner des effets néfastes sur la production végétale. Par exemple, le Zn est un élément essentiel à la croissance et au développement végétal. Il intervient dans l'activation de nombreuses enzymes (Coleman, 1992), dans la synthèse des protéines et des acides nucléiques et dans le métabolisme des lipides (Marschner, 1993). Au niveau mondial, la carence en Zn apparait comme la plus répendue au sein des plantes cultivées, ce qui entraîne de lourdes pertes de rendement agricole notamment dans les zones céréalières (Graham *et al.,* 1992). La carence en Zn entraîne de nombreux troubles physiologiques tels que la mortalité des semis, le retard de croissance et de floraison, la chlorose et la réduction des feuilles (Broadley *et al.,* 2007). Dans un sol contaminé en métaux lourds, la concentration en métaux excède généralement la quantité requise pour les organismes en tant qu'oligoéléments. Les métaux lourds sont alors plus accumulés dans les plantes et par conséquence, ils sont beaucoup plus présents dans la chaîne alimentaire.

I-1-3- Les sources de pollution métallique :

Les métaux lourds se retrouvent dans l'environnement à travers de processus naturels tels que les émissions dues aux éruptions volcaniques ou à l'érosion et l'altération des roches et à travers de processus anthropiques tels l'exploitation minière, le traitement de déchets (Tableau I-1). L'exploitation et l'utilisation des métaux lourds existent depuis la préhistoire, les Hommes s'en servaient comme pigments naturels pour réaliser des fresques murales. A l'époque gréco-romaine, le Cu était utilisé sous forme d'alliage pour fabriquer divers ustensiles et des armes. Des traces d'exploitations minières de Cu ont été mises en évidence dans les glaces du Groenland (Hong *et al.,* 1996). A cette même époque, la pollution atmosphérique liée à ces exploitations a pu être mise en évidence et elle était 10 fois supérieure à celle connue après la révolution industrielle, en raison essentiellement de l'utilisation de techniques très polluantes (Hong *et al.,* 1996). Au cours de l'ère industrielle, l'exploitation des sites miniers s'est intensifiée avec l'utilisation de nouvelles techniques d'exploitation des métaux lourds. La révolution industrielle et l'utilisation de nouvelles techniques a permis une diminution de la pollution atmosphérique mais l'intensification de l'exploitation des gisements a généré une forte accumulation de déblais miniers (Nriagu, 1996). Le rejet des métaux lourds dans l'environnement n'est pas seulement dû à l'industrie métallurgique mais aussi aux épandages sur les sols agricoles ou des boues résiduelles de stations d'épuration, à l'émission de gaz d'échappement, à l'incinération de déchets, au déversement des eaux usées, à l'utilisation de pesticides ou de fongicides (Lone et al., 2008; Wuana and Okieimen, 2011) (Tableau I-1). Par rapport à l'émission naturelle des métaux lourds dans l'atmosphère, les sources anthropiques émettent trois fois plus de Zn, six fois plus de Cd et 28 fois plus de Pb (Tableau I-2) (Clark, 2001).

Tableau I-1 : Les différentes sources de pollution métallique (Lone *et al.,* 2008).

Heavy metals	Sources
As	Semiconductors, petroleum refining, wood preservatives, animal feed additives, coal power plants, herbicides, volcanoes, mining and smelting (Nriagu, 1994)
Cu	Electroplating industry, smelting and refining, mining, biosolids (Liu *et al.,* 2005)
Cd	Geogenic sources (Baize, 1997), anthropogenic activities (Nriagu and Pacyna, 1988), metal smelting and refining, fossil fuel burning, application of phosphate fertilizers, sewage sludge (Kabata-Pendias, 2001)
Cr	Electroplating industry, sludge, solid waste, tanneries (Knox, 1999)
Pb	Mining and smelting of metalliferous ores, burning of leaded gasoline, municipal sewage, industrial wastes enriched in Pb, paints (Gisbert *et al.,* 2003)
Hg	Volcano eruptions, forest fire, emissions from industries producing caustic soda, coal, peat and wood burning (Lindqvist *et al.,* 1991)
Se	Coal mining, oil refining, combustion of fossil fuels, glass manufacturing industry, chemical synthesis (*e. g.*, varnish, pigment formulation)
Ni	Volcanic eruption, land fill, forest fire, bubble bursting and gas exchange in ocean, weathering of soils and geological materials (Knox, 1999)
Zn	Electroplating industry, smelting and refining, mining, biosolids (Liu *et al.,* 2005)

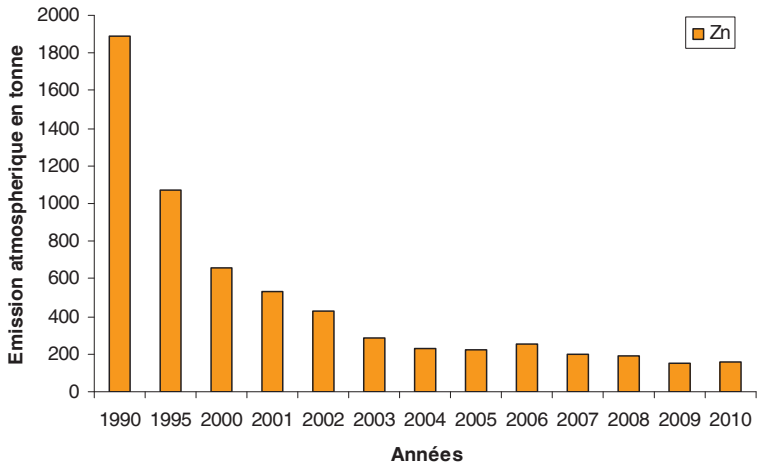
Tableau I-2 : Sources naturelles et anthropogéniques des émissions atmosphériques des métaux lourds dans le monde (en millier de tonnes par an) (Clark *et al.,* 2001).

Metal	Natural sources	Anthropogenic sources
Arsenic	12	18
Cadmium	1.3	7.6
Copper	28	35
Lead	12	332
Nickel	30	56
Zinc	45	132

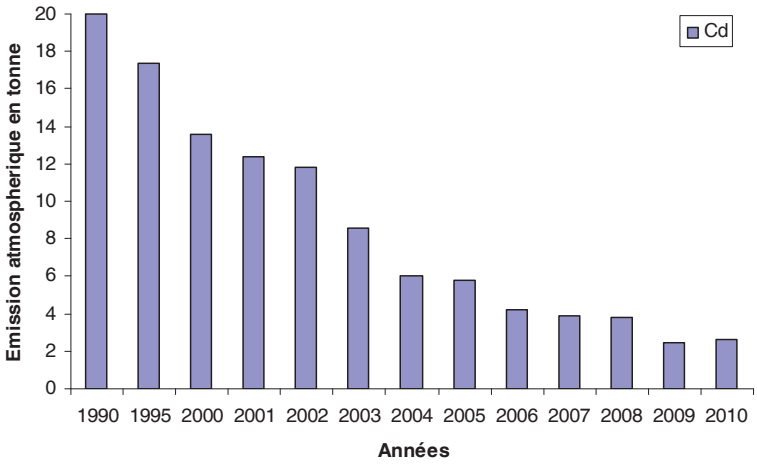
Aujourd'hui en France, les émissions de métaux lourds dans l'atmosphère se sont stabilisées pour le Cu et Se et ont baissé d'au moins 60 % depuis 1990 pour les autres éléments (Zn, Cd, Hg, Pb, As, Cr, Ni) (données CITEPA / format SECTEN-Avril 2011) (Figure I-2) : ceci est dû principalement aux efforts des entreprises pour réduire leurs rejets et leurs déchets. Bien que la pollution atmosphérique soit en baisse depuis 1990, la base de données Basol (Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable, des Transports et du Logement (MEDDTL)) recensant les sites et sols pollués (ou potentiellement pollués) et appelant une action des pouvoirs publics, à titre préventif ou curatif, recense aujourd'hui environ quatre fois plus de sites pollués qu'il y a 15 ans (autour de 4 138 sites recensés en 2

011 contre 1 023 sites en 1996) et pour lesquels l'Etat a entrepris une action de dépollution (d'après MEDDTL, Basol au 16 novembre 2011).

A



B



C

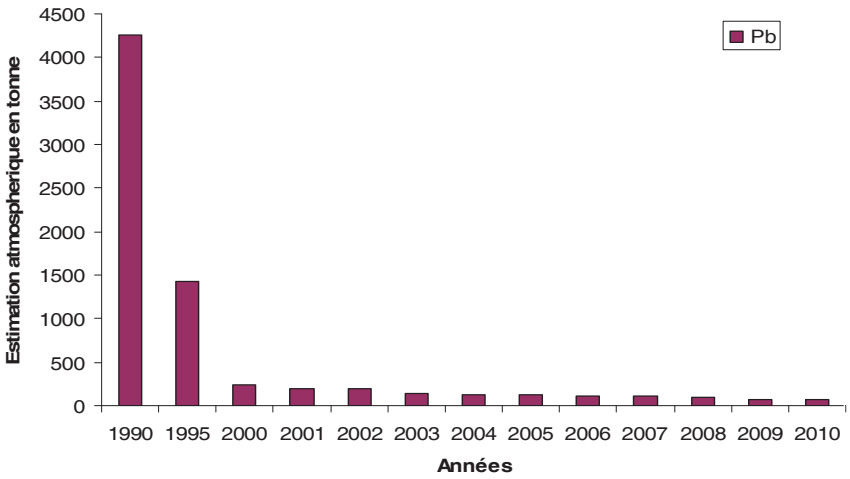


Figure I-2 : Emissions atmosphériques totales en France métropolitaine estimées en tonne pour le Zn (A), Cd (B) et Pb (C) (données CITEPA / format SECTEN-Avril 2011). Pour l'année 2010, la valeur d'émission est une estimation préliminaire.

I-1-4- Les impacts de la pollution métallique sur la santé et l'environnement :

Contrairement aux contaminants organiques, les métaux lourds générés par les activités anthropiques ne peuvent pas être dégradés biologiquement et persistent indéfiniment dans l'environnement. De plus, les environnements pollués tels que les sites miniers sont généralement soumis à de fortes contraintes topographiques, climatiques et hydriques, érodant fortement les déchets et induisant une pollution pour les eaux et les sols environnants. Les sols miniers sont pauvres en matière organique et en minéraux fertilisants comme l'azote empêchant alors le développement d'une couverture végétale pouvant faire office de barrière à la dispersion des métaux lourds. De ce fait, la non-gestion des sites miniers pose un problème environnemental conduisant à de graves dégâts écologiques. Les métaux lourds présents dans l'environnement peuvent s'accumuler dans la chaîne alimentaire et créer des problèmes de santé publique. Les métaux lourds causent divers effets néfastes sur la santé humaine en atteignant toutes les fonctions biologiques bien qu'il n'y ait pas de symptômes spécifiques et détectables face à une intoxication métallique. A terme, les métaux lourds présents dans les organismes dérèglent les fonctions cellulaires notamment à cause de l'intéraction des charges positives des cations métalliques avec les charges négatives des acides aminés des protéines et des enzymes et sont responsables de cancers (Duruibe, 2007; Kampa and Castanas, 2008). Parmi les maladies les plus graves dues à une intoxication métallique, le saturnisme correspond à une intoxication au Pb comprenant une plombémie supérieure à 100 µg L^{-1} de Pb dans le sang qui entraîne des effets graves et irréversibles sur l'organisme notamment des retards mentaux chez l'enfant (Needleman, 2004). Le Pb se substitue à d'autres métaux essentiels tels que le Ca, Fe et Zn et donc perturbe la production de protéines et de molécules impliquant ces trois métaux. Par exemple, le Pb inhibe la synthèse d'enzymes vitales telles que la ferrochélatase participant à la formation de l'hème de l'hémoglobine et donc interfère dans le transport de l'oxygène par le sang. Au niveau écologique, une accumulation excessive de métaux lourds dans un milieu réduit l'activité et la diversité microbienne (Smejkalová *et al.,* 2003 ; Nwuche *et al.,* 2008 ; Giller *et al.,* 2009 ; Stan *et al.,* 2011), la fixation biologique de l'azote, la nodulation (Chaudhary et *al.,* 2004 ; Stan *et al.,* 2011) et la fertilité des sols (McGrath *et al.,*1995).

I-1-5- Le problème de la toxicité des métaux lourds :

Les métaux lourds ont tous un potentiel toxique qui dépend principalement de leur concentration dans le milieu considéré et de leur biodisponibilité, c'est-à-dire de leur fraction soluble et accessible par les organismes.

A l'état de trace dans l'organisme, certains métaux lourds sont des oligoéléments indispensables à la vie et jouent un rôle clé dans les processus biologiques. Sous forme de catalyseurs dans les réactions biochimiques, ils stabilisent la structure des protéines et des membranes cellulaires et servent à maintenir la balance osmotique (Andreini *et al.,* 2008). D'autres métaux lourds, tels que le Cd, Pb et Hg, ne possèdent pas de fonctions biologiques aujourd'hui connues pour être essentielles à la vie cellulaire. De trop fortes concentrations en métaux lourds même essentiels sont toxiques pour les organismes vivants. En effet les cations métalliques chargés positivement peuvent interagir avec les protéines et les enzymes chargées négativement. Les effets de trop fortes concentrations en métaux lourds sont très divers sur les cellules : altération de la structure ADN et membranes cellulaires, altération des fonctions enzymatiques et dérèglement des fonctions cellulaires, perturbation des fonctions métaboliques, remplacement d'ions métalliques essentiels, favorisation du stress oxydatif (Bruins *et al.,* 2000; Nies, 2003).

La biodisponibilité en métaux lourds définit leur aptitude à être transférés d'un compartiment vers un autre. Plus l'espèce métallique est libre et mobile, plus elle est biodisponible et plus il y a un risque de toxicité sur les organismes vivants. La biodisponibilité dépend de la spéciation du métal (différentes formes chimiques d'un élément métallique) ainsi que des conditions physico-chimiques de l'environnement où se trouve le métal considéré (pH, teneur en phosphate disponible, teneur en matière organique, activités biologiques). En effet, les métaux lourds existent soit sous forme élémentaire soit sous forme dérivée. Etant chargés positivement, ils sont alors susceptibles d'interagir avec n'importe quels éléments chargés négativement pour former des dérivés inorganiques (sel, sulfure, oxyde) ou organiques (avec liaison carbone). L'acidification du sol favorise la mobilité des métaux lourds notamment par la mise en solution de sels métalliques ou la destruction de la phase de rétention. Inversement, l'augmentation du pH provoque l'immobilisation par la formation de composés insolubles. La plupart des plantes excrètent par leur racine des acides afin de favoriser l'absorption d'élément nutritifs et du coup solubilisent aussi d'autres éléments pas forcement nécessaires à la plante. Ainsi, l'acidification de la rhizosphère de *Thlaspi caerulescens* faciliterait la capture

par la plante des métaux lourds devenus plus disponibles suite à la baisse du pH (Delorme *et al.,* 2001). A l'inverse, des sols carbonatés, argileux ou riches en matière organique globalement chargés négativement ont tendance à retenir les cations métalliques et donc les rendre moins disponibles (Pardo *et al.,* 2011). Les activités biologiques de certains organismes peuvent aussi influencer la disponibilité des métaux lourds présents dans le sol. Certaines activités métaboliques microbiennes influencent aussi la mobilité des métaux lourds par solubilisation, insolubilisation ou volatilisation (Misra, 1992; Gadd, 2010). Le Cd est très rare sous sa forme naturelle, il peut être retrouvé sous forme de sulfure de Cd (CdS) ou de carbonate ($CdCO_3$) et plus souvent associé au Zn, Cu et Pb sous forme de sulfure. Le Cd est beaucoup plus mobile que le Zn et particulièrement autour de pH 4,5-5,5 et il ne l'est plus au dessus de pH 7,5. Sa forme divalente est soluble mais peut se complexer avec des formes organiques et oxydées. Le Zn est sous forme divalente et peu mobile à des pH acides (4.5-5.5) alors qu'à des pH plus forts (6.5-7.5), le Zn est plus disponible grâce à la solubilisation de ses formes minérales et organiques (Mulligan *et al.,* 2001).

I-1-6- Les méthodes de gestion des environnements contaminés :

Il est important d'élaborer des méthodes de gestion des environnements contaminés en métaux lourds afin de limiter la pollution engendrée car leurs accumulations et leurs transferts constituent un risque pour la santé humaine *via* la contamination de la chaîne alimentaire, mais aussi pour le milieu naturel dans son ensemble.

Il existe trois principales méthodes de dépollution : (i) la **dépollution physique** telle que l'excavation, l'incinération, le traitement thermique (Mulligan *et al.,* 2001; Wuana and Okieimen, 2011), (ii) la **dépollution chimique**, telle que la précipitation, la neutralisation, l'encapsulation, l'oxydation-réduction (Mulligan *et al.,* 2001; Wuana and Okieimen, 2011), (iii) la **dépollution biologique** qui consiste à utiliser les microorganismes pour modifier la spéciation des métaux (bioremediation) (Carrasco *et al.,* 2005; Prasad *et al.,* 2010) ou à utiliser les plantes pour accumuler les métaux de milieux contaminés ou limiter leur mobilité (phytoremédiation) (Lone *et al.,* 2008 ; Prasard *et al.,* 2010).

Je focaliserai ma synthèse bibliographique sur la dépollution biologique de type phytoremédiation. La **phytoremédiation** destinée aux métaux lourds est subdivisée en quatre stratégies (Figure I-3) :

(a) La **phytoextraction** est une technique qui utilise des plantes hyperaccumulatrices de métaux lourds (Brooks, 1998) : ce sont des plantes capables d'accumuler 10 000 mg kg^{-1} de poids sec pour le Zn, 1 000 mg kg^{-1} pour le Co, Cu, Pb, 100 mg kg^{-1} pour le Cd, 1 000 mg kg^{-1} pour le Ni, afin de concentrer les contaminants du sol dans les tissus végétaux (Chaney *et al.,* 2007; Barzanti *et al.,* 2011). La récolte des plantes permet une récupération des métaux lourds à intérêt économique (Bani *et al.,* 2007). Cependant, son utilisation est restreinte à des sols modérément contaminés et son extraction est limitée à la surface du sol (profondeur des racines) et à la fraction disponible par les végétaux. De plus, les plantes hyperaccumulatrices ont une croissance lente et produisent peu de biomasse. Elles sont adaptées à des environnements particuliers et sont peu compétitives par rapport aux autres plantes, dès que la concentration en métaux lourds est en dessous d'un certain seuil. Il y a aujourd'hui environ une centaine de taxons identifiés comme capables d'accumuler des métaux lourds appartenant au moins à 100 familles de plantes. Parmi ces plantes, l'une des plus connues est *Thlaspi caerulescens*, largement étudiée par la communauté scientifique car elle est capable d'accumuler de fortes quantités en Zn et en Cd dans les parties aériennes sans symptômes de toxicité (30 000 ppm de Zn, 14 000 ppm de Cd, mesures de poids sec) (Escarré *et al.,* 2000; Epelde *et al.,* 2010).

(b) La **phytostabilisation** est une technique qui utilise des plantes tolérantes aux métaux lourds en association avec des microorganismes pour limiter la diffusion des particules métalliques par voies aériennes ou hydriques (Dary *et al.,* 2010). Les plantes utilisées accumulent très peu de métaux lourds dans les parties aériennes afin de limiter le transfert dans la chaîne alimentaire (Gosh *et al.,* 2005). Le principal désavantage de cette technique est que les métaux lourds restent dans le sol, ils ne sont pas enlevés. En effet, cette technique n'a pas pour but d'enlever les métaux lourds dans le sol mais seulement de les contenir. Cette technique est par contre efficace pour des sites très contaminés tels que les sites miniers où la méthode de phytoextraction est peu efficace. Les travaux de Frérot *et al.* (2006) sur la phytostabilisation d'anciens déblais miniers riches en Zn, Cd et Pb dans la région méditerranéenne ont montré *in situ* que la combinaison d'écotypes métallicoles de plantes natives de la région permettait d'améliorer et de régénérer de façon durable et significative la fertilité du sol en l'enrichissant en minéraux fertilisants et plus particulièrement en azote.

(c) La **phytovolatilisation** est une technique qui utilise des plantes pour absorber les contaminants afin de les transformer en composés volatiles moins toxiques qui seront libérés dans l'atmosphère *via* les feuilles. Les travaux menés sur des environnements contaminés en Se (de Souza *et al.,* 1999; Lin *et al.*, 1999), As (Henry, 2000; Sakakibara *et al.,* 2010) et en Hg (Rugh *et al.,* 1996; Bizily *et al.,* 1999) démontrent le processus de volatilisation de ces métaux lourds en composés moins toxiques. *Brassica juncea* associée avec des bactéries de la rhizosphère est capable d'accumuler de fortes concentrations en Se et de le volatiliser en diméthylselenide, 500-700 fois moins toxique que le sélénite ou séléniate. La plante hyperaccumulatrice d'As *Pteris vittata* est capable de produire des exsudats racinaires pour solubiliser l'As présent dans le sol, de le transférer dans ses parties aériennes et de le réduire en arséniate (63 %) et arsénite (37 %) dans ses feuilles qui pourront donner des formes volatiles. La plante *Arabidopsis thaliana* a été génétiquement modifiée pour exprimer le gène bactérien *mer*A codant pour l'enzyme mercure réductase, capable de convertir l'ion Hg(2+) en H(0) qui est moins toxique et volatile (Rugh *et al.,* 1996).

(d) La **rhizofiltration** est une technique qui utilise les racines des plantes pour absorber, concentrer ou précipiter les contaminants de l'eau. Cette technique est surtout utilisée pour des sources à faibles teneurs en métaux lourds, dans le cas des drainages d'acides miniers ou de rejets industriels (Ghosh and Singh, 2005). Les travaux de Dushenkov *et al.* (1995) ont montré que *B. juncea* était capable d'accumuler au niveau racinaire, 131-563 fois plus de métaux lourds tels que Cu^{2+}, Cd^{2+}, Cr^{6+}, Ni^{2+}, Pb^{2+} et Zn^{2+} provenant de solutions aqueuses.

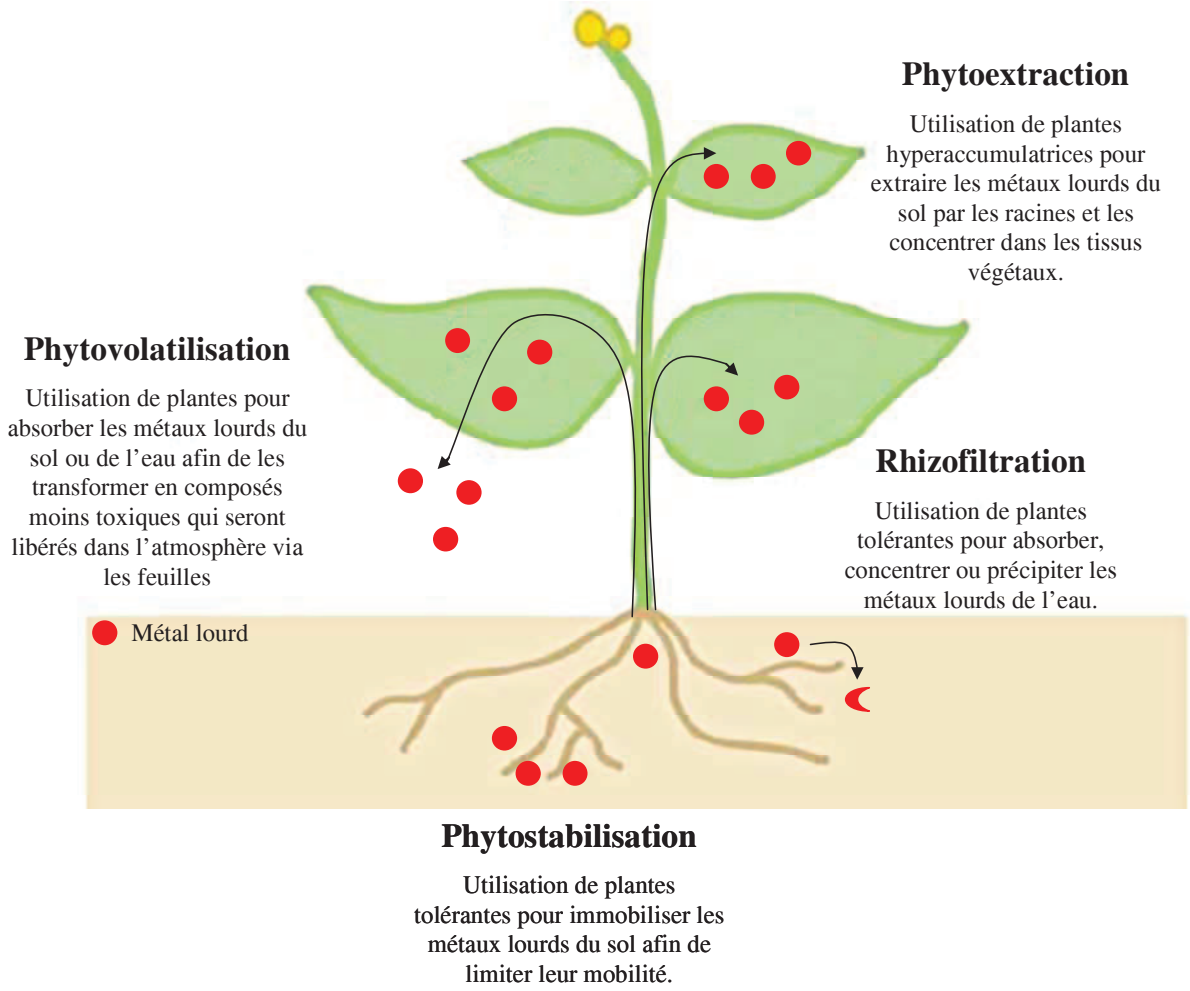


Figure I-3 : Les différentes stratégies de phytoremédiation utilisées pour dépolluer les environnements contaminés en métaux lourds.

L'utilisation de techniques physico-chimiques apparait aujourd'hui moins appropriée car elles coutent chères, ne sont pas complètement efficaces et surtout détruisent la structure du sol et sa fertilité. Les techniques biologiques utilisant soit les microorganismes soit les végétaux apparaissent plus écologiques, moins coûteuses mais les effets sont plus longs dans le temps. De plus, les plantes utilisées en phytoremédiation, associées ou non avec des microorganismes accumulent seulement la fraction disponible des métaux lourds.

I-2- Utilisation de la symbiose fixatrice d'azote légumineuses/rhizobia dans des stratégies de phytostabilisation :

L'azote est un facteur limitant majeur dans la production agricole car c'est un élément nutritif indispensable pour les plantes, assimilable sous forme de nitrate ou d'ammonium provenant de la décomposition de la matière organique azotée dans le sol. En condition de carence azotée, comme c'est le cas dans les sols miniers contaminés en métaux lourds et à faibles teneurs en matière organique, les plantes associent à des bactéries du sol capables de fixer l'azote atmosphérique (réserve importante avec 80 % de N_2), et de le réduire sous une forme combinée assimilable, leurs permettant ainsi de couvrir en grande partie leurs besoins en azote.

Il existe deux grands types de symbiose fixatrice d'azote : (i) la **symbiose actinorhizienne** impliquant des bactéries filamenteuses du genre *Frankia* avec des plantes ligneuses (symbiose impliquée dans plus de 220 espèces de plantes actinorhiziennes, (Wall, 2000)) et (ii) la **symbiose légumineuses/rhizobia** impliquant des bactéries appelées « rhizobia » concernant près de 8 322 espèces de légumineuses sur 9 253 étudiées (estimation selon http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/index.pl?language=fr, actualisé au 30 Aout 2012). Je focaliserai ma synthèse bibliographique sur cette dernière symbiose.

I-2-1- Généralités sur la symbiose fixatrice d'azote légumineuses/rhizobia :

Les symbioses fixatrices d'azote fixent au niveau mondial, environ 110 millions de tonnes d'azote par an, soit un niveau inférieur à la production d'azote issue de l'industrie (autour de 160 millions de tonnes par an) (Gruber and Galloway, 2008). On estime que la fixation symbiotique légumineuses/rhizobia peut produire entre 200-300 kg d'azote ha^{-1} an^{-1} (Peoples *et al.,* 1995) alors que certaines bactéries fixatrices libres du genre *Azotobacter* et *Clostridium* en produisent environ 100 fois moins.

La fixation biologique de l'azote met en jeu un dialogue moléculaire complexe (Figure I-4) entre les deux partenaires permettant leur reconnaissance mutuelle et aboutissant à la formation d'organes particuliers situés sur les racines ou sur les tiges appelés les nodosités. La plante fournit ainsi à la bactérie une niche protectrice et les sucres issus de sa photosynthèse et

en échange, les bactéries fournissent à la plante les substances azotées synthétisées à partir de l'azote atmosphérique. Ce sont les facteurs Nod (dérivé de lipo-chito-oligo-saccharide) synthétisés par les rhizobia et codés par des gènes *nod* qui sont reconnus par des kinases végétales qui vont déclencher une succession d'événements aboutissant à la formation de la nodosité. Il a été récemment décrit que certaines symbioses fixatrices d'azote étaient Nod-indépendantes. C'est le cas de l'interaction entre la légumineuse tropicale aquatique du genre *Aeschynomene* et des souches de *Bradyrhizobium* photosynthétiques qui ne fait pas intervenir la synthèse de facteurs Nod (Giraud *et al.,* 2007).

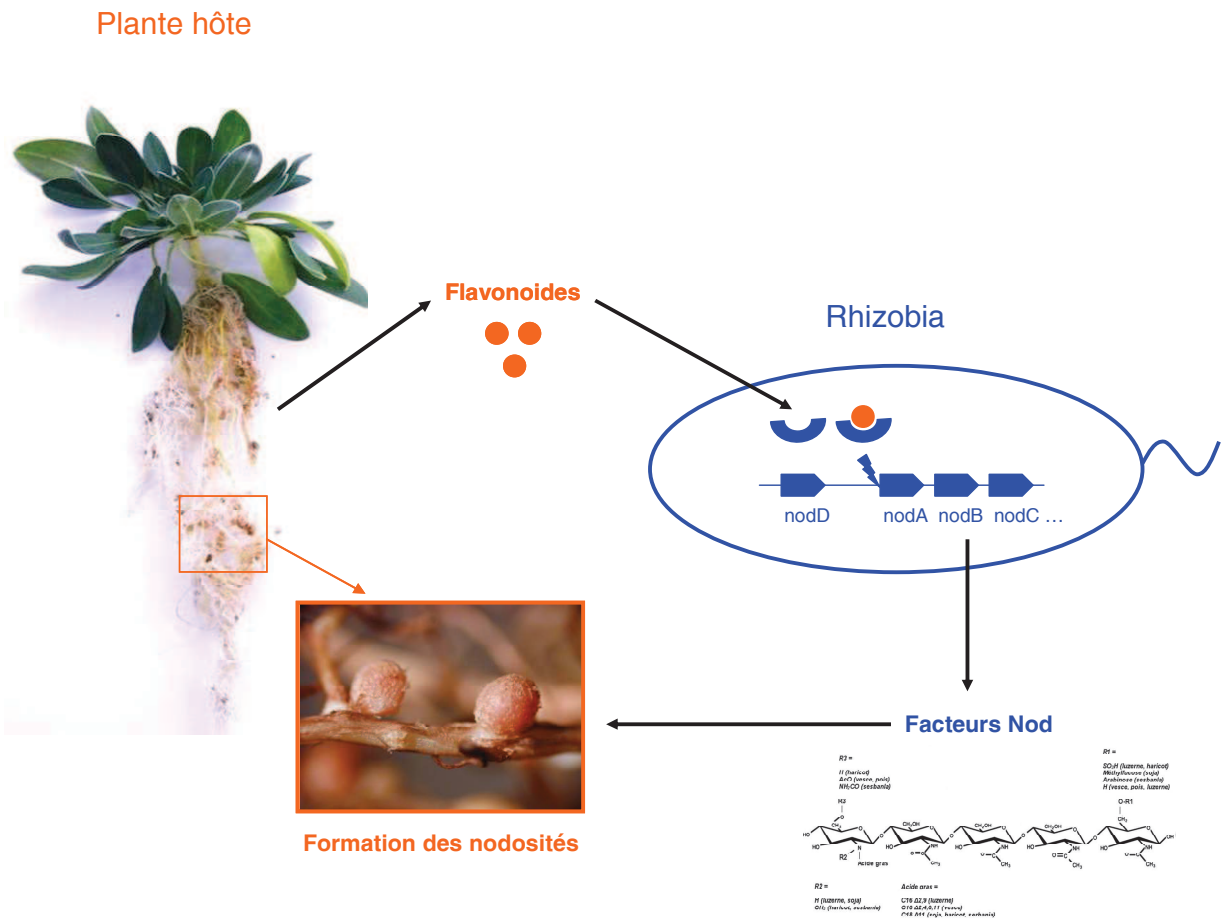


Figure I-4 : Dialogue moléculaire de la symbiose fixatrice d'azote entre la légumineuse hôte et le rhizobium.

La famille des **Légumineuses** est la troisième grande famille des Angiospermes appartenant au clade des Eurosidées I qui contient environ 730 genres et plus de 19 400 espèces. Elle est divisée en trois sous-familles (Figure I-5) : (1) la sous-famille des Caesalpinioideae comprenant 2 300 espèces réparties en 171 genres et 4 tribus, (2) la sous-famille des Mimosoideae comprenant environ 3 300 espèces réparties en 77 genres et 5 tribus et (3) la sous-famille des Papilionoideae comprenant 13 800 espèces réparties en 478 genres

et 28 tribus (Sprent, 2007). La sous-famille des Papilionoideae est à ce jour celle qui comprend le plus d'espèces aptes à établir des symbioses (97 %) contre 90 % pour la sous-famille des Mimosoideae et 5 % pour celle des Caesalpinioideae respectivement (Doyle and Luckow, 2003). Beaucoup de légumineuses sont cultivées pour leurs intérêts agronomiques (engrais verts pour maintenir la fertilité des sols), alimentaires (sources de protéines végétales pour l'alimentation animale ou humaine), écologiques (utilisation en revégétalisation pour des sols dégradés), médicinales (production de purgatifs ou laxatifs), forestiers (utilisation de certains bois recherchés par les ébénistes, extraction de colorants pour l'industrie). Les légumineuses sont très diversifiées en termes de morphologies (d'herbes à de grands arbres) et d'habitats (des régions tempérées aux tropiques). Malgré les 19 400 espèces de légumineuses décrites à ce jour, seule une faible proportion a été étudiée pour leur capacité à entrer en symbiose avec des rhizobia.

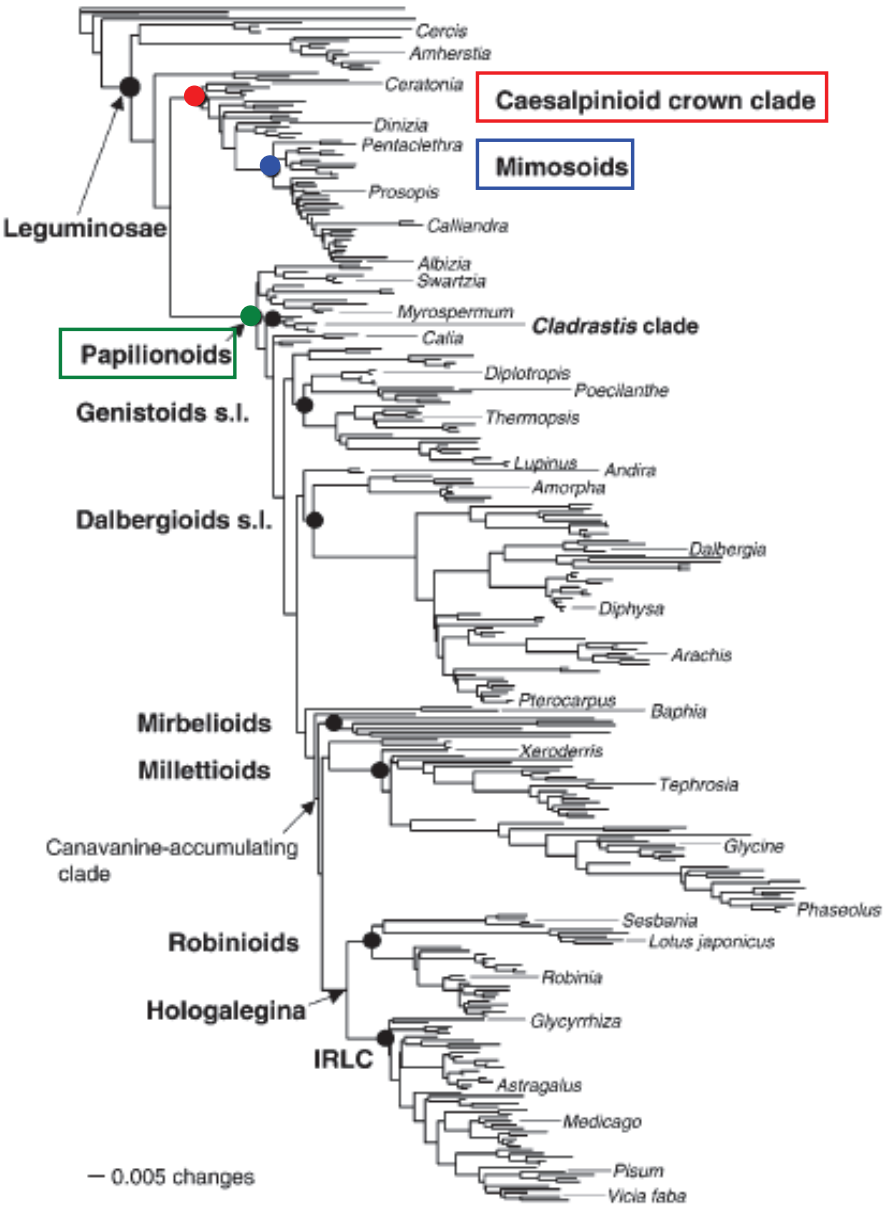


Figure I-5 : Arbre phylogénétique de 330 séquences du gène *mat*K de légumineuses selon la méthode bayésienne (Wojciechowski *et al.,* 2004).

D'après la base de données « **Rhizobia** » de Weir (2012) (www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html, mise à jour en avril 2012), on compte 98 espèces de rhizobia réparties dans 13 genres bactériens : *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer*, *Bradyrhizobium*, *Microvirga*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Devosia*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Shinella*, appartenant à la classe α-proteobacteries et les genres *Burkholderia* et *Cupriavidus* appartenant à la classe β-proteobacteries (Moulin *et al.,* 2001). Dans mon travail de thèse, nous avons identifié un autre genre bactérien, le genre *Aminobacter* de la classe des α-proteobacteries, inconnu jusqu'ici pour ses capacités de

nodulation (Maynaud *et al.,* 2012). La nodulation au sein de la sous-famille des Caesalpinoideae est rare contrairement à la sous-famille des Papilionoideae qui est majoritairement nodulée par des rhizobia appartenant à la classe des α-Protéobactéries. Récemment la sous-famille des Mimosoideae a attiré l'attention car les rhizobia isolés des nodosités appartiennent à la classe des β-Protéobactéries (Franche *et al.,* 2009).

I-2-2- Impact des métaux lourds sur la symbiose légumineuses/rhizobia :

Divers facteurs environnementaux tels que la salinité, la sécheresse, l'acidité, l'alcalinité, les métaux lourds et les hydrocarbures, les températures extrêmes, des déficits en nutriments ont des effets néfastes à tous les stades menant à l'établissement de la symbiose ; depuis l'infection à la fixation de l'azote en passant par la formation des nodosités et la croissance des rhizobia et de la plante (Figure I-6) (Zahran, 1999).

Le Cd par exemple est l'un des métaux lourds qui même à de faible dose est très toxique pour les organismes vivants. Son effet sur la symbiose et sur le développement des deux partenaires est bien documenté (Pereira *et al.,* 2006; Younis, 2007). Au sein de la population de *Rhizobium* isolée des nodosités de *Trifolium pratense* L., le Cd affecte la diversité, la croissance et l'activité microbienne ce qui est directement corrélé avec la diminution du nombre de nodosités présentes sur les racines (Stan *et al.,* 2011). Au sein des légumineuses, diverses publications font état des effets néfastes du Cd sur la croissance, la photosynthèse, la nutrition, la fixation d'azote chez le haricot et le soja (Azmat *et al.,* 2006; Sheirdil *et al.,* 2012). Chez le soja, le Cd induit la sénescence des nodosités, réduit le nombre de nodosités et indirectement, induit aussi un stress oxydatif qui réduit la synthèse de protéines (leghémoglobine) et de carbohydrates dans la nodosité (Balestrasse *et al.,* 2004). Bien que le Zn soit un oligoélément indispensable à la vie, à de trop fortes concentrations il affecte significativement la survie et le nombre de rhizobia (Broos *et al.,* 2005). Dans le cas de la symbiose *Rhizobium/Acacia auriculaeformis*, la formation des nodosités est inhibée de 50 % par de fortes teneurs en Zn et la fixation d'azote diminue avec l'augmentation de la concentration en Zn (Zhang *et al.,* 1998).

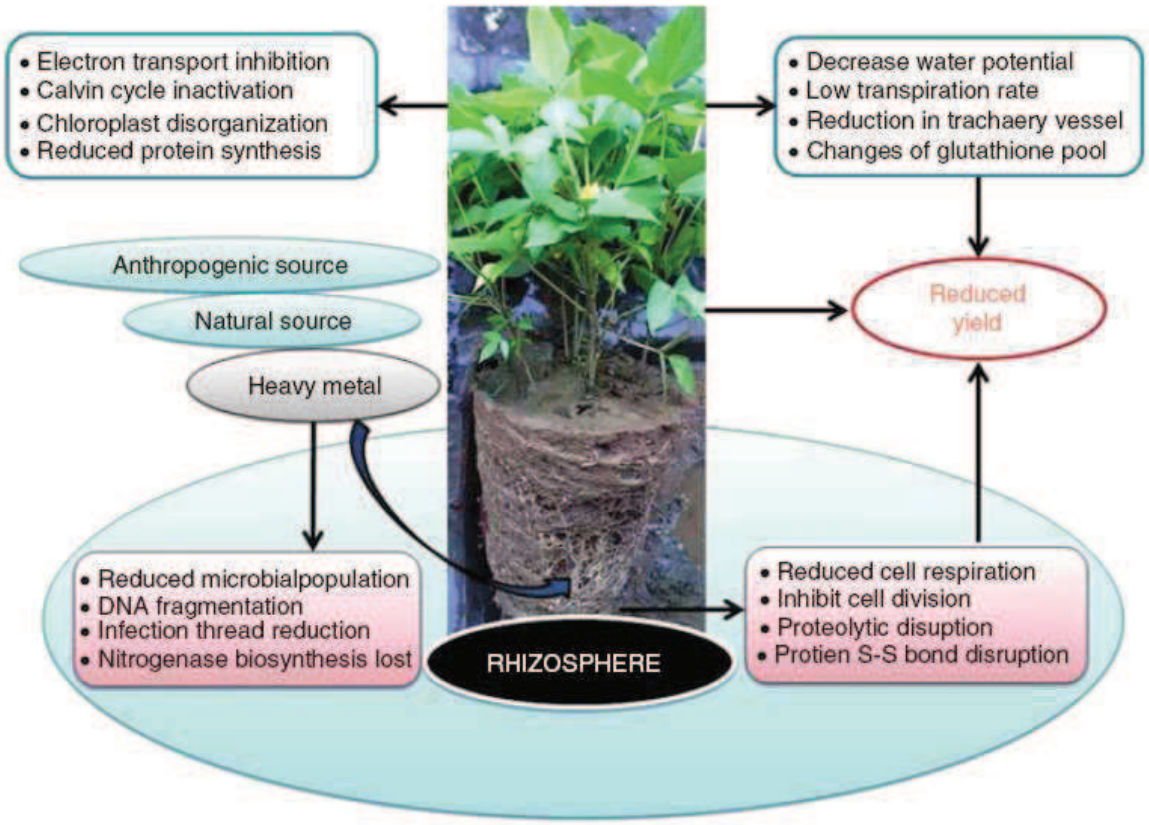


Figure I-6 : Effets des métaux lourds sur les différentes cibles métaboliques chez les deux partenaires de la symbiose légumineuses/rhizobia (Ahmad *et al.,* 2012).

I-2-3- Exemples de symbioses fixatrices d'azote utilisées dans des stratégies de revégétalisation :

La symbiose fixatrice d'azote peut être utilisée pour accroitre la fertilité des sols en particulier pour des sols carencés en éléments nutritifs mais aussi pour restaurer des écosystèmes perturbés ou contaminés par des composés toxiques tels que les métaux lourds. Deux exemples de travaux récents montrent l'efficacité de la symbiose fixatrice d'azote pour revégétaliser des sites pollués en métaux lourds et particulièrement en Zn et en Cd.

Dary *et al.* (2010) ont évalué le potentiel de la légumineuse *Lupinus luteus* inoculée avec une souche de *Bradyrhizobium* et un consortium de bactéries rhizosphériques qualifiées de PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) pour revégétaliser un site modérément contaminé en métaux lourds (As, Cd, Zn, Cu et Pb) après déversement de boues contaminées provenant de la mine d'Aznalcóllar en Espagne en 1998. Les auteurs ont montré que la légumineuse était bien adaptée aux quantités modérées en métaux lourds présents sur le site, avec une accumulation principalement dans les racines sauf pour le Cu, Cd et Pb qui sont

majoritairement accumulés dans les parties aériennes. L'inoculation avec la souche de *Bradyrhizobium* résistante aux métaux lourds a induit une augmentation de 29 % de la biomasse végétale et de 3,9 % l'azote incorporé. L'inoculation avec un consortium de PGPR a lui aussi un effet bénéfique sur la biomasse végétale (augmentation de 109 %) et entraîne une baisse de l'accumulation de métaux par la plante, limitant alors leur intégration dans la chaîne alimentaire.

Mahieu *et al.* (2011) ont également démontré l'efficacité de la symbiose fixatrice d'azote entre la légumineuse *Anthyllis vulneraria* et *Mesorhizobium metallidurans* provenant d'un site minier cévenol fortement contaminé en Zn, Pb et Cd. Les résultats ont montré que *M. metallidurans* était bien adaptée aux conditions environnementales extrêmes et que la la légumineuse associée à la bactérie était capable de fixer 80 % de l'azote atmosphérique. Frérot *et al.* (2006) avaient auparavant mis en évidence que la combinaison d'*A. vulneraria* avec d'autres espèces végétales, notamment *Festuca arvernensis* et *Koeleria vallesiana*, permettait d'augmenter significativement la biomasse de ces espèces.

I-3- Réponse des bactéries au stress métallique :

I-3-1- Mécanismes d'adaptation aux métaux lourds :

Les organismes vivants ont développé des mécanismes d'adaptation aux métaux lourds pour contrebalancer l'effet toxique de certains d'entres eux ou de trop fortes concentrations tout en maintenant le rôle biologique et essentiel d'autres éléments métalliques. Les organismes utilisent divers mécanismes d'adaptation pour protéger leurs composants cellulaires des effets néfastes des métaux. Il existe principalement quatre mécanismes d'adaptation aux Zn, Cd et Pb ; les microorganismes possèdent en général une combinaison de ces mécanismes :

(a) **Immobilisation des métaux lourds sur la paroi bactérienne par la production d'exopolysaccharides de surface (EPS)** : les EPS sont des polymères constitués de plusieurs oses, excrétés dans le milieu et capables d'absorber les métaux lourds présents dans l'environnement. La production des EPS et leur capacité à séquestrer des ions métalliques ont été rapportées chez certaines souches de *Burkholderia* isolées de champs de rizières pollués, pour la réduction de la biodisponibilité du Cd (Zhang and Min, 2010), chez des souches de

Pseudomonas isolées d'une mine d'Ur, dans le cas de la multi-résistance aux métaux (Choudhary and Sar, 2009) et chez des souches d'*Azospirillum brasilense* pour la résistance au Zn (Gowri and Srivastava, 1996).

(b) **Séquestration intracellulaire des métaux lourds par la production de diverses protéines chélatantes** : les métallothionéines de type SmtA sont des protéines intracellulaires riches en cystéine, décrites chez *Synechococcus* PCC 7942 et elles ont été identifiées comme capable de séquestrer des cations de Zn et de Cd (Klaassen *et al.,* 1999; Blindauer *et al.,* 2002). D'autres métallothionéines bactériennes de type BmtA, ont été décrites chez *Anabanea* PCC 7120, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida* et *E. coli* et sont capables de lier de multiples ions Zn (Blindaueur *et al.,* 2002). Chez *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Bradyrhizobium* sp. et *Saccharomyces cerevisiae,* la production de glutathion, un tripeptide contenant un groupement thiol qui produit en général lors d'un stress oxydatif a été mis en évidence dans la détoxification de cations métalliques tels que le Cd et le Ni (Murata *et al.,* 1981; Figueira *et al.,* 2005; Bianucci *et al.,* 2010). Les réponses transcriptomiques d'*E. coli* lors d'un stress Zn ou Cd met en évidence l'induction de gènes impliqués dans la biosynthèse de cystéines pouvant séquestrer l'excès de métal (Wang and Crowley, 2005; Yamamoto, 2005). Chez *E. coli*, la production de métallochaperones qui sont d'autres protéines riches en cystéine, ont été décrites pour la séquestration d'ions Zn dans le périplasme (Blencowe and Morby, 2003).

(c) **Séquestration extracellulaire des métaux lourds par la précipitation de formes insolubles** : *Cupriavidus* sp. et *Klebsiella aerogenes* sont capables de détoxifier le Cd en excrétant des sulfures pour limiter l'influx de Cd dans la cellule (Aiking *et al.,* 1982; McEntee *et al.,* 1986). Des souches de *Citrobacter* utilisent les phosphates pour précipiter le Cd à l'extérieur de la cellule pour éviter son entrée (Macaskie *et al.,* 2000). Chez la souche *C. metallidurans* CH34 isolée d'un environnement industriel, les auteurs ont montrés que suite à de fortes concentrations en métaux, l'opéron *czc* impliqué dans l'efflux de cations métalliques à l'extérieur de la cellule est induit. Cette induction est ensuite suivie par un processus de bioprécipitation des métaux sous forme de bicarbonates ou d'hydroxydes permettant d'empêcher la ré-entrée des cations exportés (Diels *et al.,* 1995).

(d) **Transports actifs des métaux lourds par des pompes d'efflux** telles que les P_{IB}-ATPases, les complexes protéiques de type HME-RND (Heavy Metal Efflux Resistance

Nodulation and cell-Division), les protéines de la famille CDF (Cation Diffusion Facilitor) et celles de la famille MFS (Major Facilitor Superfamily). Ces différents systèmes d'efflux sont décris plus précisément dans la partie I-3-2.

On peut aussi classer ces différents mécanismes d'adaptation aux métaux lourds en deux catégories : (i) les **mécanismes de tolérance** qui sont définis comme des mécanismes passifs énergie-indépendants intervenant dans une première défense contre les métaux lourds et efficaces lors d'un faible stress : modification de la perméabilité membranaire, séquestration intra- et extracellulaires des métaux lourds et (ii) les **mécanismes de résistance** qui sont définis comme des systèmes d'efflux énergie-dépendants localisés dans l'épaisseur de la membrane cytoplasmique qui préservent l'équilibre physico-chimique du milieu intracellulaire en s'opposant à l'accumulation des ions toxiques par leur reconnaissance, leur fixation et leur transport. Ces mécanismes interviennent lors d'un fort stress métallique.

I-3-2- Mécanismes d'adaptation aux métaux lourds : l'exemple des transporteurs d'efflux des métaux lourds

Les transporteurs actifs des métaux lourds correspondent aux diverses pompes d'efflux et existent en quatre principaux systèmes d'efflux :

(a) Les **P_{IB}-ATPases** (autres noms : CPX-ATPases ou HM-ATPases) sont des transporteurs de cations métalliques à travers la membrane cellulaire contre leur gradient en utilisant l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie. Les P_{IB}-ATPases font partie donc de la grande famille des transporteurs ATPases de type P dont le « P » fait référence à la formation d'un intermédiaire aspartate phosphorylé. Axelsen et Palmgreen (1998) sous-classent cette grande famille en quatre sous-groupes selon leur spécificité vis à vis des métaux : (1) P_{IB-1} comprend les P-ATPases transportant le Cu^+/Ag^+ telles que CopA d'*E. coli* (Gonzalez-Guerrero and Arguello, 2008), (2) P_{IB-2} comprend les P-ATPases transportant $Zn^{2+}/Cd^{2+}/Pb^{2+}$ telles que ZntA d'*E. coli* (Figure I-7) (Rensing *et al.,* 1997), CadA de *Staphylococcus aureus* (Nucifora *et al.,* 1989), (3) P_{IB-3} comprend les P-ATPases transportant $Cu^+/Ag^+/Cu^{2+}$ telles que CopB d'*Enterococcus hirae* (Bissig *et al.,* 2001), (4) P_{IB-4} comprend les P-ATPases transportant Co^{2+} telles que CoaT de *Synechocystis sp.* (Rutherford *et al.,* 1999). Outre les sites de phosphorylation, de phosphatase et de fixation de l'ATP, le type IB se distingue des autres types de P-ATPase par la présence de motifs en N- ou C-terminal de la

protéine ou au sein de domaines transmembranaires (TMs) liés à la reconnaissance, au transport et à la régulation des cations, appelés « Metal Binding Domain (MBDs) ». Toutes les P_{IB}-ATPases possèdent un motif riche en cystéine dont la séquence en acides aminés est de type CPX (Cystéine, Proline et X = C, Histidine ou Serine) ou SPC, TPC et présentent entre TM6-7 une large boucle cytoplasmique (Argüello, 2003).

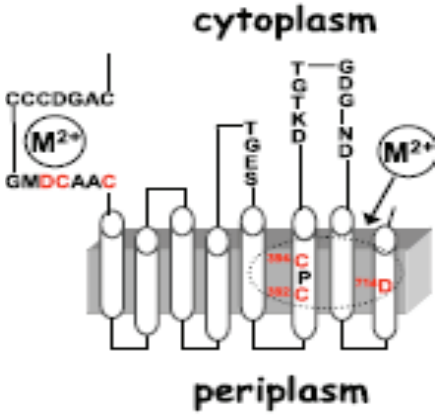


Figure I-7 : Représentation de la P_{IB}-ATPase ZntA (Rensing *et al.,* 1997).
Légende : M^{2+} représente les sites de fixation du Zn, localisés sur l'extrémité N-terminale et sur les TM6-8.

(b) Les **protéines transmembranaires de type HME-RND** (Heavy Metal Efflux Resistance Nodulation and cell-Division) sont de gros complexes protéiques appartenant à la famille des protéines RND d'abord décrites dans le transport de substrats impliqués dans la résistance aux métaux lourds (*C. metallidurans*), la nodulation (*M. loti*) et la division cellulaire (*E. coli*) (Nies, 2003). Les HME-RND se composent de trois protéines, la protéine RND constituant la pompe localisée dans la membrane interne qui est couplée à deux autres protéines membranaires ; la protéine de membrane externe (OMF : Outer Membrane Factors) et la protéine de fusion membranaire (MFP : Membrane Fusion Protein) formant un antiport cation/deux protons, permettant l'export d'ions métalliques à l'extérieur de la cellule (Figure I-8). En effet, les protons issus de la chaîne respiratoire sont expulsés dans l'espace périplasmique pour servir de co-transporteurs antiports aux cations métalliques. Les protons créent une force proton motrice qui permet l'échange par exemple entre protons et cations métalliques de localisations diverses, au niveau du site actif de la protéine RND. La concentration élevée en cations dans ce dernier permet de les expulser par diffusion. Parmi les HME-RND les plus décrites, le complexe protéique CzcABC codée par l'opéron *czc* présent sur le plasmide pMOL30 de *C. metallidurans* CH34, permet l'adaptation à de fortes concentrations en Co, Ni, Zn et Cd (von Rozycki and Nies, 2009). CzcA constitue la protéine RND localisée dans la membrane interne et possède 12 TMs et deux domaines périplasmiques

avec des résidus glutamines et aspartates essentiels au transport de protons. CzcB constitue une protéine périplasmique de la famille des MFP qui est ancrée dans la membrane interne par l'extrémité N-terminale et est au contact de CzcA et CzcC dans le périplasme. CzcC constitue une protéine localisée dans la membrane externe appartenant à la famille des OMF et forme le pore en contact avec CzcA dans le périplasme.

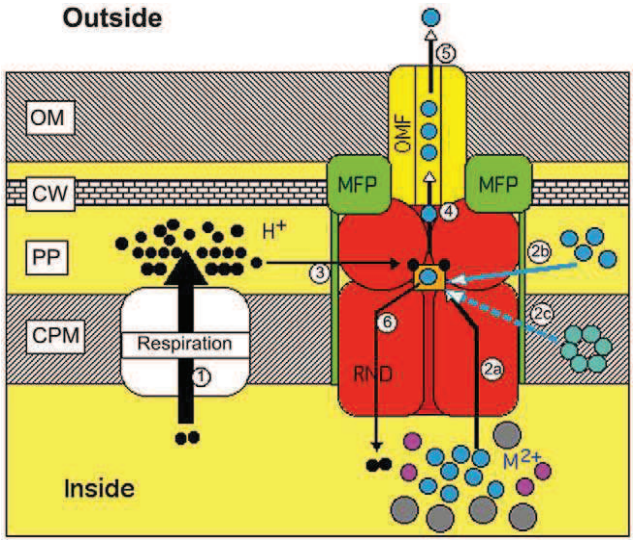


Figure I-8 : Modèle du mécanisme des protéines HME-RND (Nies, 2003).
Légende : OM (membrane externe), CW (paroi cellulaire), PP (espace périplasmique), CPM (membrane cytoplasmique), RND (Resistance Nodulation and cell-Division), MFP (Membrane Fusion Protein) et OMF (Outer Membrane Factors). (1) Les protons (points noirs) issus de la chaîne respiratoire, sont expulsés dans l'espace périplasmique. (6) Ils servent de co-transporteurs antiports aux cations métalliques (6). (3) Les protons créent une force protons motrice qui permet l'échange, par exemple entre protons et cations métalliques, de localisation diverses (2), au niveau du site actif de la protéine RND. (4) Les cations sont accumulés dans le canal MPF-OMF. (5) La concentration élevée en cations dans celui-ci, permet d'expulser les cations par diffusion.

(c) Les **protéines CDF** (Cation Diffusion Facilitor) sont des transporteurs membranaires secondaires de type antiport protons/cations, utilisant la force proton motrice ou le gradient en potassium comme source d'énergie. Ces transporteurs furent les premiers à être définis comme spécifiques de l'exclusion des cations métalliques. Ces transporteurs possèdent six TMs dont les quatre premiers semblent conservés avec un résidu sérine et aspartate. Ils possèdent aussi de nombreux sites de liaison des cations métalliques et de nombreux résidus histidines aux extrémités C- et N-terminales et/ou dans la région située entre les hélices transmembranaires 4 et 5 qui sont essentielles au transport des métaux (Paulsen and Saier, 1997). La protéine CzcD de type CDF décrite chez *C. metallidurans* CH34 est impliquée dans l'export de Zn, Co et Cd du cytoplasme vers le périplasme (Anton *et al.,* 1999). Les protéines CzcD sont sous forme d'un dimère, constitué de quatre hélices-α transmembranaires, localisé sur la membrane cytoplasmique et capables de fixer trois atomes

de Zn (Nies, 2003). CzcD est orthologue à ZitB, un autre CDF décrit chez *E. coli*, comme un transport de haute affinité pour le Zn (Grass *et al.,* 2001b) (Figure I-9).

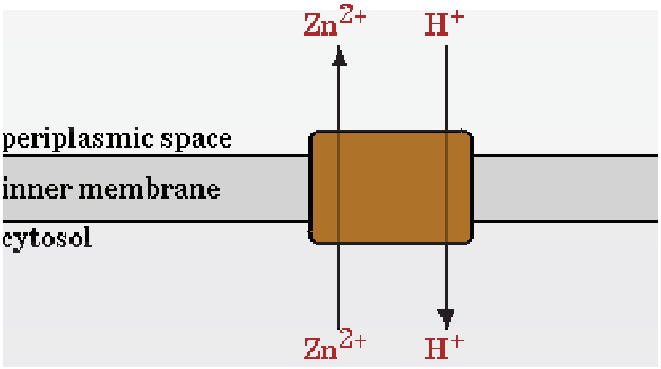


Figure I-9 : Représentation de l'antiport de type-CDF ZitB.

(d) Les **systèmes MFS** (Major Facilitator Superfamily) sont des protéines membranaires de type uniport, symport ou antiport qui transportent des solutés de petites tailles en réponse à un gradient chimiosmotique, tel que les hydrates de carbone, les intermédiaires du cycle de Krebs, les antibiotiques, les acides aminés, les nucléosides, les vitamines, ainsi que les cations et anions, mais pas les macromolécules (Marger and Saier Jr, 1993) (Figure I-10). L'exemple le plus connu est la protéine NreB décrite chez la souche 31A de *C. metallidurans*, qui permet l'efflux spécifique du Ni (Grass *et al.,* 2001a). Cette protéine possède 12 TMs avec un domaine C-terminal riche en histidine, non essentiel à la fonction de la protéine mais nécessaire à l'acquisition d'une résistance complète (Bolhuis *et al.,* 1997; Grass *et al.,* 2001a).

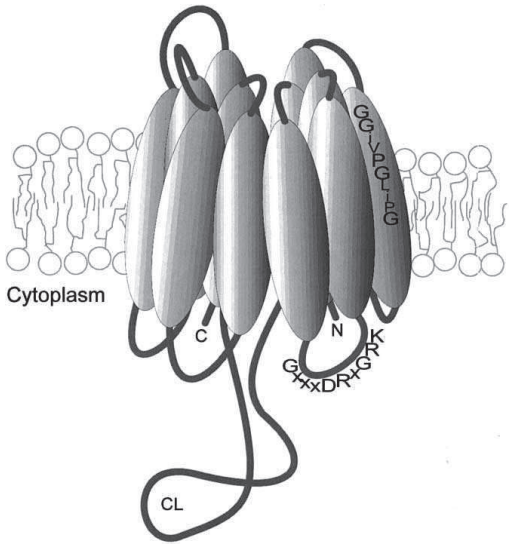


Figure I-10 : Structure des protéines MFS (Bolhuis *et al.,* 1997).
Légende : Les segments en hélice α sont représentés par des ellipses. Les régions N- et C-terminales sont dans le cytoplasme, de même qu'une large boucle centrale (notée CL). Les motifs conservés sont notés sur la figure.

I-3-3- Mécanismes d'adaptation aux métaux lourds : les systèmes de régulation

Les différents systèmes d'efflux décrits précédemment sont régulés par des protéines régulatrices qui se lient dans la région opératrice du promoteur afin d'activer ou de réprimer la transcription des gènes concernés. Silver and Phung, (2005) ont décrit trois principales familles de régulateurs transcriptionnels :

(1) Les **régulateurs transcriptionnels de la famille MerR** sont des homodimères qui régulent divers systèmes de détoxification, décrits initialement dans la résistance au Hg (MerR), puis au Zn (Hantke, 2001; Brocklehurst *et al.,* 2003; Brown *et al.,* 2003). Dans le cas de la régulation de Hg, MerR joue à la fois le rôle de répresseur et d'activateur de la transcription, respectivement en absence et en présence de Hg. Il reconnait une séquence palindromique entre les boites -34 et -10 de la séquence promotrice. La répression n'est due en fait qu'à la structure particulière de la région opérateur/promoteur ; la présence de MerR ne la modifiant en rien. En effet, l'espace entre les hexamères -10 et -35 est anormalement long, 19 paires de bases (pb) au lieu de 17 pb. Ce décalage de 2 pb modifie l'alignement relatif des positions -10 et -35, ne permettant pas le bon positionnement de l'ARN polymérase. En revanche, MerR est véritablement un activateur de transcription lors de la présence de Hg. La fixation d'un ion mercurique sur le dimère de MerR induit une modification conformationnelle de celle-ci, qui se répercute sur l'ADN par une distorsion d'un angle de 33° environ. Dans ce cas, le promoteur se retrouve dans l'alignement des boites -10 et -35 comme dans celui d'un promoteur classique. L'ARN polymérase, bien placée, peut ensuite démarrer la transcription du reste de l'opéron *mer*TPAD (Brown *et al.,* 2003).

(2) Les **régulateurs transcriptionnels de type ArsR/SmtB** sont des homodimères qui répriment la transcription en condition sans métal. Diverses protéines interviennent dans la régulation de As et de Sb chez *E. coli* (ArsR), du Zn chez *Synechococcus* (SmtB) et *Synechocystis* (ZiaR), du Cd chez *Staphylococcus aureus* pI258 (CadC) (Busenlehner *et al.,* 2003). La levée de la répression est induite par la fixation d'un ion métallique. CadA est une P_{IB}-ATPase impliquée dans l'export de Cd(II), Zn(II) ou Pb(II) chez *S. aureus*, régulée par CadC, un répresseur transcriptionnel de la famille ArsR/SmtA. Sous la forme d'un dimère, CadC se lie à l'ADN au niveau d'une région opératrice, provoquant la répression de la transcription de CadA. La présence de cations Zn, Cd ou Pb entraîne un changement de conformation de la protéine CadC, qui se dissocie de la molécule d'ADN permettant alors à l'ARN polymérase de démarrer la transcription de CadA (Endo and Silver, 1995).

(3) Les **systèmes de régulation à deux composants** sont constitués d'une protéine membranaire « senseur (S) » et d'une protéine intracellulaire « régulatrice (R) ». Un stimulus extérieur, par exemple la présence de métaux lourds dans l'environnement, entraîne l'autophosphorylation de la protéine S qui transmet son groupe phosphate à la protéine R laquelle active ou réprime la transcription du gène considéré. Les systèmes de régulation à deux composants régulent les systèmes de résistance au Cu chez *E. coli* (*cus*RS) (Munson *et al.,* 2000), au Cd/Zn/Pb chez *C. metallidurans* CH34 (*czc*RS) (van der Lelie *et al.,* 1997).

I-3-4- Adaptation aux métaux lourds des rhizobia métallicoles :

A ce jour, la description de rhizobia métallicoles, isolés d'environnements contaminés en métaux lourds, associés à des légumineuses et impliqués dans des stratégies de phytoremédiation, est peu documentée. Beaucoup de travaux sur les mécanismes de résistance aux métaux lourds ont été publiés et décrits d'après l'étude de la bactérie modèle dans ce domaine, *C. metallidurans* CH34 (von Rozycki and Nies, 2009). Je citerai trois exemples d'études des mécanismes d'adaptation aux métaux lourds chez des rhizobia.

Peirera *et al.* (2006) ont montré que *R. leguminosarum* bv. *viciae* était capable de résister à de fortes concentrations en Cd grâce à la synthèse intracellulaire de biomolécules (polysaccharides, thiols et acides organiques) capables de séquestrer le Cd et ainsi de limiter sa toxicité et les dommages éventuels. De plus, les auteurs ont aussi mis en évidence la production extracellulaire de LipoPolysaccharides de Surface (LPS) pour immobiliser le Cd sur la paroi cellulaire et limiter alors son entrée dans la cellule.

Chaintreuil *et al.* (2007) ont décrit les premiers *Bradyrhizobium* résistants au Ni, isolés des nodosités de la légumineuse *Serianthese calycina* sur sol contaminé en Ni de Nouvelle Calédonie. Ils ont démontré que la résistance au Ni était due à deux déterminants de résistance codant pour des systèmes d'efflux de type HME-RND ; opéron *cnr* (49 % d'identité avec CnrA de *C. metallidurans* CH34) et *nre* (61 % d'identité avec NreB de CH34). La présence de ces deux marqueurs de résistance au Ni donnent aux souches de *Bradyrhizobium* un avantage pour la croissance dans ces environnements contaminés et pour l'établissement de la symbiose avec la légumineuse.

Hao *et al.* (2012) et Li *et al.* (2012) ont respectivement séquencé les génomes de *M. amorphae* CCNWGS0123 isolé des nodosités de *Robinia pseudoacacia* et *Ensifer meliloti* CCNWSX0020 isolé des nodosités de *Medicago lupulina*, provenant de sites miniers contaminés en Zn/Pb, dans lesquels ils ont identifié de nombreux gènes de résistance aux métaux lourds potentiellement impliqués pour des stratégies de revégétalisation. Chez *M. amorphae* CCNWGS0123, des gènes impliqués dans la résistance au Cu ont été identifiés tels que ceux codants pour des systèmes d'efflux de type HME-RND (CusAB), des P_{IB}-ATPases (proches de la P_{IB}-ATPase CopA) et des Multicopper oxydases (Hao *et al.,* 2012). Chez *E. meliloti* CCNWSX0020, des gènes impliqués dans la résistance au Cu ont aussi été identifiés tels que ceux codants pour des systèmes d'efflux de type P_{IB}-ATPase et des Multicopper oxydases (Li *et al.,* 2012).

Chapitre II

Caractérisation et description du gène *cad*A1 codant pour une P_{IB}-ATPase impliquée dans la résistance au Zn et au Cd chez *Mesorhizobium metallidurans*

II-1- Introduction :

Les travaux antérieurs conduits au laboratoire ont montré que les souches de *Mesorhizobium metallidurans* isolées des nodosités d'*Anthyllis vulneraria* sur le site minier des Avinières (St-Laurent-le-Minier), étaient capables de résister à de fortes concentrations en Zn et en Cd (Vidal *et al.,* 2009). Des travaux préliminaires ont été menés afin de détecter par amplification PCR au sein des souches de *M. metallidurans*, la présence des gènes de résistance aux métaux lourds (*pbr*R, *pbr*A, *pbr*BC, *czc*C, *czc*A et *czc*D) décrits chez la bactérie de référence pour l'étude des gènes de résistance aux métaux, *Cupriavidus metallidurans* souche CH34 (von Rozycki and Nies, 2009). Seul le gène *czc*D (codant pour une protéine de type CDF impliquée dans l'export de Zn, Cd et Co (Anton *et al.,* 1999)) a été partiellement amplifiée chez *M. metallidurans*. Il semble que l'adaptation aux métaux lourds chez *M. metallidurans* soit assurée par un système génétiquement divergent de celui déjà décrit notamment chez CH34 et donc que les amplifications de séquences homologues ne permettent pas de retrouver les gènes de résistance chez *M. metallidurans*. En effet, les mécanismes d'adaptation aux métaux lourds chez diverses bactéries sont nombreux et très diversifiés. Leurs structures et leurs fonctions dépendent du ou des cations métalliques transportés et des organismes chez lesquels ils se trouvent (Nies, 2003).

Afin d'identifier les gènes impliqués dans l'adaptation au Zn et/ou Cd chez *M. metallidurans* et mieux comprendre son adaptation au sol fortement contaminé du site minier des Avinières, nous avons développé une approche de génétique moléculaire. Cette approche a été fondée sur le criblage fonctionnel d'une banque cosmidique réalisée à partir de l'ADN de la souche type de *M. metallidurans* STM 2683^T dans un hôte hétérologue *E. coli*, sur milieu de culture additionné de Zn ou de Cd, de manière à sélectionner des clones potentiellement tolérants. Les gènes impliqués dans l'adaptation ont alors été caractérisés par séquençage et une étude fonctionnelle plus approfondie a été menée pour démontrer leur rôle dans l'adaptation aux métaux lourds chez *M. metallidurans*. Les résultats de cette description fonctionnelle sont présentés sous la forme d'un article scientifique en préparation pour une future soumission (partie II-2). En complément de ces résultats, l'expression du gène *cad*A1 codant pour un système d'efflux de type P_{IB}-ATPase, impliqué dans la résistance au Zn chez *M. metallidurans* identifié par l'approche de génétique moléculaire (partie II-2), a été étudiée directement dans les nodosités d'*A. vulneraria* après un stress métallique (partie II-3) afin de

dégager des pistes quant au rôle potentiel de *cad*A1 dans le fonctionnement de l'association symbiotique métallicole *A. vulneraria*/*M. metallidurans*.

II-2- Article en préparation :

CadA1 is a novel P_{IB}-type ATPase involved in cadmium and zinc resistance in *Mesorhizobium metallidurans* isolated from a mining soil

Géraldine Maynaud,[a #] Brigitte Brunel,[a] Erika Yashiro,[a †] Max Mergeay,[b] Jean-Claude Cleyet-Marel,[a] and Antoine Le-Quéré,[a ‡]

Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes UMR113, IRD/INRA/CIRAD/Montpellier SupAgro/Université Montpellier II, TA A-82/J, 34398 Montpellier Cedex 5, France [a] and Molecular and Cellular Biology, Unit Microbiology, Belgian Nuclear Research Center (SCK·CEN), Boeretang 200, B-2400 Mol, Belgium [b].

[†] Present address: Université de Lausanne, Département de Microbiologie Fondamentale, Bâtiment Biophore, CH-1015 Lausanne, Switzerland.

[‡] Present address: Laboratoire Mixte International, Biotechnologie Microbienne et Végétale, Rabat, Maroc.

[#] Address correspondence to Géraldine Maynaud, maynaud@supagro.inra.fr.

Running title: novel Cd/Zn export P-type ATPase in M. metallidurans

ABSTRACT

Mesorhizobium metallidurans is a cadmium and zinc-resistant nitrogen-fixing bacterium that nodulates *Anthyllis vulneraria* in zinc and lead mine tailings. To study the mechanisms whereby bacteria cope with heavy metals, we functionally screened a cosmid genomic library of *M. metallidurans* for zinc or cadmium resistance. A resistant clone harbored a gene encoding a P_{IB}-type ATPase (named CadA1) homologous to CadA that leads to cadmium and zinc resistance in *E. coli*. CadA1 contains all the signatures of the P_{IB-2}-type ATPase subgroup that exports Zn^{2+}/Cd^{2+}; it has numerous Metal Binding Domains, including an atypical duplicated Heavy Metal-Associated domain. The *cadA1*-deleted strain of *M. metallidurans* failed to grow at high zinc concentrations (2 mM) and its growth was delayed at lower zinc

concentrations under laboratory conditions. Yet, it survived well in mining soil. Transcriptional studies showed that *cadA1* was specifically induced by zinc or cadmium, the response magnitude being 10-fold higher for cadmium, and deleting *cadA1* increased sensitivity to both metals. Our data indicate that *cadA1* encodes a novel P_{IB}-type ATPase involved in the detoxification of cadmium and zinc ions and confers *M. metallidurans* a higher ability to cope with high zinc concentrations. Yet, *cadA1* alone is not sufficient to explain the survival of *M. metallidurans* in heavily contaminated mining soils.

INTRODUCTION

Heavy metals released by anthropogenic activities are a major cause of environmental pollution due to their toxicity [68]. Mining generates spoils that are extremely rich in toxic heavy metals and which often contaminate the surrounding soils and waters. Since they cannot be degraded or destroyed, they persist within natural environments and have been shown to disturb ecosystem dynamics. Heavy metal pollution constitutes a significant threat to public health [28] and to natural environments [48]. Some heavy metals (including Zn, Fe or Co) are essential for life at low concentrations and play important roles in biological cell functioning [2]. High concentrations of these essential metals or of toxic metals with unknown biological roles (such as Cd, Pb or Hg) can damage DNA structure and cell membranes, alter enzymatic activity and disrupt cellular functions because of their interference with oxidative phosphorylation [14, 46]. Bacteria use a variety of mechanisms to protect sensitive cellular components against heavy metals [14, 44] such as metal exclusion thanks to a permeability barrier [70], active transport [46], intracellular sequestration [31], precipitation as insoluble salts to reduce their bioavailability [1] or transformation of metals into less toxic forms by enzymatic detoxification [41].

P-type ATPase transporters belong to the large superfamily of ATP-driven pumps found in all three kingdoms of life. The letter "P" refers to the formation of a phosphorylated aspartate intermediate during the reaction cycle [29]. These P-type ATPases are involved in the transport of charged substrates across cell membranes against their concentration gradients to maintain constant and non-toxic levels of heavy metals within the cytoplasm and to provide metals for the periplasmic assembly of metalloproteins [32]. P-type ATPases are classified into five major types according to their substrate specificity [5]: (1) type-I (K^+- and heavy metal-pumps), (2) type-II (Ca^{2+}-, Na^+/K^+-, H^+/K^+-pumps), (3) type-III (H^+- and Mg^{2+}-pumps), (4) type-IV (phospholipid-pumps) and (5) type-V (no assigned substrate specificity). Type-I proteins can be divided into two subfamilies; P_{IA} for K^+-ATPases and P_{IB} for heavy

metal pumps. A topological arrangement of 6-8 TransMembrane domains (TMs) flanking the large cytoplasmic loop and several regulatory cytoplasmic Metal Binding Domains (MBDs) distinguish P_{IB}-type ATPases from other P-type ATPases. All P_{IB}-type ATPases have signature sequences in the TM-MBD containing a CPX (X = cysteine, histidine or serine), an SPC or a TPC motif downstream of the largest cytoplasmic loop. One of these motifs is required for the catalytic phosphorylation of a ubiquitous aspartate residue by ATP which results in the conformational changes required for metal translocation across the membrane [38]. All P_{IB}-type ATPases contain one or more MBDs located in the N- (N-MBDs) and/or the C-terminal region (C-MBDs) responsible for metal recognition, movements across the membrane permeability barrier and the specificity of transported metal ions [42]. N-MBDs do not appear to be essential for ATP hydrolysis or metal transport, but they can be involved in regulation [6, 7, 42, 38, 39]. C-MBDs that include a conserved aspartate residue are exclusively described in ZntA of *E. coli* and homologs appear essential for resistance or ATP hydrolysing activity [19]. The sequence signatures identified in P_{IB}-type ATPases point out various MBDs which allow the classification of P_{IB}-type ATPases into four major subgroups according to distinct metal binding and transport specificities [4]: P_{IB-1} (Cu^+/Ag^+ -ATPases, [57]), P_{IB-2} ($Zn^{2+}/Cd^{2+}/Pb^{2+}$ -ATPases, [47, 56]), P_{IB-3} ($Cu^+/Ag^+/Cu^{2+}$ -ATPases, [37]) and P_{IB-4} (Co^{2+} -ATPases, [61]).

Located in the south of France, Saint-Laurent-le-Minier was once an important mining area for zinc exploitation (1872-1914). Among the former mining sites, one named the Avinières is a hotspot of high pollution by heavy metals particularly Zn, Cd and Pb [36]. An efficient nitrogen-fixing symbiosis between the leguminous plant *Anthyllis vulneraria* and the rhizobial species *Mesorhizobium metallidurans* was however identified in the Avinières site [65]. This *Anthyllis-Mesorhizobium* symbiotic pair has recently been described as a key potential bioremediation agent for stimulating a sustainable plant cover which could then limit heavy metal dispersion from the contaminated sites [22, 36]. As *A. vulneraria* and the microbiont *M. metallidurans* are able to survive and grow in such highly contaminated soils, they are likely to have developed strategies for tolerating high concentrations of heavy metals such as Zn or Cd [65].

The aim of this work was to investigate the molecular mechanisms involved in *M. metallidurans* Zn and Cd adaptation in order to gain a better understanding of its adaptation in such highly polluted mining sites. Using a functional screening approach, we isolated a genomic region of the *M. metallidurans* type strain that responded to Zn and Cd stress. A putative P_{IB}-type ATPase was identified and its role in metal resistance was further analyzed.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids and growth conditions. The bacterial strains, plasmids and cosmids used in this study are listed in Table II-S1 in the supplemental material. *Escherichia coli* strains were cultured in Luria Bertani (LB) broth at 37°C [62]. *Mesorhizobium* strains were cultured at 28°C in Tryptone Yeast extract (TY) medium or TY medium supplemented with 0.5 mM Na_2-EDTA when Pb was used (15). Ampicillin (Ap, 50 µg ml^{-1}), tetracycline (Tc, 15 µg ml^{-1}), gentamicin (Gm, 10 µg ml^{-1}), kanamycin (Km, 50 µg ml^{-1}), isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG, 100 mM) and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactosidase (X-gal, 80 µg ml^{-1}) were added as required. Solid media contained 2 % agar.

Molecular techniques. General DNA manipulations were performed using standard techniques [62]. Products from PCR and restriction digestions were cleaned up using illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kits (GE Healthcare). All enzymes were purchased from Promega and all primers from Eurofins. The primers used in this study are listed in Table II-S1 in the supplemental material. All constructions were sequenced by Genoscreen Company (France).

Minimal Inhibitory Concentration (MIC) assays. Minimal Inhibitory Concentrations (MICs) were determined in liquid medium. MIC was defined as the lowest concentration of metal that inhibited visible growth. *E. coli* strains were pre-cultured overnight and *Mesorhizobium* strains for 4 days, and each culture was adjusted at OD_{600nm}= 0.5 before inoculation. One hundred and fifty microliters of medium containing increasing concentrations of metal ($ZnSO_4$ or $CdCl_2$ or $NiSO_4$ or $CoCl_2$ or $PbCl_2$) or no metal (positive control) were inoculated with 10 µl of pre-culture and incubated at 28°C or 37°C for *Mesorhizobium* or *E. coli* strains, respectively, with orbital shaking. Growth was monitored following the OD_{600nm} by using a spectrofluorometer (TECAN Infinite M200) for 4 days for *E. coli* strains and for 1 week for *Mesorhizobium* strains.

Construction of a cosmid library of *Mesorhizobium metallidurans* STM 2683^T and screening for Zn or Cd resistance. Total DNA from *M. metallidurans* STM 2383^T was partially digested with *Sau*3AI and size-fractionated on a 0.3 % agarose gel. DNA fragments (approximately 40 kb) were ligated into pCPP47 vectors (encoding for Tc^R) [8] that were digested with *Sca*I and *Bam*HI and treated with rapid Alkaline Phosphatase [55]. The size-

fractionated STM 2683^T DNA was ligated to a *Bam*HI-digested SuperCos vector with T4 DNA ligase following the SuperCos protocol (Stratagene). *E. coli* XLI-Blue MR strain using Gigapack III XL packaging extract kit (Stratagene), were transformed with the ligation mixture and transformants were selected with Tc. The library clones were stored in twenty-two 96-well microtiter plates as single clones (2000 clones) and in cryotubes as clone pools containing approximately 20000 clones until screening for metal resistance. The screening for Zn or Cd resistance was carried out on LB plates supplemented with 4 mM Zn or 1.6 mM Cd. Selected cosmid clones were isolated using Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) and their DNA restriction digestion analysis was carried out with *Eco*RI to confirm the presence of an insert in pCPP47. MIC assays were performed to define cosmid clone resistance in the presence of increasing Zn or Cd concentrations.

Transposon mutagenesis. Tn*5*-transposons containing the Km^R gene were randomly introduced *in vitro* into MPCdR2 using the EZ-Tn5 KAN-1 Insertion Kit (Epicentre) to generate MPCdR2::ΩKm. Recombinant plasmids were transformed into *E. coli* EC100 strain following TransforMax^{TM} EC100 Electrocompetent *E. coli* instructions (Epicentre) and clones were selected on Km. The Km^R clones were screened negatively on LB medium with 1.5 mM Cd and were checked by MIC assays with increasing Cd concentrations (1, 1.5 and 2 mM). The Zn resistant phenotype was investigated on liquid LB medium containing 1, 2 and 2.5 mM Zn. Km^R clones were sequenced bidirectionally using the KAN-2 FP-1 forward and KAN-2 RP-1 reverse transposon-specific-primers provided in the kit. DNA sequences were analyzed using BioEdit version.7.0.9.0. Putative Open Reading Frames (ORFs) were identified with BLASTX program and the amino-acid sequences obtained were compared to the Genbank database using BLAST Protein program (BLASTP) in order to identify the most similar sequences available. For complementation assays, pCPP47-MPCdR2 was introduced into electrocompetent EC100 cells containing MPCdR2::ΩKm (described above) by electroporation and transformants were selected with Tc and Gm. The restoration of Cd and Zn resistance in Tn*5*-mutated *E. coli* EC100 was studied by transforming the MPCdR2 cosmid into several metal-sensitive strains of EC100 containing MPCdR2::ΩKm. Metal resistance was measured by MIC assays.

Sub-cloning and identification of metal-resistance ORFs. MPCdR2 was sub-cloned into pBBR1MCS-5 (encoding for Gm^R) [33]. The cosmid clone MPCdR2 was digested with *Eco*RI. The restriction fragments were ligated into *Eco*RI-linearized pBBR1MCS-5. The

ligation mixture was transferred into *E. coli* DH10B electrocompetent cells by electroporation [18, 63] and transformants were plated onto LB solid medium supplemented with Gm and 1.6 mM Cd to select Cd resistant sub-clones. The insert of the Cd-resistant sub-clone DH10B pBBR1-CdEI was sequenced using T3 and T7 primers and custom-designed internal primers. DNA sequences were checked by BioEdit. ORFs were identified with BLASTX program. Sequences of the Cd-resistant inserts were mapped to the STM 2683^T genome (unpublished data) to identify complete DNA regions involved in metal resistance.

Phylogenetic analysis and structural description of CadA1. The sequence obtained from the Zn and Cd resistant DH10B sub-clone containing pBBR1-CdE1 matched with a CDS encoding for a P_{IB}-type ATPase and the *M. metallidurans* gene was named *cadA1*. *cadA1* amino acid sequence was compared to the Genbank database using BLASTP program in order to identify the most similar sequences available on NCBI. The amino-acid sequence corresponding to the *cadA1* gene was aligned with 14 bacterial P_{IB}-type ATPase sequences identified by BLASTP, and a phylogenetic tree was inferred by the maximum likelihood method using the PhyML program [16]. The tree was rooted using *C. metallidurans* CH34 strain as an outgroup. For phylogenetic analysis, the sequences were aligned using ClustalX version.1.83 and optimized manually with GeneDoc version.2.7.00. The confidence level of the tree branches was estimated with 500 bootstrap repetitions. The number of TMs and protein topology were predicted by HMMTOP server version.2.0 and the conserved domains were defined manually by comparing with the closest protein sequences retrieved from the Genbank database.

Construction of a *cadA1* mutant and complementation experiments. A 3-kb region carrying the *cadA1* gene with its flanking DNA was amplified by PCR with custom-designed primers (STM 2849 forward and STM 2785 reverse) including *Xba*I sites. The PCR-amplified product was cloned as an *Xba*I fragment into a pGEM-T Easy vector (Promega) to create pGEM-*cadA1*. The 2.5-kb *Hind*III-flanked ΩKm resistance cassette was excised from pHP45 ΩKm and inserted in the place of a 2.5-kb *Hind*III-deleted region carrying *cadA1*. The resulting pGEM-*cadA1*::ΩKm plasmid was digested with *Xba*I, the fragment containing *cadA1*::ΩKm was ligated into the pBBR1MCS-5 plasmid before being ligated into the suicide vector pJQ200SK to create pJQ::*cadA1*::ΩKm and be transformed into previously prepared electrocompetent *M. metallidurans* STM 2683^T cells [25]. Transformants were selected on LB plates containing Km and 5 % sucrose to allow the selection of knockout clones that has

undergone a double crossover. Double crossover gene replacement in mutants was verified by screening for antibiotic-resistant phenotypes (Km^R) and also by PCR using STM 2985 forward and STM 2986 reverse primers to detect the inserted construction, STM 2612 forward and STM 2613 reverse primers targeted to the deleted fragment, and STM 2849 forward and STM 2987 reverse primers to detect the presence of the cassette. To test for the complementation of the mutated strain (named Δ*cadA1*), a 3-kb PCR fragment containing the *cadA1* gene and its promoter was PCR-amplified with STM 2849 forward and STM 2785 primers, then cloned into a pGEM-T Easy vector before being cloned into pBBR1MCS-5, generating the pBBR1-*cadA1* plasmid. The construction was then used to transform electrocompetent cells of the Δ*cadA1* strain. Complemented clones were confirmed by amplifying of *cadA1* by PCR using custom-designed STM 2245 forward and STM 2263 reverse primers targeted to the mutated region and one clone (named Δ*cadA1-cadA1*) was chosen for phenotypical analysis.

Induction experiments using a promoter-*gfp* fusion reporter system. For testing the promoter activity of the *cadA1* 5' region, promoter/reporter-gene fusions were constructed in the broad-host-range promoter-probe vector pPROBE-GT (encoding for Gm^R) [40], which allows transcriptional fusions with the *gfp* gene. The 200-bp region upstream of the *cadA1* start codon contains a regulatory site for metal-sensing regulators of the MerR-family [30, 51] and was PCR-amplified from the STM 2683^T genome with STM 2740 forward and STM 2244 reverse primers. The PCR product was cloned into a pGEM-T Easy vector to create pGEM-*cadA1*p. It was digested with *Eco*RI and the fragment was ligated between *Eco*RI sites of the pPROBE-GT vector (renamed pGT), downstream of the *gfp* gene to create pGT-*cadA1*p and its sequence was determined to exclude any unwanted mutations. The plasmid was electroporated into STM 2683^T and into the Δ*cadA1* strain and transformants were selected with Gm or Km, respectively. The expression of strains containing pGT-*cadA1*p was studied with increasing concentrations of Cd (0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.8 mM), Zn (0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 1, 1.5 and 2 mM), Ni (0.01, 0.02 and 0.03 mM), Co (0.01, 0.02 and 0.03 mM) and Pb (0.05, 0.1 and 0.2 mM) and compared with the expression of pGT-empty cells as a negative control. Moreover, *cadA1* induction was tested with a water extract from the Avinières mine as follows: 20 g of mine soil were shaken with 100 ml of milliQ water (1/5 ratio, named concentration 1X in Figures) for 4 hours. After centrifugation, the mine-soil extract supernatant was 0.2-µm filtered and kept at 0°C until use. Its chemical analysis was performed by atomic absorption spectrometry (UMR 5569

Hydrosciences, Montpellier, France). The inducible activity of the *cadA1*-promoter upon the different metal exposures or upon exposure to the water-extracted soil was quantified by measuring cell fluorescence intensities with a TECAN microplate spectrofluorometer, using excitation and emission wavelengths of 485 nm and 535 nm, respectively. The relative expression values were obtained by substracting the fluorescence values of corresponding non-inoculated controls and by normalizing the fluorescence to cell density. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA plus Newman-Keuls post-hoc test, with *p - values* below 0.01 considered as significant. All assays were performed at least three times.
The metal-dependent *cadA1* transcriptional responses as assessed by *gfp* expression under the control of the *cadA1*-promoter were subjected to a non-linear regression analysis and fitted to the sigmoidal dose-response curves with a variable slope (four parameters) using the Prism software package (version.5, GraphPad software) as described previously [23]. We used observed bottom (when no metal was added to the growth medium) and top transcriptional relative expression levels to calculate the background expression level and the maximum-fold induction levels for each strain within the concentration range that did not induced growth differences between the compared strains. We also determined the effective concentration (EC_{50}) corresponding to half the maximum transcriptional response (except for the wild-type response to Zn for which we used the maximum relative expression), the Hill slope (or Hill coefficient), which describes the steepness of the curve indicating ultrasensitivity of the response [54] and goodness of fit as expressed by the R^2 values.

Mutant survival in mine tailings and soil characteristics. Survival of the Δ*cadA1* strain and of the complemented clone (Δ*cadA1-cadA1*) as compared to the STM 2683^T wild-type and the metal-sensitive *Mesorhizobium* sp. STM 2682 [36] was tested in a tailing pond soil. The soil was collected from a tailing pond of the Avinières site, slightly air-dried and sifted through a 2-mm mesh sieve before transferring 5-g samples into 50-ml centrifuge tubes (Falcon^{TM}). Each tube was supplemented with 1.4 ml of deionized water. The soil was sterilized twice by autoclaving at 120°C for 20 min and was left for 4 weeks after sterilization to limit the possible toxic effect of sterilization. A loop of 72-hour-old Petri dish culture strains was transferred into 200 ml of fresh liquid medium. After aerobic growth, the culture was centrifuged and the cell pellet was re-suspended in 30 ml of 0.85 % (W/V) NaCl to get a final concentration of about 10^{10} CFUs (Colony Forming Units) ml^{-1}. Then, 0.5 ml of cell suspension was introduced into each sterilized soil sample in triplicate. All samples (40 % water content) were incubated at 28°C. CFU g $soil^{-1}$ values were determined immediately

after inoculation and 1, 2, 3, 7 and 15 days after inoculation. They were estimated by shaking each incubated soil sample in 25 ml of sterile water that was then 10-folf serially diluted and spread onto TY agar and Gm-supplemented TY for the complemented strain. The construction of mutated and complemented strains was checked by PCR amplification.

DNA sequencing and sequence accession number. DNA sequencing was performed by Genoscreen Company (France). The 2917-bp nucleotide sequence harboring the *cadA1* gene and its flanking regions including the partial 5' promoting region in strain STM 2683^T were deposited in GenBank under the accession number HE820903. Nucleotide sequence data of five other STM 2683^T P_{IB}-type ATPases are available in Genbank database under accession numbers: *fixI* (HE965426), *actP* (HE965427), *zntA* (HE965428), MESS2v1_1650024 (HE965430) and MESS2v1_p120012 (HE965429).

RESULTS

Isolation of a Cd-resistant clone in *E. coli*. In order to identify genes involved in Zn or Cd resistance in *M. metallidurans*, a cosmid library was constructed from *M. metallidurans* STM 2683^T strain DNA, using *E. coli* XL1-Blue MR strain as the host. The resulting collection (20000 clones) was spread onto LB plates supplemented with Zn or Cd to select metal-resistant clones. Out of the 24 cosmid clones isolated from the first screen (14 clones were selected on 1.6 mM Cd and 10 clones on 4 mM Zn), the *E. coli* clone containing MPCdR2 displayed the highest resistance to Cd compared to the other clones, with a Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of 2 mM (Figure II-S1, MIC = 1 mM for clones BOCdR1, BOCdR4, BOZnR8, MIC = 1.5 mM for MPZnR7). Clone MPCdR2 was successfully sub-cloned in *E. coli* DH10B strain using the plasmid pBBR1MCS-5. The screening of this secondary library on 1.6 mM Cd allowed the isolation of the sub-clone CdE1. CdE1 tolerated higher Cd and Zn concentrations (MIC = 3 mM Cd and 2.5 mM Zn) as compared to the negative control DH10B containing the empty pBBR1MCS-5 plasmid (MIC = 1.5 mM Cd and 2 mM Zn) (Figure II-1). And, it was sensitive to Pb^{2+}, Co^{2+} or Ni^{2+}, as was the MPCdR2 cosmid.

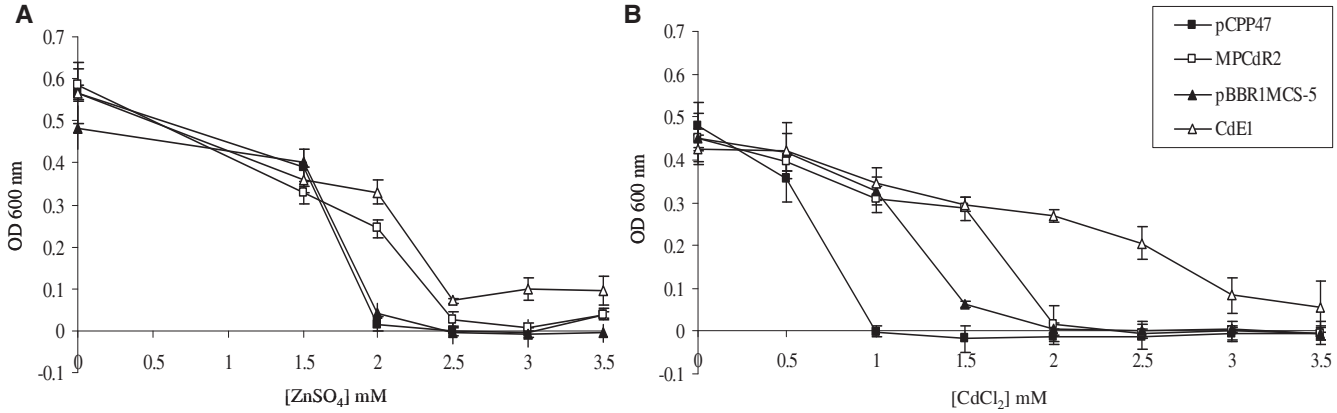


Figure II-1: Zn (A) and Cd (B) resistance of *Escherichia coli* XL1-Blue MR strain containing the MPCdR2 cosmid clone (white squares) and *E. coli* DH10B strain containing the CdE1 plasmid sub-clone (white triangles). Clones and sub-clones are compared with their respective negative controls consisting of the same E. coli strains containing the empty pCPP47 cosmid (black squares) or the empty pBBR1MCS-5 plasmid (black triangles). The OD600nm was measured after 24 hours growth. The results are the means of three replicates. Bars indicate the standard deviations from the means (±SD).

The CdE1 insert was sequenced by primer walking. BLASTP analyses of all putative translated Open Reading Frames (ORFs) were identified in the CdE1 insert that allowed the identification of an ORF showing homologies to a P_{IB}-type ATPase. The cloned sequence was further mapped onto the STM 2683^T draft genome (unpublished data) and found to match a CDS of 2733 bp, automatically annotated as a heavy metal-translocating P_{IB}-type ATPase of 910 amino acids (aa), named CadA1, which showed homology with CadA of *S. aureus* (37 % identity) (Table II-S2). The phylogenetic tree constructed with several P_{IB}-type ATPases showed that *cadA1* from *M. metallidurans* was closely related (> 60 % identity, Table II-S2) to nine P_{IB}-type ATPases identified in rhizobia and to three strains found in related genera (*Agrobacterium*, *Chelativorans* and *Rhodopseudonomas*). CadA1 was closely related to the P_{IB}-type ATPase of *Chelativorans multitrophicus* BNC1, an EDTA-degrading strain [17] with 87 % bootstrap value (Figure II-S2).

To verify whether the sub-cloned fragment CdE1 was the only genetic determinant conferring higher resistance in the MPCdR2 cosmid clone, a Tn*5*-transposon-based *in vitro* mutagenesis was performed. The Tn*5*-Km^R locus was randomly introduced into MPCdR2, resulting in a collection of 330 insertion mutants. *E. coli* EC100 clones harboring mutated MPCdR2 variants were screened for Cd sensitivity. Out of the 330 MPCdR2 mutant derivatives, 15 were found to be Cd sensitive (MIC = 1.5 mM Cd compared to MIC > 2 mM for the wild-type) (Figure II-S3A). These clones also exhibited lower Zn resistance (MIC = 2 mM *versus* MIC > 2.5 mM for the wild-type) (Figure II-S3B). Insertion sites of 11 MPCdR2

mutants sensitive to both Zn and Cd were characterized. The sequence analysis showed that they were all mutated in the domains required for enzyme functioning (phosphorylation, phosphatase activity, ATP-binding domain) and metal-binding (TM-MBD containing the CPX motif). After complementation of the Tn*5*-mutants by insertion of the CdE1 insert containing the *cadA1* gene, the Cd and Zn resistant phenotypes were restored, confirming that *cadA1* played a key role in the increased tolerance to these heavy metals (Figure II-S3).

CadA1 belongs to the P_{IB-2}-type ATPase subgroup, involved in Zn and Cd efflux. The HMMTOP transmembrane protein prediction tool predicted that CadA1 contained eight potential TMs with a large cytoplasmic loop between TM6 and TM7. The provisional model from the CadA1 protein sequence showed three regions whose domains presented homologies with other P_{IB}-type ATPases, all of them involved in heavy metal transport: (1) a duplicated 61-aa Heavy Metal Associated domain (HMA) in the N-terminal region containing one GXXCXXC motif each [26], (2) the 225-aa P_{IB}-type ATPase region containing the DKTGT motif with the phosphorylation site of an Aspartate residue (D), the phosphatase domain (TGES motif) and the ATP-binding domain (GDGXNDXP motif), characteristic of all P_{IB}-type ATPases [5], and [3] the 125-aa C-terminal region which contains the HaloAcid Dehalogenase (HAD) domain (hydrolase-like domain).

The CadA1 sequence and 14 selected P_{IB}-type ATPases (Table II-S2) were aligned and compared using Arguello's P_{IB}-type ATPase database [4] (Figure II-2). CadA1 exhibited all the characteristics of the P_{IB-2}-family (TM-MBD containing the CPX motif and C-MBD containing the $N(X)_7K(X)_{20}DXG(X)_7N$ motif). In addition, CadA1 had numerous other MBDs involved in metal recognition and movement across the membrane permeability barrier. Among those, a duplicated N-MBD containing a duplicated GMDCAAC motif of the GXXCXXC-type (also named HMA domain) was found in the N-terminal region of CadA1 (Figure II-2A). Unlike ZntA of *E. coli*, the N-MBD of CadA1 did not contain the four additional cysteine residues (CCCXXXC, located 25-aa upstream of the GXXCXXC motif) (Figure II-2A) which have been described as necessary for binding Pb^{2+} in addition to Zn^{2+}/Cd^{2+} [35]. This result suggests that CadA1 can bind Zn^{2+}/Cd^{2+} but not Pb^{2+}, which agrees with the Pb-sensitive phenotype we observed in the *E. coli* clones harboring CdE1. However, similarly to ZntA of *E. coli*, the N-MBD of CadA1 exhibited two cysteine residues and one aspartate (GXDCXXC) in the GXXCXXC motif which formed a tetrahedral coordination allowing the binding of Zn^{2+}/Cd^{2+} but not of monovalent ions (Figure II-2A). In contrast, the binding of monovalent ions like Cu^{+}/Ag^{+} has been shown to require a linear

geometry with only the two cysteine residues as described in Cu^{2+}-ATPases [7] Another duplicated N-MBD containing histidine-rich residues $(HX)_n$ was present in the N-terminal region of CadA1, 75-aa downstream of the N-MBD containing the GMDCAAC motif. Finally, a C-MBD containing an $N(X)_7K(X)_{20}DXG(X)_7N$ motif was found in CadA1 (Figure II-2C), which suggests that both lysine (K) in H7 and Asparagine (N) in helice 8 coordinate the metal rather than make a salt bridge as showed for ZntA of *E. coli* (19). Unlike the C-MBD of P_{IB-3}-type ATPases, the C-MBD of CadA1 does not contain a serine (S) in TM8 (Figure II-2C), which may facilitate the tetragonal coordination geometry involved in Cu^{2+} binding [4]. Consequently, structural analyses suggest that CadA1 is involved in the export of Zn^{2+}/Cd^{2+} but not of Pb^{2+}, Cu^{2+}, Cu^{+} or Ag^{+}.

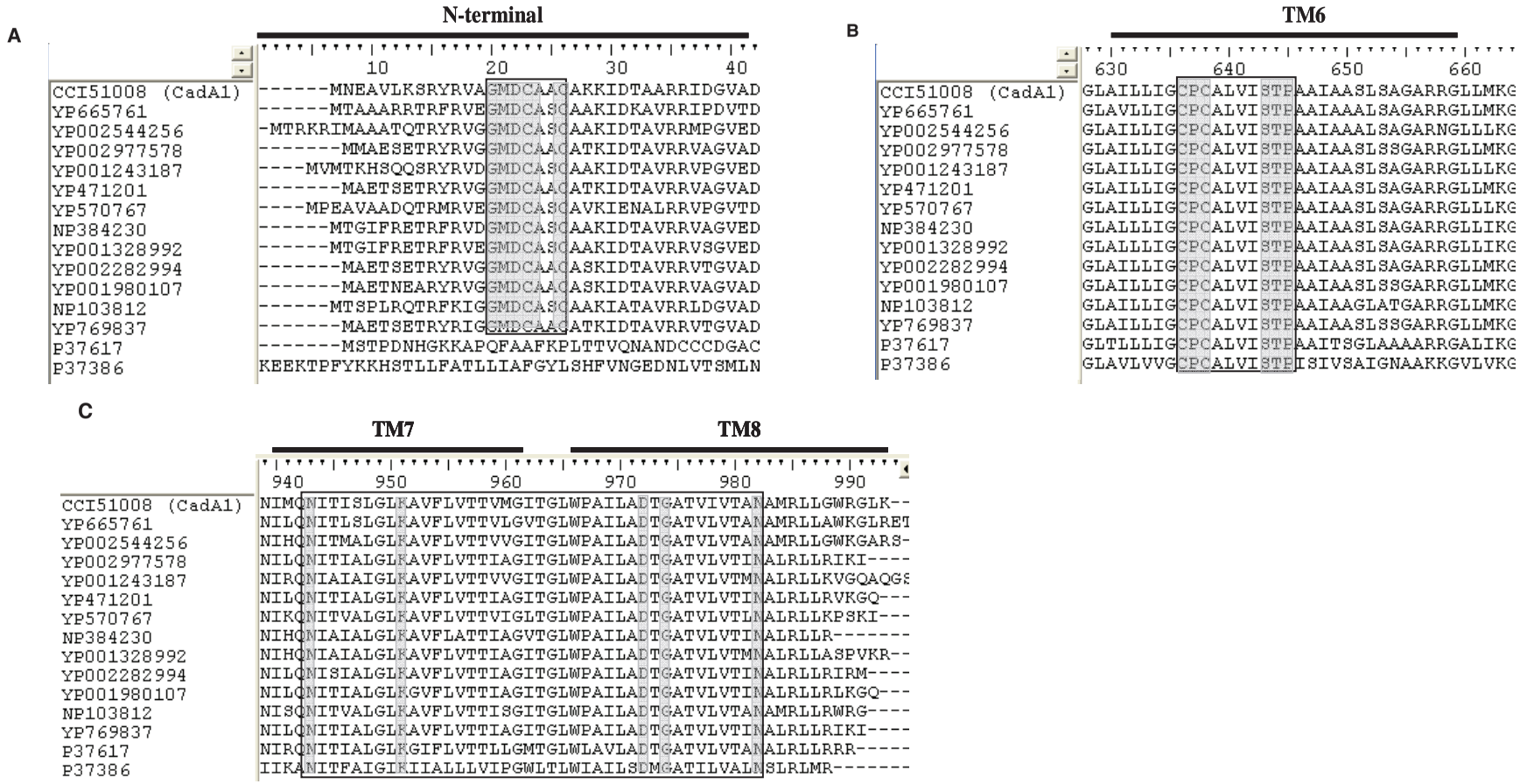


Figure II-2: Alignment of *Mesorhizobium metallidurans* STM 2683^{T} CadA1 Metal Binding Domains (MBDs) with 12 P_{IB}-type ATPases of rhizobia and relative strains, ZntA of *Escherichia coli* and CadA of *Staphylococcus aureus* using ClustalX. The P_{IB}-type ATPases are named by their accession numbers: CCI51008 (CadA1 of *M. metallidurans* STM 2683^{T}); YP_665761 (Chelativorans multitrophicus BNC1); YP002544256 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* WSM1325); YP002977578 (*R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841); YP001243187 (*R. leguminosarum* bv. *trifolii* WSM2304); YP471201 (*R. etli* CIAT 652); YP570767 (*R. etli* CFN 42); NP384230 (*Agrobacterium radiobacter* K84); YP001328992 (*Bradyrhizobium* sp. BTAi1); YP002282994 (*Rhodopseudomonas palustris* BisB5); YP001980107 (*M. huakuii* MAFF303099); P37617 (*E. coli* K12) and P37386 (*S. aureus* MRSA252). MBD motifs are bordered and conserved amino acid residues are highlighted by a dark grey background: (A) N-MBD in the N-terminal regions containing the GXXCXXC motif, (B) TM-MBD in the TM6 regions containing the $CP(X)_5STP$ motif and (C) C-MBD in the C-terminal regions containing the $N(X)_7K(X)_{20}DXG(X)_7N$ motif with a lysine (K) in TM7 interacting via a salt bridge with the glycine (G) and the asparagine (N) located in TM8.

Mutation of *cadA1* reduces *M. metallidurans* Zn resistance. The function of *cadA1* was investigated by directed mutagenesis through partial deletion and replacement of the *M. metallidurans cadA1* gene by a ΩKm^R cassette. The construction containing the partially deleted *cadA1* gene with the ΩKm^R interposon was sub-cloned into the suicide vector pJQ200SK and the resulting plasmid was used to transform STM 2683^T. The *cadA1* deletion mutant (named Δ*cadA1*) was obtained upon double homologous recombination and verified to confirm proper mutagenesis. The growth of the Δ*cadA1* strain on TY medium supplemented with Zn or Cd was compared to that of the STM 2683^T wild-type and of the sensitive *M. tianshanense* ORS 2740 strains as positive and negative controls, respectively. Δ*cadA1* growth was inhibited in the presence of 2 mM Zn (Figure II-3A). In the presence of 1.5 mM Zn, Δ*cadA1* growth was reduced and delayed compared to the wild-type (Figure II-3C). The higher Zn sensitivity of the Δc*adA1* strain was abolished when complemented by the full copy of the *cadA1* gene under the control of its own promoter region (pBBR1-*cadA1*), demonstrating that the disruption of *cadA1* was responsible for the reduced Zn resistance at higher concentrations (Figure II-3A) and for the delayed growth at 1.5 mM Zn (Figure II-3C). In contrast, Δ*cadA1* growth was not affected by increasing Cd concentrations (Figure II-3B). These results show that a functional *cadA1* is essential for *M. metallidurans* growth at high Zn concentrations.

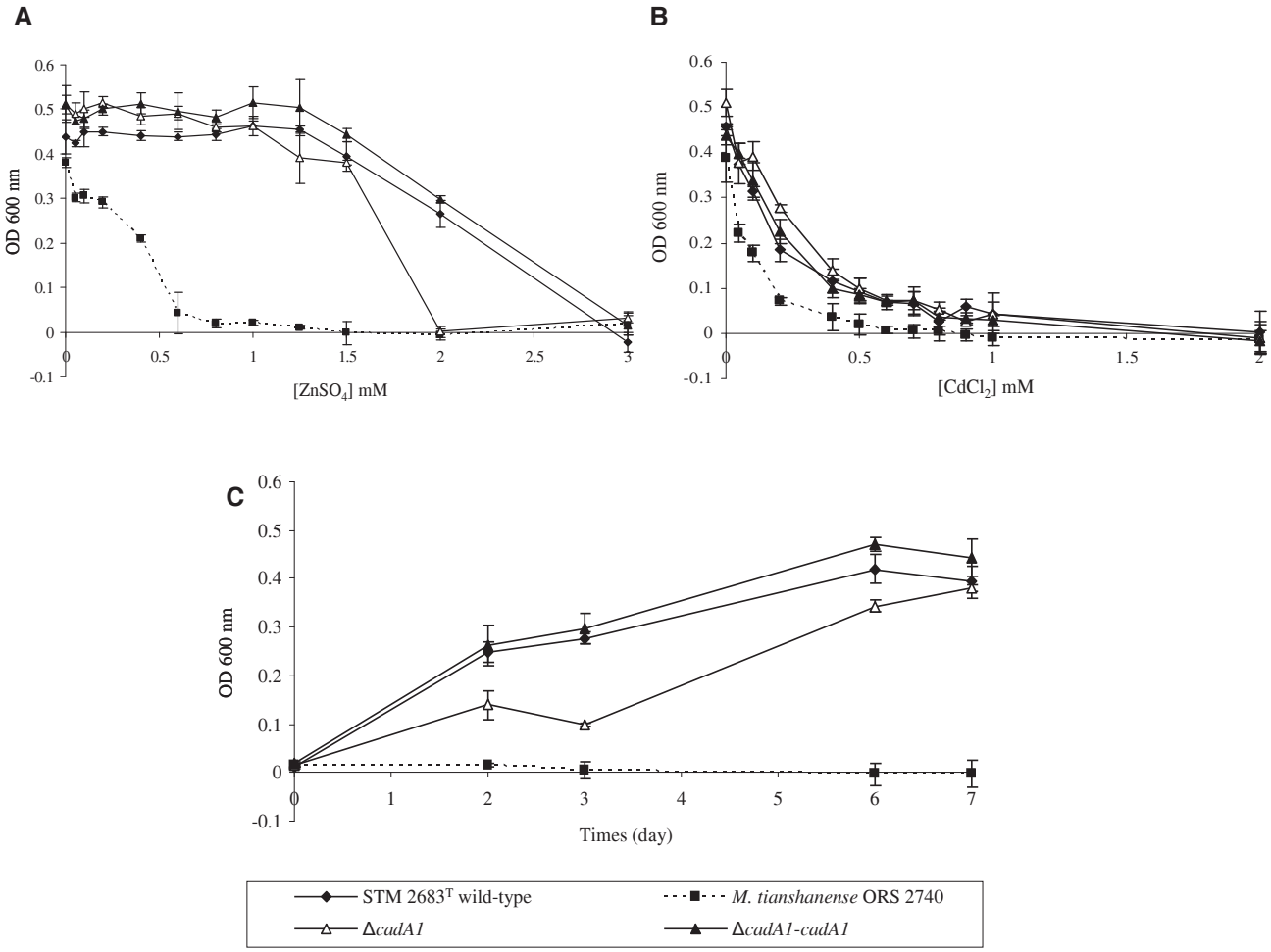


Figure II-3: Effect of *cadA1* deletion on Zn and Cd resistance in *M. metallidurans*. The OD600nm was measured after 7 days growth to determine Zn (A) and Cd (B) MICs, and after 2, 3, 6 and 7 days growth for the time-course assays (C). The data are those obtained for the M. metallidurans STM 2683^T wild-type strain (filled diamonds), the Δ*cadA1* mutant (empty triangles), the ΔcadA1 mutant complemented with the original copy under the control of its own promoter (Δ*cadA1-cadA1* strain, filled triangles) and the sensitive strain M. tianshanense (filled squares). The results are the means ±SD of at least three replicates.

***cadA1* is specifically upregulated by Zn and Cd in a dose-dependent manner and its mutation increases sensitivity to these metals.** Analysis of the *cadA1* promoter region showed that it contained a palindromic 19-bp spacer located 35 to 10 bp upstream of the predicted transcriptional start site of *cadA1* (Figure II-S4). Such a palindromic sequence has been shown to be essential for the binding and the transcriptional control of MerR-type regulators [13]. This sequence (TCCTCTAGCTGCTAGAGGA) is the same as those predicted as binding CadR regulators in several rhizobia [30]. The *cadA1* promoter region of STM 2683^T was cloned upstream of the *gfp*-reporter gene in pPROBE-GT. The *gfp*-fused *cadA1* promoter (renamed pGT-*cadA1*p) as well as the promoter less vector (renamed pGT)

were transferred into STM 2683^T and into the Δ*cadA1* strain by electro-transformation. The transcriptional activity of *cadA1* as assessed by *gfp*-induced fluorescence was examined in the presence of Zn, Cd, Co, Ni, Pb and Zn/Cd mixes. No fluorescence was detected in the presence of Ni (0.01, 0.02 and 0.03 mM), Co (0.01, 0.02 and 0.03 mM) or Pb (0.05, 0.1 and 0.2 mM) (data not shown). By contrast, the fluorescence levels obtained with pGT and pGT-*cadA1*p evidenced statistically significant induction levels as a result of exposure to increasing Zn or Cd concentrations (up to 0.4 mM and 0.05 mM, respectively) (Figure II-4A and B). These *cadA1*-promotor-mediated induction studies showed that Cd concentrations down to 0.05 mM were sufficient to induce the P_{IB}-type ATPase (Figure II-4B). A maximum transcription level was reached at 0.4 mM Cd. As for Zn, it induced a continuous increase in *cadA1* expression up to 2 mM Zn. Based on the observation that the expression level of *cadA1* was metal-specific and dose-dependent, we tested the effect of *cadA1* mutation on its transcriptional activity. To do so, pGT-*cadA1*p was transferred to Δ*cadA1* and its transcriptional responses upon Zn or Cd exposure were analyzed. The relative expression of *cadA1* in these strains and in media containing various Zn or Cd concentrations was recorded and the sigmoidal dose response curve we obtained was fitted to a non linear regression model that allowed us to estimate the slope parameters (Figure II-4C and D). Interestingly, in the Δ*cadA1* strain, higher *cadA1* expression was observed when compared with the STM 2683^T wild-type even when the bacteria were subjected to low heavy metal doses (Figure II-4C and D). Indeed, even without adding metals, the basal *cadA1* transcription level (corresponding to the background expression) in the Δ*cadA1* strain was more than 7-folds higher than in the wild-type (Table II-S3). We also found that the mutant was more sensitive than the wild-type to both metals, as indicated by the lower EC_{50} values obtained in the mutant (Table II-S3). The half maximal effective concentration went down from 1.2 mM in the wild-type to 0.2 mM in the mutant for Zn and from 0.12 mM (wild-type) to 0.043 mM (mutant) for Cd (Table II-S3). These shifts correspond to 6- and 3-fold increased sensitivity of the mutant to Zn and Cd, respectively. We also found that Zn induced a higher (45-fold) maximal induction than Cd (20-fold) in the wild-type genomic background, while maximum induction was respectively 8- and 6-fold in the mutant (Table II-S3). These differences suggest that Zn and Cd mediated inductions are under the control of specific and distinct regulatory complexes. Furthermore, the lower maximum induction observed in the mutant at the highest Zn and Cd concentrations may result from saturated *cadA1* transcriptional activity. Using the slope value fitted from the non-linear regression model mentioned above, the Hill coefficient was found to range from 1.4 to 1.6 (Table II-S3) and was not affected either by

strain or metal, suggesting that a non hypersensitive-type response was triggered in the mutant and the wild-type strains under the conditions we used. To better characterize the regulatory effects of the inducing metals, *cadA1* expression was monitored in the wild-type and the Δ*cadA1* strains when exposed to various Zn and Cd mixes (Figure II-S5A). Comparing *cadA1* relative expression in the mixes to those obtained after summing up the corresponding metal concentrations taken separately (Figure II-S5B and C), we found high correlation factors (R^2) of over 0.99 and 0.94 for the wild-type and the Δ*cadA1* strains, respectively. This suggests that despite different inducing levels triggered by Zn or Cd, *cadA1* transcriptional induction is cumulative.

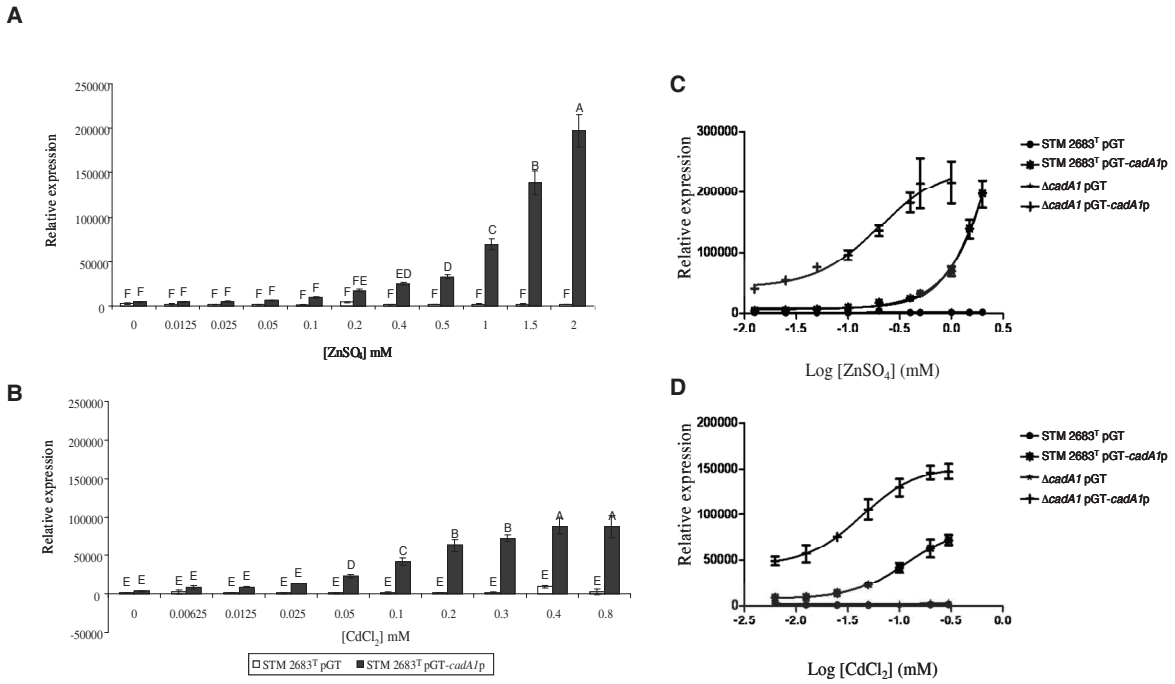


Figure II-4: Effect of various Zn and Cd concentrations on *cadA1* transcription using the *cadA1* promoter fused to a *gfp* construct (pGT-*cadA1*p). *cad*A1 transcriptional levels (black bars) induced by various concentrations of Zn (A) or Cd (B) in the *Mesorhizobium metallidurans* STM 2683^T wild-type were compared to intensities of the promoterless vector pGT (white bars). The Zn (C) and Cd (D) transcriptional response curves obtained for the wild-type strain (filled circles) and the Δ*cadA1* strain (filled squares) are shown. The parameters of the best fitted curves (solid lines in C and D) are shown in Table II-S3. The relative expression values were obtained by substracting the fluorescence values of the non-inoculated control and by normalizing the fluorescence to the OD_{600nm}. The results are the means ± SD of three replicates. Different letters indicate statistically significant (*p-value* < 0.01) differences while identical letters indicate no statistical difference (A, B).

Finally, *cadA1* induction was tested in the presence of a mine-soil water extract obtained from the tailing pond soil of the Avinières mine (*see Experimental procedures*). Chemical analysis of the mine-soil water extract revealed very low metal concentrations (Table II-S4). Only 79.5 µM Zn and 2.2 µM Cd were detected in the mine-soil water extracts

while the mine soil contained 26 mg kg^{-1} soil Zn and 1.24 mg kg^{-1} soil Cd obtained after EDTA-extraction [36]. In the presence of these water extracts, *cadA1* expression level was only twice as high as in STM 2683^T containing the empty pGT, and expression did not increase with increasing mine-soil water extract concentrations, showing that *cadA1* was not induced by the mine-soil water extracts (Figure II-S6A). The non-toxic concentration of the metals contained in the mine-soil water extract from the contaminated mine tailing was confirmed by the normal growth of the metal-sensitive *M. tianshanense* strain ORS 2740 in TY medium prepared with the same mine-soil water extract (corresponding to a dilution of 1/5 (W/V) of the Avinières soil (1X)) (Figure II-S6B).

Mutation of *cadA1* does not impact *M. metallidurans* survival in sterilized mining soil. Survival of the Δ*cadA1* strain and of its complemented clone was tested in contaminated soil from the Avinières mine, previously sterilized by autoclaving. It was compared with positive (STM 2683^T wild-type) and negative (STM 2682) control strains for metal-resistance. The wild-type and its derivatives exhibited a constant population density at about 10^7 CFU g^{-1} of mining soil throughout 15 days (Figure II-5). In contrast, the sensitive *Mesorhizobium* STM 2682 strain completely disappeared after 2 days' incubation. The Δ*cadA1* strain survived in the mining soil as well as the wild-type strain, showing that *cadA1* is dispensable for *M. metallidurans* survival in the highly contaminated soil of the Avinière mine.

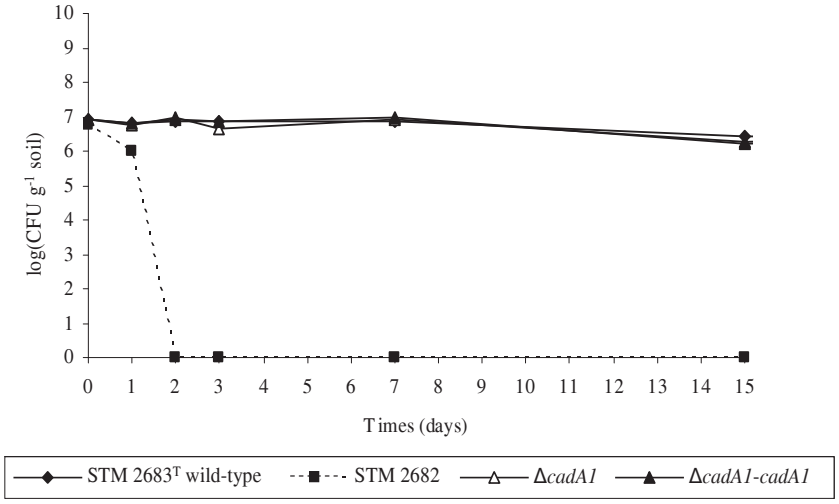


Figure II-5: Time-course of the survival of the mutated strain *Mesorhizobium metallidurans* STM 2683^T (Δ*cadA1*) (empty triangles), the complemented strain (Δ*cadA1-cadA1*) (filled triangles), the *M. metallidurans* STM 2683^T wild-type (filled diamonds) and the sensitive STM 2682 strain (filled squares) in sterilized tailing pond soil over a 15-days period.

Metal resistance and metal efflux systems in the genome of *M. metallidurans* STM 2683^T. The STM 2683^T genome contained at least five and possibly six (*fix*I) genes encoding P_{IB}-type ATPases (Table II-1). Only one gene (MESS2v1_p120012) seemed to be plasmid-borne. The *actP* gene similar to *fixI* (33.3 % identity) appeared to be the only Cu-ATPase in *M. metallidurans*. It lied among housekeeping genes and no putative regulatory gene was detected closely linked to it. The other P_{IB}-type ATPases clustered into two groups based on rather high identities: CadA and ZntA on one side, the products of MESS2v1_p120012 and MESS2v1_1650024 on the other side. Among the P_{IB}-type ATPase genes linked to *M. metallidurans cadA1*, we only detected one regulatory gene (called ZntR), which belongs to the MerR family and is linked to ZntA. No synteny of the *cadA1* gene was observed with any regulatory gene or with a gene involved in gene mobility, but only with a *ccdA*-like gene normally involved in the biogenesis of cytochrome c in various syntenies. In fact, both *ccdA* and *cadA1* gene orthologs have already been observed in a four- or five-gene structure in different *Methylobacter* strains, in *Actinobacteria* and in *Arthrobacter* sp. FB24 which contains three copies. The genes of the *Methylobacter* and *Arthrobacter* strains closely to *M. metallidurans ccdA* and *cadA1* orthologs include at least one regulatory gene (ArsR or MerR family), a peptidase gene and a transporter. The two P_{IB}-type ATPases (MESS2v1_1650024 and MESS2v1_ p120012) identified in the *M. metallidurans* genome are both located near an insertion sequence (IS), possibly a deleted regulatory gene for MESS2v1_1650024 and a deletion of *dsbA* reductase for MESS2v1_p120012. These observations suggest that genes that allow the acquisition of the P_{IB}-type ATPase genes could have been progressively eroded or deleted. When looking for other efflux proteins, we identified the *copCD* genes (MESS2v1_740005-06) and the HME-RND (Heavy Metal Efflux-Resistance Nodulation and cell-Division) *cusBA* (MESS2v1_730254 and MESS2v1_730253) genes that seem to be involved in Cu homeostasis. The *cus* operon lacked a *czc/cusC*-like gene that was replaced by a small gene that is neither an ortholog of *cusC* or *cusF* and for which we coined the name *cusG* (MESS2v1_730255). This *cusGBA* structure seems to be highly conserved in the *Alphaproteobacteria* and *Nitrobacter* genomes (*Betaproteobacteria*). Additionally, remnants of the CDF-family (Cation Diffusion facilitators) *czcD*-like genes (MESS2v1_730268-69) involved in Co, Zn and Cd export were identified in the STM 2683^T genome, near to *ccdA* and *cadA1*. Finally an Hg-resistance operon has to be mentioned not far from the *traG/fixIS* cluster; it contained five genes with the structure *merR/merTPCA* (MESS2v1_30049-53) structure.

Table II-1: Genomic information about the six genes encoding heavy metal P_{IB}-type ATPases sharing at least 30 % identity with *cadA1* in the genome of *Mesorhizobium metallidurans* STM 2683[T].

Gene label[a] (Accession number)	Gene product[b]	Protein size (aa)	Identity with CadA1 (%)	Highest identity (%)	Closely linked regulatory gene	Other linked genes of interest
MESS2v1_740030 (HE820903)	Heavy metal translocating P-type ATPase / CadA1	910	100	ZntA (67.15)	ND[c]	*ccdA* (MESS2v1_740029) Putative Zn transporter (MESS2v1_740027)
MESS2v1_10039 (HE965426)	Copper transport ATPase / FixI	760	31	ActP (33.33) MESS2v1_p120012 (31.79)	ND	25-gene block *glmS*/*traG*/*copG*/ *trbBCDEJLFGI/gir/hemN/fnrN/fixNOPGHIS* are conserved in five *Mesorhizobium* genomes
MESS2v1_1050036 (HE965427)	Copper-transporting P-type ATPase / ActP	834	40	FixI (33.33)	ND	Five genes *mutS/yeaE/glnD/mviN/trpS* are conserved in five *Mesorhizobium* genomes
MESS2v1_980073 (HE965428)	zinc, cobalt and lead efflux / ZntA	748	67.15	CadA1 (67.15)	*zntR* (MESS2v1_980074)	Unknown
MESS2v1_1650024 (HE965430)	Cadmium-exporting ATPase	822	38.01	MESS2v1_p120012 (72.62)	ND	Possible deleted remnant of a MerR regulator seen in *H. arsenicooxydans* (MESS2v1_1650027) Deleted Insertion Sequence (IS) 4-like (MESS2v1_1650029)
MESS2v1_p120012 (HE965429)	Heavy metal translocating P-type ATPase	842	35.29	MESS2v1_1650024 (72.62)	ND	Fragment of *dsbA* reductase (MESS2v1_120011) Fragment of transposase (MESS2v1_120014)

[a] Genes named by gene labels from MaGe.
[b] Gene products deduced from automatic or manual (only *cadA1*) annotations.
[c] not detected.

DISCUSSION

We identified a new, 910-aa P_{IB}-type ATPase involved in Zn/Cd transport in *M. metallidurans* STM 2683^T, a nitrogen-fixing bacterium isolated from root nodules of the metallicolous legume *Anthyllis vulneraria* [65]. We named it CadA in reference to the Cd resistant phenotype of the first *E. coli* MPCdR2 cosmid clone we isolated and to its homology with CadA of *Staphylococcus aureus* and CadA1 because it is the first CadA-type protein identified in *M. metallidurans*. We demonstrated that the protein sequence of CadA1 is similar to the best characterized P_{IB}-type ATPase efflux transporters, *i.e.* ZntA of *Escherichia coli* [9] and CadA of *S. aureus* [47] that are known to transport $Zn^{2+}/Cd^{2+}/Pb^{2+}$ and promote metal detoxification *via* cytoplasmic efflux. Moreover, CadA1 displays high identity (> 60 %) with another rhizobial P_{IB}-type ATPase that was functionally showed to play a crucial role in the defense against Cd and Zn stress in *Ensifer meliloti* [60]. CadA1 sequence structure indicates that it is involved in metal resistance and we showed that it conferred *M. metallidurans* higher resistance during its growth at high Zn concentrations. In addition, *cadA1* was specifically induced by Zn and Cd, supporting a role in the resistance of *M. metallidurans* to these metals.

CadA1 displays all the key features of P_{IB}-type ATPases involved in metal export [4], including two functional domains predicting metal resistance activities that are characteristic of the P_{IB-2} subgroup of ATPases. These two domains are as follows: first, the TM6-MBD contains a CPCALVISTP motif (CPX-type) with a serine (S) and a threonine (T) downstream of the proline (P) residue and secondly, the C-MBD contains an $N(X)_7K(X)_{20}DXG(X)_7N$ motif in the TM7-8. Both are described as necessary for the pump to function and have its resistance activity [20, 59, 38]. Thus, CadA1 belongs to the P_{IB-2} subgroup of ATPases typically involved in Zn^{2+}/Cd^{2+} transport. By contrast, in the N-terminal region, most P_{IB}-type ATPases contain one or more N-MBDs that are not essential for ATP hydrolysis and metal transport. Nevertheless, N-MBDs can exhibit a GXXCXXC motif (part of the HMA domain) and/or histidine-rich residues $(HX)_n$ involved in metal regulation [6, 37]. Among prokaryotes, up to three HMA domains are present in (Cu^+/Ag^+) P_{IB-1}-type ATPases. P_{IB-2}-type ATPases $(Zn^{2+}/Cd^{2+}/Pb^{2+})$ generally contain a unique HMA domain which is rarely duplicated. $(HX)_n$ motifs are only found in P_{IB-2}, P_{IB-3} and P_{IB-4}-type ATPases. P_{IB-2}-type ATPases form the only subgroup containing transporters that bear both types of N-MBDs (*i.e.* a GXXCXXC and an $(HX)_n$ motifs). CadA1 has the distinctive feature of carrying four N-MBDs containing a duplicated GXXCXX motif (or a duplicated HMA domain) and a duplicated $(HX)_n$ motif downstream of the GXXCXXC motifs, which makes it an outlier among known P_{IB-2}-type

ATPases. Only 3 out of the 47 P_{IB-2}-type ATPases described in Arguello's database show both a duplicated GXXCXX motif and a duplicated $(HX)_n$ motif [4]. Since then, a duplicated HMA domain has been evidenced in a few P_{IB-2}-type ATPases: Meso 4129 of *C. multitrophicus* BNC1 (an EDTA-degrading strain), EEQ96899 of *Ochrobactrum intermedium* LMG 3301 (a Cr-resistant strain) and CadA of *S. aureus* subsp. *aureus* MRSA252 (a metal- and methicillin-resistant bacterium); all these strains share the common feature of being isolated from industrial and medical environments.

According to functional analyses, STM 2683^T *cadA1* gene confers Zn and Cd resistance to *E. coli,* whereas it was proved important for tolerance to high Zn concentrations but not essential for Cd resistance during *M. metallidurans* cell growth. The phenotypic differences observed between the two species can be explained by the different genetic backgrounds of the two strains, which show contrasting properties as far as metal resistance is concerned. STM 2683^T is well adapted to metals [65] and may contain a larger genetic arsenal for tolerating toxic metals that could compensate for the absence of CadA1. Such genes involved in metal adaptation and allowing the complementation of the defective CadA1 function can belong to efflux systems or to metal sequestration detoxification processes. In the automatically annotated genome of STM 2683^T, we identified three other P-type ATPases that shared high identity with CadA1 (*e.g.* ZntA involved in Zn export (56)) and a fourth one, ActP [58] involved in Cu export, with lower identity. Besides P_{IB}-type ATPases, only remnants of CDF-family genes (*czcD*-like as previously described in *Cupriavidus metallidurans* [3]) and only one HME-RND-type representative (CusGBA previously described in *E. coli* [50]) were identified in the *M. metallidurans* genome. This emphasizes the central role of P_{IB}-type ATPases in heavy metal detoxification in *M. metallidurans*. Additionally, the tight clustering of the genes involved in the response to heavy metals observed in the *C. metallidurans* CH34 genome [66] was not found in the *M. metallidurans* genome. Only *copCD* genes, remnants of *czcD*-like genes, and *cusGBA* genes are located close to *cadA1*. We can speculate that in symbiotic bacteria adapted to metal-contaminated soils, the acquisition of metal resistance genes occurred a very long time ago and that horizontal gene transfer traces, if any, were considerably eroded. In addition to efflux systems, other mechanisms allowing bacteria to tolerate high Zn or Cd levels could participate in bacterial tolerance to these metals. For example, intracellular metal sequestration through the production of chelating agents has been evidenced: metallothioneins have been found, such as SmtA from *Synechococcus* PCC 7942 or BmtA from *Pseudomonas* and *E. coli* strains [11]; glutathione described in the early response to oxidative stresses, (for instance in *R.*

leguminosarum bv. *viciae* [21]); more generally, cysteine-rich proteins may play a role in the transient trapping of excess metal prior to export [69, 70]. Our results indicate that *cadA1* alone does not confer maximal metal resistance to *M. metallidurans*. Resistance probably relies on several systems (as presented above) that interact in an as-yet undefined way. The combination of these metal tolerance systems within a single strain was previously described in *C. metallidurans* CH34 [43, 64] and in *E. coli* [69, 70] and altogether guarantees a maximal metal resistance.

The analysis of the promoter region upstream of the *cadA1* gene revealed a regulatory consensus site previously described in other rhizobia [30, 51], which is recognized by a MerR-family transcriptional regulator. MerR-family proteins regulate detoxification systems aimed at several metals, including Zn or Cd [12, 13, 24]. This suggests that *cadA1* is also regulated by a MerR-family transcriptional regulator. Transcriptional analyses of *cadA1* revealed that it was specifically induced by Zn^{2+} and Cd^{2+}. Our data showed that Cd activated *cadA1* transcription at lower concentrations than Zn with a lower EC_{50} value. This could be acceptable for a toxic and non essential metal and if the efflux system is involved in the extrusion of Zn and Cd divalent cations. The higher sensitivity to metals observed in the Δ*cadA1* mutant, as estimated by the apparent EC_{50} shifts, suggests that in the Δ*cadA1* strain, higher intracellular heavy metal concentrations accumulate in bacteria and could result from lower efflux efficiency caused by *cadA1* deficiency. We found that in the absence of *cadA1*, metals present in the culture media (probably Zn) were sufficient to induce its transcription, suggesting that this transporter is functional in metal export, as described previously for ZntA of *E. coli* [10]. Additionally, when we compared the expression levels obtained when both inducing metals are present in the growth medium to those obtained *in silico* (by summing up the relative expressions induced by the same amounts of metals when added separately to the medium), we found that *cadA1* induction is cumulative for the metal concentrations tested. Such experiments indicate that Zn- and Cd-mediated *cadA1* transcription might be under the control of specific regulatory complexes which do not compete, at least under the conditions tested. Complex regulation involving two distinct Mer regulators (MerR/MerD) which specifically bind to the same DNA operator site upstream of the *mer* operon has been described [45]. As no regulatory gene was identified in the synteny of the P_{IB}-type ATPase genes of the *M. metallidurans* genome (except for ZntA and ZntR), *cadA1* gene regulation should be considered mainly outside of its direct genetic environment with possible action exerted *in trans* exerted *via* unlinked genes, and it could be interesting to check if ZntR affects *cadA1* transcription.

Finally, when the Δ*cadA1* strain was introduced into the Avinières substratum, it survived like the STM 2683^T wild-type whereas the sensitive *Mesorhizobium* strain collapsed down to undetectable levels two days post inoculation. This result suggests that *cadA1* alone is not essential for metal resistance when *M. metallidurans* cells survive in mine environments. Our results indicate that *cadA1* represents a portion of the heavy-metal resistance arsenal which can help bacterial survival, although its transcriptional activity was not detected using heavy-metal water extracts from the Avinières soil. However, water extraction from the mine substrate recovered only a fraction of the most available metal cations, biologically speaking, present in that soil. This could explain that the water-extracted solution was not toxic while the soil solution from the mine substrate itself could be. Indeed, compared to the concentrations obtained by EDTA-extraction that detect higher metal contents, the mine-soil water extracts contained far less metals (1350-fold less for Zn and 13-fold less for Cd, [36]). The lack of *cadA1* induction by our mine-soil water extracts and the observed growth of the sensitive *Mesorhizobium* strain using these same extracts could be attributed to the absence of toxicity of the water extracts from the Avinières mine. *In situ*, bacteria can be expected to face much higher metal concentrations locally than revealed by our water extract measurements. This hypothesis is supported by the fact that the survival test showed that the sensitive *Mesorhizobium* strain could not recover after 2 days exposure in the soil substratum in our survival test. Water has been showed to extract only a small fraction of available metals, unlike chelating agents such as soluble organic species (for example EDTA or DTPA) that could better represent the true bioavailable metals in mining soils [34, 49].

In conclusion, this article demonstrates that *cadA1* that encodes an efflux system P_{IB-2}-type ATPase involved in the Zn resistance in *M. metallidurans*. Our data suggest that *cadA1* may be required together with other genes involved for metal adaptation allowing *Mesorhizobium* to grow and/or survive in soils highly contaminated by metals. To get more detailed information on systems that act along with the CadA1 P_{IB}-type ATPase, further work has been undertaken to get a global view of the different systems involved in Zn and Cd resistance responses by *M. metallidurans*. Preliminary results of a transcriptomic analysis show that *cadA1* is one of the top-induced genes after Cd or Zn stresses (Maynaud *et al.* unpublished), confirming its central role in the metal resistance response of *M. metallidurans*.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche Programme « Contaminants, Ecosystèmes et Santé » (CES 2008-12, APTITUDE). G.M. received a PhD grant from the Ministère de la Recherche et de l'Education Nationale. We thank the French National Sequencing Center (Genoscope) for their helpful assistance in sequencing, annotating the *Mesorhizobium metallidurans* STM 2683^T genome and using the MicroScope platform.

REFERENCES

[1] **Aiking H, Kok K, van Heerikhuizen H, van 't Riet J.** 1982. Adaptation to cadmium by *Klebsiella aerogenes* growing in continuous culture proceeds mainly via formation of cadmium sulfide. Appl. Environ. Microbiol. **44**:938-944.

[2] **Andreini C, Bertini I, Cavallaro G, Holliday G, Thornton J.** 2008. Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. J. Biol. Inorg. Chem. **13**:1205-1218.

[3] **Anton A, Grobe C, Reibmann J, Pribyl T, Nies DH.** 1999. CzcD is a heavy metal ion transporter involved in regulation of heavy metal resistance in *Ralstonia* sp. strain CH34. J. Bacteriol. **181:**6876-6881.

[4] **Argüello JM. 2003.** Identification of ion-selectivity determinants in heavy-metal transport P_{1B}-type ATPases. J. Membrane. Biol. **195**:93-108.

[5] **Axelsen KB, Palmgren MG.** 1998. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. J. Mol. Evol. **46**:84-101.

[6] **Bal N, Mintz E, Guillain F, Catty P.** 2001. A possible regulatory role for the metal-binding domain of CadA, the *Listeria monocytogenes* Cd^{2+}-ATPase. FEBS Letters **506**:249-252.

[7] **Banci L, Bertini I, Ciofi-Baffoni S, Su XC, Miras R, Bal N, Mintz E, Catty P, Shokes JE, Scott RA.** 2006. Structural basis for metal binding specificity: the N-terminal cadmium binding domain of the P1-type ATPase CadA. J. Mol. Biol. **356**:638-650.

[8] **Bauer DW, Collmer A.** 1997. Molecular cloning, characterization and mutagenesis of a *pel* gene from *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* encoding a member of the *Erwinia chrysanthemi* PelADE family of pectate lyases. MPMI **10**:369-379.

[9] **Beard SJ, Hashim R, Membrillo-Hernandez J, Hughes MN, Poole RK.** 1997. Zinc(II) tolerance in *Escherichia coli* K-12: evidence that the *zntA* gene (o732) encodes a cation transport ATPase. Mol. Microbiol. **25**:883-891.

[10] **Binet MRB, Poole RK.** 2000. Cd(II), Pb(II) and Zn(II) ions regulate expression of the metal-transporting P-type ATPase ZntA in *Escherichia coli*. FEBS Letters **473**:67-70.

[11] **Blindauer CA, Harrison MD, Robinson AK, Parkinson JA, Bowness PW, Sadler PJ, Robinson NJ. 2002.** Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like zinc fingers. Mol. Microbiol. **45**:1421-1432.

[12] **Brocklehurst KR, Megit SJ, Morby AP.** 2003. Characterisation of CadR from *Pseudomonas aeruginosa*: a Cd(II)-responsive MerR homologue. Biochem. Biophys. Res. Commun. **308**:234-239.

[13] **Brown NL, Stoyanov JV, Kidd SP, Hobman JL.** 2003. The MerR family of transcriptional regulators. FEMS Microbiol. Rev. **27**:145-163.

[14] **Bruins MR, Kapil S, Oehme FW.** 2000. Microbial resistance to metals in the environment. Ecotoxicol. Environ. Saf. **45**:198-207.

[15] **Carrasco JA, Armarioc P, Pajueloa E, Burgosa A, Caviedesc MA, Lopez R, Chambera MA, Palomares AJ.** 2005. Isolation and characterization of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcollar pyrite mine. Soil Biol. Biochem. **37**:1131-1140.

[16] **Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM, Gascuel O.** 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. Nucl. Acids Res. **36:**465-469.

[17] **Doronina NV, Kaparullina EN, Trotsenko YA, Nörtemann B, Bucheli-Witschel M, Weilenmann HU, Egli T.** 2009. *Chelativorans multitrophicus* gen. nov., sp. nov. and *Chelativorans oligotrophicus* sp. nov., aerobic, EDTA-degrading bacteria. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **60**:1044–1051.

[18] **Durfee T, Nelson R, Baldwin S, Plunkett G 3rd, Burland V, Mau B, Petrosino JF, Qin X, Muzny DM, Ayele M, Gibbs RA, Csörgo B, Pósfai G, Weinstock GM, Blattner FR.** 2008. The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. J. Bacteriol. **190**:2597-2606.

[19] **Dutta SJ, Liu J, Hou Z, Mitra B.** 2006. Conserved Aspartic Acid 714 in transmembrane segment 8 of the ZntA subgroup of P_{1B}-Type ATPases is a metal-binding residue. Biochemistry **45**:5923-5931.

[20] **Fan B, Rosen BP.** 2002. Biochemical characterization of CopA, the *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. J. Biol. Chem. **49**:46987-46992.

[21] **Figueira EM, Lima AI, Pereira SI.** 2005. Cadmium tolerance plasticity in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*: glutathione as a detoxifying agent. Can. J. Microbiol. **51**:7-14.

[22] **Frérot H, Lefèbvre C, Gruber W, Collin C, Dos Santos A, Escarré J.** 2006. Specific interaction between local metallicolous plants improve the phytostabilization of mine soils. Plant Soil **282**:53-65.

[23] **Hakkila KM, Nikander PA, Junttila SM, Lamminmäki UJ, Virta MP.** 2011. Cd-specific mutants of mercury-sensing regulatory protein MerR, generated by directed evolution. Appl. Environ. Microbiol. **77**:6215-6224.

[24] **Hantke K.** 2001. Bacterial zinc transporters and regulators. BioMetals **14**:239–249.

[25] **Hayashi M, Maeda Y, Hashimoto Y, Murooka Y.** 2000. Efficient transformation of *Mesorhizobium huakuii* subsp. *rengei* and *Rhizobium* species. J. Biosci. Bioeng. **89**:550-553.

[26] **Iqbal A, Hayat S, Aqil A, Samiullah AI.** 2001. Metal and antibiotic resistance traits in *Bradyrhizobium* sp. (cajanus) isolated from soil receiving oil refinery wastewater. World J. Microbiol. Biotechnol. **17**:379-384.

[27] **Jarvis BDW, Van Berkum P, Chen WX, Nour SM, Fernandez MP, Cleyet-Marel JC, Gillis M.** 1997. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov.. Int. J. Syst. Bacteriol. **47**:895-898.

[28] **Kampa M, Castanas E.** 2008. Human health effects of air pollution. Environ. Pollution **151**:362-367.

[29] **Kaplan JH.** 2002. Biochemistry of Na, K-ATPase. Annu. Rev. Biochem. **71**:511-535.

[30] **Kazakov AE, Kalinina OV, Permina EA, Gelfand MS.** 2004. Bacterial metal resistance systems regulated by transcription regulators of the *merR* family, p 91-94. Proceeding of the 4th International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure (BRG'2004), Novosibirsk, Russia.

[31] **Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S.** 1999. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **39**:267-294.

[32] **Koch HG, Winterstein C, Saribas AS, Alben JO, Daldal F.** 2000. Roles of the *ccoGHIS* gene products in the biogenesis of the cbb3-type cytochrome c oxidase. J. Mol. Biol. **297**:49-65.

[33] **Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, Peterson KM.** 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. Gene **166**:175-176.

[34] **Kumar B, Kumar S, Mishra M, Singh SK, Prakash D, Sharma SC, Mukherjee DP.** 2011. Geochemical fractionation of some heavy metals in soils in the vicinity of sukinda mining Area, Orissa. Adv. Appl. Sci. Res. **2**:263-272.

[35] **Liu J, Stemmler AJ, Fatima J, Mitra B.** 2005. Metal-binding characteristics of the amino-terminal domain of ZntA binding of lead is different compared to cadmium and zinc. Biochemistry **44**:5159-5167.

[36] **Mahieu S, Frérot H, Vidal C, Galiana A, Heulin K, Maure L, Brunel B, Lefèbvre C, Escarré J, Cleyet-Marel JC.** 2011. *Anthyllis vulneraria/Mesorhizobium metallidurans*: an efficient symbiotic nitrogen fixing association able to grow in mine tailings highly contaminated by Zn, Pb and Cd. Plant Soil **342**:405-417.

[37] **Mana-Capelli S, Mandal AK, Arguello J.** 2003. *Archaeoglobus fulgidus* CopB is a thermophilic Cu^{2+}-ATPase. J. Biol. Chem. **278**:40534-40541.

[38] **Mandal AK, Arguello JM.** 2003. Functional roles of Metal Binding Domains of the *Archaeoglobus fulgidus* Cu^{+}-ATPase CopA. Biochemistry **42**:11040-11047.

[39] **Mandal SM, Pati BR, Das AK, Ghosh AK.** 2008. Characterization of a symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic: Isolated from the root nodules of *Vigna mungo* (L.) hepper grown in an arsenic-contaminated field. J. Gen. Appl. Microbiol. **54**:93-99.

[40] **Miller WG, Leveau JHJ, Lindow SE.** 2000. Improved *gfp* and *inaZ* Broad-Host-Range Promoter-Probe Vectors. MPMI **13**:1243-1250.

[41] **Misra TK.** 1992. Bacterial resistances to inorganic mercury salts and organomercurials. Plasmids **27**:4-16.

[42] **Mitra B, Sharma R.** 2001. The Cysteine-rich amino-terminal domain of ZntA, a Pb(II)/Zn(II)/Cd(II)-Translocating ATPase from *Escherichia coli*, is not essential for its function. Biochemistry **40**:7694-7699.

[43] **Monchy S, Benotmane MA, Janssen P, Vallaeys T, Taghavi S, van der Lelie D, Mergeay M.** 2007. Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* are specialized in the maximal viable response to heavy metals. J. Bacteriol. **189**:7417-7425.

[44] **Morozkina EV, Slutskaia ES, Fedorova TV, Tugaĭ TI, Golubeva LI, Koroleva OV.** 2010. Extremophilic microorganisms: Biochemical adaptation and biotechnological application (review). Appl. Biochem. Microbiol. **46**:1-14.

[45] **Mukhopadhyay D, Yu HR, Nucifora G, Misra TK.** 1991. Purification and functional characterization of MerD. A coregulator of the mercury resistance operon in gram-negative bacteria. J. Biol. Chem. **266**:18538-18542.

[46] **Nies DH.** 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. FEMS Microbiol. Rev. **27**:313-339.

[47] **Nucifora G, Chu L, Misra TK, Silver S.** 1989. Cadmium resistance from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258 *cadA* gene results from a cadmium-efflux ATPase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **86**:3544-3548.

[48] **Nwuche CO, Ugoji EO.** 2008. Effects of heavy metal pollution on the soil microbial activity. Int. J. Environ. Sci. Tech. **5**:409-414.

[49] **Okuku EO, Peter HK.** 2012. Choose of heavy metals pollution biomonitors: A critic of the method that uses sediments total metals concentration as the Benchmark. Int. J. Environ. Res. **6**:313-322.

[50] **Outten FW, Huffman DL, Hale JA, O'Halloran TV.** 2001. The independent *cue* and *cus* systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **276**:30670-30677.

[51] **Permina EA, Kazakov AE, Kalinina OV, Gelfand MS.** 2006. Comparative genomics of regulation of heavy metal resistance in Eubacteria. BMC Microbiology **6**:49.

[52] **Prentki P, Krisch HM.** 1984. In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. Gene **29**:303-313.

[53] **Quandt J, Hynes MF.** 1993. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. Gene **127**:15-21.

[54] **Ralston DM, O'Halloran TV.** 1990. Ultrasensitivity and heavy-metal selectivity of the allosterically modulated MerR transcription complex. Proc. Natl. Acad. Sci. **87**:3846-3850.

[55] **Rapisarda VA, Chehín RN, De Las Rivas J, Rodríguez-Montelongo L, Farías RN, Massa EM.** 2002. Evidence for Cu(I)-thiolate ligation and prediction of a putative copper-binding site in the *Escherichia coli* NADH dehydrogenase-2. Arch. Biochem. Biophys. **405**:87-94.

[56] **Rensing C, Mitra B, Rosen BP.** 1997. The *zntA* gene of *Escherichia coli* encodes a Zn(II)-translocating P-type ATPase. Proc. Natl. Acad. Sci. **94**:14326-14331.

[57] **Rensing C, Fan B, Sharma R, Mitra B, Rosen BP.** 2000. CopA: an *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **97**:652-656.

[58] **Reeve WG, Tiwari RP, Kale NB, Dilworth MJ, Glenn AR.** 2002. ActP controls copper homeostasis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and *Sinorhizobium meliloti* preventing low pH-induced copper toxicity. Mol. Microbiol. **43**:981-991.

[59] **Rice WJ, MacLennan DH.** 1996. Scanning mutagenesis reveals a similar pattern of mutation sensitivity in transmembrane sequences M4, M5, and M6, but not in M8, of the Ca^{2+}-ATPase of sarcoplasmic reticulum (SERCA1a). J. Biol. Chem. **271**:31412-31419.

[60] **Rossbach S, Mai DJ, Carter EL, Sauviac L, Capela D, Bruand C, de Bruijn FJ.** 2008. Response of *Sinorhizobium meliloti* to elevated concentrations of cadmium and zinc. Appl. Environ. Microbiol. **74**:4218-4221.

[61] **Rutherford JC, Cavet JS, Robinson NJ.** 1999. Cobalt-dependent transcriptional switching by a dual-effector MerR-like protein regulates a cobalt-exporting variant CPx-type ATPase. J. Biol. Chem. **274**:25827-25832.

[62] **Sambrook J, Fritschi EF, Maniatis T.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual.

[63] **Sharma R, Schimke R.** 1996. Preparation of electrocompetent *E. coli* using salt-free growth medium. BioTechniques **20**:42-44.

[64] **Taghavi S, Lesaulnier C, Monchy S, Wattiez R, Mergeay M, van der Lelie D.** 2009. Lead(II) resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34: interplay between plasmid and chromosomally-located functions. Antonie van Leeuwenhoek **96**:71-182.

[65] **Vidal C, Chantreuil C, Berge O, Mauré L, Escarré J, Béna G, Brunel B, Cleyet-Marel JC.** 2009. *Mesorhizobium metallidurans* sp. nov., a metal-resistant symbiont of *Anthyllis vulneraria* growing on metallicolous soil in Languedoc, France. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **59**:850-855.

[66] **von Rozycki T, Nies D.** 2009. *Cupriavidus metallidurans*: evolution of a metal-resistant bacterium. Antonie van Leeuwenhoek **96**:115-139.

[67] **Wang A, Crowley DE.** 2005. Global gene expression responses to cadmium toxicity in *Escherichia coli.* J. Bacteriol. **187**:3259-3266.

[68] **Wuana RA, Okieimen FE.** 2011. Heavy metals in contaminated soils: A review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. ISRN Ecology Article **2011**:1-20.

[69] **Yamamoto K, Ishihama A.** 2005. Transcriptional response of *Escherichia coli* to external zinc. J. Bacteriol. **187**:6333-6340.

[70] **Zhang JH, Min H.** 2010. Characterization of a multimetal resistant *Burkholderia fungorum* isolated from an e-waste recycling area for its potential in Cd sequestration. World J. Microbiol. Biotechnol. **26**:371-374.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

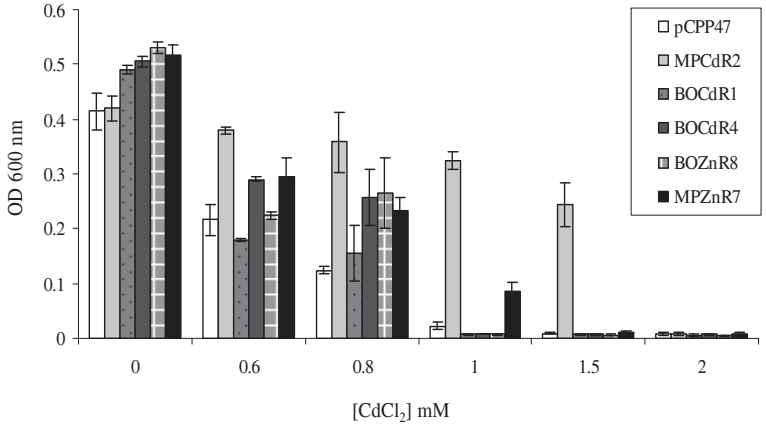


Figure II-S1: Cd resistance of five *Escherichia coli* XL1-Blue MR cosmid clones containing an insert of *Mesorhizobium metallidurans* STM 2683^T type strain (MPCdR2, BOCdR1, BOCdR4, BOZnR8 and MPZnR7) compared with the insert-free negative control (pCPP47) (white).The OD_{600nm} was measured after 24 hours growth. The results are the means of three replicates. Bars indicate the standard deviations from the means (± SD).

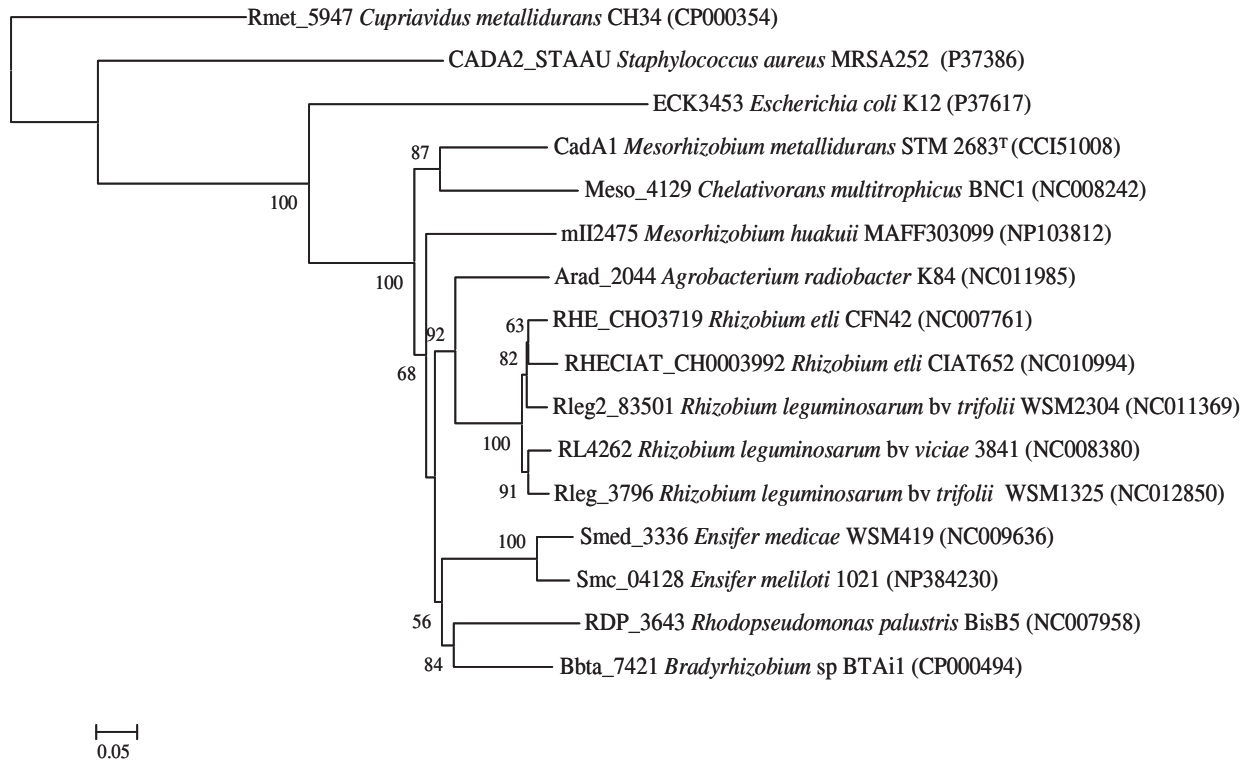


Figure II-S2: Maximum likelihood tree of putative CadA1 of *Mesorhizobium metallidurans* STM 2683^T, showing the phylogenetic relationships of 12 P_{IB}-type ATPases from rhizobia and relative strains, ZntA of *Escherichia coli* and CadA of *Staphylococcus aureus*.The tree is rooted using *Cupriavidus metallidurans* CH34 as an outgroup. Genbank accession numbers are given next to strain numbers and the significance of each branch is indicated by a bootstrap value calculated for 500 subsets at the major branching points.

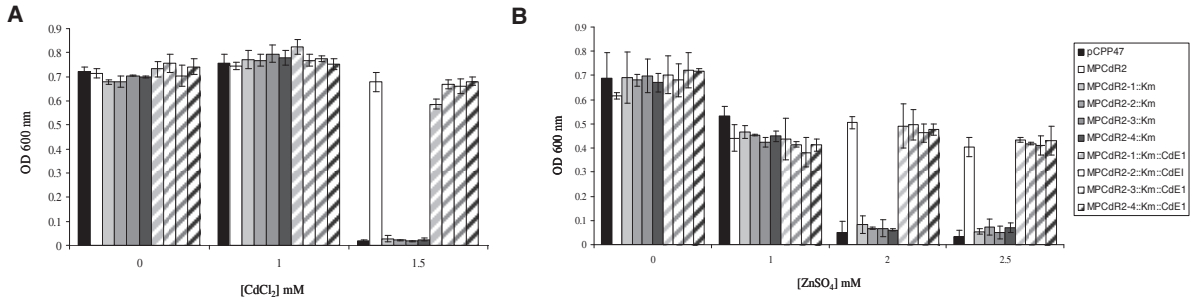


Figure II-S3: Cd (A) and Zn (B) resistance of four *Escherichia coli* EC100 clones (grey bars) containing MPCdR2::ΩKm and four complemented clones (hatched bars), compared with the EC100 MPCdR2 wild-type (white bars) and a negative control (EC100 containing an empty pCPP47) (black bars).The OD_{600nm} was measured after 4 days growth. The results are the means ± SD of at least three replicates.



Figure II-S4: Relevant features of the *cadA1* promoter sequence of *Mesorhizobium metallidurans* STM 2683^T. The transcriptional start site (downward arrowhead), the probable -10 and -35 sequences (bold) and the inverted repeat sequence (arrow) are indicated.

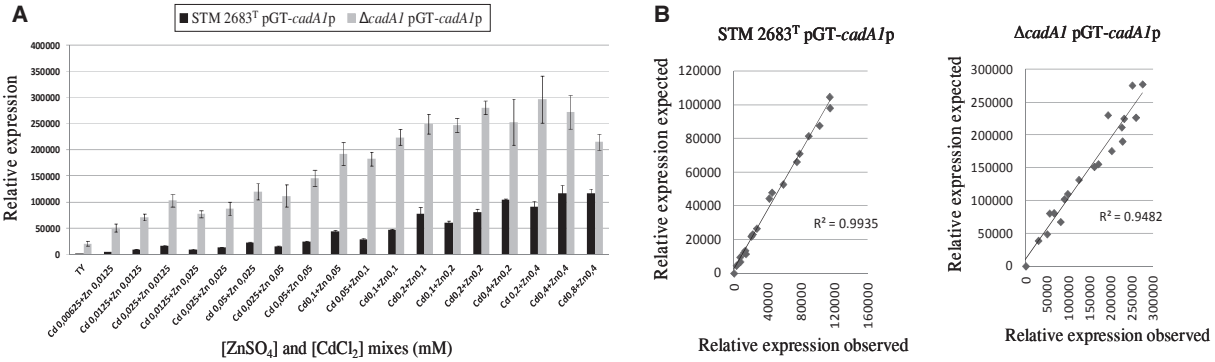


Figure II-S5: The mean relative expression of *cadA1* in STM 2683^T (black bars) or in the Δ*cadA1* strain (grey bars) grown on various Zn and Cd mixes (A) was calculated from three replicates. Bars indicate means ±SD. The relative expression values observed from the mixed metal solutions (X axis) were plotted against the relative expression values expected by adding the corresponding relative expression values obtained from single metal solutions (Y axis). They are shown for STM 2683^T (B) and for the Δ*cadA1* strain (C). The OD_{600nm} and fluorescence intensity were measured after 2 days growth. The relative expression values were obtained by substracting the normalized data corresponding to the pGT-*cadA1*p constructs from those obtained with the promoterless pGT vectors. Finally, to test if the relative expression in Zn and Cd mixes was correlated to the sum of the relative expression value in single metal assays (B and C), the normalized relative expression values observed in the presence of metal were corrected by the expression values obtained in the TY control medium.

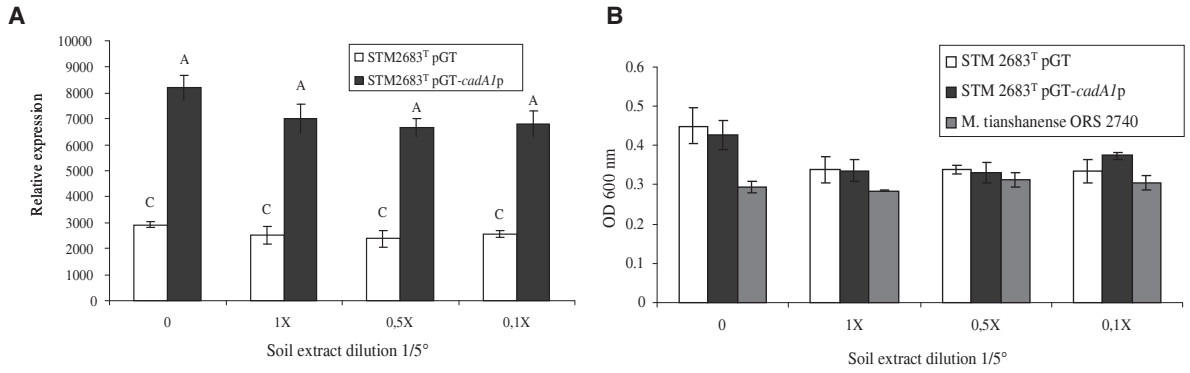


Figure II-S6: Expression of STM 2683^T pGT-*cadA1*p (black bars) compared with STM 2683^T containing an empty pGT (white bars) (A) and growth of *M. tianshanense* ORS 2740 (grey bars) compared with two *M. metallidurans* STM 2683^T constructions (B) in the presence of water-extracted soil from a tailing pond of the Avinières mine. The OD_{600nm} and fluorescence were measured after 4 days growth. The relative expression values were obtained by substracting the fluorescence values of the non-inoculated control and by normalizing the fluorescence to the OD_{600nm}. The results are the means ± SD of at least three replicates. Different letters indicate statistically significant (*p-value* < 0.01) differences while identical letters indicate no statistical difference (A).

Table II-S1: Strains, plasmids, cosmids and primers used.

Strains/plasmids/primers	Characteristics	Source/reference/amplified region
Strains		
Escherichia coli		
XL1-Blue MR	Δ(*mcrA*)183 Δ(*mcrCB*-hsdSMR-*mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac*	Stratagene
DH10B	F- *endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL* Δ*lac*X74 Φ80l*ac*ZΔM15 *araD139* Δ(ara,leu)7697 *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) λ-	18
EC100	TransforMax EC100 Electrocompetent *E. coli*	Epicentre
Mesorhizobium sp.		
M. metallidurans STM 2683^T	wild-type	65
M. metallidurans STM 2683^T Δ*cadA1*	*cadA1*-deleted strain, Km^R	This study
M. metallidurans STM 2683^T Δ*cadA1-cadA1*	Complemented strain, Km^R, Gm^R	This study
Mesorhizobium sp. STM 2682	wild-type	36
M. tianshanense ORS 2740^T	wild-type	27
Plasmids		
pCPP47	Broad-host-range cosmid derived from pCPP34, tandem cos+, par+, Tcr^R	8
MPCdR2	pCPP47 containing a 40-kb STM 2683^T *Eco*RI fragment, Tc^R	This study
BOCdR1	pCPP47 containing a 40-kb STM 2683^T *Eco*RI fragment, Tc^R	This study
BOCdR4	pCPP47 containing a 40-kb STM 2683^T *Eco*RI fragment, Tc^R	This study
BOZnR8	pCPP47 containing a 40-kb STM 2683^T *Eco*RI fragment, Tc^R	This study
MPZnR7	pCPP47 containing a 40-kb STM 2683^T *Eco*RI fragment, Tc^R	This study
pBBR1MCS-5	Broad-host-range cloning vector, Gm^R	33
pBBR1-CdEI	pBBR1MCS-5 containing *Eco*RI Cd^R insert, Gm^R	This study
pBBR1-*cadA1*	pBBR1MCS-5 containing *Xba*I *cadA1* gene with its promotor, Gm^R	This study

EZ: : Tn<KAN-2>Tnp	Transposome; Km^R	Epicentre
MPCdR2-1::ΩKm	MPCdR2 derivative constructed by random insertion into ΩKm, Km^R	This study
MPCdR2-2::ΩKm	MPCdR2 derivative constructed by random insertion into ΩKm, Km^R	This study
MPCdR2-3::ΩKm	MPCdR2 derivative constructed by random insertion into ΩKm, Km^R	This study
MPCdR2-4::ΩKm	MPCdR2 derivative constructed by random insertion into ΩKm, Km^R	This study
MPCdR2-1::ΩKm::CdE1	MPCdR2 derivative constructed by random insertion into ΩKm and complemented with CdE1, Km^R	This study
MPCdR2-2::ΩKm::CdE1	MPCdR2 derivative constructed by random insertion into ΩKm and complemented with CdE1, Km^R	This study
MPCdR2-3::ΩKm::CdE1	MPCdR2 derivative constructed by random insertion into ΩKm and complemented with CdE1, Km^R	This study
MPCdR2-4::ΩKm::CdE1	MPCdR2 derivative constructed by random insertion into ΩKm and complemented with CdE1, Km^R	This study
pJQ200SK	Gene replacement vector; Gm^R, Suc^R	53
pHP45ΩKm	Km resistance cassette plasmid	52
pJQ::*cadA1*::ΩKm	pJQ200SK derivative constructed by replacing a *cadA1 Hind*III fragment by a *Hind*III fragment containing ΩKm, KmR	This study
pGEM-T Easy	lacPOZ, cloning vector	Promega
pGEM-*cadA1*p	pGEM-T Easy containing the *Hind*III *cadA1* promotor, Ap^R	This study
pGEM-*cadA1*	pGEM-T Easy containing *Xba*I c*adA1* gene with its promotor, Ap^R	This study
pGEM-*cadA1*::ΩKm	pGEM-T easy derivative constructed by replacing a *cadA1 Hind*III fragment by a *Hind*III fragment containing ΩKm, Km^R, Ap^R	This study
pPROBE-GT	Promoter-probe vector with *gfp* gene, Gm^R	40
pGT-*cadA1*p	pPROBE GT containing *Hind*III *cadA1* promotor downstream of the *gfp* gene, Gm^R	This study
Primers		
KAN-2 FP-1	5'-ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC-3'	ΩKm

KAN-2 RP-1	5'-GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG-3'	ΩKm
T3	5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3'	pBBR1MCS-5
T7	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'	pBBR1MCS-5
STM 2244-Reverse	5'-CGAATTCCATGCCCGCTACC-3'	*cadA1* promoter region
STM 2245-Forward	5'-CCGACGGCACGATCATCTCC-3'	*cadA1*
STM 2263-Reverse	5'-TTCAATACCTTCCTTGGCGTCCT-3'	*cadA1*
STM 2612-Forward	5'-GACCGAGCGGTTCATCG-3'	*cadA1*
STM 2613-Reverse	5'-CGGTCAGCATCACAGCAG-3'	*cadA1*
STM 2740-Forward	5'-TCTAGATGCCTATGGAGACGG-3'	*cadA1* promoter region
STM 2785-Reverse	5'-TCTAGACTGTGGTGACCAGGAACA-3'	*cadA1*
STM 2849-Forward	5'-TCTAGACAAGAGCATTCGGAAGGC-3'	*cadA1*
STM 2985-Forward	5'-TCTAGACTTCGTGCCTATGGAGAC-3'	*cadA1*
STM 2986-Reverse	5'-TCTAGACCACTTCTCAGCTCCG-3'	*cadA1*
STM 2987-Reverse	5'-TCTCGACCAGTTGGATAATGCG-3'	*cadA1*

Table II-S2: Comparison of CadA1 from *Mesorhizobium metallidurans* STM 2683^T with 12 P_{IB}-type ATPases of rhizobia and relative strains and three reference strains (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Cupriavidus metallidurans*).

P_{IB}-type ATPase accession number	**P_{IB}-type ATPase name**	**Bacterial source**	**BLASTP score (hits)**	**Length (aa)**	**% identity (aa range between brackets)**
YP665761	Meso_4129	*Chelativorans multitrophicus* BNC1	1070	955	61 % (972)
YP002544256	Arad_2044	*Agrobacterium radiobacter* K84	941	768	65 % (775)
YP002977578	Rleg_3796	*Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii WSM1325	928	756	67 % (761)
YP001243187	Bbta_7421	*Bradyrhizobium* sp. BTAi1	918	764	67% (756)
YP769837	RL4262	*Rhizobium leguminosarum* bv. viciae 3841	917	756	67 % (754)
YP002282994	Rleg2_83501	*Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii WSM2304	914	758	66 % (752)
YP001980107	RHECIAT_CH0003992	*Rhizobium etli* CIAT 652	908	747	67 % (751)
YP471201	RHE_CH03719	*Rhizobium etli* CFN 42	892	748	68 % (751)
NP103812	mll_2475	*Mesorhizobium huakuii* MAFF303099	891	749	65 % (754)
NP384230	Smc_04128	*Ensifer meliloti* 1021	890	743	63 % (752)
YP001328992	Smed_3336	*Ensifer medicae* WSM419	890	744	63 % (763)
YP570767	RDP_3643	*Rhodopseudomonas palustris* BisB5	886	726	64 % (747)
P37617	ECK3453	*Escherichia coli* K12	523	732	51 % (636)
P37386	CADA2_STAAU	*Staphylococcus aureus* 1280	478	804	37 % (760)
CP000354	Rmet_5947	*Cupriavidus metallidurans* CH34	436	799	46 % (564)

The results were obtained from a BLAST Protein (BLASTP) search of CadA1 with the protein sequence of the Genbank database. The P_{IB}-type ATPases are listed by their accession number (first column) and their name (second column). BLASTP scores are given as indicators of how good the alignment is. It is calculated from the number of gaps and substitutions associated with each aligned sequence. The percentages of amino acid (aa) identity and the lengths of the homologous regions from BLASTP matching are shown. The closest match found was the P_{IB}-type ATPase of *Chelativorans multitrophicus* BNC1.

Table II-S3: Characteristics of the response of STM 2683^{T} and of the Δ*cadA1* mutant to Zn and Cd and parameters estimated from the best-fitted sigmoidal dose-response curve using a non linear regression analysis.

Strain	**Metal response**	**EC_{50} (M) [a]**	**Background fluorescence [b] ± SD**	**Max Fold induction [c]**	**Hill coefficient [d]**	**R^2**
STM 2683^{T}	Zn	1.20E-03	3511 ± 596	45.8	1.51	0.98
STM 2683^{T}	Cd	1.20E-04	3511 ± 596	20.6	1.66	0.97
Δ*cadA1*	Zn	2.00E-04	25642 ± 2130	8.8	1.43	0.93
Δ*cadA1*	Cd	4.30E-05	25642 ± 2130	5.8	1.62	0.97

[a] EC_{50} values were deduced from the best-fitted curves, except for STM 2683^{T} after Zn exposure for which we used the maximum relative expression.
[b] Mean background fluorescence corresponds to the relative expression obtained in the basal medium without any heavy metals added.
[c] The Max fold induction was calculated by dividing the means of the maximum relative expression by the means of the minimum relative expression obtained from three independent replications.
[d] The Hill coefficients were obtained from the best-fitted curves.

Table II-S4: Chemical contents of the water-soil extract obtained from the tailing pond of the Avinières mine (gram soil per ml water: 1/5). Data are expressed as µM.

Metal	water-soil extract (µM)
Al	0.042
Ca	224.238
Ti	0.002
V-H2	2.90E-04
Cr-H2	0.055
Mn-H2	0.186
Fe-H2	0.228
Co-H2	0.005
Ni-H2	0.041
Cu-H2	0.019
Zn-H2	79.48
As-H2	0.003
Rb	0.02
Sr	0.786
Mo	0.004
Ag	3.70E-05
Cd	2.21
Sb	0.016
Cs	3.00E-04
Ba	1.384
Tl	0.027
Pb	0.671
U	4.20E-06

II-3- Etude préliminaire de l'expression de *cad*A1 dans les nodosités d'*Anthyllis* soumises à un stress Zn :

Introduction. Le gène *cad*A1 a été précédemment décrit comme codant pour un système d'efflux des métaux lourds fonctionnellement impliqué dans la résistance au Zn chez *M. metallidurans* STM 2683^{T}. L'étude de la régulation de *cad*A1, réalisée en condition *in vitro*, montrent que *cad*A1 est induit spécifiquement par le Zn et le Cd et à des concentrations qui inhibent la croissance de *Mesorhizobium* non métallicoles (1 mM), en culture liquide. D'après l'analyse génomique réalisée précédemment, *cad*A1 semble être un gène spécifique

impliqué dans l'adaptation au Zn chez *M. metallidurans* et chez des souches proches, provenant du site minier d'Eylie (Pyrénées Ariègeoises), lorsque les cellules bactériennes sont cultivées en milieu liquide. Sur le site des Avinières, les nodosités d'*A. vulneraria* ne contiennent que des souches de *Mesorhizobium* résistantes aux métaux lourds. On peut alors se demander si les gènes de résistance aux métaux lourds tels que *cad*A1 jouent un rôle au sein des souches métallicoles de *Mesorhizobium*, en vie saprophytique ou en vie symbiotique et favorise ainsi, dans des sols chargés en métaux lourds, une symbiose plus efficace avec une plante hôte métallicole. On peut supposer que *cad*A1 est un gène important lors des étapes d'attraction, de colonisation et de multiplication des rhizobia dans la rhizosphère ainsi que lors de l'attachement aux poils racinaires ; étapes au cours desquelles les bactéries se trouvent à l'état libre et sont directement en contact avec les particules métalliques du substrat minier. Dans la rhizosphère, les plantes peuvent libérer divers composés (acides organiques, sidérophores, sucres, acides aminés, ions inorganiques) qui peuvent solubiliser ou au contraire précipiter ou chélater les métaux et donc modifier leur biodisponibilité et ainsi les rendre plus ou moins toxiques pour les organismes (Mench and Martin, 1991; Dakora and Phillips, 2002; Dessureault-Rompre *et al.,* 2008). Par contre lorsque la nodosité est formée et après la différenciation des bactéries en bactéroïdes, le rôle que peut jouer *cad*A1 dans l'efficacité du fonctionnement de la nodosité est plus incertain. Dans plusieurs études, les nodosités sont décrites comme des micro-niches potentiellement protectrices des rhizobia vis-à-vis des métaux lourds (Delorme *et al.,* 2003) et on peut supposer que les tissus végétaux des nodosités limitent l'entrée des métaux lourds, protégeant ainsi les bactéries en cours de différenciation et les bactéroïdes, des métaux lourds. Les travaux de Chen *et al.* (2008) ont montré que les nodosités limitent l'absorption et le transfert des métaux lourds dans la plante, constituant une zone de protection contre des concentrations toxiques en métaux. De récents travaux réalisés au laboratoire, ont montré que les nodosités d'*A. vulneraria* récoltées après 4 semaines de croissance en hydroponie dans une solution nutritive contenant 1 mM de Zn, contenaient 15 fois plus de Zn par rapport à la condition sans Zn, sachant que les nodosités ont tout abord été formées dans de l'attapulgite sans métal avec une souche bactérienne métallicole (STM 2683) et non métallicole (Soussou *et al.,* soumis), suggérant ainsi que le Zn est présent dans les nodosités. De plus, les nodosités induites par la souche métallicole STM 2683 possède une teneur en Zn sensiblement et significativement inférieure à celles des nodosités générées par une souche non-métallicole, laissant supposer que la souche de *Mesorhizobium* métallicole puisse participer à limiter la concentration en Zn dans ses nodosités (Soussou *et al.,* soumis). On peut supposer que les *Mesorhizobium* métallicoles en

vie libre dans la rhizosphère d'*Anthyllis* peuvent séquestrer les métaux lourds présents dans l'environnement par la synthèse de divers chélateurs (EPS (Zhang *et al.,* 2010), métallothionéines (Blindauer *et al.,* 2011), glutathion (Figuiera *et al.,* 2005)), réduisant alors leur entrée dans la plante *via* les nodosités. De même, les racines végétales possèdent des transporteurs de métaux lourds impliqués dans la nutrition de la plante car certains métaux sont des oligoéléments essentiels (Hussain *et al.,* 2004) et dans la détoxification lorsque les concentrations externes en métaux deviennent trop élevées. La P_{IB}-ATPase Zn/Cd/Co/Pb, AtHMA4 identifié majoritairement dans les tissus vasculaires notamment dans la racine d'*Arabidopsis thaliana*, a été décrite à la fois dans la nutrition (transport du Zn vers les parties aériennes de la plante *via* le xylème) et dans la détoxification (Mills *et al.,* 2005). Cette protéine peut aider à transporter les métaux lourds, des racines vers les parties aériennes *via* le xylème où ils seront compartimentés ou séquestrés afin d'être moins nocifs (Mills *et al.,* 2005). De plus, en présence de fortes concentrations en métaux, AtHMA4 est aussi induit dans les cellules épidermiques où il peut favoriser l'efflux des métaux des tissus racinaires vers l'extérieur de la plante (Mills *et al.,* 2005). On peut donc émettre une hypothèse selon laquelle, les bactéries en cours de différenciation ou les bactéroïdes possédant des systèmes d'efflux de type CadA1, seraient capables de participer à la détoxification de la nodosité. Pour ce faire, les bactéries favoriseraient l'efflux de métaux vers les tissus vasculaires ou vers les cellules épidermiques, ce qui faciliterait l'exportation des métaux vers l'extérieur de la plante grâce à des transporteurs de type AtHMA4. Cette synergie entre la bactérie et la plante pour l'efflux des métaux lourds potentiellement toxiques permettrait ainsi de réduire la quantité de métal dans la nodosité.

Suite à ces observations, une expérience préliminaire a été conduite pour savoir si les gènes de résistance aux métaux lourds des bactéries métallicoles différenciées en bactéroïdes ou en cours de différenciation sont exprimés dans les nodosités (étude de faisabilité et d'expression). Cette expérience nous permettra de savoir si le Zn est détecté dans les nodosités et s'il est en quantité suffisante pour induire l'expression de gènes de résistance aux métaux lourds tels que *cad*A1. Aussi, elle nous permettra de mettre en avant des pistes quant au rôle des bactéroïdes et des nodosités dans l'établissement d'une symbiose plus efficace avec le partenaire végétal lors d'une exposition métallique.

Matériel et méthodes.

Préparation des inocula bactériens – Pour étudier l'expression du gène *cad*A1 au sein des nodosités d'*Anthyllis*, trois souches de *M. metallidurans* ont été cultivées dans 150 ml de

milieu TY pendant 4 jours à 28°C afin de servir d'inoculum bactérien pour l'inoculation des plants d'*Anthyllis.* Le premier inoculum contient la souche de *M. metallidurans* STM 2683 pNT-*cad*A1p, contenant la partie promotrice de *cad*A1 clonée en amont de la *gfp* portée par un plasmide pNT (Kanamycine résistant) comme système rapporteur, le deuxième contient la souche STM 2683 pNT vide (témoin négatif de la fluorescence) et le troisième contient la souche STM 2683 (souche sauvage).

Essais sur plantes, conditions de culture – Après scarification et stérilisation (Vidal, 2008), les graines d'*A. vulneraria* subsp. *carpatica* (écotype métallicole des Avinières à St-Laurent-le-Minier, France) ont été placées dans les boîtes de Pétri contenant 10 % d'agar et transférées pendant 48h à 5°C puis en chambre à 22°C pour la germination. Les plantules ont été transférées dans des tubes de culture (une plante par tube) contenant de l'attapulgite (Oil Dri US Special, Damolin, Denmark; http://www.damolin.dk) puis transférées en chambre de culture (14h de jour et 10h de nuit ; 22°C le jour et 15°C la nuit). 48h après le transfert en tube, 12 plants d'*Anthyllis* ont été inoculées avec la souche STM 2683 pNT-*cad*A1p et 12 plants ont été inoculés avec STM 2683 pNT, à raison d'environ 10^9 UFC.ml^{-1}. Six des 12 plants ont été arrosés avec une solution nutritive (2,38 mM $CaSO_4$, 1 mM $MgSO_4$, $7H_2O$, 0,61 mM K_2HPO_4, 0,39 mM KH_2PO_4, 0,15 µM $CoCl_2$, 0,041 mM H_3BO_3; 0,07 mM Fe-EDTA 6,1 µM $MnSO_4$, $7H_2O$, 0,59 µM Na_2MoO_4, $2H_2O$, 1,49 µM $ZnSO_4$, $7H_2O$, 0,33 µM $CuSO_4$, $5H_2O$, pH ajusté avec 1 M NaOH ou 1 M HCl) contenant 12,5 µg.ml^{-1} de Kanamycine afin de garder la pression de sélection sur le plasmide pNT et les six autres ont été arrosés avec la même solution nutritive mais sans ajout d'antibiotique. Dix plants d'*Anthyllis* ont aussi été inoculés avec la souche STM 2683 (témoin positif de la nodulation) et 10 plants n'ont pas été inoculés (témoin négatif de la nodulation). Quatre des 10 plants ont été arrosés avec la solution nutritive décrite précédemment contenant la Kanamycine et six plants ont été arrosés avec la même solution nutritive sans antibiotique. Les plants non inoculés ont été arrosés avec la même solution nutritive que précédemment mais complétée avec 2,5 mM de KNO_3. Pendant 7 semaines en chambre de culture, les plantes se sont développées dans l'attapulgite sans addition de Zn, de façon à favoriser la formation de nodosités matures. Les plants ont été arrosés une fois par semaines. Après 7 semaines de croissance, les plantes ont été transférées dans une solution nutritive avec ou sans un apport de $ZnSO_4$ à 1 mM, en hydroponie et en chambre de culture avec les mêmes conditions que ci-dessus, pendant 5 semaines (protocole hydroponie selon Soussou *et al.,* soumis). La concentration en Zn de 1 mM a été choisie car elle correspond à la concentration qui affecte la croissance des plants d'*A. vulneraria* subsp.

carpatica inoculés avec une souche bactérienne sensible aux métaux lourds et qui affecte la croissance des écotypes d'*Anthyllis* non métallicoles (Soussou *et al.,* soumis). Le Tableau II-2 résume les différents traitements Zn/Kanamycine qu'ont reçu les plants d'*Anthyllis*, en hydroponie.

Tableau II-2 : Traitements appliqués (Kanamycine et/ou Zn) aux divers plants d'*Anthyllis vulneraria,* inoculés avec ou sans les souches de *Mesorhizobium metallidurans* STM 2683, en hydroponie.

		Souches bactériennes			
		STM 2683 pNT-*cad*A1p	**STM 2683 pNT**	**STM 2683**	**Non inoculé**
Nombre de plants / traitements	**+Km[a] +Zn[b]**	3	3	2	2
	+Km –Zn[c]	3	3	2	2
	-Km[d] +Zn	3	3	3	3
	-Km –Zn	3	3	3	3

[a] Traitement avec 12,5 µg.ml^{-1} de Kanamycine.
[b] Traitement avec 1 mM de Zn.
[c] Traitement sans Zn.
[d] Traitement sans Kanamycine.

Les solutions nutritives avec ou sans antibiotique et avec ou sans Zn ont été changées deux fois par semaine, pendant 5 semaines. Après 5 semaines de culture en hydroponie, les nodosités ont été récoltées. L'identité de la souche inoculée au départ a été vérifiée par isolement sur milieu TY pour la souche sauvage STM 2683 et sur milieu TY additionné de Kanamycine pour les souches contenant les constructions pNT, puis après amplification PCR et séquençage. Les paramètres de la nodulation et de la fixation d'azote ont été mesurés. Le nombre de nodosités a été comptabilisé pour tous les plants et la teneur en chlorophylle a été mesurée avec SPAD52 (Minolta Soil-Plant Analyses Development). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel XLSTAT 2010.

Préparation des coupes histologiques de nodosités et observations microscopiques - Les nodosités récoltées après 5 semaines de culture en hydroponie ont été lavées à l'eau puis immédiatement utilisées pour la préparation des coupes histologiques. Des coupes de

nodosités d'environ 50-60 µm d'épaisseur ont été réalisées dans 2 % d'agarose au vibratome (Leca® VT1000S) et selon un plan vertical. Les coupes ont ensuite été colorées au calcofluor (Sigma, 0,01 %, coloration des parois cellulaires en bleu) pendant 10 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. Seules les coupes correspondant aux nodosités infectées par la souche STM 2683 sauvage ont été colorées au syto 13 (Invitrogen, 5 µM, coloration des acides nucléiques en vert) pendant 10 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les coupes colorées ont ensuite été rincées à l'eau puis montées entre lame et lamelle dans une goutte de tampon phosphate salin additionné de 50 % de glycérol (Sigma, PBS, 10 mM). Les préparations histologiques ont enfin été observées d'abord au microscope optique sous filtre GFP (Nikon AZ100) pour visualiser la nodosité dans son ensemble, puis au microscope confocal (Carl Zeiss LSM 700) afin de bien visualiser les cellules infectées. Sous microscopie confocale, les intensités de fluorescence ont été mesurées après excitation et émission des différents fluorochromes : le calcofluor (excitation à 405 nm et émission à 500 nm), la GFP (485 nm, 535 nm) et le syto 13 (488 nm, 529 nm). Les images obtenues par microscopie confocale ont été analysées à l'aide du logiciel Zen 2009.

Résultats et discussion. Après 7 semaines de croissance dans l'attapulgite sans addition de Zn, les plants d'*Anthyllis* arrosés avec une solution nutritive contenant de la Kanamycine ne montrent pas de symptômes de toxicité par rapport aux plants arrosés sans l'ajout d'antibiotique (Figure II-6). Par contre, après 5 semaines de culture en hydroponie (avec ou sans ajout de Zn), tout les plants ayant été arrosés avec une solution nutritive contenant de la Kanamycine sont morts (Figure II-7). On observe donc un effet toxique de l'antibiotique pour les plants maintenus en hydroponie. La toxicité de l'antibiotique a peut être pu s'exprimer qu'en condition d'hydroponie car l'antibiotique a pu s'absorber sur les particules argileuses de l'attapulgite de manière à le rendre moins mobile et moins toxique. De plus, lors de la première étape de croissance en milieu solide, les tubes de culture ont été exposés à la lumière alors qu'en hydroponie, les tubes ont été protégés de la lumière et la solution nutritive a été changée régulièrement deux fois par semaines, augmentant ainsi la charge en antibiotique. L'ajout de Zn ne semble pas avoir eu d'effet sur la nodulation et la fixation d'azote des plants d'*Anthyllis* inoculés avec les souches contenant les constructions GFP (Tableau II-3) confirmant que cet écotype métallicole est parfaitement bien adapté aux fortes concentrations en Zn. Quelle que soit le traitement et la souche utilisée, les nodosités obtenues sont majoritairement sphériques et sensiblement de même taille et de même morphologie (données non montrées). La forme sphérique des nodosités d'*Anthyllis* nous

amène à penser au type déterminé caractérisé par le fonctionnement limité de méristème, comme observé chez *Lotus japonicum* appartenant à la même tribu qu'*Anthyllis* (Mergaert *et al.,* 2006; Sprent, 2007).

Après la préparation des coupes histologiques, nous observons les caractéristiques communes aux nodosités déterminées déjà décrites dans la littérature comme par exemple (Szczyglowski *et al.,* 1998) : la zone centrale correspondant à la zone infectée entourée d'une zone de cellules corticales non infectées qui contient les vaisseaux vasculaires en périphérie. Dans notre cas, les nodosités récoltées semblent avoir perdu leur turgescence et contiennent moins de cellules infectées par rapport à ce qui est rapporté chez le lotier (Szcyglowski *et al.,* 1998), dans toutes les conditions de l'expérience et pour toutes les souches inoculées. Ce résultat peut s'expliquer par les conditions de culture utilisées qui ont pu fragiliser les nodosités (manipulation en tube puis passage en solution). Suite à ce résultat, il serait souhaitable de récolter les nodosités après un temps plus court de croissance en hydroponie, correspondant par exemple au temps que met la plante pour percevoir le Zn afin d'avoir du matériel dans un meilleur état physiologique. D'après les analyses microscopiques, les bactéroïdes sont de forme allongée d'environ 1-2 µm de longueur (Figure II-8B), que ce soit dans les conditions avec Zn ou sans Zn, suggérant ainsi que la concentration utilisée en Zn ne modifie en rien la forme des bactéroïdes. Les bactéroïdes des cellules végétales infectées des nodosités d'*Anthyllis* sont comparables à ceux du lotier (Szcyglowski *et al.,* 1998). Dans le cas des nodosités de type déterminé, Mergaert *et al.* (2006) ont démontré que les bactéroïdes étaient comparables aux bactéries en vie libre, en terme de forme, de taille, de viabilité et de contenu génomique. Les cellules bactériennes de *M. metallidurans* observées en vie libre montrent une forme en bâtonnet d'environ 2 µm de taille (Favry, communication personnelle), de morphologie alors comparable à celle des cellules bactériennes en condition de symbiose. La présence de cordons d'infection n'a pas été visualisée dans les nodosités, sous microscope. Dans le cas de nodosités déterminés, les cordons d'infection pénètrent les cellules végétales en phase mitotique correspondante au stade d'invasion du primordium nodulaire par les rhizobia, de différenciation en bactéroïdes et de maturation, contrairement aux nodosités indéterminées (Ferguson *et al.,* 2010). Nous avons cependant observé au sein des nodosités d'*Anthyllis*, une infection à la fois intracellulaire et intercellulaire (Figure II-8A et C). Cette même observation a été aussi visualisée chez quelques nodosités matures du soja, suite à une inoculation avec des souches de *Bradyrhizobium* photosynthétiques, où le processus de nodulation semblait perturbé (Giraud, communication personnelle). A ce jour, il n'y a pas eu d'autres cas observés présentant cette double infection cellulaire ce qui en fait

des cas rares et originaux laissant ouverte la question de l'origine et du rôle de cette infection intercellulaire.

Au microscope à fluorescence, les cellules végétales infectées avec STM 2683 pNT-*cad*A1p sont plus fluorescentes dans la condition avec Zn que sans Zn, et plus fluorescentes par rapport aux cellules de STM 2683 contenant pNT vide (Figure II-9). Cependant, les cellules infectées par STM 2683 pNT-*cad*A1p paraissent plus infectées en terme de densité de bactéroïdes que celles infectées par STM 2683 pNT, ce qui peut expliquer la fluorescence plus intense dans le cas des cellules STM 2683 pNT-*cad*A1p. Pour faire face à cet éventuel biais, nous avons observé et comparé au microscope confocal des cellules végétales ayant une même densité d'infection. Pour des cellules végétales comparables en terme d'infection, les cellules infectées par STM 2683 pNT-*cad*A1p apparaissent plus fluorescentes que celles infectées par STM 2683 pNT (Figure II-10) et cela avec les mêmes paramètres d'intensité et de durées d'exposition lumineuse. Ces premières observations suggèrent que le Zn entre dans la nodosité et est en concentration suffisante pour induire l'expression de *cad*A1. Ce résultat est en accord avec les travaux menés par Soussou *et al.,* (soumis) quant à la présence du Zn dans la nodosité. Cependant pour le confirmer, il serait important de connaitre sa spéciation ainsi que sa localisation au sein de la nodosité, par exemple en mettant en œuvre des techniques de rayonnements synchrotrons (Sarret *et al.,* 2009). L'étude de la spéciation et la localisation du Zn chez *Anthyllis* est en cours d'étude dans le cadre du projet SyMetal (ANR CES Contaminant Environnement Santé). Les travaux de Chen *et al.* (2008) sur la symbiose fixatrice d'azote entre un rhizobium métallicole *C. taiwanensis* et la légumineuse *Mimosa pudica* ont montré que les plantes inoculées ont une capacité d'absorption qui augmente de 12 %, 70 %, et 86 % pour le Cu, le Cd et le Pb respectivement, par rapport aux plantes non inoculées. Les auteurs ont donc mis en évidence le rôle joué par les nodosités dans l'absorption des métaux lourds, qui limiterait le transfert des métaux lourds dans toute la plante et constituerait alors une première zone de protection pour la plante contre des métaux lourds toxiques ou en concentrations trop élevées. Les auteurs mettent en avant que l'absorption des métaux lourds par les nodosités peut être due à un changement de la composition du tissu racinaire au niveau de la nodosité qui pourrait mener à une augmentation des sites de séquestration des cations métalliques (Chen *et al.,* 2008). De plus, lors des étapes d'infection menant à la formation de la nodosité, les plantes, *via* les racines, peuvent excréter divers polysaccharides (Stougaard, 2000) qui augmentent alors les sites de séquestration des métaux.

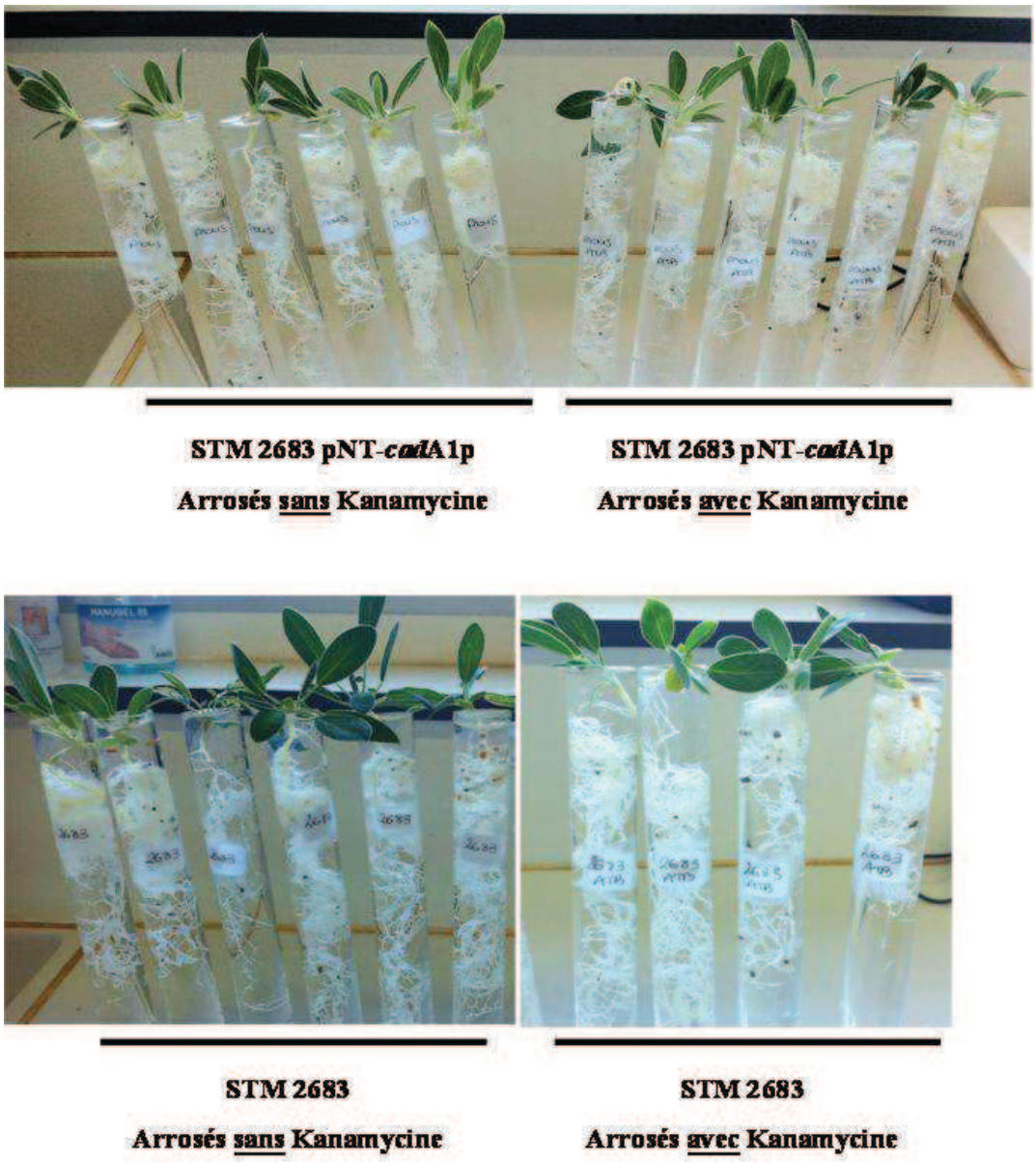


Figure II-6 : Plants d'*Anthyllis vulneraria* inoculés avec *Mesorhizobium metallidurans* STM 2683 pNT-*cad*A1p (A) et STM 2683 (B) après 7 semaines de croissance en chambre de culture dans de l'attapulgite et arrosés avec une solution nutritive sans Kanamycine (à gauche) et contenant 12,5 µg.ml^{-1} de Kanamycine (à droite).



Figure II-7 : Plants d'*Anthyllis vulneraria* inoculés avec les souches de *Mesorhizobium metallidurans* (STM 2683 pNT-*cad*A1p, STM 2683 pNT et STM 2683) et non inoculés, après 5 semaines de croissance en hydroponie dans une solution nutritive contenant 12,5 µg.ml^{-1} de Kanamycine, sans ajout de Zn (A) et avec ajout de Zn (B).

Tableau II-3 : Mesure des paramètres de nodulation et de fixation de l'azote chez les plants d'*Anthyllis vulneraria* inoculés avec les souches de *Mesorhizobium metallidurans* STM 2683, STM 2683 pNT-*cad*A1p, STM 2683 pNT et non inoculés, après 5 semaines en hydroponie dans une solution nutritive sans Kanamycine et avec 1 mM de Zn (+Zn) ou sans Zn (-Zn). Le nombre moyen de nodosités par plant (n=3) et de la teneur en chlorophylle (SPAD) pour tous les plants ont été mesurés et une analyse de variance (*p-value* < 0.01) ainsi qu'une comparaison par paires de type Newman-keuls ont été réalisée.

Souches bactériennes	Nb de nodosités / plante*	Teneur en chlorophylle (unité SPAD)*
STM 2683 pNT-*cad*A1p -Zn	30,3±15,3^{a}	54,6±6,6^{a}
STM 2683 pNT-*cad*A1p +Zn	32,3±9,7^{a}	53,9±5,7^{a}
STM 2683 pNT -Zn	22±15,6^{ab}	46,2±10,3^{a}
STM 2683 pNT +Zn	14±7,8^{ab}	51±2,3^{a}
STM 2683 -Zn	22,3±18,2^{ab}	53,1±7,1^{a}
STM 2683 +Zn	35,3±8,3^{a}	59±9,9^{a}
Non inoculé -Zn	0	54,9±9,5^{a}
Non inoculé +Zn	0	29.3±7.1^{b}

* La moyenne suivie de l'écart type qui présente la même lettre ne sont pas significativement différents suivant le test de comparaison par paires de Newman-Keuls.

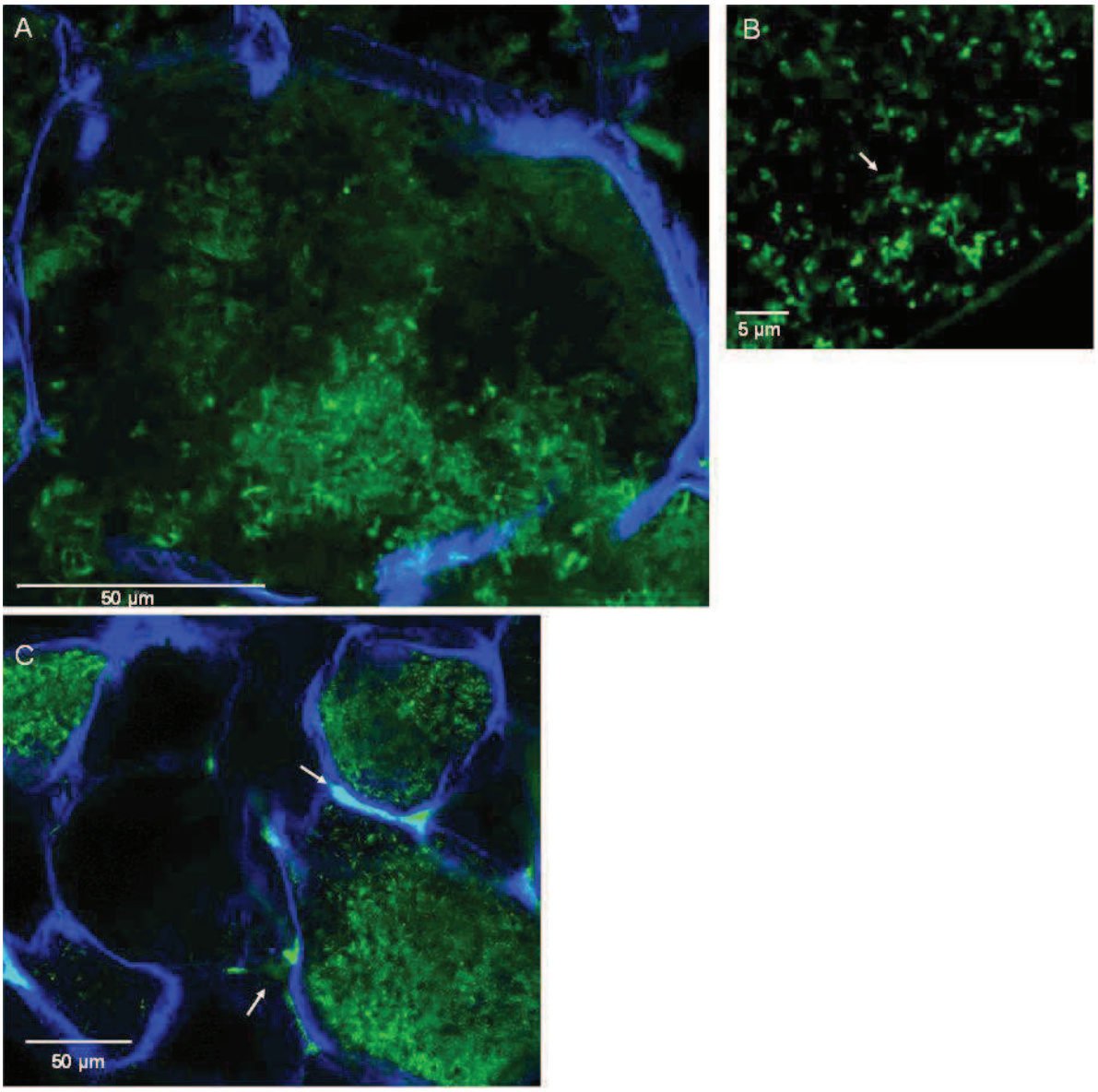


Figure II-8 : Cellule infectée d'*Anthyllis vulneraria* visualisée au microscope confocal montrant, (A) une cellule végétale infectée, (B) la forme en bâtonnet des bactéroïdes et (C) le réseau intercellulaire de bactéries, après coloration au syto 13 des acides nucléiques (en vert) et au calcofluor des parois cellulaires (en bleu).

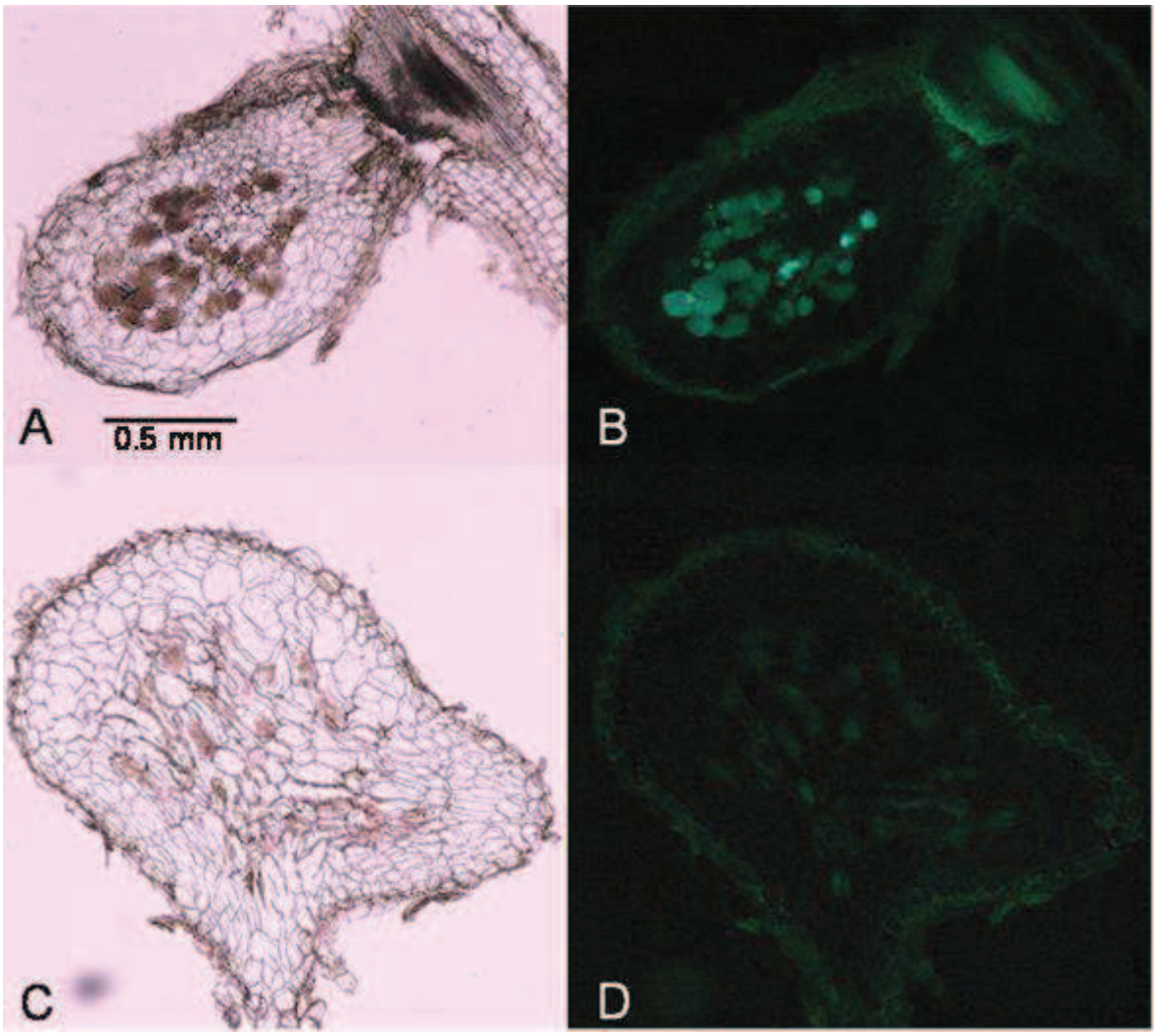


Figure II-9 : Comparaison des coupes de nodosités d'*Anthyllis vulneraria* avec STM 2683 pGT-*cad*A1p dans la condition avec Zn (A et B) et dans la condition sans Zn (C et D), visualisées sous microscope optique. Les photos A et C ont été prises sous lumière naturelle et les photos B et D sous le filtre GFP.

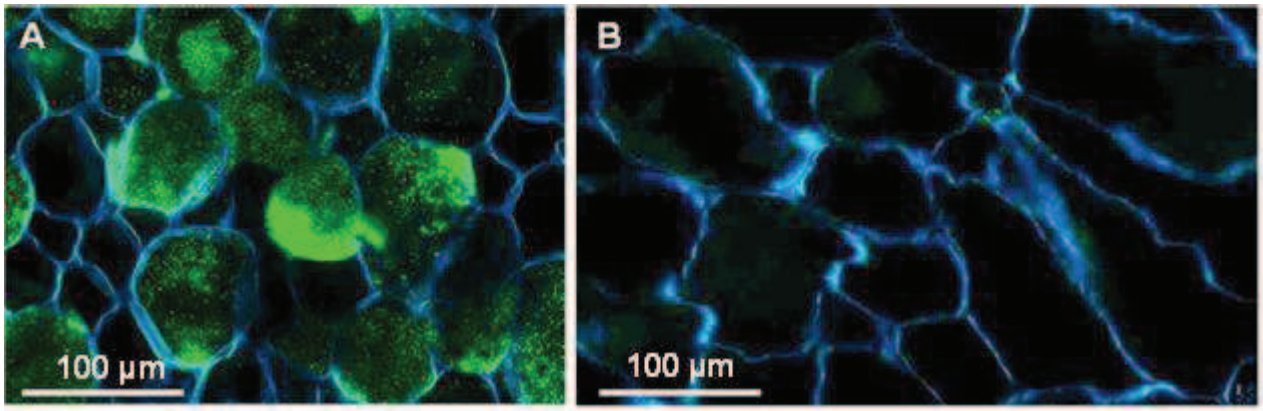


Figure II-10 : Comparaison des coupes de nodosités d'*Anthyllis vulneraria* avec STM 2683 pGT-*cad*A1p dans la condition avec Zn (A) et dans la condition sans Zn (B), visualisées au microscope confocal après coloration des parois cellulaires par le calcofluor (en bleu).

En conclusion, ce travail préliminaire nous a permis de mettre en évidence l'expression du gène de résistance *cad*A1 dans les cellules infectées des nodosités soumises à une forte concentration en Zn (concentration qui affecte les plants d'*A. vulneraria* subsp. *carpatica* inoculées avec une souche bactérienne sensible aux métaux lourds et qui affecte la croissance des écotypes d'*Anthyllis* non métallicoles), suggérant ainsi que le Zn pourrait entrer dans les nodosités. *M. metallidurans* permettrait en association avec *Anthyllis* d'améliorer la fertilité du sol et on peut émettre les hypothèses suivantes quant à son(ses) rôle(s) dans la symbiose afin d'établir une interaction plus efficace avec la plante hôte : (i) *M. metallidurans* en vie libre permettrait de séquestrer ou de précipiter les métaux lourds dans la rhizosphère d'*Anthyllis* et ainsi limiter leur entrée dans la plante *via* les racines ou les nodosités à travers l'expression de gènes impliqués dans la séquestration (Zhang *et al.,* 2010 ; Blindauer *et al.,* 2011 ; Figuiera *et al.,* 2005), (ii) *M. metallidurans* permettrait l'absorption des métaux au sein de la nodosité et réduire leur mobilité et donc leur transport dans la plante, ce qui pourrait se révéler nocif pour le végétal, (iii) *M. metallidurans* permettrait sous forme de bactéroïdes ou bactéries en cours de différenciation de favoriser l'export des métaux, par l'expression de gènes impliqués dans l'efflux des métaux lourds (Nies, 2003), hors de la nodosité et de limiter le transport dans la plante ou vers les parties aériennes afin qu'ils soient séquestrés par les mécanismes d'adaptations mis en place par la plante (Clemens, 2006). Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour déterminer la spéciation et la localisation du Zn dans les nodosités afin de mieux appréhender le rôle potentiellement joué par les nodosités dans la détoxification de la rhizosphère ou de la plante. Par ailleurs, il est possible que les *Mesorhizobium* métallicoles soient plus efficaces dans les étapes précoces menant à la symbiose *i. e.* les étapes de pré-infection. Il serait alors intéressant d'étudier l'expression de *cad*A1 en cinétique, c'est-à-dire à différentes étapes de la nodulation car on peut supposer que *cad*A1 est exprimé différemment selon le stade de l'infection.

II-4- Synthèse :

Ce travail s'est intéressé à la description d'un premier déterminant génétique impliqué dans la résistance aux métaux lourds chez *Mesorhizobium metallidurans*, à travers l'étude de sa structure, sa fonction et sa régulation. Une approche de génétique moléculaire a permis de déterminer un gène, nommé *cad*A1 codant pour un système d'efflux de type P_{IB}-ATPase, dont sa fonction est l'export de cations métalliques du cytoplasme vers l'espace périplasmique.

CadA1 est homologue à CadA de *Staphylococcus aureus* (Nucifora *et al.,* 1989) et est phylogénétiquement proche de P_{IB}-ATPases de rhizobia telles que la P_{IB}-ATPase d'*Ensifer meliloti* dont sa fonction dans la détoxification au Zn et Cd a été démontrée (Rossbach *et al.,* 2008). En plus de posséder toutes les caractéristiques structurales communes aux P_{IB-2}-ATPases (Zn^{2+}/Cd^{2+}/Pb^{2+} -ATPases), CadA1 contient de nombreux Metal Binding Domain (MBD) en N-terminale de la protéine (N-MBDs), définis comme étant impliqués dans la régulation, la reconnaissance et le transport des cations métalliques à travers la membrane cytoplasmique (Bal *et al.,* 2001 ; Mana-Capelli *et al.,* 2003). CadA1 a la particularité de posséder une duplication à la fois du N-MBD appelé Heavy Metal Associated (HMA) domaine caractérisé par le motif CXXC et du N-MBD caractérisé par un motif riche en histidine. D'après la base de données d'Arguello en 2003, peu de P_{IB-2}-ATPases possèdent ces domaines dupliqués. Les rares pompes les détenant sont issues pour la plupart d'organismes isolés d'environnements industriels ou médicaux. De plus, l'analyse de la séquence protéique de CadA1 ainsi que la description des différents domaines suggèrent que CadA1 est impliquée dans l'export de Zn^{2+}/Cd^{2+} et non de Pb^{2+}, Cu^{+}/Ag^{+} et Cu^{2+}.

Suite à la mutagenèse par délétion de *cad*A1 et double recombinaison dans *M. metallidurans, cad*A1 semble important pour établir une forte résistance au Zn mais ne permet pas d'assurer l'ensemble de la résistance au Cd. De plus, dans des conditions de survie de *M. metallidurans* dans du sol minier, *cad*A1 ne semble pas essentiel. Cependant, la méthode utilisée pour le dénombrement sur boîte des bactéries n'est peut être pas assez sensible pour détecter un effet faible ou temporaire des métaux lourds sur la survie des bactéries. Ces résultats nous indiquent cependant qu'en plus de *cad*A1, *M. metallidurans* possède probablement dans son génome d'autres gènes impliqués dans l'adaptation aux métaux lourds, sous forme de transporteurs ou de chélateurs interagissant entre eux afin de garantir une adaptation maximale, comme cela a été montré chez *C. metallidurans* CH34 (Monchy *et al.,* 2007 ; Taghavi *et al.,* 2009 ; Monsieurs *et al.,* 2011) ou *E. coli* (Wang *et al.,* 2005 ; Yamamoto *et al.,* 2005). D'ailleurs, une analyse plus fine des autres systèmes d'adaptation aux métaux lourds présents dans le génome de STM 2683^{T} révèle l'existence d'au moins cinq P_{IB}-ATPases dont ZntA impliquées dans l'export de Zn chez *E. coli* (Rensing *et al.,* 1997) et ActP impliquées dans l'export de Cu chez *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and *E. meliloti* (Reeve *et al.,* 2002). De plus, la présence d'un seul système d'efflux HME-RND de type CusGBA précédemment décrit dans la résistance au Cu chez *E. coli* (Outten *et al.,* 2001) soutient le rôle important des P_{IB}-ATPases dans l'adaptation aux métaux lourds chez *M. metallidurans*.

Du point de vue de la régulation, l'analyse des environnements géniques des P_{IB}-ATPases dans le génome de STM 2683^T a montré qu'aucun régulateur n'était présent aux alentours sauf pour ZntA, ce qui suggère que le régulateur de *cad*A1 est probablement à l'extérieur de son environnement génique. La région promotrice de *cad*A1 a révélé la présence d'un site consensus reconnu par le régulateur de type MerR, précédemment décrit dans la régulation de diverses P_{IB}-ATPases (Kazakov *et al.,* 2004 ; Brown *et al.,* 2003). L'étude de l'expression de *cad*A1 par clonage de la partie promotrice en amont du gène *gfp,* porté par un plasmide comme système rapporteur et mesure de la fluorescence sous induction de divers métaux (Zn, Cd, Co, Ni et Pb) a démontré que *cad*A1 est spécifiquement induit par le Zn et le Cd et dépendant de la concentration en métaux. Les données d'expression dans le mutant de *M. metallidurans* confirment l'implication de *cad*A1 dans la résistance au Zn et Cd car l'expression est fortement stimulée en présence des deux métaux. D'autre part, des mesures complémentaires révèlent que *cad*A1 est induit à la fois par le Zn et le Cd et ce de façon cumulée, c'est-à-dire que les deux métaux ne semblent pas entrer en compétition pour l'expression du gène. Ce résultat suggère que *cad*A1 est probablement régulé par des voies de régulation plus complexes que ZntA (Hantke, 2001), comme cela a déjà été décrit dans la régulation de l'opéron *mer* impliqué dans la résistance au Hg faisant intervenir deux régulateurs (MerR et MerD) agissant sur le même opérateur de l'opéron (Mukhopadhyay *et al.,* 1991). De plus, une première expérience a montré que l'étude de l'expression de gènes de résistance aux métaux lourds tels que *cad*A1 dans les nodosités d'*Anthyllis* suite à une exposition Zn était possible et que *cad*A1 surexprimé dans les nodosités de plantes soumises à un stress Zn. Ce résultat préliminaire indique que les gènes de résistance aux métaux lourds sont exprimés dans les bactéries différenciées ou en cours de différenciation au sein de la nodosité, suggérant une éventuelle implication dans l'établissement d'une symbiose plus efficace avec *Anthyllis*. Des résultats complémentaires doivent être apportés à cette étude préliminaire, notamment au niveau de la localisation et de la spéciation des métaux lourds dans la nodosité et dans les parties aériennes ainsi que sur l'expression des gènes de résistance aux métaux tels que *cad*A1 aux divers stades menant à la nodosité mature et fixatrice. De plus, il serait intéressant d'étudier l'impact du mutant STM 2683 *cad*A1 délété sur la nodulation et la fixation chez *A. vulneraria* sur le sol contaminé des Avinières. Précédemment, nous avons montré que le mutant *cad*A1 délété, en condition *in vitro*, était plus sensible aux fortes concentrations en Zn, en milieu liquide. On peut alors penser que *M. metallidurans* affecté dans l'efflux des métaux lourds sera moins performant dans la colonisation de la rhizosphère d'*Anthyllis* pour établir la symbiose.

En résumé, ce travail a permis de mettre en évidence un premier déterminant génétique, *cad*A1 codant pour un système d'efflux de type P_{IB}-ATPase qui participe activement à l'adaptation de *M. metallidurans* face à un stress métallique Zn. Outre ces originalités décelées au niveau de sa structure protéique et de sa régulation, il apparait de *cad*A1 n'est pas le seul gène impliqué dans la résistance et la survie chez *M. metallidurans* en milieu contaminé comme en témoigne la présence d'autres P_{IB}-ATPases dans le génome de la bactérie. Il semble alors judicieux de développer une approche à haut débit de type transcriptomique pour déterminer les autres gènes impliqués spécifiquement dans la réponse aux métaux lourds, ce qui fera l'objet du **chapitre III**.

Chapitre III

Réponse transcriptionnelle au stress métallique (Zn/Cd) et analyse génomique de *Mesorhizobium* métallicoles isolés de sites miniers

III-1- Introduction :

Le travail présenté dans le **chapitre II** a démontré que l'adaptation aux métaux lourds de la souche type de *Mesorhizobium metallidurans* STM 2683^T était en partie due à la P_{IB}-ATPase CadA1. Les études physiologiques menées sur le mutant *cad*A1 montrent que ce mutant perd partiellement sa résistance au Zn et ne semble pas affecté dans la résistance au Cd, ce qui suggère que d'autres gènes viennent compléter la réponse adaptative au Zn et au Cd. Afin d'identifier les autres gènes de *M. metallidurans* potentiellement impliqués dans l'adaptation aux métaux lourds, des approches de comparaisons génomiques et transcriptomiques ont été développées. Les approches transcriptomiques représentent aujourd'hui des outils puissants pour définir des profils d'expressions spécifiques à une ou des condition(s) particulière(s). Parmi les approches développées, les puces à ADN permettent de mesurer et de visualiser rapidement des différences d'expression entre les gènes et ceci à l'échelle d'un génome complet. Cependant, la mise en œuvre de puces à ADN est dépendante des séquences disponibles d'un génome correspondant à un organisme donné ou à plusieurs organismes très proches génétiquement. Leur utilisation est limitée à la qualité du génome ainsi qu'à son annotation et donc à ce qui est connu, ne permettant pas la découverte de nouveaux gènes (Sorek and Cossart, 2010). L'utilisation de nouvelles techniques de séquençage de type RNAseq (RNA sequencing) permet de séquencer directement les ARNs dont les ARNm exprimés sous une ou des conditions(s) particulière(s), et donc d'étudier des profils d'expressions permettant d'identifier des loci différentiellement régulés dans des organismes non encore étudiés et sans avoir au préalable les séquences des génomes ainsi que leur annotation à disposition (Levin *et al.,* 2010; Kimbrel *et al.,* 2011). Cette technologie sans *a priori* permet la découverte rapide de nouveaux gènes et facilite l'annotation de génomes. En revanche, l'inconvénient majeur de la technologie RNAseq est la production énorme de données (des centaines de millions de séquences) qui requiert des outils d'analyses puissants et un minimum d'étude et de savoir-faire en bioinformatique.

Afin de mettre en évidence, les gènes potentiellement impliqués dans la résistance aux métaux lourds, les génomes et les transcriptomes, obtenus après induction métallique (Zn et/ou Cd), de deux souches de *Mesorhizobium* métallicoles ont été analysés. Ces deux souches sont phylogénétiquement proches et isolées de nodosités d'*Anthyllis vulneraria* mais proviennent de sites miniers français géographiquement éloignés : la souche STM 2683 provient de la mine des Avinières (Cévennes, Gard) et la souche STM 4661 provient de la

mine d'Eylie (Pyrénées ariégeoises). Les résultats de ces analyses sont présentés sous la forme d'un article scientifique qui sera soumis dans *BioMed Central Genomics* (partie III-2). En complément de ces résultats, une étude de génomique comparative avec les génomes actuellement disponibles de souches de *Mesorhizobium* a été effectuée (partie III-3) afin de mettre en évidence les caractéristiques communes aux *Mesorhizobium* et les spécificités génétiques en relation avec le phénotype métallicole.

III-2- Article en préparation pour *BioMed Central Genomics* :

Genome-wide transcriptional responses of two metal-tolerant symbiotic *Mesorhizobium* isolates to Zinc and Cadmium exposure

Géraldine Maynaud[1], Brigitte Brunel[2], Damien Mornico[4], Maxime Durot[4], Denis Severac[5], Jean-Pierre Desvignes[5], Elisabeth Navarro[3], Jean-Claude Cleyet-Marel[1] and Antoine Le Quéré[3,$]

[1] USC1242 INRA, [2] Montpellier SupAgro, [3] IRD, CIRAD, Université Montpellier II, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, UMR113 TA A-82/J, 34398 Montpellier Cedex 05, France.

[4] CEA, IG, Genoscope, 2 rue Gaston Crémieux, CP5706, F-91057 Evry Cedex, France.

[5] Institut de Génomique Fonctionnelle, UMR 5203 CNRS / U 661 INSERM / Université de Montpellier, 141 rue de la Cardonille, 34094 Montpellier Cedex 05, France.

[a] maynaud@supagro.inra.fr

[b] brunel@supagro.inra.fr

[c] dmornico@genoscope.cns.fr

[d] maxime.durot@m4x.org

[e] Dany.Severac@mgx.cnrs.fr

[f] Jean-Pierre.Desvignes@igf.cnrs.fr

[g] elisabeth.navarro@ec-lyon.fr

[h] cleyet@supagro.inra.fr

[$] Correspondence: antoine.le-quere@ird.fr

ABSTRACT

Background: *Mesorhizobium metallidurans* STM 2683^{T} and *Mesorhizobium* sp. strain STM 4661 were isolated from nodules of the metallicolous legume *Anthyllis vulneraria* from distant mining spoils. They tolerate unusually high Zinc and Cadmium concentrations as compared to other mesorhizobia. This work aims to study the gene expression profiles associated with Zinc or Cadmium exposure and to identify genes involved in metal tolerance in these two metallicolous *Mesorhizobium* strains of interest for mine phytostabilization purposes.

Results: The draft genomes of the two *Mezorhizobium* strains were sequenced and used to map RNAseq data obtained after Zinc or Cadmium stresses. Comparative genomics and transcriptomics allowed the rapid discovery of metal-specific or/and strain-specific genes. Respectively 1.05 % (72/6844) and 0.97 % (68/6994) predicted Coding DNA Sequences (CDS) for STM 2683 and STM 4661 were significantly differentially expressed by Zinc and/or Cadmium. Among these, a significant number of CDSs involved in transport (13/72 and 13/68 for STM 2683 and STM 4661, respectively) and sequestration (15/72 and 16/68 for STM 2683 and STM 4661, respectively) were identified. Thirteen CDSs had homologs in both strains and were differentially regulated by Zinc and/or Cadmium. For instance, several P_{IB}-type ATPases and genes likely to participate in metal sequestration were identified. Among the conserved CDSs that showed differential regulation in the two isolates, we also found *znu*ABC homologs encoding for a high affinity ABC-type Zinc import system probably involved in Zinc homeostasis. Additionally, global analyses suggested that both metals also repressed significantly the translational machinery.

Conclusions: The comparative RNAseq-based approach revealed a relatively low number of genes significantly regulated in our two *Mesorhizobium* strains. Very few of them were involved in the non-specific metal response, indicating that our approach was well suited for identifying genes that specifically respond to Zinc and Cadmium. Among significantly up-regulated genes, several encode heavy metal efflux and sequestration systems which are the most widely represented mechanisms of rhizobial heavy metal tolerance. Downstream functional studies will increase successful phytostabilization strategies by selecting appropriate metallicolous rhizobial partners.

KEYWORDS

Mesorhizobium, Metal tolerant rhizobia, Zinc, Cadmium, Comparative Genomics and Transcriptomics, RNAseq, *znu*ABC

BACKGROUND

Heavy metal extraction activities generate large amounts of contaminated materials. Mining spoils are major sources of pollution as they disperse into the surrounding environment through aerial or water erosion and can be found several kilometers away from their original site of deposit. Such sources of pollution pose significant risks to public health [1] and to ecosystem dynamics due to reduced biodiversity resulting from low plant coverage caused by soil toxicity [2]. While remediation through chemical extraction destructs soils and is more expensive, phytoremediation strategies appear as more environment-friendly and constitute long term solutions to reduce metal toxicity in polluted sites. In highly polluted soils like mining soils, where the removal of metals by phytoextraction using hyperaccumulator plants is not efficient due to the slowness of the process, the best adapted method is phytostabilization [3]. This consists in limiting the dissemination of toxic metals by using metallicolous plants, *i.e.* heavy-metal tolerant plants, to establish a persistent plant cover and prevent pollution through erosion. Such a phytostabilization approach is nevertheless challenging since it requires metallicolous plants able to grow in soils where nutrients are most often dramatically scarce. Legume/rhizobia symbioses which transform atmospheric dinitrogen into organic nitrogen are of ecological interest here as it can improve natural soil fertility and thereby allow the colonization of other plant species and the installation of a plant cover [4, 5]. However, survival and proliferation of organisms on heavy-metal contaminated sites depends on their capacity to tolerate high metal concentrations and requires the acquisition of resistance mechanisms.

A recent study conducted in a former mining area contaminated by Zinc (Zn), Cadmium (Cd) and Lead (Pb), named “les Malines Mining District” in the South of France, allowed the description of 116 plant species, some of which may be used in phytoremediation projects [6]. Among the plant species listed, a leguminous plant, *Anthyllis vulneraria,* is of particular interest as it can enter in symbiosis with rhizobia and thus enrich soil nitrogen through biological fixation. A heavy-metal tolerant symbiotic partner of *A. vulneraria* was recently characterized as a new species of *Mesorhizobium* and named *M. metallidurans* [7]. Additionally, the *Anthyllis*/*Mesorhizobium* symbiosis has been identified in the mining site of Eylie in the Pyrenees (France). Eylie’s mine soil presents a geochemical background similar to the Avinières mine where *M. metallidurans* was found. It is highly polluted by Zn, Cd and Pb (14300 mg kg^{-1}, 23 mg kg^{-1} and 4253 mg kg^{-1}, respectively) but displays higher organic carbon content [5] than the Avinières soil. *Mesorhizobium* strains isolated from *Anthyllis* are (i) capable of entering in symbiosis with metal-tolerant ecotypes of *A. vulneraria* and (ii)

tolerant to several metals including Zn and Cd; therefore, they can be used in future phytostabilization strategies and constitute a good rhizobial model for studying the mechanisms they have evolved to tolerate high heavy-metal concentrations.

Prokaryotes have developed several complex molecular mechanisms to deal with ionic homeostasis or heavy-metal toxics [8, 9, 10]. The most and best studied heavy-metal resistant model bacterium is *Cupriavidus metallidurans* CH34, which harbors in its genome an exceptionally high number of heavy-metal resistance mechanisms [11]. The major mechanisms bacteria use to counteract heavy-metal toxicity consist in (i) permeability barriers, (ii) effluxes via P_{IB}-type ATPases, Resistant Nodulation cell-Division proteins (RNDs), Cation Diffusion Facilitor proteins (CDFs) or Major Facilitor Superfamily systems (MFSs), (iii) intracellular and/or extracellular sequestration and (iv) transformation of metals into a less toxic form by enzymatic detoxification [8]. Efflux systems represent the largest category of metal-resistance systems [9].

In order to identify genes or functions in an organism of interest, genome sequences can be produced and analyzed using comparative genomics tools. Although genomic sequence data allow for the listing of putative gene contents in an organism, they do not provide any functional evidence. To go one step further, genome-wide transcriptional analyses allow for rapid identification of genes or loci that are transcriptionally active and associated with a particular physiological state. Such transcriptomic studies can now be available for any organism at a relatively low cost using high-throughput sequencing techniques in RNA sequencing (RNAseq) experiments.

In this paper, the main goals are to study gene expression profiles associated with Zn or Cd exposure and to identify genes involved in Cd and Zn tolerance in symbiotic *Mesorhizobium* bacteria using comparative genomics and transcriptomics. Two strains isolated from mining spoils of distinct geographical origins are compared: strain STM 2683 was isolated from the Avinières mine in the Cévennes area [7] and strain STM 4661 was isolated from the Eylie mine in the Pyrénées ariégeoises (France). The draft genome sequences were produced using mate-pair 454 pyrosequencing and analyzed using an automated microbial genome annotation pipeline. RNAseq analyses were performed on bacteria exposed for half a generation time to mild Zn or Cd stresses which affect growth negatively but only to a low extent. Using mild exposure allows for the detection of genes and mechanisms specifically induced in the response to heavy metals while avoiding all stresses related to complex responses induced when submitting bacteria to high growth-inhibiting or lethal heavy-metal concentrations.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of Zn and Cd on *Mesorhizobium metallidurans* STM 2683^T and *Mesorhizobium* sp. STM 4661 growth – The effect of Zn or Cd addition to the TY growth medium was tested for the two metal-tolerant *Mesorhizobium* strains (STM 2683 and STM 4661) and for the metal-sensitive strains *M. thianshanense* (ORS 2740^T) and *Mesorhizobium* sp. STM 2682 (Figure III-1). Strains STM 2683 and 4661 were able to grow in media containing higher concentrations of Zn or Cd when compared to sensitive strains (MIC = 3 mM Zn and MIC > 0.5 mM Cd). In TY medium, the closely related *Mesorhizobium* strain STM 2682 or *M. thianshanense* were not able to grow when Zn or Cd concentrations were raised to 1 mM or 0.2 mM, respectively (Figure III-1). Aiming at characterizing genes responding to Zn or Cd exposure in our mesorhizobial strains, we prepared three RNA libraries previously depleted in rRNA for both sequenced strains. The experimental design included Cd or Zn (0.025 and 0.5 mM, respectively) at concentrations that were high enough to affect mesorhizobia growth without being lethal (Figure III-1). Such conditions were chosen in order to avoid general and unspecific stress responses which would lead in the deregulation of a large number of genes that are not directly linked to the heavy-metal response. Furthermore, we used a short time exposure (approximately half a generation time) to these metals so as to detect genes and functions involved in the early response to the metals studied.

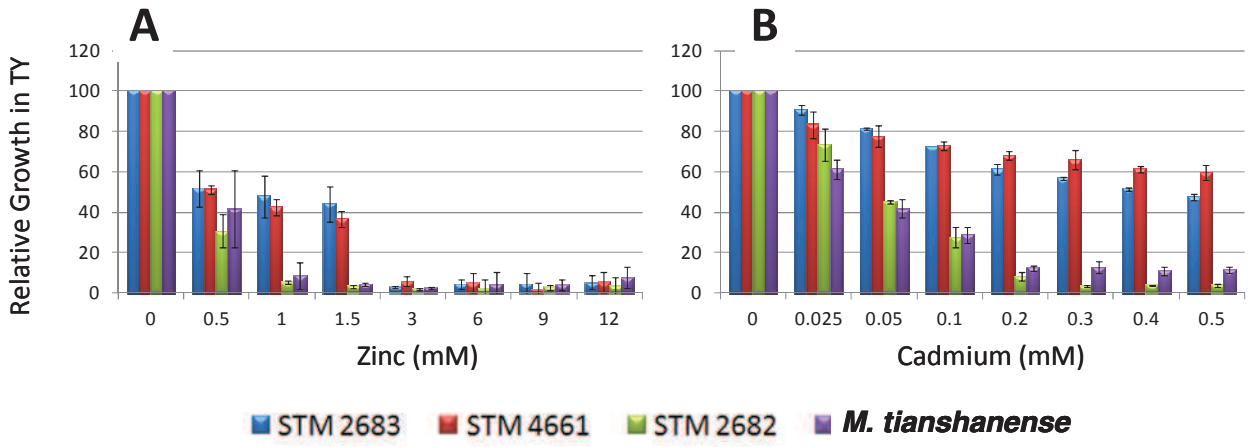


Figure III-1: Relative growth of *Mesorhizobium* strains STM 2683, STM 4661, STM 2682 and *M. tianshanense* in TY medium complemented with various concentrations of Zinc (A) or Cadmium (B).

Genome sequencing, assembly and automated annotation – In order to identify the genetic bases of our two metal-tolerant mesorhizobia and to use them as references to map sequence reads from the transcriptome data sets, the draft genomes of the two studied strains were first sequenced using half a 454 run (Titanium kit) with paired-end reads from an 8 kb genomic bank for each isolate. After the assembly, the comparison with *Mesorhizobium loti* genome led for both genomes to the identification and organization of one chromosomal (~ 6 Mb) and one plasmidic (~ 250 kb) scaffolds. These genomes were integrated into the MicroScope platform [12] to perform automatic and expert annotation of the genes, providing 6908 genomic objects for STM 2683 and 7065 for STM 4661. The general genome characteristics for the two analyzed strains are listed in Table III-1.

In order to estimate genomic divergence between the two strains, we explored the proportions of homologous CDSs as a function of the identity percentage. Homologous genes present in the two strains were retrieved with the comparative genomics phyloprofile tool in MicroScope. Using an alignment threshold of 80 % identity over at least 80 % of the query sequence and target size, approximately 4200 homologous genes, present in both strains, were identified (4183 CDSs from STM 2683 presented at least one homolog in STM 4661 and 4186 CDSs from STM 4661 presented a minimum of one homolog in STM 2683). These results show that approximately two thirds of the genomes are conserved in the two sequenced metal-tolerant strains (data not shown).

Table III-1: Genome overview after automated annotation in MaGe.

Characteristics	**STM 2683**		**STM 4661**	
	Chromosome	**Plasmid**	**Chromosome**	**Plasmid**
Sequence length (bases)	6020204	233929	6304314	251782
GC (%)	62.53	60.53	62.44	60.53
Number of Scaffolds	3	2	1	1
Number of Contigs	171	20	83	6
Nosferatu Repeated Regions (%)	5.4	2.47	4.99	0
Average CDS length (bp)	825.98	755.96	845.13	838.18
Average intergenic length (bp)	134.86	162.18	139.62	160.14
Protein coding density (%)	88.01	86.25	88.01	87.12
Number of Genomic Objects (CDS, fCDS, rRNA, tRNA, miscRNA) *	6,628	280	6,791	274
Number of CDSs *	6,512	272	6,683	267
Number of fCDSs *	54	6	40	4
Number of miscRNAs	14	2	16	3
Number of rRNAs	3	0	3	0
Number of tRNAs	45	0	49	0

* Without artefacts.

RNAseq analysis, mapping and statistical analyses using DESeq - The universal bacterial rRNA subtraction kit (Microbe Express, Ambion) allowed for the removal of most rRNAs. Qualitative analyses of RNA samples prior and after depletion indicated that total RNA was of high quality (RIN values ranging from 7 to 10) and that most 16S and 23S rRNA peaks were removed after depletion (Figure III-S1). The mRNA samples were sequenced using the HiSeq2000 technology (36 bp). The number of reads which passed the initial quality filter varied from 68.8 to ca 81.6 million and the quality analyses of the sequencing runs showed that the sequencing step was successful (data not shown). The general characteristics of the RNAseq data, listed in Table III-2, showed homogeneity between treatments and strains. Notably, we found that more than 97 % of the sequence reads were mapped at least once onto genomic objects identified via the automated annotation Microscope pipeline. Considering that total bacterial RNA is composed of 95 % rRNA, we found that the percentage of rRNA depletion was extremely high (ranging from 92 to 96 %) confirming that the kit used was well suited for our *Mesorhizobium* strains.

After removal of all rRNA reads, more than 30 million sequence reads for each treatment mapped uniquely onto genomic objects and were used to estimate gene expression. Interestingly, sequence reads were successfully assigned to all predicted genomic objects, suggesting that all CDSs were transcribed and that sequencing was deep enough to cover the full transcriptomes. All read mapping data of STM 2683 and STM 4661 are accessible from MaGe interface at http://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/expdata/rnaseqProjects.php.

Table III-2: RNAseq overview. Numbers of reads per sample are indicated according to the mapping results together with their proportions relative to the total read numbers in parentheses.

Characteristics	STM 2683			STM 4661		
	control (TY)	Zinc (0.5 mM)	Cadmium (0.025 mM)	control (TY)	Zinc (0.5 mM)	Cadmium (0.025 mM)
Total read number	81308886 (100 %)	73773403 (100 %)	68813483 (100%)	72111015 (100 %)	74765870 (100 %)	81587705 (100 %)
Number of unmapped reads	1949038 (2.40 %)	2031313 (2.75 %)	1892551 (2.75 %)	1623268 (2.25 %)	1718059 (2.30 %)	1776552 (2.18 %)
Number of reads mapped at least once	79359848 (97.60 %)	71742090 97.25 %)	66920932 (97.25 %)	70487747 (97.75 %)	73047811 (97.70 %)	79811153 (97.82 %)
Number of reads mapped on rRNA	41428635 (50.95 %)	30531652 (41.39 %)	32224949 (46.83 %)	39466389 (54.73 %)	37982860 (50.80 %)	47500946 (58.22 %)
rRNA substitution rate *	94.3	96.1	95.1	93.3	94.3	92.3
Number of reads kept (only reads uniquely mapped)	78729668 (96.83 %)	71178074 (96.48 %)	66380750 (96.46 %)	70090461 (97.20 %)	72683423 (97.21 %)	79431748 (97.36 %)
Number of reads kept against chromosome	78147818 (96.11 %)	70490263 (95.55 %)	65861607 (95.71 %)	69802581 (96.80 %)	72348246 (96.77 %)	79118286 (96.97 %)
Number of reads kept against plasmid	581850 (0.72 %)	687811 (0.93 %)	519143 (0.75 %)	287880 (0.40 %)	335177 (0.45 %)	313462 (0.38 %)
Number of reads kept for downstream analyses**	37301033 (45.86 %)	40646422 (55.10 %)	34155801 (49.64 %)	30624072 (42.47 %)	34700563 (46.41 %)	31930802 (39.14 %)

* Estimated rRNA substitution rate, considering that 95 % of the RNA was initially composed of rRNA.
** Only reads that uniquely mapped, and did not map rRNAs.

Using the MicroScope automated RNASeq pipeline, mapping results were then translated into raw read counts for each gene and processed through the DESeq statistical package [12] to normalize and test for differential expression between conditions (see Materials & Methods). Basically, DESeq estimates library size factors to normalize gene read counts between samples by assuming that a majority of genes have comparable expression levels in all samples. It then estimates gene expression dispersion due to biological and technical variations within each condition, and model it using negative binomial distributions. Genes for which expression levels significantly differ from the estimated dispersion are then called as differently expressed, and DESeq provides *p-values* adjusted for multiple testing with the Benjamini-Hochberg procedure [14] to control the false discovery rate (FDR). Although each sample (composed of 6 pooled biological replicates) was sequenced in one replicate only, DESeq was able to estimate gene expression dispersion by assuming that most genes have similar expression across treatments. This method overestimates dispersion relatively to when sample replicates are available, resulting in more conservative differential expression calls and slightly lower sensitivity [13].

Possible ways to estimate the quality and reproducibility of the RNAseq data produced

consist in comparing the distributions of (i) the read number per CDS prior to normalization and (ii) the differential expressions of CDSs in all comparisons after normalization. Because we observed a wide magnitude in the read count numbers per CDS, a logarithmic transformation of these data was performed. A logarithmic base-2 transformation of fold changes was used to represent expression differences. The Table III-S1 reports the descriptive statistics obtained from our quantitative RNAseq datasets. The variances obtained in expression statistical analyses (Table III-S1) were low (ranging from 0.058 to 0.075), indicating that most predicted genes presented similar expression levels across treatments. Box plots can be used to compare the general characteristics of large datasets. These were produced in order to compare the distributions of our RNAseq data between treatments but also between strains (Figure III-2). Figure III-2A presents the distribution of the read numbers per CDS for all three treatments (control, Zn and Cd) and the two strains (STM 2683 and 4661). The median read number per CDS varied from 1432 to 1714 for STM 2683 and from 1180 to 1342 for STM 4661 (Table III-S1). The lower median read number per CDS obtained from the RNAseq data of STM 4661 can be attributed to the larger number of reads mapped on ribosomal RNAs as well as the higher CDS number that was predicted in this isolate. Nevertheless, despite this shift in the median values, comparable distributions were found as indicated by box sizes and box plot whiskers (Figure III-2A). The box plots representing the distributions of expression differences (corresponding to log-2 fold changes) for all possible comparisons and for the two isolates were also very similar (Figure III-2B). In this case, the interquartile values obtained were lower than 0.3 for all comparisons, which is equivalent to a negative or a positive fold change of 1.11 or less for 50 % of the annotated CDSs. Furthermore, whiskers sizes (+/- 1.5 of the interquartile values representing more than 95 % of the data in our distributions) were similar between comparisons and isolates and close to a log-2 fold change of +/- 0.5, showing that for more than 95 % of the predicted CDSs, fold changes under 1.41 were observed. These results indicate that the treatments did not have a profound effect at the genome-wide expression level and that the majority of CDSs were not affected by the treatments. Histograms showing the distributions of the log-10 read counts for each treatment and the log-2 fold changes for all comparisons are presented in Figures III-S2 and III-S3, respectively. Interestingly, they were very similar for all treatments and were not strain-specific, showing that the transcriptome sequencing step was reproducible at the quantitative level.

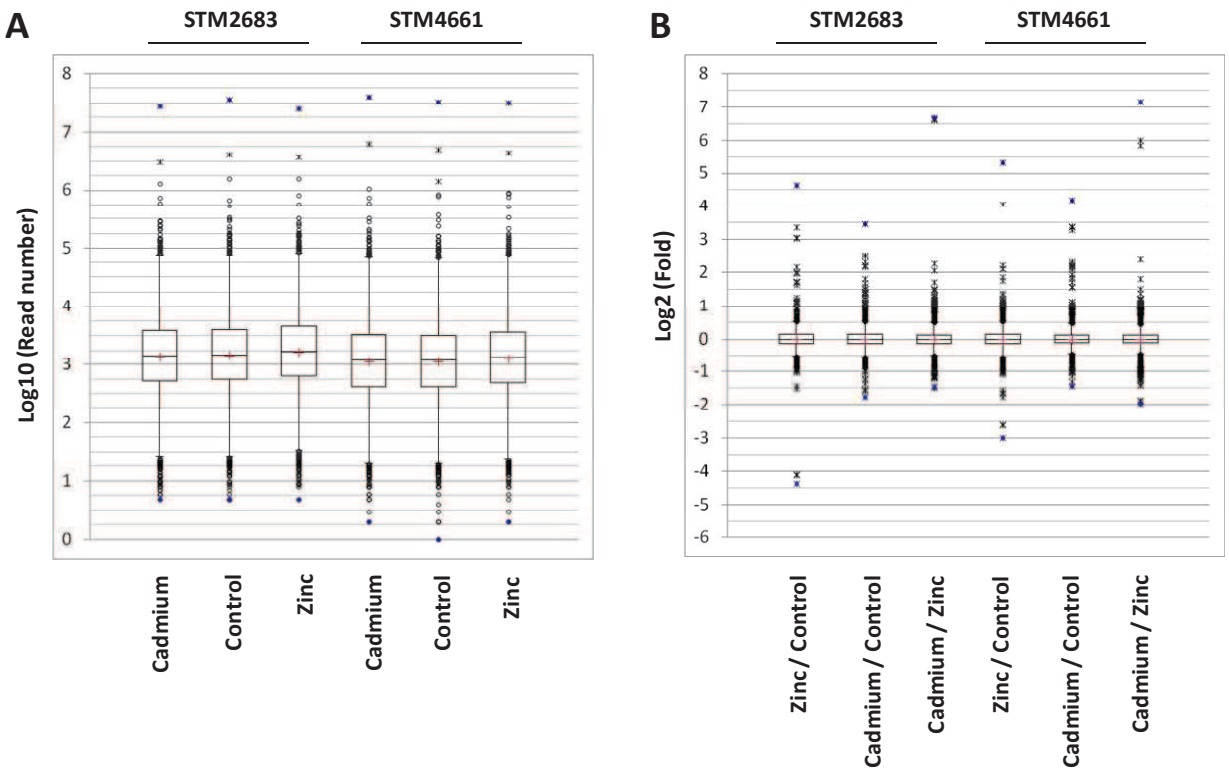


Figure III-2: Distributions of the RNAseq datasets using box plot representations including mild and extreme outliers (empty circles and stars, respectively) and whiskers corresponding to + and – 1.5 of the interquartile values (bars). (A) Box plots representing expression level distributions (log 10 of read numbers) for all CDSs in the three treatments (Cadmium, control or Zinc, bottom of the graph) and for the two isolates (STM 2683 and 4661, top of the graph). (B) Box plots representing the distributions of the log-2 fold changes for all possible comparisons (bottom of the graph) for all CDSs and for the two isolates (top of the graph). Extreme values are in blue and mean values are represented by red crosses.

The Box plot and histogram graphical representations showed that the distributions of the data were quantitatively comparable between treatments and strains, showing that the approach was reproducible. However, these representations do not allow to test if read numbers affect differential expression variance, especially for genes that are lowly transcribed. In order to visualize and estimate data dispersion according to read count levels, scatter plots and MA plots were produced for each metal *vs* control comparison (Figure III-S4 and III-S5). These representations show that the data were highly centered in all comparisons. Correlation factors (R^2 values) were calculated for CDSs classified by their mean read numbers for all scatter plots (Figure III-S4). As expected, the correlation factor generally increased with the read count number per CDS, even though a rather high correlation factor ($R^2 > 0.73$) for CDSs with a mean read number under 100 was found. Altogether, our data show that the RNAseq approach produced high quality and quantitative data, even for lowly expressed CDSs.

Quantitative PCR on selected genes - The reliability of our RNAseq data can be assessed by comparing the differential expression of a set of regulated genes using an alternative approach such as quantitative real time PCR (qPCR). The relative expression of three genes present in both studied microbial genomes was estimated using qPCR. Three genes presenting significant differential expression values after DESeq analyses in our RNAseq data (genes encoding for a heavy-metal-translocating P_{IB}-type ATPase: MESS2v1_74003/MESS4v1_360013, a periplasmic binding protein of the ABC-type transporter: MESS2v1_300037/MESS4v1_520016, and a putative Signal peptidase II: MESS2v1_740019/MESS4v1_360023 in STM 2683 and 4661, respectively) were chosen and analyzed using two reference genes (*rec*A *and gln*A) whose expression was unaltered by heavy metal treatment. The logarithm (base 2) ratios (Zn or Cd treatment/control treatment) were assessed in the two strains using the same pooled extracted RNA samples that were used for the RNAseq. The relative expression values obtained by qPCR for each gene and for the two treatments were calculated using the mean values obtained using the two reference gene expression values as standards. These relative expression levels were compared to those obtained with the RNAseq approach (Figure III-S6). We found that the genes identified as significantly regulated using the genome-wide approach were also differentially expressed by qPCR for both isolates (Figure III-S6A, B, D and E). Despite a higher up-regulation observed by qPCR for MESS2v1_740019 upon Cd treatment on STM 2683, a correlation factor (R^2) above 0.9 was found for both isolates when plotting the log 2 (metal/control) values obtained for the five selected genes using the genome-wide RNAseq approach against the qPCR data (Figure III-S6C and F). Differences in the amplitude of the deregulation between the two techniques could be attributed to the PCR step used to amplify libraries prior to Illumina sequencing or to differences resulting from the mRNA purification procedure. Nevertheless, the high correlation between the two approaches shows that RNAseq data can be used to assess the global gene expression levels in our *Mesorhizobium* strains and more particularly to identify the genes specifically induced or repressed by Zn or Cd.

To estimate the biological variance of our data, the relative expression ratios of the same target genes were also studied by qPCR in STM 2683, using total RNA isolated from independent biological replicates as starting materials, and the ratios were compared to the results obtained using pooled RNA samples (Figure III-S7). Again, a correlation factor above 0.99 was obtained between replicates (data not shown). We found that the relative expression values obtained from the pooled RNA samples and the biological replicates were very similar with both metal treatments and the standard deviations between technical replicates were

comparable to those obtained in biological replicates (Figure III-S7A and B) and were highly correlated ($R^2 > 0.98$) (Figure III-S7C). Overall, the high correlation factors we obtained show that the RNAseq data produced in the present study contain reliable relative expression values. This is in agreement and in line with the RNAseq data analyses which showed high correlations of the read count numbers between treatments at the genome-wide level. Despite its relatively high cost, the RNAseq approach, which is based on transcript sequencing, represents a choice method for quantitative transcript measurements: the generated sequences are proofs of the corresponding gene transcriptional activities as compared to other indirect global approaches based on hybridization or qPCR which allow for the quantification of transcript levels for a minimal set of targets.

Functional composition of *Mesorhizobium* transcriptomes and alteration upon heavy metal exposure - The functional COG classification of all CDSs in the two *Mesorhizobium* genomes under study were obtained automatically using COGNiTOR [15] which is included in the automated annotation pipeline of MicroScope used to mine genomic and transcriptomic data. The CDSs that were assigned to a COG class were retrieved. Approximately 72 % of all predicted CDSs were assigned to at least one COG class for both our isolates (Table III-3).

Table III-3: COG functional assignment of CDSs detected in the genomes of *M. metallidurans* STM 2683^T and *Mesorhizobium* sp. STM 4661.

COG Class ID	Process	Description	CDS Number	
			2683*	4661**
B	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Chromatin structure and dynamics	5	6
C[1, 2]	METABOLISM	Energy production and conversion	370	393
D[2]	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	54	51
E[1]	METABOLISM	Amino acid transport and metabolism	1111	1135
F	METABOLISM	Nucleotide transport and metabolism	134	128
G[1]	METABOLISM	Carbohydrate transport and metabolism	628	604
H	METABOLISM	Coenzyme transport and metabolism	194	210
I	METABOLISM	Lipid transport and metabolism	279	295
J[1, 2]	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Translation, ribosomal structure and biogenesis	247	257
K	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Transcription	526	540
L[2]	INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Replication, recombination and repair	278	257
M[1, 2]	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	322	343
N[2]	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Cell motility	69	48
O[2, 3]	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	227	213
P[1, 3]	METABOLISM	Inorganic ion transport and metabolism	629	654
Q	METABOLISM	Secondary metabolite biosynthesis, transport and catabolism	249	263
R[1]	POORLY CHARACTERIZED	General function prediction only	994	1058
S	POORLY CHARACTERIZED	Function unknown	421	454
T[2]	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Signal transduction mechanisms	237	237
U[2]	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	107	91
V	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Defense mechanisms	204	205
W	CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	Extracellular structures	1	1

* 4903 CDS out of 6844 (*i.e.* 71.6 %) were assigned to at least one COG class ID for STM 2683.
** 5042 CDS out of 6994 (*i.e.* 72.1 %) were assigned to at least one COG Class ID for STM 4661.
[1] COG Class representing more than 5 % of the transcriptomes for both strains and for all treatments (cf. Figure III-3).
[2] Transcriptionally over-active COG Class for both strains and in all treatments (cf. Figure III-4).
[3] COG Class presenting a higher proportion of differentially regulated genes for both strains and both heavy metal treatments when compared to control treatments (cf. Figure III-5).

To estimate absolute RNA contents in *Mesorhizobium* transcriptomes as related to functional classes, the sums of reads for the CDSs assigned to each COG functional category were calculated for each treatment. The pie charts representing the proportions of each COG class (B-W) in the transcriptomes of *Mesorhizobium* were produced using the means of read numbers for all three treatments (Figure III-3A and 3C for STM 2683 and STM 4661, respectively). For all the six transcriptomes obtained by RNAseq (two isolates and three

treatments), the median read number per COG class was calculated to distinguish the most represented classes at the quantitative level in the transcriptomes (Figure III-3B and 3D for STM 2683 and 4661, respectively). The total read count per COG class enabled us to get an insight into the functional status of the organism under study under predefined conditions. Using total and mean read counts in relation to COG categories, we calculated the correlations for all possible comparisons (Table III-S2). We found that the functional status in terms of quantitative functional contents of the transcriptomes was globally conserved across treatments within a strain but also between strains with correlation factors (R^2) above 0.98 and 0.90, respectively, when comparing absolute RNA contents (total read number per COG Class, Table III-S2A) or above 0.94 and 0.77, respectively, when mean read per COG class was tested (Table III-S2B). The most represented functional categories at the transcriptional level in both isolates belonged to metabolism processes, principally COG classes E, G, P and C which refer to the metabolism and transport of amino acids, carbohydrates, inorganic ions and energy production and conversion, respectively, the poorly characterized COG class R, and class J which refers to translation and ribosome structure and biogenesis.

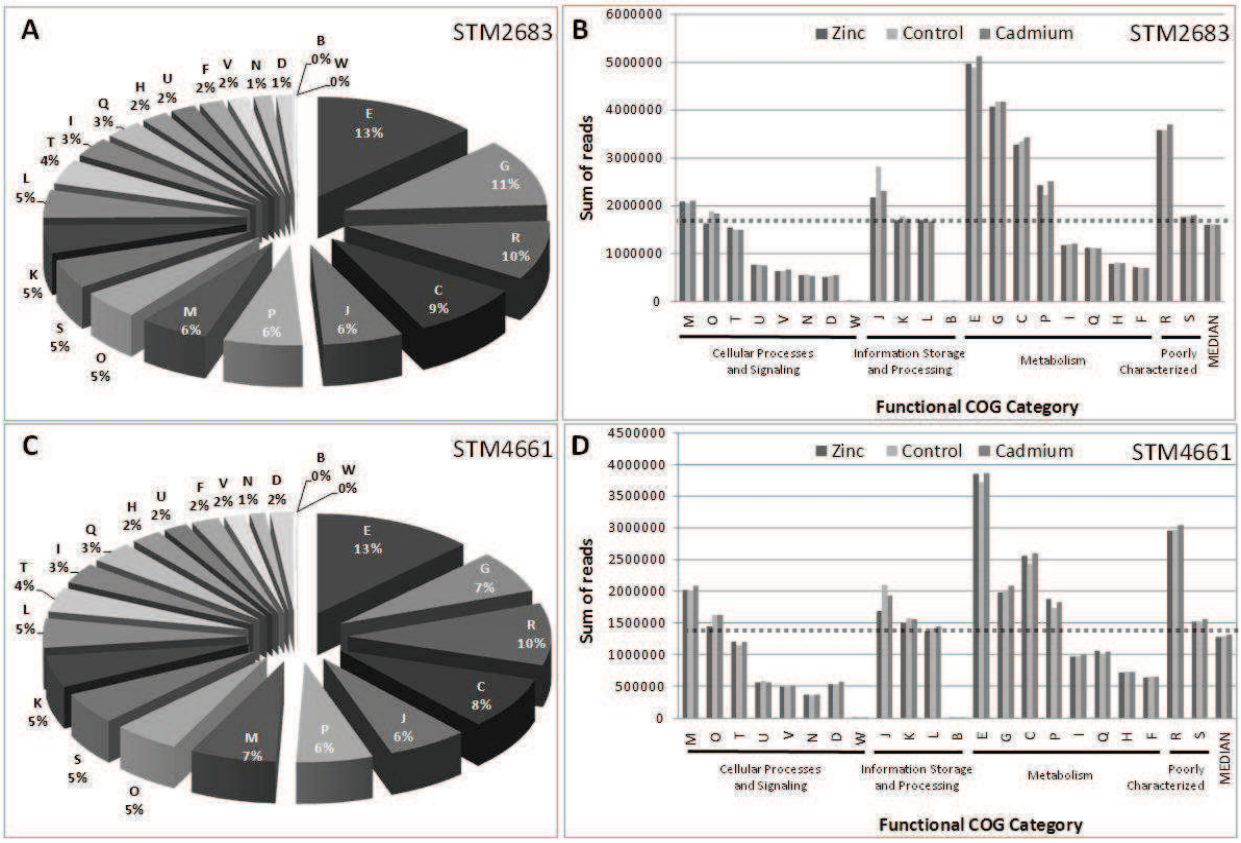


Figure III-3: Functional composition of *Mesorhizobium metallidurans* transcriptomes. The proportions and absolute amounts of reads for CDSs after COG class assignment are shown for strains STM 2683 (A and B) and STM 4661 (C and D). Chart pies (A and C) show the relative quantities of transcripts belonging to defined COG functional classes (B-W; see Table III-3 for description) in the *M. metallidurans* transcriptomes. Histograms representing the quantitative composition of the transcriptomes (B and D) organized by the biological Process and Class ID (bottom of histograms) show the total amounts of reads (indicative of transcript abundance) in each class and for each treatment (Zinc, control or Cadmium). The median read numbers per class and per treatment are indicated as the last bars on the histograms which were used to draw the dotted line above which the defined classes are the most represented for both organisms and for all treatments (these class IDs and their proportions are indicated in white on the pie charts).

Our quantitative analysis evidences the relative content of each functional class of the transcriptomes likely to be representative of *Mesorhizobium* growth in each medium under study. However, as expected, the number of transcripts per COG class was correlated to the number of CDSs per class (R^2 of 0.8, data not shown) and thus reflects relative genomic content. In order to estimate the relative transcriptional activity of each functional category, the sums of reads per COG class was normalized to their respective CDS numbers (Figure III-4). Such normalization shows that the COG classes belonging to cellular processes and signaling (classes M, O, T, U, N and D) as well as information processing and storage (classes J and L) and class C could be considered as transcriptionally over-active as compared to the other COG classes in both isolates (Figure III-4 and Table III-3). These results are not surprising as the cells were harvested during the exponential growth phase which requires the

involvement of many genes whose function is associated with (i) basic cellular processes such as cell cycle control, cell division, chromosome partitioning, cell wall/ membrane/ envelope biogenesis, signal transduction mechanisms, intracellular trafficking and (ii) information storage and processing such as replication and translation, all of which require high energy production and conversion.

Interestingly, despite correlations of the sum and mean read counts between the treatments and strains (Table III-S2), slight differences were noted for the COG class J that refers to translation, ribosomal structure and biogenesis. Indeed, in both isolates, the two metal treatments triggered a decrease of the transcription levels for genes assigned to this particular COG class (Figures III-3 and III-4). Box plot representations of the log-2 fold changes between metal and control treatment data as classified by COG functional categories (Figure III-S8) confirmed this observation, suggesting that metal treatment affects translation and ribosome structure and biogenesis. These results are in line with observations made by Pereira and colleagues (2006) who found that metal exposure could affect protein levels as shown for *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolates [16]. However, despite a relatively high tolerance of our *Mesorhizobium* isolates as compared to other mesorhizobia [7], our transcriptomic data suggest that a global repression of the translation machinery occurs upon Cd or Zn exposure; according to Pereira's hypothesis, such repression should categorize our isolates as metal sensitive. Additional experiments are required to verify whether our isolates are affected in protein synthesis and compare their levels to other mesorhizobia, including strains more tolerant than those presently studied in order to validate this hypothesis and show that it is applicable to the *Mesorhizobium* genus. Interestingly, previous studies on the response of *E. coli* to Cd show that among the functions the heavy metal altered most, protein biosynthesis was stopped [17].

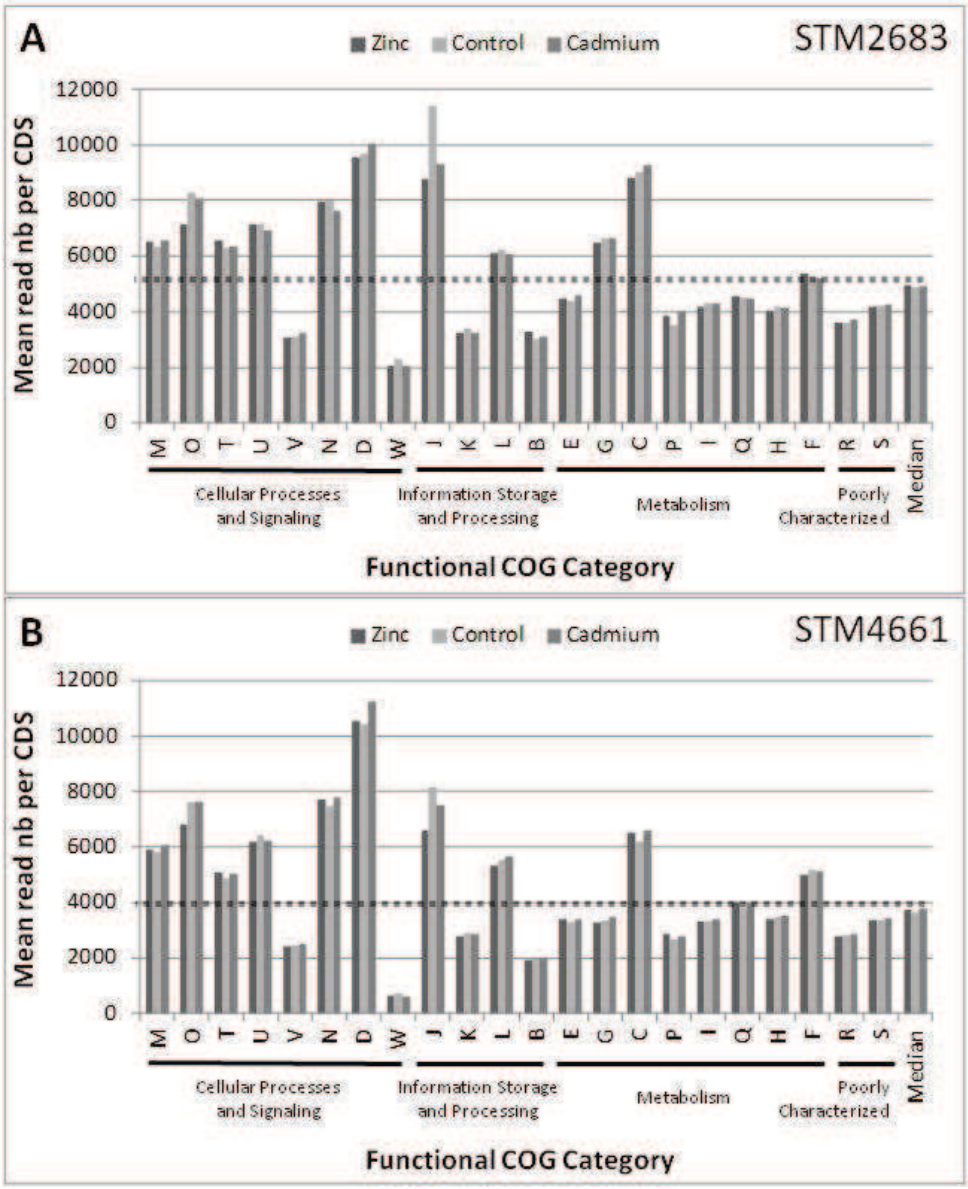


Figure III-4: Histograms representing mean read numbers per COG class for STM 2683 (A) and 4661 (B) in the three treatments (Zinc, control and Cadmium). The median read numbers per class and per treatment (last bars on the histograms) were used to draw the dotted line above which classes can be considered as transcriptionally over-active and those below as under-active.

In order to assess the effect of heavy metals on general functional processes in the isolates, we compared the functional distribution of the most significantly deregulated genes (padj ≤ 0.1) to which a COG class was assigned to full gene set distribution (Figure III-5). The percentage of deregulated genes per category gives a rapid mean to estimate which COG classes are the most affected by metal treatment. Interestingly, classes O and P appeared as over-represented when compared to the full gene set for both metals and both isolates. Class O refers to post-translational modification, protein turnover, chaperones, which support the hypothesis that protein biosynthesis and stability are affected by Zn and Cd exposure. Class P corresponds to inorganic ion transport and metabolism, which indicates that Zn or Cd divalent

cations are processed by bacteria as soon as they are sensed, most probably through export systems [9].

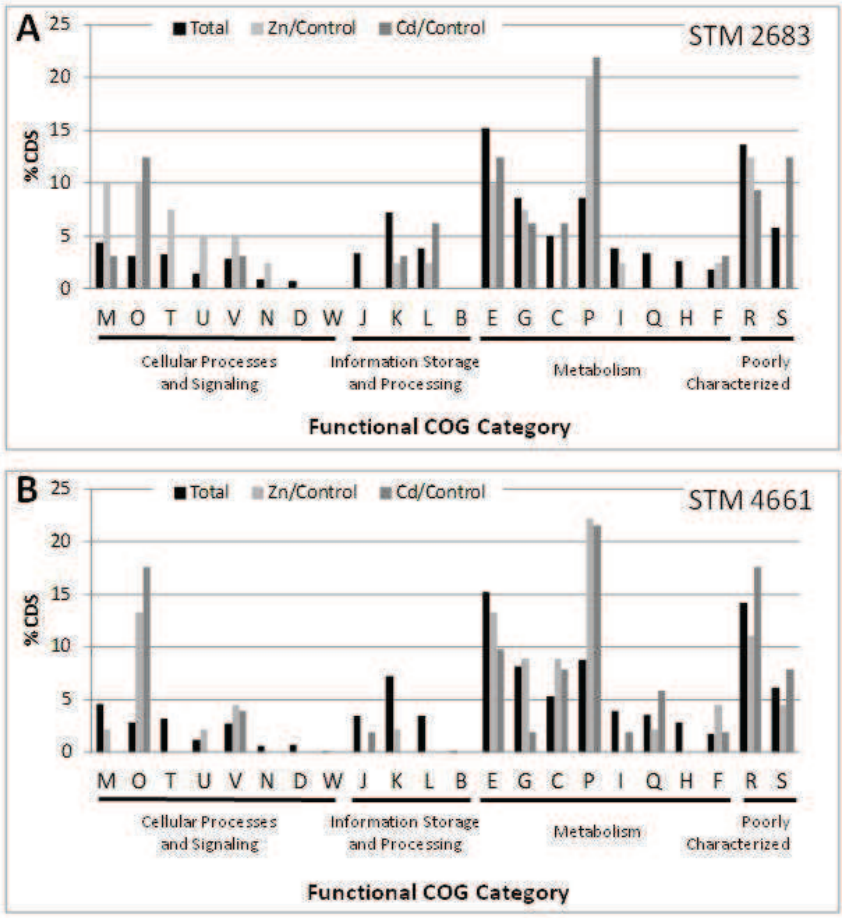


Figure III-5: Histograms representing the percentages of CDSs classified by functional COG category for STM 2683 (A) and 4661 (B) in the total set of CDSs (black bars), in the Zinc or Cadmium treatments when compared to the control treatment (respectively light and dark gray bars). For a defined COG class, gray bars above the black ones indicate that upon heavy metal treatment, the corresponding COG class contains a higher proportion of CDSs that display differential regulation.

Identification of genes regulated by heavy metals in *Mesorhizobium* strains STM 2683 and STM 4661 - Transcriptional profiles obtained using the genome-wide RNAseq approach was performed on pooled samples. The high reproducibility between treatments, as exemplified by the high correlation factors of read counts and relative expression values of the RNAseq datasets allowed us to obtain adjusted *p-values* (FDR) with DESeq. Putative CDSs presenting FDR values < 0.1 in a "metal" *vs* "control" experiment are listed in Tables III-4 and III-5 for STM 2683 and STM 4661, respectively. A total of 72/6844 and 68/6994 putative CDSs (or 1.05 % and 0.97 % CDSs for STM 2683 and 4661, respectively) were found to be significantly differentially expressed by one or both metals for STM 2683 and STM 4661, respectively. These putative differentially expressed CDSs are classified into six

categories: transport, sequestration, regulation, oxidoreduction, others and unclassified. Thirteen out of seventy-two and 13/68 putative CDSs (18 % for STM 2683 and 19.1 % for STM 4661) encoded transport proteins, 15/72 and 16/68 putative CDSs (20.8 % for STM 2683 and 23.5 % for STM 4661) encoded proteins involved in sequestration, 3/72 and 1/68 (4.2 % for STM 2683 and 1.5 % for STM 4661) encoded regulators, 5/72 and 10/68 putative CDSs (7 % for STM 2683 and 14.7 % for STM 4661) encoded proteins involved in oxidoreduction, 6/72 and 4/68 putative CDSs (8.3 % for STM 2683 and 5.9 % for STM 4661) encoded proteins possibly not involved in the metal response and 30/72 and 24/68 putative CDSs (41.7 % for STM 2683 and 35.3 % for STM 4661) were unclassified for STM 2683 and 4661, respectively. The category "unclassified" is the most represented among significant regulated putative CDSs; this is probably due to the automatic annotation of the two mesorhizobial genomes. Few CDSs are classified into the category "others" which can be assimilated to the non-specific metal response, suggesting that the RNAseq approach in our conditions is reliable and allowed us to identify the genes involved in the specific metal response. "Transport" and "sequestration" are the most represented categories after the "unclassified" category among significantly regulated putative CDSs. This result is confirmed by a comparative genomic study performed with seven sequenced *Mesorhizobium* genomes; three metallicolous genomes (*M. metallidurans* STM 2683^{T}, *Mesorhizobium* sp. STM 4661 and *M. amorphae* CCNWGS0123) and four non-metallicolous genomes (*M. ciceri* bv. *biserrulae* WSM 1271, *M. opportunistum* WSM 2075, *M. huakuii* MAFF303099, *M. australicum* WSM 2073). The study shows that the genes that encode transport and sequestration proteins are specific to the three metallicolous mesorhizobial genomes, (data not shown). Among the putative CDSs significantly regulated in STM 2683, 39 (27 up and 12 down) and 48 (38 up and 10 down) were regulated upon Zn and Cd exposure, respectively; 15 of them were regulated by both metals. In STM 4661, 36 (23 up and 13 down) and 49 (42 up and 7 down) were regulated after Zn and Cd treatments, respectively, and 17 were regulated by both metals (Tables III-4 and III-5).

Among the 1.05 % and 0.97 % putative CDSs that are significantly and differentially expressed for STM 2683 and STM 4661, respectively, 13 putative CDSs presenting homologs for both isolates were identified as significantly regulated under Zn and/or Cd treatments. Among these conserved and significantly regulated putative CDSs, some had homologies to genes encoding proteins whose function could be associated to specific heavy metal responses like metal sequestration or metal transport.

Table III-4: List of putative STM 2683 CDSs with a FDR < 0.1 after DESeq analysis in at least one metal treatment when compared to the control treatment.

Label*	CDS description and putative function	Zn / control **		Cd / control **		
		log2 Fold Change	FDR	log2 Fold Change	FDR	STM 4661 Homologs §
Transport						
MESS2v1_p180001	**Cation efflux system protein czcD-type (fragment)**	**1.97**	**2.5E-16**	**1.41**	**2E-08**	**MESS4v1_360039**
MESS2v1_300037	**ABC transporter, periplasmic binding protein, Zn import**	**-4.09**	**2E-60**	**2.54**	**1.3E-24**	**MESS4v1_520016**
MESS2v1_300038	**ABC transporter, permease protein, Zn import**	**-4.13**	**3E-116**	**2.49**	**4.5E-43**	**MESS4v1_520017**
MESS2v1_300039	**ABC transporter-related protein, Zn import**	**-4.37**	**2E-127**	**2.32**	**4E-24**	**MESS4v1_520018**
MESS2v1_740030	**Heavy metal-translocating P-type ATPase CadA1**	**3.07**	**6.7E-21**	**2.2**	**2.2E-12**	**MESS4v1_360013**
MESS2v1_980072	Transporter protein of unknown function	3.36	3E-42	2.2	4.9E-17	Not found
MESS2v1_980073	**Zinc, cobalt and lead efflux system ZntA**	**4.65**	**2E-134**	**3.48**	**6E-131**	**MESS4v1_610026**
MESS2v1_620035	Multidrug efflux system, subunit C, MdtC	0.93	0.0283	0.13	1	MESS4v1_690033
MESS2v1_620036	Multidrug efflux system, subunit A, MtdA	0.95	0.0116	0.0714	1	MESS4v1_690034
MESS2v1_730268	**Putative cation efflux system protein (Cobalt-zinc-cadmium resistance CzcD-like), CDF family (fragment, part 1)**	**1.12**	**0.0182**	**0.67**	**0.69**	**MESS4v1_360039**
MESS2v1_730269	**Putative cation efflux system protein (Cobalt-zinc-cadmium resistance CzcD-like), CDF family (fragment, part 2)**	**1.26**	**0.00012**	**0.64**	**0.48**	**MESS4v1_360039**
MESS2v1_320039	ABC transporter, permease protein, sugar transporter	0.44	1	0.82	0.0364	MESS4v1_530098
MESS2v1_730254	Efflux transporter, RND family, MFP subunit	-0.32	1	1.2	9.6E-05	Not found
Heavy metal sequestration						
MESS2v1_p180003	**conserved and cytoplasmic protein of unknown function, contains 2 CPX Zn finger domain**	**2.01**	**4.4E-17**	**1.42**	**5.5E-08**	**MESS4v1_360040**
MESS2v1_730267	**conserved and cytoplasmic protein of unknown function, contains 2 CPX Zn finger domain**	**1.09**	**0.0263**	**0.58**	**1**	**MESS4v1_360040**
MESS2v1_1150003	**conserved and cytoplasmic protein of unknown function, contains 2 CPX Zn finger domain**	-0.78	0.0792	-0.3	1	Not found
MESS2v1_310036	**Cyclic beta-glucan succinyl transferase OpgC, cytoplasmic membrane**	**-0.14**	**1**	**0.76**	**0.0813**	**MESS4v1_520093**
MESS2v1_1210019	Antibiotic biosynthesis monooxygenase, putative, involved in the biosynthesis of extracellular polysaccharides	-0.0992	1	0.77	0.0654	MESS4v1_160035
MESS2v1_740029	**Cytochrome c biogenesis protein, transmembrane region CcdA, putative, involved in reduction into Zn or Cd Sulfides**	**3.04**	**6.2E-29**	**2.17**	**1.9E-30**	**MESS4v1_360014**

MESS2v1_740015	Phosphoesterase PA-phosphatase-related (fragment), located in cytoplasmic membrane	1.19	3E-05	0.73	0.23	Not found
MESS2v1_740019	**Signal peptidase II. Aspartic peptidase. MEROPS family A08, located in cytoplasmic membrane**	**1.64**	**1.5E-12**	**0.65**	**0.3**	**MESS4v1_360023**
MESS2v1_440031	Rhodanese domain protein, putative, involved in reduction into sulfide	-0.0727	1	0.88	0.0481	MESS4v1_590053
MESS2v1_1160006	Transcription regulator, putative, involved in reduction into Cd Sulfides	0.0363	1	0.93	0.00391	MESS4v1_120164
MESS2v1_1660011	Putative cytochrome c biogenesis protein, involved in reduction into Cd sulfide, located in cytoplasmic membrane	0.1	1	1.59	2.9E-11	Not found
MESS2v1_1660012	Thioredoxin-related, putative, involved in reduction into Cd sulfide	-0.0234	1	1.68	9.2E-12	Not found
MESS2v1_160018	Serine endoprotease, periplasmic DegQ, putative, involved in Zn periplasmic binding	1.7	1.7E-10	0.24	1	MESS4v1_440007
MESS2v1_160022	Glutamate-ammonia-ligase adenylyltransferase GlnE, putative, involved in Zn periplasmic binding and participating to degQ activity	0.94	0.00988	0.33	1	MESS4v1_440011
MESS2v1_1530017	**conserved exported protein of unknown function, putative metal-binding protein**	**-0.45**	**1**	**-1.58**	**3.9E-06**	**MESS4v1_830506**
Regulation						
MESS2v1_160020	putative Two-component transcriptional regulator; transcriptional regulator involved in heavy-metal (Cu/Zn) homeostasis	1.12	0.00012	0.0744	1	MESS4v1_440009
MESS2v1_160021	Sensor protein	0.87	0.0294	0.17	1	MESS4v1_440010
MESS2v1_300035	Transcriptional regulator, AsnC family	-0.38	1	1.12	0.00047	MESS4v1_520012
Oxidoreduction						
MESS2v1_110046	Alpha/beta hydrolase fold protein	-0.87	0.0228	0.18	1	Not found
MESS2v1_620027	NAD(P)H:quinone oxidoreductase	1.1	0.00721	0.19	1	Not found
MESS2v1_1150002	Haloalkane dehalogenase	-0.83	0.0623	-0.74	0.21	Not found
MESS2v1_300036	conserved protein of unknown function, putative, hydrolase activity	-0.77	0.27	1.5	4.2E-07	MESS4v1_520015
MESS2v1_790137	**conserved exported protein of unknown function, putative, succinate dehydrogenase/fumarate reductase, flavoprotein subunit**	**-0.26**	**1**	**1.08**	**0.00047**	**MESS4v1_830086**
Others						
MESS2v1_1590041	**conserved protein of unknown function - N-acetyltransferase activity**	**-0.94**	**0.00626**	**-0.65**	**0.3**	**MESS4v1_830271**
MESS2v1_10049	Protein folding- Stress - chaperonin groES	-0.91	0.0796	-0.51	1	MESS4v1_60077, MESS4v1_430231, MESS4v1_510195
MESS2v1_900005	transposase	-0.0531	1	0.95	0.0027	
MESS2v1_980071	protein of unknown function, putative transposase	0.8	0.0689	-0.0345	1	Not found

MESS2v1_1530018	Nuclear export factor GLE1 (fragment)	-0.4	1	-1.54	2.6E-09	Not found
MESS2v1_1660010	conserved protein of unknown function, putative, antirestriction protein ArdC	-0.0576	1	0.89	0.00928	Not found

Unclassified

MESS2v1_p180002	protein of unknown function	2.02	1.8E-14	1.29	1.1E-06	Not found
MESS2v1_740028	exported protein of unknown function	2	3.1E-28	1.41	5E-07	Not found
MESS2v1_740031	protein of unknown function	2.17	2.4E-39	1.43	1.4E-09	Not found
MESS2v1_1030151	protein of unknown function	-1.5	2.7E-12	-1.75	2.1E-14	Not found
MESS2v1_1280026	protein of unknown function	1.73	6.8E-13	1.82	3.4E-13	Partial MESS4v1_220037
MESS2v1_1520011	protein of unknown function	-0.94	0.0626	-0.99	0.0116	Not found
MESS2v1_160019	protein of unknown function	1.71	1.1E-12	0.27	1	Not found
MESS2v1_280030	protein of unknown function	-0.79	0.0689	-0.66	0.29	Not found
MESS2v1_460011	protein of unknown function	0.79	0.0689	0.13	1	Not found
MESS2v1_620020	conserved exported protein of unknown function	-0.98	0.0834	0.12	1	Not found
MESS2v1_740027	protein of unknown function	1.18	3.5E-05	0.67	0.41	Not found
MESS2v1_980070	protein of unknown function	1.72	8.8E-08	0.92	0.62	Not found
MESS2v1_p110013	protein of unknown function	-0.72	0.73	-1.25	0.0192	Not found
MESS2v1_50011	protein of unknown function	-0.57	0.93	-0.99	0.0167	Not found
MESS2v1_310082	protein of unknown function	0.35	1	0.75	0.0813	Not found
MESS2v1_360012	protein of unknown function	-0.53	1	-0.77	0.0585	Not found
MESS2v1_600022	protein of unknown function	0.28	1	0.89	0.0833	Not found
MESS2v1_600023	conserved exported protein of unknown function	0.33	1	1.1	0.00014	MESS4v1_680074
MESS2v1_660006	protein of unknown function	-0.34	1	-0.75	0.0813	Not found
MESS2v1_730256	conserved protein of unknown function	-0.083	1	0.93	0.0049	Not found
MESS2v1_760133	protein of unknown function	-0.65	0.4	-0.75	0.0833	Not found
MESS2v1_1100024	conserved exported protein of unknown function	-0.41	1	0.94	0.0226	MESS4v1_120015
MESS2v1_1100025	conserved exported protein of unknown function	-0.12	1	1.05	0.00597	MESS4v1_120016
MESS2v1_1100026	conserved exported protein of unknown function	-0.22	1	1.05	0.00426	MESS4v1_120016
MESS2v1_1210020	conserved protein of unknown function	-0.71	0.44	1.36	5.1E-07	MESS4v1_160036
MESS2v1_1210021	conserved protein of unknown function	0.0842	1	1.2	0.00105	MESS4v1_160037
MESS2v1_1270078	conserved exported protein of unknown function	-0.0732	1	0.84	0.0503	MESS4v1_220001
MESS2v1_1530016	protein of unknown function	-0.42	1	-1.52	4.5E-05	Not found
MESS2v1_1660004	membrane protein of unknown function	0.16	1	1.04	0.00032	Not found
MESS2v1_1660005	conserved protein of unknown function	0.38	1	1.5	4.1E-12	Not found

* Gene labels (CDSs) were obtained from MaGe; CDSs significantly regulated (FDR < 0.1) upon metal exposure in both STM 2683 and STM 4661 are in bold.
** Significantly induced genes are on a green background while repressed genes are on a red background.
§ When detected, STM 4661 homologs are indicated (See Materials and Methods for details).

Table III-5: List of putative STM 4661 CDSs with a FDR < 0.1 after DESeq analysis in at least one metal treatment when compared to the control treatment.

Label*	CDS description and putative function	Zn / control **		Cd / control **		STM 2683 Homologs §
		log2 Fold Change	FDR	log2 Fold Change	FDR	
Transport						
MESS4v1_360013	**Heavy metal-translocating P-type ATPase CadA1**	**5.32**	**1.53E-121**	**3.38**	**1.96E-171**	**MESS2v1_740030**
MESS4v1_360015	conserved membrane protein of unknown function, putative CDF	2.2	1.10E-29	0.88	1.12E-02	Not found
MESS4v1_520016	**ABC transporter, periplasmic binding protein, Zn import**	**-2.98**	**4.47E-96**	**4.19**	**9.71E-173**	**MESS2v1_300037**
MESS4v1_520017	**ABC transporter, permease protein, Zn import**	**-2.59**	**1.49E-33**	**3.28**	**9.43E-144**	**MESS2v1_300038**
MESS4v1_520018	**ABC transporter-related protein, Zn import**	**-2.61**	**1.01E-23**	**3.4**	**2.99E-59**	**MESS2v1_300039**
MESS4v1_670093	Transporter protein of unknown function	-1.75	4.35E-06	-1.44	3.69E-04	MESS2v1_580019
MESS4v1_360039	**Zinc efflux system ZitB type**	**1.11**	**2.35E-02**	**0.55**	**0.91**	**MESS2v1_730268 MESS2v1_730269 fissed MESS2v1_p180001 (fragment)**
MESS4v1_610026	**Zinc, cobalt and lead efflux system ZntA**	**1.77**	**1.07E-10**	**-0.11**	**1**	**MESS2v1_980073**
MESS4v1_750116	Aliphatic sulphonate ABC transporter	-1.02	1.35E-03	-0.22	1	Not found
MESS4v1_240016	Iron-hydroxamate transporter subunit ; ATP-binding component of ABC superfamily, FhuC	-0.81	0.25	-1.3	7.08E-05	MESS2v1_1320036
MESS4v1_360106	ABC transporter, permease protein	0.13	1	0.87	7.05E-03	Not found
MESS4v1_360107	Transporter protein of unknown function	-0.28	1	0.8	3.68E-02	Not found
MESS4v1_670092	Hemin transport protein HmuS	-0.63	0.66	-0.8	6.41E-02	MESS2v1_580018
Heavy metal sequestration						
MESS4v1_360040	**Conserved and cytoplasmic protein of unknown function, contains 2 CPX Zn finger domains**	**1.02**	**8.10E-02**	**0.54**	**1**	**MESS2v1_730267, MESS2v1_p180003**
MESS4v1_750294	Xanthine dehydrogenase, Fe-S binding subunit XdhC, located in the cytoplasm	0.86	5.42E-02	0.1	1	Not found
MESS4v1_280090	Methyltransferase type 11, located in the cytoplasm	0.2	1	1.05	1.03E-04	MESS2v1_1480043
MESS4v1_520093	**Cyclic beta-glucan succinyl transferase OpgC, cytoplasmic membrane**	**0.15**	**1**	**0.81**	**4.02E-02**	**MESS2v1_310036**
MESS4v1_360014	**Cytochrome c biogenesis protein, transmembrane region CcdA, putative, involved in reduction into Zn or Cd Sulfides**	**4.07**	**4.31E-48**	**2.22**	**3.75E-31**	**MESS2v1_740029**
MESS4v1_360049	Thiol:disulfide interchange protein CycY, putative, involved in reduction into Zn or Cd Sulfides, located in the periplasm	1.12	1.07E-04	1.93	1.30E-24	MESS2v1_730262
MESS4v1_360050	Reduction into Zn or Cd Sulfides - putative thioredoxin protein	1.18	8.54E-05	2.14	4.83E-29	MESS2v1_730261

MESS4v1_360052	Putative oxidoreductase protein involved in reduction into Zn or Cd Sulfides	0.91	1.13E-02	1.86	9.13E-25	MESS2v1_730259
MESS4v1_360053	Conserved exported protein of unknown function, putative protein-disulfide isomerase	0.82	4.09E-02	1.71	3.89E-22	MESS2v1_730258
MESS4v1_360023	**Signal peptidase II. Aspartic peptidase. MEROPS family A08, located in cytoplasmic membrane**	**1.85**	**1.54E-13**	**0.69**	**0.14**	**MESS2v1_740019**
MESS4v1_160007	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrA, putative, involved in reduction into Cd Sulfides	8.49E-02	1	1.13	3.01E-04	MESS2v1_1200004
MESS4v1_360103	Glutathione S-transferas, putative, involved in reduction into Cd Sulfides	-0.26	1	0.98	1.81E-03	Not found
MESS4v1_310058	Fe(3+)-binding periplasmic protein, FbpA	-0.87	9.42E-02	-1.01	1.37E-03	MESS2v1_1490012
MESS4v1_360047	Conserved exported protein of unknown function, predicted metal-binding domain	1.33	1.93E-07	2.27	1.93E-36	MESS2v1_730264
MESS4v1_360048	Conserved exported protein of unknown function, predicted metal-binding domain	1.24	2.38E-06	2.19	8.73E-21	MESS2v1_730263
MESS4v1_830506	**conserved exported protein of unknown function, putative metal-binding protein**	**4.76E-02**	**1**	**-0.9**	**5.15E-02**	**MESS2v1_1530017**
Regulation						
MESS4v1_580068	ROK family protein	-0.84	3.37E-02	-0.36	1	MESS2v1_400012
Oxidoreduction						
MESS4v1_360054	Cytochrome c-type biogenesis protein CdcA (fragment)	0.92	2.06E-02	1.59	2.89E-18	
MESS4v1_360046	Multicopper oxidase, type 3	1.24	4.42E-06	2.09	1.95E-19	MESS2v1_730265
MESS4v1_750295	Putative Medium FAD-binding subunit of molybdenum enzyme	1.03	1.13E-02	0.29	1	Not found
MESS4v1_310027	Aldo/keto reductase	-3.16E-02	1	0.74	7.75E-02	MESS2v1_1480132
MESS4v1_340203	Exported protein of unknown function, putative hydrolase	-3.91E-02	1	0.84	4.40E-02	Not found
MESS4v1_340204	Conserved protein of unknown function, putative hydrolase	-5.32E-02	1	0.78	6.89E-02	Not found
MESS4v1_360100	Putative dioxygenase	-0.25	1	0.98	4.02E-03	Not found
MESS4v1_360104	3-hydroxybutyryl-coA dehydrogenase	-0.22	1	0.8	4.28E-02	Not found
MESS4v1_820066	Putative reductase	-0.1	1	0.88	1.07E-02	MESS2v1_790060
MESS4v1_830086	**conserved exported protein of unknown function, putative succinate dehydrogenase/fumarate reductase, flavoprotein subunit**	**-0.21**	**1**	**2.18**	**2.63E-32**	**MESS2v1_790137**
Others						
MESS4v1_830271	**conserved protein of unknown function - N-acetyltransferase activity**	**-1.08**	**3.12E-04**	**-0.47**	**1**	**MESS2v1_1590041**
MESS4v1_830272	putative ornithine decarboxylase	-0.98	1.42E-02	-0.62	0.32	MESS2v1_1590040
MESS4v1_580067	Tagatose-1,6-bisphosphate aldolase, located in the cytoplasm	-0.94	1.87E-02	-0.4	1	MESS2v1_400011
MESS4v1_360102	Putative translation initiation inhibitor, yjgF	-0.22	1	0.98	1.84E-03	Not found

	family					
Unclassified						
MESS4v1_360051	protein of unknown function	0.94	1.42E-02	1.8	3.06E-15	Not found
MESS4v1_280043	conserved protein of unknown function	0.89	3.06E-02	0.38	1	Not found
MESS4v1_330155	conserved protein of unknown function	0.83	8.89E-02	0.59	0.51	Not found
MESS4v1_430174	conserved protein of unknown function	0.88	2.49E-02	0.17	1	MESS2v1_130027
MESS4v1_610025	protein of unknown function	1.04	2.09E-03	-4.88E-02	1	Not found
MESS4v1_690015	protein of unknown function	-1.64	1.71E-06	0.18	1	Not found
MESS4v1_720075	protein of unknown function	0.84	9.38E-02	0.43	1	Not found
MESS4v1_830036	conserved exported protein of unknown function	-0.89	9.38E-02	0.32	1	MESS2v1_790093
MESS4v1_110143	conserved exported protein of unknown function	2.75E-02	1	0.76	4.41E-02	MESS2v1_1080055
MESS4v1_210104	protein of unknown function	0.46	1	0.76	6.06E-02	Not found
MESS4v1_230034	protein of unknown function	-0.19	1	0.83	2.10E-02	Not found
MESS4v1_240036	conserved exported protein of unknown function	1.38E-03	1	0.75	6.82E-02	Not found
MESS4v1_360025	protein of unknown function	0.2	1	0.83	4.41E-02	Not found
MESS4v1_360101	conserved protein of unknown function	-0.17	1	0.92	6.17E-03	Not found
MESS4v1_360109	protein of unknown function	-0.12	1	1.03	1.37E-03	Not found
MESS4v1_490002	conserved protein of unknown function	0.12	1	0.78	6.89E-02	MESS2v1_210010
MESS4v1_560009	protein of unknown function	-7.77E-02	1	0.77	4.07E-02	Not found
MESS4v1_560010	conserved exported protein of unknown function	-0.34	1	0.88	6.33E-03	Not found
MESS4v1_640142	protein of unknown function	-0.57	0.69	-0.82	3.68E-02	Not found
MESS4v1_680031	protein of unknown function	-0.69	0.25	-0.78	5.49E-02	MESS2v1_590015
MESS4v1_710103	conserved membrane protein of unknown function	-0.33	1	0.75	7.73E-02	MESS2v1_650084
MESS4v1_750195	conserved protein of unknown function	0.32	1	0.81	2.31E-02	MESS2v1_730184
MESS4v1_830287	conserved protein of unknown function	-8.46E-02	1	0.76	6.14E-02	Not found
MESS4v1_110128	conserved membrane protein of unknown function	-0.82	3.80E-02	0.56	0.63	MESS2v1_1080036

* Gene labels (CDSs) were obtained from MaGe; CDSs significantly regulated (FDR<0.1) upon metal exposure in both STM 2683 and STM 4661 are in bold.
** Significantly induced genes are on a green background while repressed genes are on a red background.
§ When detected, STM 2683 homologs are indicated (See Materials and Methods for details).

Conserved and differentially regulated genes possibly involved in sequestration - Metal sequestration can be used by microorganisms to reduce metal bioavailability and thereby avoid metal toxicity. Metal sequestration includes cell wall components, periplasm- or cytoplasm-binding proteins involved in the precipitation of metals by phosphates or in their reduction into sulfides, and intracellular binding proteins containing CPX-Zn finger domains.

Among the 13 putative CDSs present and regulated by metal(s) in both isolates, several may be involved in cell membrane sequestration. Among them, we identified a putative *opg*C gene encoding a membrane protein required for succinylation of periplasmic glucans in *M. loti* [18]. It was slightly but significantly induced upon Cd exposure (> 1.6 fold) in both *Mesorhizobium* strains (MESS2v1_310036 in STM 2683 or MESS4v1_520093 in STM 4661) but was not significantly regulated by Zn (Tables III-4 and III-5). The addition of succinyl groups confers global negative charges to periplasmic cyclic glucans and may thus limit the diffusion of toxic cations into the cytoplasm through immobilization in the bacterial cell membrane. Intriguingly, work on *E. meliloti* showed that the *exo*K gene which generates low-molecular-weight exopolysaccharides (EPSs) in the form of succinoglycans was significantly up-regulated upon Zn treatment while no significant differential expression was observed upon Cd treatment [19]. Nevertheless, a recent study on an *exoY* mutant of *E. meliloti* deficient in EPS production showed that extracellular metal sequestration through Cd binding was principally generated via siderophores or extracellular proteins [20]. Immobilization of heavy metals in cell walls through EPS production has been demonstrated in several microorganisms, including *Burkholderia fungorum* isolated from a Cd-contaminated paddy soil [21], the multi-metal resistant *Pseudomonas* strains isolated from a uranium mine [22] and *Azospirillum brasilense* sp7 [23]. In STM 2683, a putative CDS encoding an antibiotic-biosynthesis monooxygenase with a COG function involved in extracellular EPS biosynthesis was identified as induced by Cd (MESS2v1_1210019, > 1.6 fold). This putative CDS presents a homolog in STM 4661 (MESS4v1_160035) that was not significantly up-regulated by metals.

Among the conserved and regulated CDSs that may be involved in metal precipitation, we identified a putative signal peptidase II, also referred to as aspartic peptidase, and MEROPS family A08 (MESS2v1_740019 in STM 2683 and MESS4v1_360023 in STM 4661) significantly up-regulated upon Zn exposure (> 3 fold) in both isolates. It presents similarities to the C-terminal part of the *pbr*BC, coding a P_{IB}-type ATPase involved in Pb efflux in *C. metallidurans* strain CH34 [24]. The authors suggest that the peptidase may cleave the PbrB and thus allow it to integrate the outer membrane where it can participate in the precipitation of Pb^{2+} via the generated phosphate ions. Interestingly, a putative membrane-associated phospholipid phosphatase (MESS2v1_740015 in STM 2683) located in the vicinity of the putative signal peptidase II, aspartic peptidase, MEROPS family A08 was also significantly up-regulated in STM 2683 (> 2 fold). Precipitation of heavy metals such as Cd by phosphates, sulfides or others to form insoluble salts that reduce metal bioavailability has

been observed in several microorganisms [25, 26, 27]. Such sequestration mechanism can be combined with other mechanisms such as efflux as shown in *C. metallidurans* CH34. In cultures containing high heavy metal concentrations, *czc*-mediated efflux of cations is followed by a process of metal bioprecipitation in the form of bicarbonates and hydroxides [28]. Additionally, RNAseq data allowed us to identify a few proteins with a thioredoxin domain significantly up-regulated by Cd in STM 2683 (MESS2v1_1660012) and up-regulated by both metals in STM 4661 (MESS4v1_360050). Thioredoxin is a general protein disulfide reductase believed to serve as a cellular antioxidant by reducing protein disulfide bonds produced by various oxidants and also interact with other proteins to form functional protein complexes [29]. [30] demonstrated the role of thioredoxin in the reduction of U(VI) to U(IV) and Cr(VI) to Cr(IV) in *Desulfovibrio desulfuricans* G20. Among our RNAseq data, we identified other CDSs significantly up-regulated in the two *Mesorhizobium* strains under Zn and/or Cd exposure (7 CDSs identified in STM 2683 and 8 in STM 4661) probably involved in the precipitation of metals by phosphates or their reduction into sulfides.

Among the putative CDSs possibly involved in metal binding by proteins containing CPX-Zn finger domains, we identified several conserved hypothetical proteins that contained two cytoplasmic CPX-Zn finger domains (MESS2v1_730267 in STM 2683 and MESS4v1_360040 in STM 4661) that were significantly up-regulated (> 2 fold) upon Zn exposure in both *Mesorhizobium* strains. CPX-Zn finger domains are known to coordinate Zn ions with a combination of cysteine and histidine residues. Interestingly, another homolog was also found in STM 2683 (MESS2v1_p180003), which was significantly induced by both metals (> 4 fold by Zn and > 3 fold by Cd). We can hypothesize about their function as chelating proteins that limit metal toxicity in the cytoplasmic compartment. Interestingly, many studies show the role of Zn-finger proteins or cysteine residues in metal binding. On the cellular speciation of Cd ions in *E. meliloti*, a significant amount of metal was predicted to result from intracellular chelation [31]. The transcriptomic analyses of *E. coli* in response to a Zn stress showed that adding excess external Zn induced the expression of many genes that are organized in the regulon for cysteine biosynthesis, implying that Zn-binding proteins containing cysteine residues are one of the mechanisms that chelate Zn [32]. Bacterial metallothioneins are small cysteine-rich proteins capable of binding Zn and Cd. Metallothioneins function as cytoplasmic metal cation-binding proteins, lowering the free ion concentrations within the cytoplasm. The metallothionein SmtA and several SmtA-like proteins have been described to sequestrate and detoxify Zn and Cd through Zn-fingers in *Synechococcus* PCC7942 and in *P. aeruginosa* and *P. putida* [33].

Conserved and differentially regulated genes possibly involved in Transport - Metal transport can be used by microorganisms to limit metal entry and thereby limit negative effects on cell components. Metal transport involves efflux proteins such as Resistant Nodulation cell-Division proteins (RND), P_{IB}-type ATPases, Cation Diffusion Facilitor proteins (CDF) or Major Facilitor Superfamily systems (MFS) [9], multi-drug transporter proteins and proteins involved in metal homeostasis.

Among the putative CDSs probably involved in metal efflux**,** we identified a putative CDF-type transporter that presented homologies with ZitB and was significantly up-regulated (> 2-fold) after Zn treatment in STM 4661 (MESS4v1_360039). ZitB is a Zn-specific transporter identified in *E. coli* [34]. Surprisingly, in STM 2683, the homolog was cleaved into two separate CDSs (MESS2v1_730268 and MESS2v1_730269). However, the two CDSs were similarly regulated and presented homologies with CzcD identified in *P. aeruginosa* CMG103 and *C. metallidurans* that is involved notably in Cd and Zn resistance [35]. Whether these two CDSs were still functional in STM 2683 is not known, nevertheless, the 5' end of a second copy of this CDF-type transporter (MESS2v1_p180001) was also identified in the edge of a contig. More interestingly, this second copy showed higher induction by Zn (4-fold) and was also induced by Cd (> 2-fold). CDF transport systems function as cation/proton antiporters and are driven by concentration, chemiosmotic gradient or potassium gradient [36].

Additionally, we identified two putative CDSs, *mdt*C and *mdt*A, encoding a permease protein and a membrane fusion protein, respectively (MESS2v1_620035-36 in STM 2683 and MESS4v1_690033-34 in STM 4661). They were significantly induced by Zn in STM 2683 but their homologs in STM 4661 were not significantly up-regulated by metals. Both genes encoded a putative RND-type protein involved in multidrug efflux. In *Lactococcus lactis* and *E. coli*, MdtA confers multiple antibiotic resistance [37]. It was also reported that in *Salmonella*, *mdt*ABC contributes to Cu and Zn resistance, in addition to their role in the resistance to β-lactams, novobiocin and deoxycholate [38]. In *E. coli*, a microarray analysis also demonstrated that the *mdt*ABC operon was up-regulated in response to stress caused by excess Zn, suggesting that metal ions can modulate bacterial resistance to antibiotics [39]. [40] reported that metal contamination functions as a selective factor in the proliferation of antibiotic resistance. Several mechanisms underlie the co-selection process between metals and antibiotics including co-resistance (different resistance determinants present on the same genetic element) and cross-resistance (the same genetic determinant responsible for resistance to antibiotics and metals) [40].

Among the 13 conserved and regulated CDSs probably involved in metal efflux, we identified two P_{IB}-type ATPases induced by both metals. P_{IB}-type ATPase transporters belong to the large superfamily of ATP-driven pumps involved in the transmembrane transport of charged substrates against their concentration gradients [41]. P_{IB}-type ATPases are known mechanisms classically used by microorganisms to maintain constant and non-toxic levels of heavy metals in the cytoplasm. Transcriptomic analyses of *E. coli* or *E. meliloti* under Zn and Cd stress showed the high induction of genes encoding P_{IB}-type ATPases [19, 39]. Exclusion from cells by efflux transporters like the P_{IB}-type ATPase ZntA of *Escherichia coli* [42] or CadA of *Staphylococcus aureus* [43] are among the most studied bacterial P_{IB}-type ATPases. We identified, in the RNAseq data of the two *Mesorhizobium* strains, a gene encoding a related ZntA (MESS2v1_980073 in STM 2683 and MESS4v1_610026 in STM 4661) which was significantly induced upon Zn exposure (> 25-fold in STM 2683 and > 3-fold in STM 4661). Intriguingly, the predicted ZntA was also strongly induced by Cd (> 11-fold) in STM 2683, while its homolog in STM 4661 was not up-regulated, indicating that different regulatory mechanisms could operate in the two strains. In accordance with this assumption, a putative MerR-type regulator with homologies to ZntR was predicted upstream of ZntA in STM 2683, on the opposite strand. Furthermore, we found highly different numbers of putative heavy-metal responsive regulators (HmrR) predicted in their genomes. A total of 19 possible HmrR-encoding CDSs were predicted in STM 2683, including two ZntR (MerR homologs) which are automatically annotated. The two annotated ZntRs are localized close to a locus involved in Hg transport and reduction. Only four putative HmrR-encoding genes were predicted in STM 4661, none of them automatically annotated as ZntR. The large number of predicted HmrR-encoding genes present in STM 2683 indicates a more complex regulation network than in STM 4661. This differential relative regulation of ZntA between the two *Mesorhizobium* strains can also be explained by metal contents in mining soils. Although the two mining sites of Eylie and Avinières have a similar geochemical background, Eylie soil is less polluted than Avinières soil. Eylie soil contains around half Zn, 6 times less Pb than Avinières soil while Cd levels are comparable. Additionally, another P_{IB}-type ATPase named CadA1 showing homologies to CadA of *S. aureus* (MESS2v1_740030 in STM 2683 and MESS4v1_360013 in STM 4661) was induced by both metals studied (> 8- and 39-fold induction upon Zn exposure and > 4- and 10-fold induction upon Cd exposure in STM 2683 and 4661, respectively). CadA1 has recently been characterized using a functional screening based on heterologous expression of a cosmid library produced from STM 2683 genomic DNA (Maynaud *et al*., unpublished observation). Directed mutagenesis of this heavy metal

P_{IB}-type ATPase which displays uncommon characteristics confirmed the involvement of the gene in the resistance of *M. metallidurans* STM 2683^T to high Zn concentrations. But alone *cad*A1 does not confer maximal metal resistance, showing that other mechanisms including those identified in the present study may participate in resistance to Zn and Cd in our metal-resistant mesorhizobial strains. It should be noted that in both STM 2683 and 4661 strains, a CDS showing homologies to the transmembrane region of the cytochrome c biogenesis protein (MESS2v1_740029 and MESS4v1_360014, respectively), homolog to CcdA of *Bacillus subtilis* or DsbD of *E. coli,* was located downstream of CadA1 and similarly up-regulated by both metals (> 4-fold). *ccd*A encodes a thiol-disulfide oxidoreductase involved in the biogenesis of a cytochrome c-type protein *via* the oxidative formation of disulfide bonds [44]. A *dsb*D-related gene has been identified as a metal-binding motif involved in copper tolerance in *E. coli* [45]. These analyses suggest that the cytochrome c-type identified in our *Mesorhizobium* strains is probably involved in heavy metal binding *via* divalent metal cation-sulfide bond formation or participates in the functioning of the P_{IB}-type ATPase by providing reducing power.

Among the up-regulated CDSs, we identified three conserved CDSs that are organized into an operon (MESS2v1_300039-37 and MESS4v1_520018-16 for STM 2683 and STM 4661, respectively) encoding for an ABC-type transport system. These genes were significantly repressed after Zn exposure (> 17- and > 6-fold repression in STM 2683 and STM 4661, respectively) and induced upon Cd exposure (> 5- and >9-fold induction for STM 2683 and STM 4661, respectively). These three CDSs contain conserved domains related to ABC-type Mn^{2+}/Zn^{2+} transport systems, including respectively the multidomain ATPase component ZnuC (COG1121), the membrane permease ZnuB (COG1108) and the soluble periplasmic Zn-binding protein ZnuA (cd01018) that captures Zn and delivers it to ZnuB. These *znu*CBA orthologs have high identity to *znu*CBA and are strongly repressed upon Zn exposure; therefore they may be involved in Zn homeostasis in our isolates, as showed in *E. coli* [46]. The transcriptional regulation of this high affinity Zn-import system has been shown to be under the control of a Zur (Zn^{2+} Uptake Regulator) repressor that belongs to the Fur (Ferric iron Uptake Regulator) family of transcriptional regulators [46, 47]. Interestingly, orthologs of *M. loti* and *E. meliloti* Zur proteins are present in STM 2683 and STM 4661 (MESS2v1_1530029 and MESS4v1_830491, respectively) and *Agrobacterium*-specific conserved *zur* binding sites [48] were also found in the promoter region of the *znu*CBA putative operon in both mesorhizobial strains (data not shown). When bacteria were subjected to Zn in the medium, the *znu*CBA genes were strongly repressed, suggesting, together with

homologies to other bacteria, that the presently identified ATP-binding cassette transport system is also a high affinity Zn-import system involved in Zn homeostasis in *M. metallidurans*. Moreover, [47] found that other divalent cations such as Fe^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+} or Cd^{2+} de-repressed the expression of the *znu* operon in *E. coli*. More recently, [49] showed that the expression of *znu*A and *znu*B increased upon Cd exposure in *Salmonella* sp. and ZnuA-tagged proteins increased upon Cd exposure in *E. coli* O157:H7 [50]. This regulation could either be direct (by direct binding of divalent cations to Zur, thereby changing the conformation of the regulator) or indirect (by lowering the intracellular Zn levels), as suggested previously [47, 49]. A possible explanation for *znu* induction by Cd could be that direct binding of divalent Cd cations to the Zur regulatory repressor protein as a substitute for Zn alters its conformation and makes it unable to bind DNA, thus directly limiting its repressive activity. Another possibility could be a deficit in intracellular Zn concentration most probably through competition between Zn and other cations for transporters [47, 49]. In line with this later observation, we found that both Zn and Cd induced several efflux systems in our isolate (Tables III-4 and 5) that may participate in the unspecific export of divalent cations, such as the P_{IB}-type ATPase CadA1 (encoded by MESS2v1_740030 in STM 2683 and MESS4v1_360013 in STM 4661), which is significantly induced by both metals and appears important for Zn adaptation in STM 2683 (Maynaud *et al*., unpublished observations). To increase our knowledge about the regulation of this high-affinity Zn-import system, we used a promoter-PROBE reporter system [51] and analyzed the transcriptional activity of the *znu*C (MESS2v1_300037) in the presence of various metal concentrations and mixes in the wild type STM 2683 and in the *cad*A1 deleted mutant. We showed that the mutant was affected in Zn tolerance as previously described (Maynaud *et al*., unpublished observation). We tested whether a reduction of the efflux components in STM 2683 through *cad*A1 mutation could alter the regulation of *znuC* upon exposure to Zn/Cd or to various mixes of the two metals (Figure III-6). Increasing the Zn concentration in the medium reduced significantly the relative expression of *znuC* in the wild-type bacterium, reaching non detectable levels when 0.4 mM Zn was used, while no transcriptional activity was detected in the *cad*A1 mutant (Figure III-6A). Since no Cd was present in the control TY medium, the fact that no induction was observed in the *cad*A1 mutant, while being relatively highly induced in the wild type, indicates that intracellular Zn concentrations were high enough in the mutant to repress *znu*C transcription, and this may result from its lower efflux capacity. When Cd was added to the growth medium, we found that *znu*C expression increased in the wild-type bacterium in the presence of as low as 0.00625 mM, but higher Cd concentrations

did not further increase its expression levels and even tended to decrease them when Cd concentration were above 0.2 mM (Figure III-6B). Surprisingly, *znu*C expression required higher Cd concentrations in the mutant, reaching a maximum at 0.1 mM Cd and then decreasing again. These results support a more indirect effect of Cd ions which could reduce intracellular Zn levels, leading to a higher stimulation of the high-affinity Zn-import system. To test whether Cd competed directly with the Zur regulator, the effect of various Cd/Zn mixes on *znu*C transcriptional activity was studied (Figure III-6C). No transcriptional activity was observed in the *cad*A1 deleted mutant suggesting that intracellular Zn concentrations were high enough in that strain to repress *znu*C transcription and out-competed the Cd level which, furthermore, was probably extruded or sequestered *via* other mechanisms. Yet, interestingly we found that the molar ratio of Zn and Cd ions in the medium affected *znu*C transcription in the wild-type bacterium. Indeed, despite a metal-dose dependent transcriptional activity of the efflux pump CadA1 (Maynaud *et al*., unpublished observation), increasing Zn/Cd molar ratios from 0.5 to 2 negatively affected the transcriptional activity of *znu*C in STM 2683, regardless of the total metal concentration used. These results suggest that the two divalent cations compete for binding to the Zur regulator which consequently alters the regulation of *znu*C. Our znuC transcriptional data indicate that Cd generates both direct and indirect effects on *znu*CBA regulation in STM 2683, but additional experiments are required to decipher this complex regulation and the effects of Cd on Zn homeostasis.

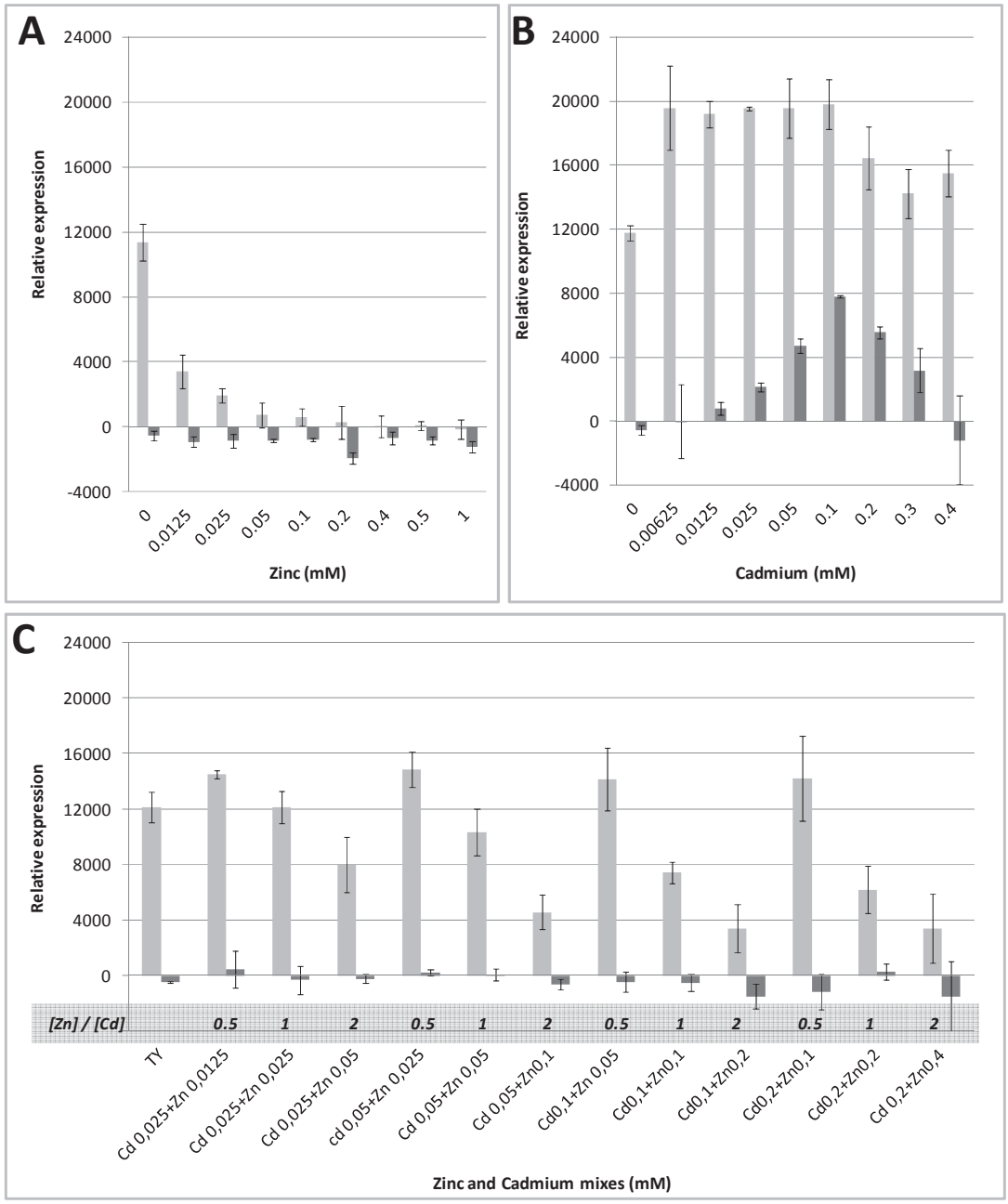


Figure III-6: Effect of Zinc and Cadmium on the transcriptional activitiy of *znu*C. The effect of increasing concentrations of Zinc (A), Cadmium (B) or mixes of the two metals (C) on the expression of *znu*C using a promoter-PROBE reporter system is shown for STM 2683 (light gray) and the *cad*A1 mutant (dark gray). [Cd]/[Zn] molar ratios are indicated at the bottom of each bar in C.

CONCLUSIONS

In the present study, we used comparative genomic and transcriptomic analyses to study the gene expression profiles associated to Zn and Cd exposure and to identify putative genes involved in metal tolerance in two metallicolous *Mesorhizobium* strains isolated from *Anthyllis* nodules from two distinct mining sites in France. Our RNAseq-based approach allowed for the rapid discovery of homologous genes that responded specifically to metals in

both strains. Analyses of the genes identified as significantly regulated suggest that transport and sequestration are the most important mechanisms underlying the heavy metal response in our metallicolous mesorhizobial strains. These mechanisms involve proteins involved in metal homeostasis (ABC-type transport systems), metal or multi-drug efflux proteins which allow for intracellular detoxification (CadA1, related ZntA, related CzcD/ZitB, related MdtC and MdtA) and cell membrane components, periplasmic and cytoplasmic proteins involved in metal precipitation and binding to reduce metal bioavailability. The number of HmrR regulators and the expression of ZntA, which is differentially regulated in the two strains, are the two major differences between our two *Mesorhizobium* strains. Additionally, the comparative RNAseq-based approach revealed a low number of genes significantly regulated in both strains (around 1 %) and a low number of genes involved in the non-specific metal response, indicating that the approach was appropriate for identifying genes that specifically respond to metals. Global analyses of RNAseq data suggested that Zn and Cd also repressed the translational machinery significantly. Our functional study detected genes that are conserved among populations of metallicolous mesorhizobia, whose expression is metal-dependent and which show a potential involvement in heavy-metal tolerance. It will help us to select appropriate rhizobial symbionts that could be used as biofertilizers to improve phytostabilization strategies and limit the impacts of mine spoil dispersal on human health and surrounding environments.

MATERIALS AND METHODS

Microbiological methods - The bacterial strains and plasmids used in the present study are listed in Table III-S3. The Zn- and Cd-resistant *Mesorhizobium* species *M. metallidurans* STM 2683^T and *Mesorhizobium* sp. STM 4661 were isolated from nodules of a metallicolous ecotype of *Anthyllis vulneraria* originating from Zn-Pb Avinières mine (St-Laurent-le-Minier, Cévennes, France) [7] and Eylie mine (Pyrénées ariégeoises, France), respectively. The complete 16S rRNA sequence of STM 4661 contains one different nucleotide compared to STM 2683, suggesting that STM 4661 is very close to *M. metallidurans* species. However, STM 4661 displayed an *atp*D sequence that differed from STM 2683 (94 % identity, 99 nucleotides different out of 1546 pb) suggesting that STM 4661 is a different species from *M. metallidurans*. The metal-sensitive species *Mesorhizobium* sp. STM 2682 was isolated from the unpolluted soil of the Prunarède site [5]. *Mesorhizobium tianshanense* type strain ORS 2640^T was used as a metal-sensitive control. *Mesorhizobium* strains were routinely cultured at 28°C in Tryptone Yeast (TY) medium [52]. *E. coli* strains

were grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) medium [53]. Gentamycin (Gm, 10 µg ml^{-1}), tetracycline (Tc, 15 µg ml^{-1}), kanamycin (Km, 50 µg ml^{-1}), ampicilline (Ap, 50 µg ml^{-1}), and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactosidase (X-gal, 80 µg ml^{-1}) were added to the media as required. Solid media contained 2 % agar.

Zn and Cd Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) were determined in triplicate on TY liquid medium containing increasing concentrations of $ZnSO_4$. (0.5, 1, 1.5, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 and 24 mM) or $CdCl_2$ (0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1, 1.5, 2 and 3 mM) in 96-well microtiter plates. Growth was assayed by Optical Density (OD) at 600 nm until one week incubation at 28°C with shaking (450 rpm) using a spectrofluorometer plate reader (TECAN Infinite M200).

For the RNAseq analysis of *Mesorhizobium* strains STM 2683 and 4661, six biological replicates were pre-grown in TY medium up to mid-exponential phase (up to OD_{600nm} = 0.5) in 250-ml Erlenmeyer flasks at 28°C and 145 rpm. When the pre-cultures reached the mid-exponential phase (after *ca* 16 hours), 15 ml were added to an equal volume of pre-warmed TY containing either nothing (control treatments), Zn at 1 mM (Zn treatments, 0.5 mM final concentration) or Cd at 0.05 mM (Cd treatments, 0.025 mM final concentration) and were further incubated for 5 hours, which corresponds to *ca* half a generation time, at 28°C at 145 rpm. After 5 hours incubation, $1/10^{th}$ volume of ice-cold stop buffer (5 % phenol in ethanol) was added to each culture and directly centrifuged at 4°C, 8 000 rpm for 4 minutes. Supernatants were quickly discarded and the tubes were re-centrifuged for 1 minute so as to collect all the liquid at the bottom of the tubes which was discarded by pipetting. Cells were snap-frozen in liquid nitrogen and stored in the -80°C freezer until use.

Electro-competent *M. metallidurans* STM 2683^T cells were prepared following a method modified from [54]. Five ml of a fresh bacterial culture were used to inoculate 100 ml of TY medium and incubated at 28°C with shaking at 250 rpm until OD_{600nm} reached 0.5 to 0.7. Cells were harvested by centrifugation at 10 000 rpm for 5 min at 4°C. The pellet was washed with 10 ml of ice-cold 300 mM sucrose solution and centrifuged as before. The pellet was finally resuspended in 5 ml of ice-cold 300 mM sucrose containing 15 % glycerol. Aliquots of 100-150 µl of electro-competent cells were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. When needed, electro-competent cells were transformed following the following procedure. Cells were thawed on ice and placed in precooled 0.2 mm electroporation cuvettes for 20 min on ice. 5-10 µl of 30-50 ng $µl^{-1}$ DNA plasmids were added to the cuvettes and electroporation was conducted at 12.5 KVolts and 720 ohms. After pulse application, the cell suspensions were diluted with 1 ml of TY medium and incubated at 28°C

with shaking for 11hours. After incubation, 100 µl of cells were plated onto TY plates containing appropriate antibiotics. Transformants were selected as single colonies using the antibiotic markers and the presence of the plasmid was verified by PCR.

Nucleic acid purification- Genomic DNAs from strains STM 2683 and STM 4661 were prepared from 15-ml cultures following previously described protocols [55]. Plasmid DNA was extracted using the Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System kit (Promega) following the manufacturer's recommendations. PCR products were cleaned up using illustra^{TM} GFX^{TM} PCR DNA and Gel Band Purification Kits (GE Healthcare).

For the preparation of the RNAseq material, total RNAs were purified from each replicate, each treatment and each strain individually using the RiboPure^{TM} kit (Ambion) following the manufacturer's recommendations. Equal amounts of total RNAs from the biological replicates belonging to the same strain and the same treatment were pooled and subjected to two successive runs of ribosomal RNA subtractions using the Microbe Express^{TM} kit (Ambion) following the manufacturer's instructions. Total and messenger RNA quantities and quality were assessed by Nanodrop and Bioanalyser using RNA chips for Agilent 2100 Bioanalyser.

STM 2683 and STM 4661 genome sequencing, assembly and automated annotation using the Microscope Pipeline- The complete genome sequences of strains STM 2683 and STM 4661 were determined using 454 Titanium technology. A mate-pair genomic library of 8 kb was constructed using Roche reagents from genomic DNA fragmented with HydroShear system. Then sequencing was carried out on this library, giving reads of 350 bp average length, up to a final coverage of 30X for STM4661 and 33X for STM2683. Assembling was done using Newbler (2.3 version), and a comparison with *Mesorhizobium loti* genome was performed to identify the scaffold organization. The draft genome sequences were uploaded into the MicroScope platform [12] and subjected to the automatic annotation pipeline. The genome sequences are available and can be browsed at: https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/mage/viewer.php and are part of the "Rhizoscope" project which can be found at the following web address: https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/about/collabprojects.php?P_id=3

RNA sequencing- For the preparation of the six cDNA libraries corresponding to the three treatments (control, Zn and Cd), 100 ng of mRNA were used according to the Illumina

kit instructions (mRNA-Seq sample preparation, Part: 1004898 Rev. D September 2009). The first step in the workflow involves fragmentation of mRNA into small pieces using divalent cations under high temperature. Then the cleaved RNA fragments were copied into first-strand cDNA using reverse transcriptase and random primers. This was followed by second-strand cDNA synthesis using DNA Polymerase I and RNase H. These cDNA fragments then went through an end-repair process, the addition of a single 'A' base, and then ligation of the adapters. These products were then purified on a gel to select a size range at 200 pb and enriched by PCR to create the final cDNA library. The efficacy of the library construction was checked in a quality control step that involved measuring the adapter-cDNA size and concentration on an Agilent DNA 1000 chip. Sequencing libraries were denatured with sodium hydroxide and diluted to 6 pM in hybridization buffer for loading onto a single lane of an Illumina HiSeq 2000 flowcell V1.5. Cluster formation, primer hybridization and single-read, 36 sequencing runs were performed on cBot and HiSeq2000 (Illumina, San Diego, CA) respectively.

Read mapping, counting and differential expression analyses using DESeq - The sequences that passed the quality filter were mapped on the annotated genomic objects identified in the genomes of STM 2683 and STM 4661 using ssaha2 software [56]. Mapped reads were converted to read counts *per* gene using BEDtools [57], which were then analyzed using DESeq standard protocol for conditions with no replicate [13]. DESeq generated differential expression values (fold changes) for all genomic objects and all pairwise comparisons of conditions and associated adjusted *p-values* (padj) and checked for false discovery rates (FDRs). Raw and analyzed RNAseq data are accessible under the following link: https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/expdata/rnaseqProjects.php.

RNAseq data analyses- The distributions of (i) the raw read count numbers per CDS after log10 transformation for each treatment and (ii) the fold changes after normalization and log2 transformations for each intra-species comparison produced by DESeq were analyzed using Microsoft Excel and XL-Stat^{TM} visualization tools such as box plots, histograms, scatter plots or pie charts. The functional COG classification of all CDSs in the two genomes was done automatically using COGNiTOR which is included in the automated annotation MicroScope pipeline. CDSs with assigned COG classes were retrieved from MicroScope and used to estimate the general composition of the transcriptomes of the two strains as well as the over-transcribed classes. The global functional effects Zn and Cd treatments had on the two

strains were assessed by comparing (i) the distributions of CDS fold changes classified by COG categories and (ii) the COG classes to which the most significantly regulated genes (FDR < 0.1 in at least one comparison) were assigned.

Real time PCR on selected genes- The primers used for quantitative PCR experiments are listed in Table III-S4. For each technical replicate, 1µg of total RNA from either total pooled RNA used for RNAseq or total RNA isolated from independent biological samples prior to pooling were reverse-transcribed with 400 U of Super-Script II (Invitrogen) and random hexamer primers. qPCRs were performed on a Strategene MXP3005P system using Power SYBER green master mix (Applied Biosystems). PCRs started with 10 min incubation at 95°C, followed by 40 cycles consisting of 15 s at 95°C, 30 s at 60°C and 30 s at 72°C. Primer specificity and the formation of primer dimers were monitored by dissociation curves. The expression levels of the Heavy-metal-translocating P_{IB}-type ATPase encoding genes (*cad*A1) (MESS2v1_740030/MESS4v1_360013), the periplasmic binding protein of the ABC-type transporter genes (*znu*A) (MESS2v1_300037/MESS4v1_520016) and the putative Signal peptidase II genes (MESS2v1_740019/MESS4v1_360023) were standardized by using *recA* (encoding part of the DNA recombination and repair system) (MESS2v1_330003/MESS4v1_540005) and *glnA* (encoding part of the glutamine synthetase I) (MESS2v1_390006/MESS4v1_580041) as references. PCR efficiency (E) for each amplicon was calculated using the linear regression method on the log(fluorescence)-*per*-cycle-number data using Stratagen MXpro software. All qPCRs were performed in three technical replicates using either total pooled RNA used for RNAseq (two replicates for each mesorhizobial strain) or total RNA isolated from three biological samples prior to pooling so as to estimate biological variability (three replicates on STM 2683). Data for each sample were expressed relative to the expression levels of *rec*A or *gln*A by using the mathematical model described by [58], which determines the relative quantification of a target gene as comparised to a reference (ref) gene between treated and control samples. The relative expression ratio (R) of a target gene is calculated based on efficiency (E) and the threshold cycle (Ct) of an unknown sample versus a control and expression in comparison to a reference gene. The average relative quantity for each gene under study was calculated and log 2-transformed. Means and standard deviations of these final log 2 ratios were calculated using data from three technical replicates. Mean comparison was performed with a multiple comparison of Conover-Iman, using XLSTAT software, to determine significant differences in gene expression levels between inducible genes and reference genes and to determine

significant differences between the metal treatments (Cd or Zn condition) and the control metal-free treatments.

Use of promoter-*gfp* fusions in transcriptional analyses - The promoter region of the heavy-metal-transporting P_{IB}-type ATPase encoding gene *cad*A1 (MESS2v1_740030) was PCR-amplified using the primer pair STM 2740-Forward and STM 2244-Reverse that generates a 200-bp fragment. The promoter region of the ABC transporter ATP-binding protein encoding gene *znu*C (MESS2v1_300039) was amplified using primers STM 2953-Forward and STM 2954-Reverse which generate a 500-bp PCR product. The PCR products were ligated into a pGEMt-easy vector (PROMEGA) following the manufacturer's recommendations to generate plasmids (pGEMt-*cad*A1p and pGEMt-*znu*Cp) that were transferred into *E. coli* XL2 Blue Ultra-competent Cells. Inserts from pGEMt-*cad*A1p and pGEMt-*znu*Cp were excised using the restriction enzyme HindIII and ligated into a pPROBE GT vector which allows for transcriptional fusions with the *gfp* gene [51], previously digested with HindIII and dephosphorylated, and the ligation mixes were transferred into electrocompetent *E. coli* strain DH10B. Plasmids containing the promoter of *znu*C (pGT-*znu*Cp) and of *cad*A1 (pGT-*cad*A1p) were sequenced to verify sequence integrity. The constructions were transferred into STM 2683 electrocompetent cells as described above and transformants were selected using the appropriate antibiotics. When needed, STM 2683 carrying the promoter-pPROBE constructs were grown on TY agar plates supplemented with antibiotics. Using sterile toothpicks, fresh colonies were transferred to sterile 8-tube strips containing 100 µl of TY. Cells were homogenized by pipetting and for each transcriptional assay, the same bacterial inocula (10 µl) were used to inoculate 150 µl TY medium supplemented or not with Zn (0.0125, 0.025, 0.05; 0.1, 0.2, 0.4, 0.5 and 1 mM) or Cd (0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 and 0.4 mM) in 96-well plates. The plates were incubated at 28°C with shaking at 450 rpm. OD_{600nm} and fluorescence (excitation filter at 485 nm and emission filter at 535 nm) were recorded 0, 24, 42, 48 and 72 hours post inoculation for the time-course of induction assays using a spectrofluorometer. Three transcriptional assays were performed for each bacterial strain carrying the promoter-*gfp* fusions. For the analysis, optical density and fluorescence data were first corrected with the values obtained from the media. Corrected fluorescence values were then normalized to the average OD_{600nm} at each time point.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche Programme « Contaminants, Ecosystèmes et Santé » (CES 2008-12, APTITUDE). G.M., received a PhD grant from the Ministère de la Recherche et de l'Education Nationale. We thank Dr. Klonowska A. (LSTM) and Cartieaux F. (LSTM) for qPCR assays.

REFERENCES

[1] Kampa M, Castanas E: **Human health effects of air pollution**. *Environ Pollut* 2008, **151**(2):362-367.

[2] Nwuche CO, Ugoji EO: **Effects of heavy metal pollution on the soil microbial activity**. *Int J Environ Sci Te* 2008, **5**(3):409-414.

[3] Ghosh M, Singh SP: **A Review on Phytoremediation of Heavy Metals and Utilization of Its Byproducts**. *Asian J Energy Environ* 2005, **6**(4):18.

[4] Frerot H, Lefebvre C, Gruber W, Collin C, Dos Santos A, Escarre J: **Specific interactions between local metallicolous plants improve the phytostabilization of mine soils**. *Plant Soil* 2006, **282**(1-2):53-65.

[5] Mahieu S, Frerot H, Vidal C, Galiana A, Heulin K, Maure L, Brunel B, Lefebvre C, Escarre J, Cleyet-Marel JC: ***Anthyllis vulneraria/Mesorhizobium metallidurans*, an efficient symbiotic nitrogen fixing association able to grow in mine tailings highly contaminated by Zn, Pb and Cd**. *Plant Soil* 2011, **342**(1-2):405-417.

[6] Escarre J, Lefebvre C, Raboyeau S, Dossantos A, Gruber W, Cleyet-Marel JC, Frerot H, Noret N, Mahieu S, Collin C *et al*: **Heavy Metal Concentration Survey in Soils and Plants of the Les Malines Mining District (Southern France): Implications for Soil Restoration**. *Wat Air Soil Pollut* 2011, **216**(1-4):485-504.

[7] Vidal C, Chantreuil C, Berge O, Maure L, Escarre J, Bena G, Brunel B, Cleyet-Marel JC: ***Mesorhizobium metallidurans* sp nov., a metal-resistant symbiont of *Anthyllis vulneraria* growing on metallicolous soil in Languedoc, France**. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2009, **59**:850-855.

[8] Nies DH: **Microbial heavy-metal resistance**. *Appl Microbiol Biotech* 1999, **51**(6):730-750.

[9] Nies DH: **Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes**. *FEMS Microbiol Rev* 2003, **27**(2-3):313-339.

[10] Ma Z, Jacobsen FE, Giedroc DP: **Coordination Chemistry of Bacterial Metal Transport and Sensing**. *Chem Rev* 2009, **109**(10):4644-4681.

[11] Janssen PJ, Van Houdt R, Moors H, Monsieurs P, Morin N, Michaux A, Benotmane MA, Leys N, Vallaeys T, Lapidus A *et al*: **The Complete Genome Sequence of *Cupriavidus metallidurans* Strain CH34, a Master Survivalist in Harsh and Anthropogenic Environments**. *PLoS One* 2010, **5**(5).

[12] Vallenet D, Engelen S, Mornico D, Cruveiller S, Fleury L, Lajus A, Rouy Z, Roche D, Salvignol G, Scarpelli C *et al*: **MicroScope: a platform for microbial genome annotation and comparative genomics**. *Database (Oxford)* 2009, **2009**:bap021.

[13] Anders S, Huber W: **Differential expression analysis for sequence count data**. *Genome Biol* 2010, **11**(10):R106.

[14] Benjamini Y, Hochberg Y: **Controlling the False Discovery Rate - a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing**. *J Roy Stat Soc B Met* 1995, **57**(1):289-300.

[15] Tatusov RL, Natale DA, Garkavtsev IV, Tatusova TA, Shankavaram UT, Rao BS, Kiryutin B, Galperin MY, Fedorova ND, Koonin EV: **The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes**. *Nucleic Acids Res* 2001, **29**(1):22-28.

[16] Pereira SI, Lima AI, Figueira EM: **Screening possible mechanisms mediating cadmium resistance in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolated from contaminated Portuguese soils**. *Microb Ecol* 2006, **52**(2):176-186.

[17] Wang AY, Crowley DE: **Global gene expression responses to cadmium toxicity in *Escherichia coli***. *J Bacteriol* 2005, **187**(9):3259-3266.

[18] Kawaharada Y, Kiyota H, Eda S, Minamisawa K, Mitsui H: **Identification of the *Mesorhizobium loti* gene responsible for glycerophosphorylation of periplasmic cyclic beta-1,2-glucans**. *FEMS Microbiol Lett* 2010, **302**(2):131-137.

[19] Rossbach S, Mai DJ, Carter EL, Sauviac L, Capela D, Bruand C, de Bruijn FJ: **Response of *Sinorhizobium meliloti* to elevated concentrations of cadmium and zinc**. *Appl Environ Microbiol* 2008, **74**(13):4218-4221.

[20] Slaveykova VI, Parthasarathy N, Dedieu K, Toescher D: **Role of extracellular compounds in Cd-sequestration relative to Cd uptake by bacterium *Sinorhizobium meliloti***. *Environ Pollut* 2010, **158**(8):2561-2565.

[21] Zhang JH, Min H: **Characterization of a multimetal resistant *Burkholderia fungorum* isolated from an e-waste recycling area for its potential in Cd sequestration**. *World J Microbiol Biotech* 2010, **26**(2):371-374.

[22] Choudhary S, Sar P: **Characterization of a metal resistant *Pseudomonas* sp. isolated from uranium mine for its potential in heavy metal (Ni2+, Co2+, Cu2+, and Cd^{2+}) sequestration**. *Bioresource Tech* 2009, **100**(9):2482-2492.

[23] Gowri PM, Srivastava S: **Encapsulation as a response of *Azospirillum brasilense* sp7 to zinc stress**. *World Journal Microbiol Biotech* 1996, **12**(4):319-322.

[24] Taghavi S, Lesaulnier C, Monchy S, Wattiez R, Mergeay M, van der Lelie D: **Lead(II) resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34: interplay between plasmid and chromosomally-located functions**. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2009, **96**(2):171-182.

[25] Aiking H, Kok K, van Heerikhuizen H, van 't Riet J: **Adaptation to Cadmium by *Klebsiella aerogenes* Growing in Continuous Culture Proceeds Mainly via Formation of Cadmium Sulfide**. *Appl Environ Microbiol* 1982, **44**(4):938-944.

[26] McEntee JD, Woodrow JR, Quirk AV: **Investigation of cadmium resistance in an *Alcaligenes* sp**. *Appl Environ Microbiol* 1986, **51**(3):515-520.

[27] Macaskie LE, Bonthrone KM, Yong P, Goddard DT: **Enzymically mediated bioprecipitation of uranium by a *Citrobacter* sp.: a concerted role for exocellular lipopolysaccharide and associated phosphatase in biomineral formation**. *Microbiology-Uk* 2000, **146**:1855-1867.

[28] Diels L, Dong QH, Vanderlelie D, Baeyens W, Mergeay M: **The Czc Operon of *Alcaligenes eutrophus* CH34 - from Resistance Mechanism to the Removal of Heavy-Metals**. *J Ind Microbiol* 1995, **14**(2):142-153.

[29] Zeller T, Klug G: **Thioredoxins in bacteria: functions in oxidative stress response and regulation of thioredoxin genes**. *Naturwissenschaften* 2006, **93**(6):259-266.

[30] Li XK, Krumholz LR: **Thioredoxin Is Involved in U(VI) and Cr(VI) Reduction in *Desulfovibrio desulfuricans* G20**. *J Bacteriol* 2009, **191**(15):4924-4933.

[31] Slaveykova VI, Parthasarathy N, Dedieu K, Toescher D: **Role of extracellular compounds in Cd-sequestration relative to Cd uptake by bacterium *Sinorhizobium meliloti***. *Environ Pollut* 2010, **158**(8):2561-2565.

[32] Yamamoto K, Ishihama A: **Transcriptional response of *Escherichia coli* to external zinc**. *J Bacteriol* 2005, **187**(18):6333-6340.

[33] Blindauer CA, Harrison MD, Robinson AK, Parkinson JA, Bowness PW, Sadler PJ, Robinson NJ: **Multiple bacteria encode metallothioneinsand SmtA-like zinc fingers**. *Mol Microbiol* 2002, **45**(5):1421-1432.

[34] Grass G, Fan B, Rosen BP, Franke S, Nies DH, Rensing C: **ZitB (YbgR), a member of the cation diffusion facilitator family, is an additional zinc transporter in *Escherichia coli***. *J Bacteriol* 2001, **183**(15):4664-4667.

[35] Anton A, Grosse C, Reissmann J, Pribyl T, Nies DH: **CzcD is a heavy metal ion transporter involved in regulation of heavy metal resistance in *Ralstonia* sp. strain CH34**. *J Bacteriol* 1999, **181**(22):6876-6881.

[36] Paulsen IT, Saier MH, Jr.: **A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins**. *J Membr Biol* 1997, **156**(2):99-103.

[37] Perreten V, Schwarz FV, Teuber M, Levy SB: **Mdt(A), a new efflux protein conferring multiple antibiotic resistance in *Lactococcus lactis* and *Escherichia coli***. *Antimicrob Agents Chemotherapy* 2001, **45**(4):1109-1114.

[38] Nishino K, Nikaido E, Yamaguchi A: **Regulation of multidrug efflux systems involved in multidrug and metal resistance of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium***. *J Bacteriol* 2007, **189**(24):9066-9075.

[39] Lee LJ, Barrett JA, Poole RK: **Genome-wide transcriptional response of chemostat-cultured *Escherichia coli* to zinc**. *J Bacteriol* 2005, **187**(3):1124-1134.

[40] Baker-Austin C, Wright MS, Stepanauskas R, McArthur JV: **Co-selection of antibiotic and metal resistance**. *Trends Microbiol* 2006, **14**(4):176-182.

[41] Arguello JM: **Identification of ion-selectivity determinants in heavy-metal transport P1B-type ATPases**. *J Membr Biol* 2003, **195**(2):93-108.

[42] Rensing C, Mitra B, Rosen BP: **The *znt*A gene of *Escherichia coli* encodes a Zn(II)-translocating P-type ATPase**. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, **94**(26):14326-14331.

[43] Nucifora G, Chu L, Misra TK, Silver S: **Cadmium Resistance from *Staphylococcus-aureus* Plasmid Pi258 CadA Gene Results from a Cadmium-Efflux ATPase**. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, **86**(10):3544-3548.

[44] Fabianek RA, Hennecke H, Thony-Meyer L: **Periplasmic protein thiol : disulfide oxidoreductases of *Escherichia coli***. *FEMS Microbiol Rev* 2000, **24**(3):303-316.

[45] Fong ST, Camakaris J, Lee BTO: **Molecular-Genetics of a Chromosomal Locus Involved in Copper Tolerance in *Escherichia coli* K-12**. *Mol Microbiol* 1995, **15**(6):1127-1137.

[46] Patzer SI, Hantke K: **The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator zur in *Escherichia coli***. *Mol Microbiol* 1998, **28**(6):1199-1210.

[47] Patzer SI, Hantke K: **The zinc-responsive regulator Zur and its control of the *znu* gene cluster encoding the ZnuABC zinc uptake system in *Escherichia coli***. *J Biol Chem* 2000, **275**(32):24321-24332.

[48] Panina EM, Mironov AA, Gelfand MS: **Comparative genomics of bacterial zinc regulons: Enhanced ion transport, pathogenesis, and rearrangement of ribosomal proteins**. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, **100**(17):9912-9917.

[49] Petrarca P, Ammendola S, Pasquali P, Battistoni A: **The Zur-Regulated ZinT Protein Is an Auxiliary Component of the High-Affinity ZnuABC Zinc Transporter That Facilitates Metal Recruitment during Severe Zinc Shortage**. *J Bacteriol* 2010, **192**(6):1553-1564.

[50] Gabbianelli R, Scotti R, Ammendola S, Petrarca P, Nicolini L, Battistoni A: **Role of ZnuABC and ZinT in *Escherichia coli* O157:H7 zinc acquisition and interaction with epithelial cells**. *BMC Microbiology* 2011, **11**.

[51] Miller WG, Leveau JHJ, Lindow SE: **Improved *gfp* and *ina*Z broad-host-range promoter-probe vectors**. *Mol Plant Microb Interact* 2000, **13**(11):1243-1250.

[52] Beringer JE: **R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum***. *J Gen Microbiol* 1974, **84**(1):188-198.

[53] Sambrook J, Fritsch, E.F., and Maniatis, T.: **Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edn.** New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press; 1989.

[54] Hayashi M, Maeda Y, Hashimoto Y, Murooka Y: **Efficient transformation of *Mesorhizobium huakuii* subsp. *rengei* and *Rhizobium* species**. *J Biosci Bioeng* 2000, **89**(6):550-553.

[55] Chen WP, Kuo TT: **A simple and rapid method for the preparation of Gram-negative bacterial genomic DNA**. *Nucleic Acids Res* 1993, **21**(9):2260-2260.

[56] Ning Z, Cox AJ, Mullikin JC: **SSAHA: a fast search method for large DNA databases**. *Genome Res* 2001, **11**(10):1725-1729.

[57] Quinlan AR, Hall IM: **BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features**. *Bioinformatics* 2010, **26**(6):841-842.

[58] Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR**. *Nucleic Acids Res* 2001, **29**(9).

[59] Durfee T, Nelson R, Baldwin S, Plunkett G, III, Burland V, Mau B, Petrosino JF, Qin X, Muzny DM, Ayele M *et al:* **The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* DH10B: Insights into the Biology of a Laboratory Workhorse**. *J Bacteriol* 2008, **190**(7):2597-2606.

[60] Jarvis BDW, Van Berkum P, Chen WX, Nour SM, Fernandez MP, Cleyet-Marel JC, Gillis M: **Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov.** *Int J Syst Bacteriol* 1997, **47**(3):895-898.

SUPPLEMENTAL MATERAL

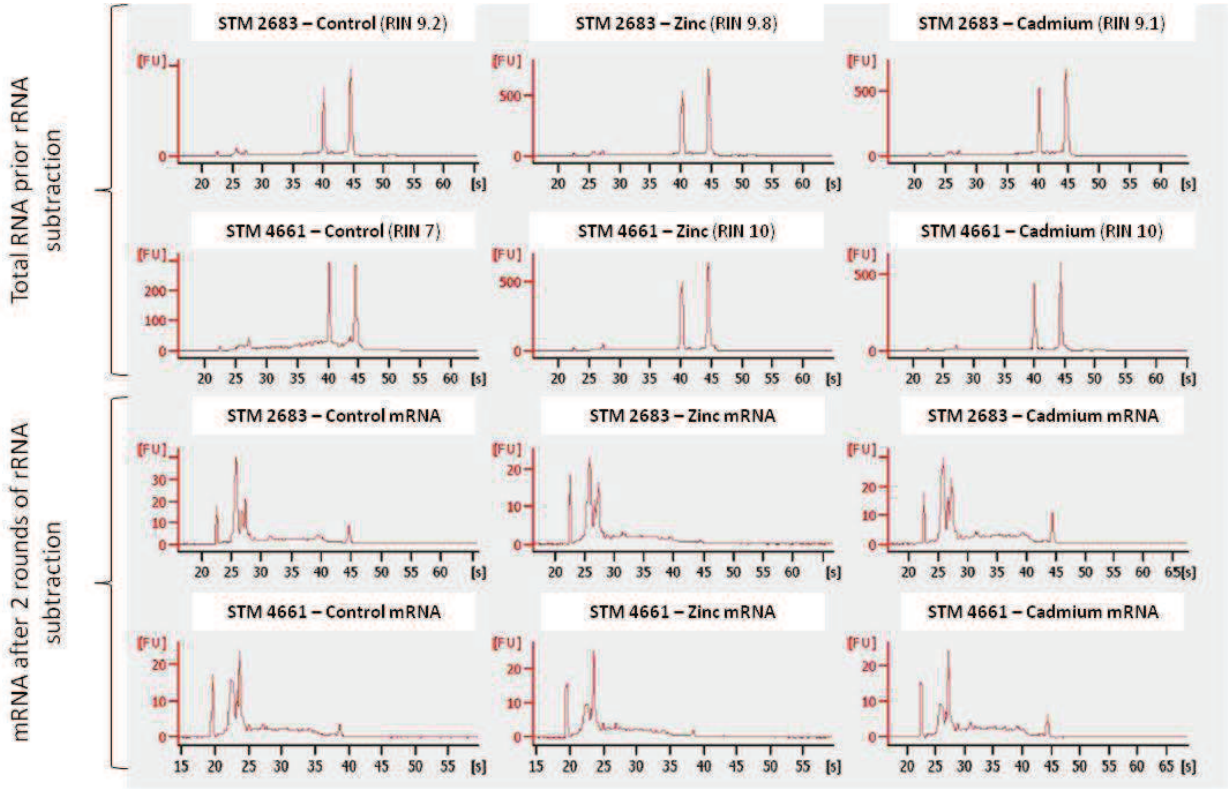


Figure III-S1: Qualitative analysis of RNA samples and effect of the rRNA subtractions. The top six chromatograms show the total RNA samples with RIN values calculated in parentheses. The six chromatograms at the bottom illustrate the profiles of the RNA-depleted samples after two rounds of subtraction using the Microbe Express kit (Ambion). Sample identity is shown at the top of each chromatogram.

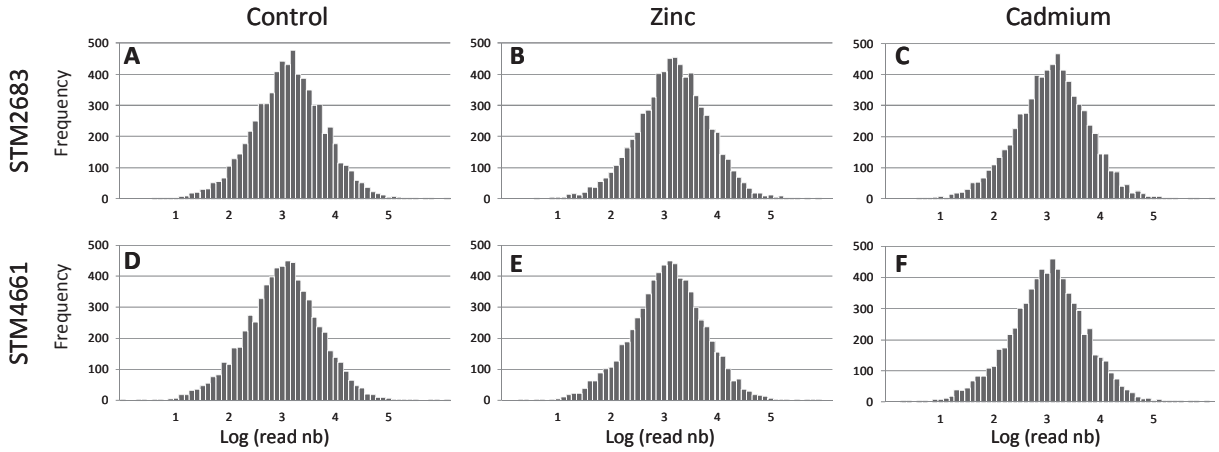


Figure III-S2: Histogram representing the log10-transformed read count numbers *per* CDS for each treatment. (TOP) Histogram showing the number of genomic objects (frequency) classified according to their respective log-transformed read numbers using intervals of 0.1 for STM 2683 (A-C) and STM 4661 (D-F), and in the three treatments tested: metal-free control (A and D), Zinc (B and E) or Cadmium (C and F).

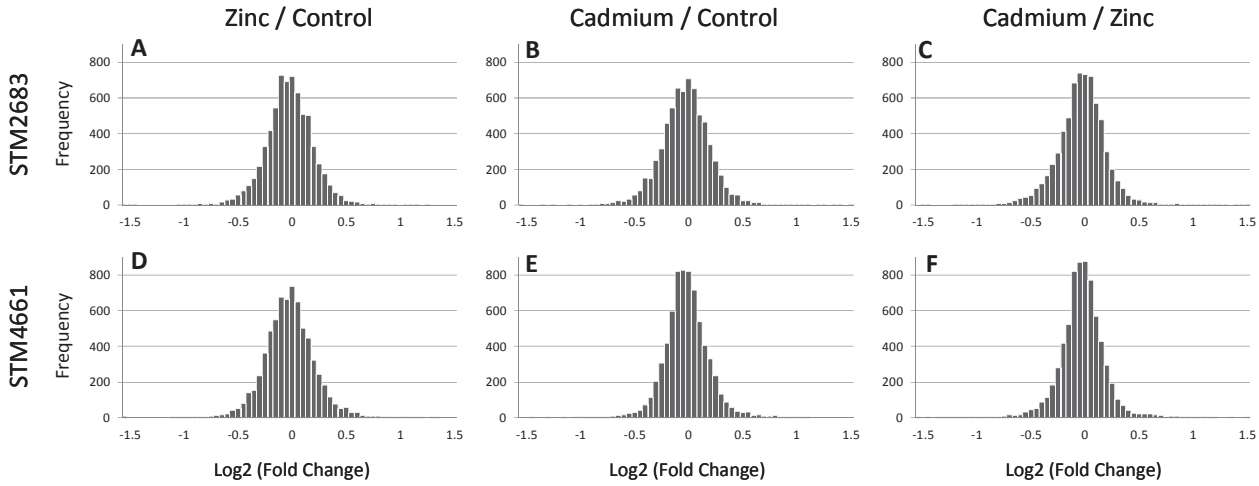


Figure III-S3: Histogram representing the log-2 fold changes obtained for all CDSs and all comparisons. Histogram showing the numbers of CDSs (frequency) classified according to their log-2 fold changes using intervals of 0.05 for STM 2683 (A-C) and STM 4661 (D-F) obtained from the three possible comparisons Zinc/control (A and D), Cadmium/control (B and E) or Cadmium/Zinc (C and F).

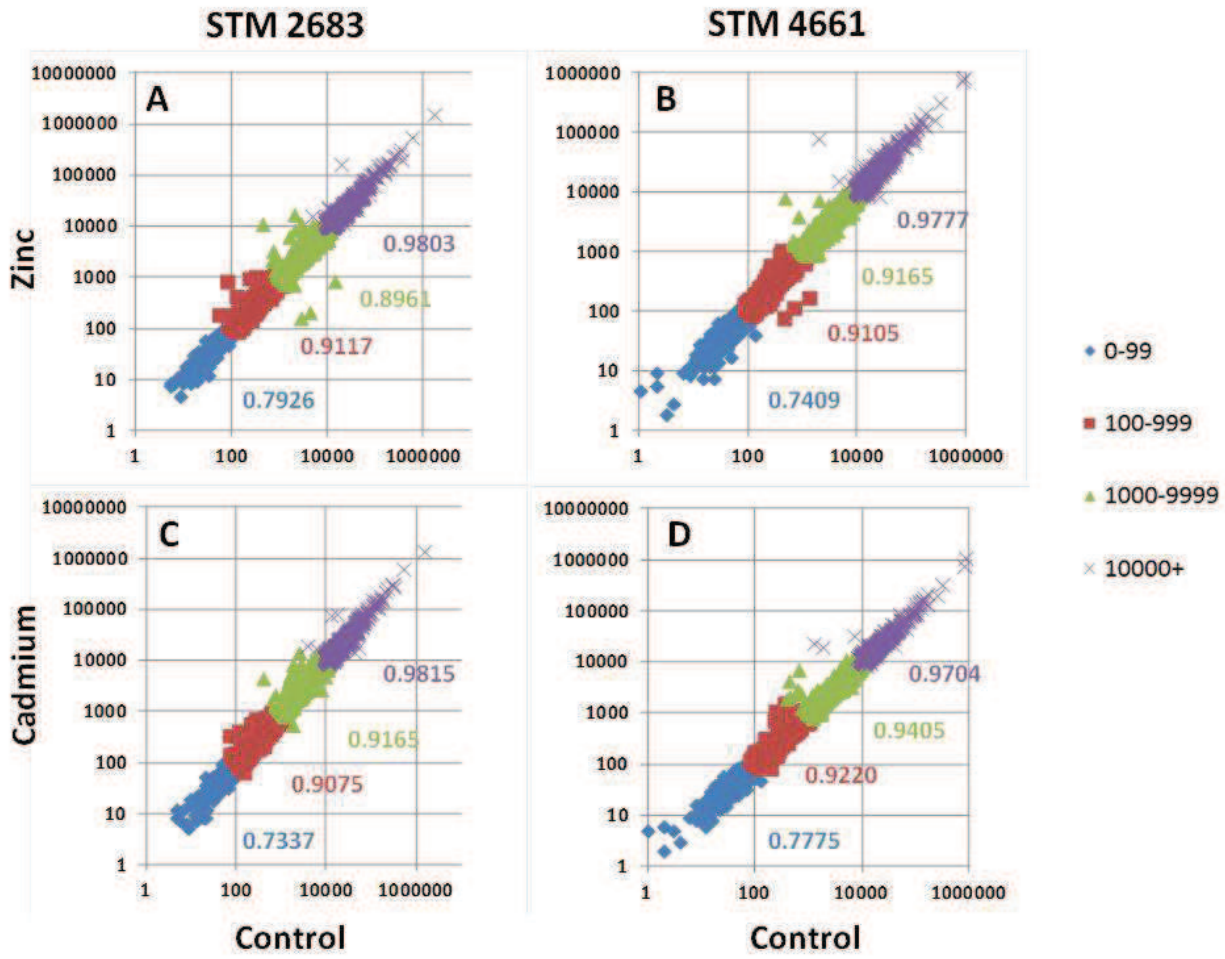


Figure III-S4: Scatter plot representations of RNAseq data from STM 283 (A and C) and STM 4661 (B and D). Read numbers for all predicted CDSs after Zinc (A and B) or Cadmium (C and D) treatments are reported on the Y axes and plotted against their respective read numbers in the metal-free control treatments on the X axes. The data were classified according to their mean CDS read number between treatments, data ranging from 0 to 99 (blue squares), from 100 to 999 (red squares), from 1 000 to 9 999 (green triangles) and above 10 000 (purple crosses) were used to calculate the correlation factors (R^2) indicated on the graphs using the same color code.

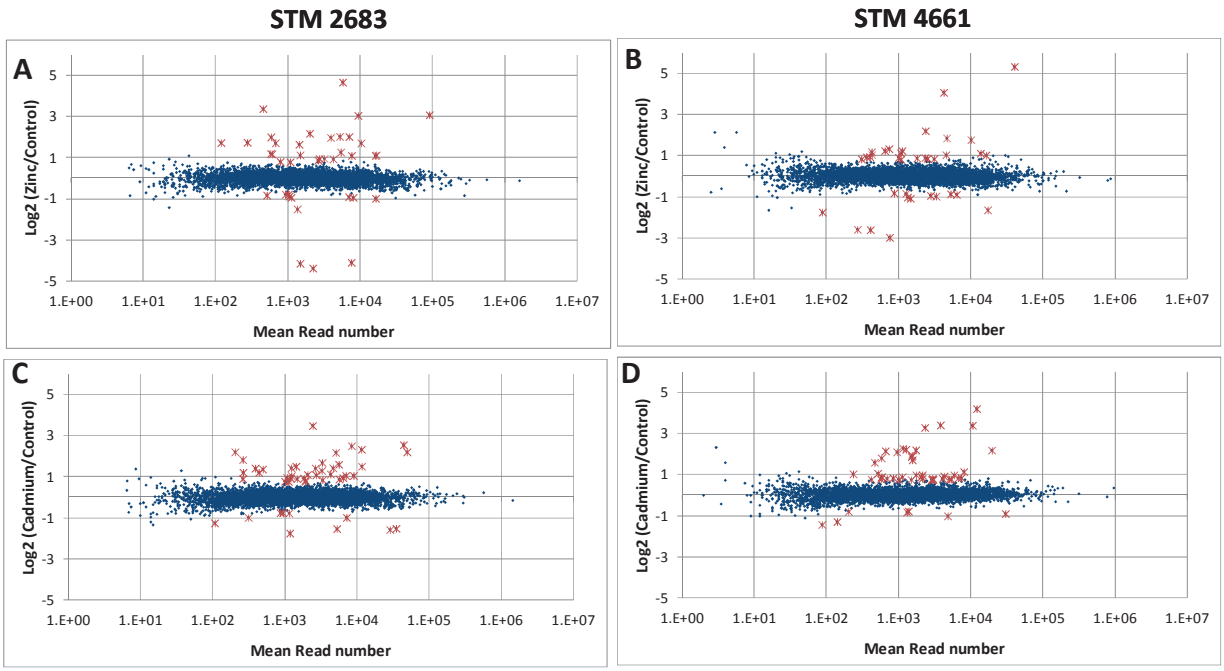


Figure III-S5: MA plot representations of RNAseq data. MA plot representing the differential expression obtained for STM 2683 (A and C) and STM 4661 (B and D) for each metal *vs* control experiment. Mean read numbers for the compared treatments Zinc *vs* control (A and B) or Cadmium *vs* control (C and D) for each predicted CDS are reported on the X axes and plotted against their respective log 2-transformed fold changes on the Y axes. Red stars refer to CDSs with a padj value below 0.1.

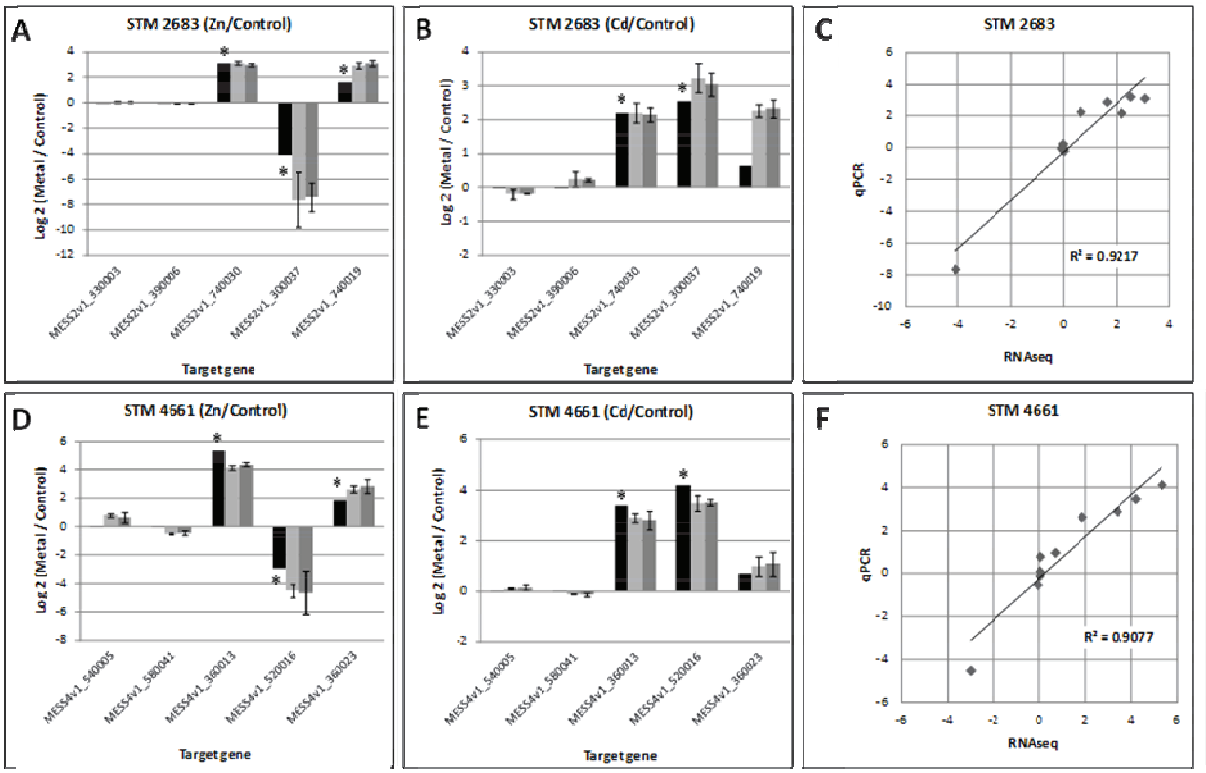


Figure III-S6: Comparison between quantitative PCR and RNAseq data. The log-2 fold changes of expression following metal treatments as compared to the control TY treatments for the heavy-metal-translocating P-type ATPase encoding gene *cad*A1 (MESS2v1_740030/MESS4v1_360013), the periplasmic binding protein of the ABC type transporter encoding gene *znu*C (MESS2v1_300037/MESS4v1_520016) and the putative Signal peptidase II encoding gene (MESS2v1_740019/MESS4v1_360023) were calculated using the reference genes *rec*A (MESS2v1_330003/MESS4v1_540005) and *gln*A (MESS2v1_390006/MESS4v1_580041) for STM 23683 (A, B) and STM 4661 (D, E), respectively. The correlation factors (R^2) between qPCR (dark and light grey bars corresponding to two independent replicates of three technical replicates) and RNAseq (black bars) data were calculated from the scatter plots obtained by plotting the log-2 fold changes (metal/control) obtained by RNAseq against the average of the two replicates obtained by qPCR for STM 2683 (C) and STM 4661 (F). When shown, error bars correspond to the qPCR (+/-) standard deviations calculated from three technical replicates.

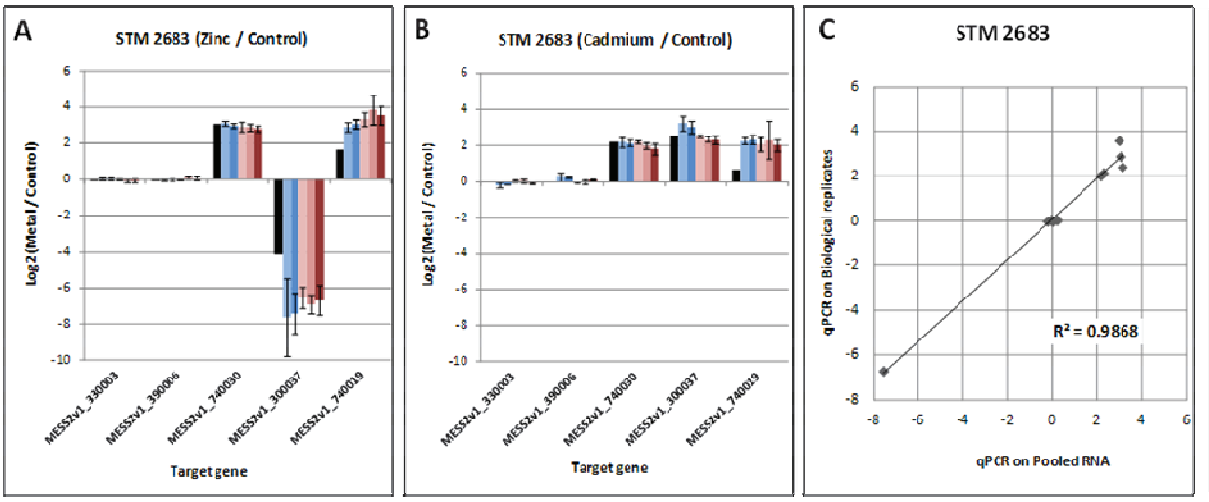


Figure III-S7: Estimation of biological variations. The log-2 fold changes of expression in Zinc (A) and Cadmium (B) treated cells as compared to the control TY cells for the heavy–metal-translocating P-type ATPase encoding gene *cad*A1 (MESS2v1_740030), the periplasmic binding protein of the ABC type transporter encoding gene *znu*C (MESS2v1_300037) and the putative Signal peptidase II encoding gene (MESS2v1_740019) were calculated using the reference genes *rec*A (MESS2v1_330003) and *gln*A (MESS2v1_390006) for STM 23683. The RNAseq differential expression values are shown as black bars. Blue bars (two independent replicates) show the relative log-2 fold changes (metal/control) as analyzed by qPCR using pooled RNA samples, and error bars correspond to three technical replicates. The three red bars (three independent replicates) show the relative log-2 fold changes (metal/control) as analyzed by qPCR using RNA samples corresponding to biological replicates, and error bars correspond to three biological replicates. The scatter plot (C) shows the average log-2 fold changes (metal/control) from the two replicates on pooled RNA samples (X axis) against the mean from three replicates on RNA samples from three biological replicates (Y axis) which was used to calculate the correlation factors (R^2) indicated on the graph.

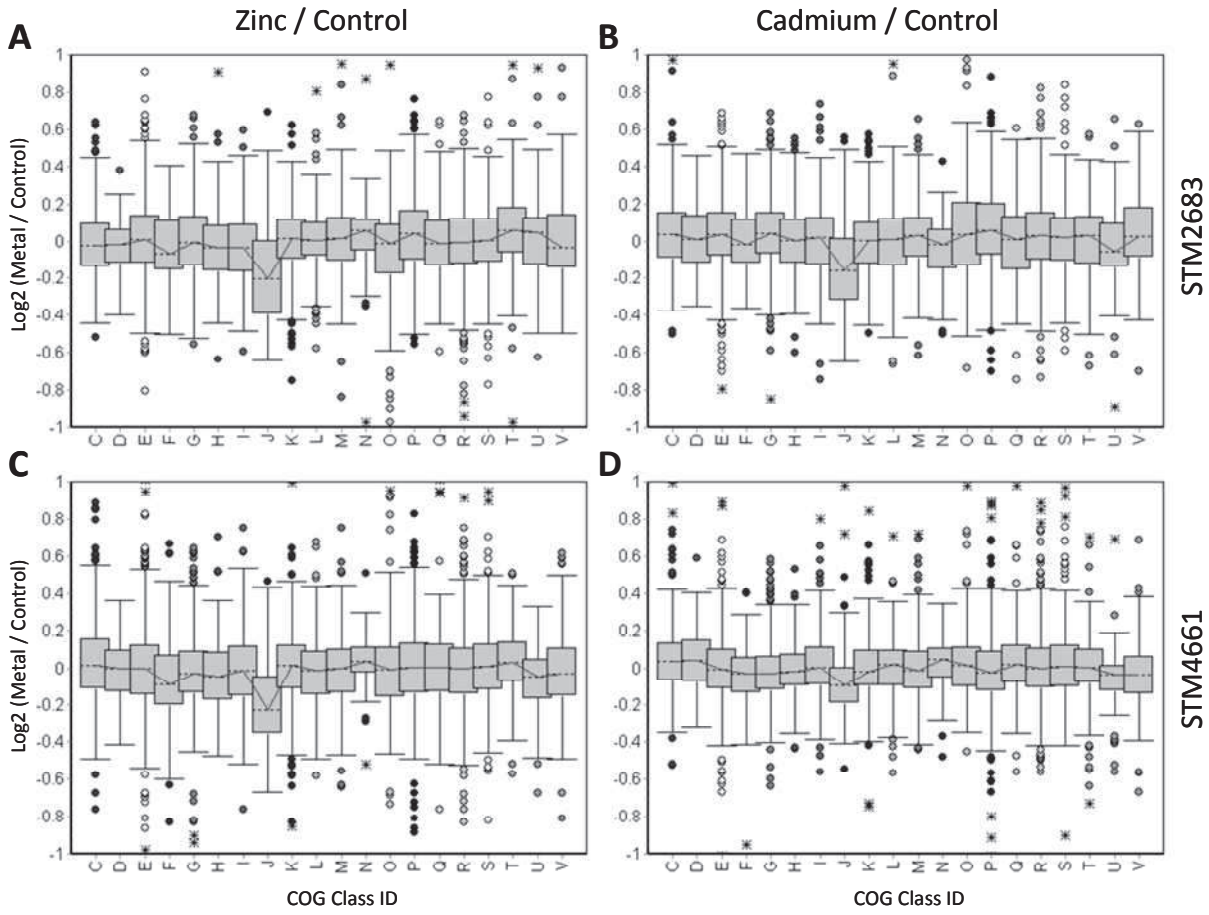


Figure III-S8: Global effect of metal treatment on the regulation of genes as classified by COG functional categories. Box plots representing the distributions of the log 2-transformed ratios (from -1 to +1) of read numbers from the metal treatments *per* read numbers from control treatments, for CDSs assigned to COG classes C to V, for isolate STM 2683 (A and B) or STM 4661 (C and D) upon Zinc (A and C) or Cadmium (B and D) exposure. Circles correspond to outliers and crosses to extreme outliers.

Table III-S1: Descriptive statistics of the RNAseq Data.

Read Count Statistics *	STM 2683			STM 4661		
	Cadmium	**Control**	**Zinc**	**Cadmium**	**Control**	**Zinc**
Nb. of observations	6908	6908	6908	7065	7065	7065
Minimum	0.699	0.699	0.699	0.301	0.000	0.301
Maximum	7.452	7.562	7.414	7.607	7.516	7.514
Quartile 1	2.709	2.738	2.803	2.621	2.620	2.682
Median	3.156	3.180	3.234	3.078	3.072	3.128
Quartile 3	3.582	3.609	3.656	3.515	3.504	3.561
Mean	3.135	3.170	3.221	3.060	3.053	3.112
Variance (n-1)	0.460	0.454	0.448	0.488	0.481	0.475
Standard deviation (n-1)	0.678	0.674	0.669	0.699	0.694	0.689

Expression Statistics**	STM 2683			STM 4661		
	Zinc /Control	**Cadmium /Control**	**Cadmium /Zinc**	**Zinc /Control**	**Cadmium /Control**	**Cadmium /Zinc**
Nb. of observations	6860	6860	6860	7013	7013	7013
Minimum	-4.370	-1.750	-1.470	-2.980	-1.440	-1.950
Maximum	4.650	3.480	6.680	5.320	4.190	7.150
Quartile 1	-0.130	-0.140	-0.130	-0.140	-0.110	-0.110
Median	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Quartile 3	0.130	0.130	0.120	0.130	0.120	0.110
Mean	0.000	-0.003	-0.006	0.002	0.011	0.001
Variance (n-1)	0.069	0.064	0.075	0.069	0.058	0.068
Standard deviation (n-1)	0.262	0.252	0.274	0.262	0.240	0.261

* Descriptive statistics of read counts obtained for the two isolates (STM 2683 or 4661) and each treatment (Cadmium, control and Zinc) obtained from all genomic objects (Number of observations) after logarithmic transformation.

** Descriptive statistics of differential expression obtained for the two isolates and all possible comparisons (Zinc/control; Cadmium/control; Cadmium/Zinc) obtained from all genomic objects excluding tRNAs and rRNAs (Number of observations) after logarithmic base-2 transformation.

Table III-S2: Correlation matrix of total read number *per* COG class (A) and mean read number *per* COG class (B) in our transcriptomic datasets. Red-labeled data refer to intraspecies correlations.

A	STM 2683 TY	STM 2683 Zn	STM 2683 Cd	STM 4661 TY	STM 4661 Zn	STM 4661 Cd
STM 2683 TY	1	0.9852	0.9888	0.9168	0.9028	0.9157
STM 2683 Zn		1	0.9984	0.9095	0.9204	0.9201
STM 2683 Cd			1	0.9143	0.9215	0.9236
STM 4661 TY				1	0.9869	0.9965
STM 4661 Zn					1	0.996
STM 4661 Cd						1
B	**STM 2683 TY**	**STM 2683 Zn**	**STM 2683 Cd**	**STM 4661 TY**	**STM 4661 Zn**	**STM 4661 Cd**
STM 2683 TY	1	0.9458	0.9627	0.8459	0.7765	0.8081
STM 2683 Zn		1	0.9853	0.8665	0.8615	0.8629
STM 2683 Cd			1	0.8698	0.8478	0.8631
STM 4661 TY				1	0.9723	0.9896
STM 4661 Zn					1	0.9926
STM 4661 Cd						1

Table III-S3: Strains, plasmids and primers used.

Strains / plasmids / primers	**Characteristics**	**Source/ reference / amplified region**
Strains		
Escherichia coli **strains**		
DH10B	F- *endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL* Δ*lac*X74 Φ80l*ac*ZΔM15 *araD139* Δ(ara,leu)7697 *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) λ-	59
XL2 Blue Ultra-competent Cells	endA1 supE44 thi-1 hsdR17 recA1 gyrA96 relA1 lac [F´ proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]	Stratagene
Mesorhizobium **strains**		
M. metallidurans STM 2683^T	wild-type from the Avinieres mine	7
Mesorhizobium sp. STM 4661	wild-type from the Eylie mine	This study
M. tianshanense ORS 2740^T	wild-type	60
Mesorhizobium sp. STM 2682	wild-type from the Prunarede site	5
Plasmids		
pGEM-T Easy	lacPOZ, cloning vector	Promega
pGEM-*cadA1*p	pGEM-T Easy containing the HindIII *cadA1* promotor, Ap^R	Maynaud *et al.* (in preparation)
pGEMt-*znu*Cp	pGEM-T Easy containing the HindIII *znu*C promotor, Ap^R	This study
pPROBE-GT	promoter-probe vector with gfp gene, Gm^R	51
pGT-*cadA1*p	pPROBE GT containing HindIII *cadA1* promotor downstream *gfp* gene, Gm^R	Maynaud *et al.* (in preparation)
pGT-*znu*Cp	pPROBE GT containing HindIII *znuC* promotor downstream *gfp* gene, Gm^R	This study
Primers		
STM 2244-Reverse	5'-CGAATTCCATGCCCGCTACC-3'	*This study / cadA1* promoter region
STM 2740-Forward	5'-TCTAGATGCCTATGGAGACGG-3'	*This study / cadA1* promoter region
STM 2953-Forward	5'-AAGCTTAGAGTCGCGGTTCGC-3'	*This study / znu*C promoter region
STM 2954-Reverse	5'-AAGCTTCCAGCGTCAGGTCG-3'	*This study / znu*C promoter region

Table III-S4: Primers used for quantitative PCR assays.

Primer name	Primer sequence (5' - 3')	STM 2683 CDS	STM 4661 CDS	Product (gene)
STM 2772 Forward	CGTCCCGCCGCTCGTCTTTG	MESS2v1_740030	MESS4v1_360013	Heavy metal translocating P-type ATPase (*cad*A1)
STM 2773-Reverse	CCCGCCCTTCATCAGCAATCCC			
STM 2782-Forward	CAGCGGCAAGACGGTCAC	MESS2v1_300037	MESS4v1_520016	ABC transporter, periplasmic binding protein (*znu*A)
STM 2773-Reverse	CGCCTTCACTTCGCCTTCG			
STM 2957-Forward	TGGTGCTCGGCTACAATGAAGG	MESS2v1_740019	MESS4v1_360023	Signal peptidase II, Aspartic peptidase, MEROPS family A08
STM 2958-Reverse	CCACTCGCTCCGCCAGAAATG			
STM 2778-Forward	CGGTGCTGCTCGCCTATTC	MESS2v1_390006	MESS4v1_580041	Glutamine synthetase I (*gln*A)
STM 2779-Reverse	TCCTTGTCCATCGGCTGTCC			
STM 2776-Forward	GGCGAGGGCGTGTCCAAG	MESS2v1_330003	MESS4v1_540005	Recombinase A (*rec*A)
STM 2777-Reverse	TGCCGCAGTGCCAGTTCG			

III-3- Analyse complémentaire de comparaison de génomes de *Mesorhizobium* séquencés :

Introduction. Le genre *Mesorhizobium* comprenant actuellement 23 espèces (actualisé à septembre 2012), joue un rôle primordial dans le cycle de l'azote car toutes les espèces appartenant à ce genre, à l'exception de *M. thiogangeticum*, sont fixatrices d'azote en symbiose avec les légumineuses. De nombreuses espèces de *Mesorhizobium* forment des nodosités avec des légumineuses qui ont un intérêt économique, agricole ou médical. Les souches du genre *Mesorhizobium* nodulent des légumineuses (Famille des Fabacées) appartenant non seulement à la sous famille des Papilionoideae (*Astragalus* (Chen *et al.,* 1991), *Lotus* (Jarvis *et al.,* 1997), *Cicer* (Nour *et al.,* 1994)) mais aussi à la sous famille des Mimosoideae (*Albizia* (Wang et al., 2007a)*, Acacia* (Degefu *et al.,* 2011)) ou celle des Caesalpinioideae (*Chamaecrista* (de Lajudie *et al.,* 1998)). Certaines espèces de *Mesorhizobium* comme en particulier *M. loti* et *M. ciceri* présentent dans leurs génomes un îlot symbiotique, contenant les gènes impliqués dans la fixation d'azote et la nodulation, capable d'être transféré dans des sols cultivés (Sullivan *et al.,* 2002; Nandasena *et al.,* 2007) favorisant ainsi la dissémination de la capacité symbiotique à de nouvelles espèces bactériennes non nodulantes. De plus, les bactéries appartenant au genre *Mesorhizobium* sont capables de s'adapter à des conditions environnementales extrêmes telles que la salinité, le pH, la température, les intrants chimiques, les métaux lourds (Zahran, 1999; Abou-Shanab *et al.,* 2007; Vidal *et al.,* 2009; Laranjo and Oliveira, 2010). Les souches appartenant au genre *Mesorhizobium* apparaissent ainsi très intéressantes pour étudier les gènes impliqués dans l'adaptation à des conditions environnementales pouvant s'avérer extrêmes pour les organismes.

Actuellement dans les bases de données, les génomes séquencés de sept souches de *Mesorhizobium* symbiotiques sont disponibles : la souche *M. ciceri* bv. *biserrulae* WSM 1271, isolée de la légumineuse *Biserrula pelecinus*, les deux souches *M. opportunistum* WSM 2075 et *M. australicum* WSM 2073 isolées également de *B. pelecinus* (Nandasena *et al.,* 2007; Nandasena *et al.,* 2009), la souche *M. huakuii* MAFF303099 isolée de *Lotus corniculatus* (Kaneko *et al.,* 2000; Saeki and Kouchi, 2000), la souche *M. amorphae* CCNWGS0123 isolée de *Robinia pseudoacacia* (Hao *et al.,* 2012) et les deux souches *M. metallidurans* STM 2683^{T} (provenant de la mine des Avinières) et *Mesorhizobium* sp. STM 4661 (provenant de la mine d'Eylie), isolées d'*Anthyllis vulenaria* (Vidal *et al.,* 2009 ;

Maynaud *et al.,* chapitre IV). Parmi ces sept génomes séquencés, trois proviennent de souches isolées d'environnements miniers, contaminés en métaux lourds (*M. amorphae* CCNWGS0123, *M. metallidurans* STM 2683 et *Mesorhizobium* sp. STM 4661) qui sont décrites comme tolérantes aux métaux (Vidal *et al.,* 2009 ; Hao *et al.,* 2012) alors que les quatre autres souches proviennent de sols cultivés et aucune résistance métallique n'a été décrite jusqu'à présent pour ces souches. A notre connaissance, aucune étude de génomique comparative entre des souches de *Mesorhizobium* n'a été réalisée. Des travaux antérieurs de comparaisons génomiques de la souche multi-résistante *Cupriavidus metallidurans* CH34 avec d'autres organismes phylogénétiquement proches ont permis de révéler les gènes qui semblaient spécifiques de l'adaptation aux métaux lourds tels que ceux codants pour des systèmes d'efflux des métaux lourds avec une majorité de P_{IB}-ATPases et de systèmes protéiques HME-RND (von Rozycki and Nies, 2009). Les auteurs ont comptabilisé 12 protéines appartenant à ces systèmes/Mb dans le génome de CH34 contre seulement 6 et 8 protéines/Mb respectivement chez la souche pathogène *Ralstonia solanacearum* UW 551 (Hayward, 1991) et chez une souche de *Burkholderia xenovorans* (Goris *et al.,* 2004) capable de dégrader des biphényles polychlorés. Ce résultat montre que la souche CH34 contient plus de systèmes d'efflux de métaux lourds que d'autres β-protéobactéries, suggérant ainsi que le niveau de résistance aux métaux lourds serait corrélé au nombre de déterminants génétiques impliqués. De même chez *Stenotrophomonas maltophilia*, un pathogène opportuniste isolé d'environnements hospitaliers, des chercheurs ont pu mettre en évidence une panoplie remarquable de gènes impliqués dans la résistance à divers composés antimicrobiens (dont des antibiotiques et des métaux lourds) avec des gènes codant pour des systèmes RND (Crossman *et al.,* 2008).

Nous avons étudié et comparé les génomes des sept souches de *Mesorhizobium* actuellement séquencés afin de rechercher des caractéristiques communes aux souches symbiotiques de *Mesorhizobium* et des caractéristiques spécifiques liées à l'adaptation aux métaux lourds chez les souches de *Mesorhizobium* métallicoles. La comparaison des génomes est un outil intéressant pour saisir les spécificités et les similarités de chaque génome (Black *et al.,* 2012) et ainsi nous aider à identifier les gènes susceptibles de contribuer à la résistance aux métaux.

Matériel et méthodes.

Analyse de génomique comparative **-** Les deux souches de *Mesorhizobium* métallicoles isolées des nodosités d'*Anthyllis vulneraria* (STM 2683, STM 4661) ont été

séquencées par le Génoscope selon la technologie 454-Titanium MATE-PAIR (Maynaud *et al.,* partie III-2) et leurs génomes ont été déposés dans la plateforme d'annotation de génomes bactériens MaGe, MicroScope (Vallenet *et al.,* 2006). Les génomes des quatre souches, *M. ciceri* bv. *biserrulae* WSM 1271 (numéro d'accession GenBank du chromosome : CP002447 et du plasmide : CP002448), *M. opportunistum* WSM 2075 (numéro d'accession GenBank : CP002279), *M. australicum* WSM 2073 (numéro d'accession GenBank : AGIX00000000) et *M. amorphae* CCNWGS0123 (numéro d'accession GenBank : AGSN01000000) ont été importés de la base de données NCBI vers la plateforme MaGe pour pouvoir réaliser une étude de génomique comparative. Le génome de la souche *M. huakuii* MAFF303099 (numéro d'accession GenBank du chromosome : BA000012 et des deux plasmides pMLa : BA000013 et pMLb : AP003017) était déjà intégré dans MaGe. La comparaison des sept génomes a été réalisée à partir de l'outil de génomique comparative de MaGe, « Gene Phyloprofile ». Cet outil a permis d'identifier des gènes communs (ou spécifiques) entre différentes souches, en considérants que des gènes étaient homologues si l'alignement de leurs séquences protéiques présentait une identité de 40 % minimum sur 80 % de la longueur (Id ≥ 40 % et Lrapmin ≥ 0.8). De plus, le critère du Bidirectional Best Hits (BBH, les gènes comparés entre deux génomes doivent présenter une grande similarité de façon réciproque par BLAST) a été imposé, renforçant le caractère orthologue des gènes mis en évidence (gènes issus d'un ancêtre commun, présents dans différents génomes). Les gènes communs aux sept souches de *Mesorhizobium* ont été identifiés selon les paramètres suivants : homologie avec toutes les séquences génomiques (chromosomes et plasmides) des sept souches de *Mesorhizobium*. Les gènes spécifiques des souches métallicoles ont été identifiés en recherchant une homologie avec les séquences génomiques (chromosomes et plasmides) des trois souches de *Mesorhizobium* métallicoles (*M. metallidurans*, *Mesorhizobium* sp. STM 4661 et *M. amorphae*) et en excluant les gènes homologues avec les séquences des souches non métallicoles. Les gènes spécifiques aux deux souches de *Mesorhizobium* métallicoles isolées des nodosités d'*A. vulneraria* et provenant de sites miniers français contaminés en Zn, Pb et Cd ont été identifiés selon les paramètres suivants : homologie avec les séquences génomiques (chromosomes et plasmides) des deux souches métallicoles de *M. metallidurans et Mesorhizobium sp.* STM 4661 mais sans homologie notable avec les séquences de *M. amorphae, M. huakuii*, *M. australicum*, *M. opportunistum* et *M. ciceri*. Enfin les gènes spécifiques de chaque souche de *Mesorhizobium* ont été identifiés en excluant les gènes homologues avec au moins une des séquences génomiques (chromosomes et plasmides) des

autres souches de *Mesorhizobium*. Les données obtenues sont présentées sous la forme d'un diagramme de Venn.

Recherche de gènes potentiellement impliqués dans la réponse aux métaux lourds dans les génomes des souches de Mesorhizobium – Les 13 gènes identifiés dans les analyses transcriptomiques (partie III-2), qui sont homologues entre les deux souches de *Mesorhizobium* métallicoles isolées des nodosités d'*A. vulneraria* (STM 2683 et 4661) et significativement induits par le Zn et/ou le Cd ont été recherchés dans les cinq autres génomes de *Mesorhizobium* séquencés en utilisant l'outil de génomique comparative de MaGe « Gene Phyloprofile ». L'homologie est détectée quand dans au moins une séquence génomique (chromosomes et plasmides) d'une souche de *Mesorhizobium,* les critères Id $\geq$ 40 % et Lrapmin $\geq$ 0.8 selon la méthode du BBH, sont satisfaits.

Dénombrement des systèmes d'efflux annotés comme transporteurs de métaux lourds dans les génomes des souches de Mesorhizobium – Les systèmes d'efflux des métaux comprenant les proteines P_{IB}-ATPases, Heavy Metal Efflux Resistance Nodulation and cell-Division (HME-RND), Cation Diffusion Facilitor (CDF), les Mercuric ion permease and binding (MerTP), les Membrane Fusion Protein (MFP), CorA Metal Ion Transporter (MIT) family, Ni^{2+}-Co^{2+} Transporter (NiCoT), Outer Membrane Factors (OMF), Outre Membrane Receptor (OMR), Chromate Ion Transporter (CHR) et Zinc-Iron Permease (ZIP), définis d'après la base de données de classification des transporteurs (www.tcdb.org), ont été recherchés dans chaque génomes de *Mesorhizobium*. Leurs nombres ont été comptabilisés pour chaque génome de *Mesorhizobium* en utilisant l'outil de recherche par mot clé dans MaGe, dénommant ces transporteurs. La recherche par mots clés a été éprouvée sur le génome de la souche CH34.

Résultats et discussion. Les caractéristiques des sept génomes des souches de *Mesorhizobium* actuellement séquencés sont décrites dans le Tableau III-6. Les sept souches de *Mesorhizobium* métallicoles et non métallicoles confondus, possèdent un génome comparable en termes de taille (entre 6 204,90 et 7 596,30 kb), de pourcentage en GC (entre 60,55 et 62,87 %), de nombre de gènes (entre 6 471 et 8 149) et de proportion de génome codant (entre 84,10 et 89 %). Les génomes possèdent entre 1 et 2 plasmides de taille moyenne de 294,28 kb. Sur la base de ces critères généraux, les génomes des souches de *Mesorhizobium* métallicoles ne semblent pas posséder de caractéristiques particulières par

rapport aux souches non métallicoles. Les génomes entiers des souches de *Mesorhizobium* sont de taille similaire à ceux des espèces de *Rhizobium* mais ces derniers possèdent un chromosome plus petit (autour de 5 000 kb) et de nombreux plasmides de tailles variables (jusqu'à 6 plasmides pour *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 avec une taille comprise entre 870,02 et 147,46 kb (Young *et al.,* 2006)). Quant aux souches de *Bradyrhizobium*, leurs génomes sont plus grands (entre 7 391,97 et 9 105,83 kb) que ceux des *Mesorhizobium,* avec un unique chromosome, sauf pour la souche BTAi1 qui possède un plasmide de 228,82 kb, et ils sont plus riches en GC (65 %) (Mornico *et al.,* 2011). Les génomes des souches de *Mesorhizobium* semblent donc avoir des caractéristiques différentes de ceux de souches de *Rhizobium* ou de *Bradyrhizobium.*

Les génomes des souches de *Mesorhizobium* ont ensuite été comparés dans MaGe avec l'outil « Gene Phyloprofile » et le résultat de la comparaison est résumé dans un diagramme de Venn (Figure III-7). 3 262 gènes apparaissent communs aux sept souches de *Mesorhizobium*, parmi lesquels on retrouve les gènes impliqués dans, (i) la nodulation (10 gènes *nod* (*nod*ABCDEFIJNQ)), (ii) la fixation d'azote (11 gènes *fix* (*fix*ABCXGHISNRU) et 9 gènes *nif* (*nif*BHDKENXQW)), (iii) la régulation des gènes impliqués dans la symbiose (1 gène *rpo*N, 1 gène *nod*D et 19 gènes codant pour un régulateur transcriptionnel de type LysR), (iv) la production d'exopolysaccharides potentiellement impliqués dans la colonisation, la formation du cordon d'infection et dans l'invasion des nodosités par les rhizobia (Dickstein *et al.,* 1988) (12 gènes *exo* (*exo*BPOMALKUYFGX)), (v) la sécrétion (1 gène *hly*D, 1 système de sécrétion de type II, 1 système de sécrétion de II et III), (vi) le métabolisme des sucres (33 gènes) et du phosphate (96 gènes). L'ensemble de ces gènes a récemment été décrit comme appartenant au « symbiome », défini comme étant l'ensemble de gènes essentiels pour les rhizobia dans l'établissement de la nodulation et de la fixation d'azote avec le partenaire végétal (Black *et al.,* 2012). Finalement, 79 gènes (77 sur les chromosomes et 2 sur les plasmides) apparaissent comme spécifiques aux trois souches de *Mesorhizobium* métallicoles (comparaison des chromosomes et des plasmides de *M. metallidurans, Mesorhizobium* sp. STM 4661 et *M. amorphae*). Parmi ces 79 gènes, 45 ne sont pas annotés (56,96 %) et 34 sont annotés (43,04 %). Les gènes annotés sont majoritairement impliqués dans (i) le transport de métaux lourds (ABC transporteurs, RND), de monosaccharides et sucres (ATPases transporteurs, ABC transporteurs), (ii) la séquestration de cations (glutathione synthétase, multicopper oxydase III), (iii) la régulation (*tet*R, *lux*R, *gnt*R) et (iv) la résistance à des antibiotiques (par exemple résistance à la bléomycine) (Tableau III-7). Certaines de ces fonctions sont décrites dans la littérature

comme participant à l'adaptation aux métaux lourds, telles que le transport et la séquestration (Nies, 2003; Figueira *et al.,* 2005). Une fois correctement annotés et fonctionnellement décrits dans la résistance aux métaux, ces gènes identifiés pourront servir de marqueurs pour rechercher des souches de *Mesorhizobium* métallicoles et symbiotiques indispensables à l'adaptation de leurs plantes-hôtes dans un environnement où les métaux sont présents à de fortes concentrations. Les souches d'intérêt pourront alors être utilisées pour faciliter la phytostabilisation de sites contaminés reposant sur l'efficacité des légumineuses partenaires.

Les 13 gènes significativement induits par le Zn et/ou le Cd, présents à la fois chez la souche STM 2683 et STM 4661 en analyses transcriptomiques, ont été recherchés dans les autres génomes de *Mesorhizobium* (Tableau III-8). Les gènes codant pour un système d'import du Zn de type ZnuABC (MESS2v1_300037, MESS2v1_300038 et MESS2v1_300039 pour STM 2683 et MESS4v1_520016, MESS4v1_520017 et MESS4v1_520018 pour STM 4661) sont présents dans les autres génomes des souches de *Mesorhizobium*. Ce résultat peut se comprendre au travers du rôle essentiel de *znu*ABC qui est impliqué dans l'homéostasie du Zn, un oligoélément indispensable à la vie cellulaire, et qui est décrit chez de nombreux genres bactériens (Patzer and Hantke, 1998). Le gène prédit *opg*C codant pour une protéine membranaire catalysant le transfert d'un résidu succinyl sur la chaîne du glucane périplasmique (MESS2v1_310036 pour STM 2683 et MESS4v1_520093 pour STM 4661) est aussi présent chez les autres souches de *Mesorhizobium*. Cependant, si les glucanes périplasmiques jouent un rôle crucial dans la symbiose fixatrice d'azote, leur modification *via* le gène *opg*C (succynilation) ou *cgm*A (glycérophosphorylation) n'apparait pas essentielle pour la croissance et le développement des nodosités chez *M. loti* (Kawaharada *et al.,* 2010). De même, le gène prédit *czc*D, codant pour un système d'efflux de type HME-RND (MESS2v1_p180001 pour STM 2683 et MESS4v1_360039 pour STM 4661), est présent chez toutes les souches de *Mesorhizobium* et uniquement sur les séquences chromosomiques sauf chez la souche STM 2683 où ce gène est porté par le plasmide. Le gène *znt*A codant pour un système d'efflux de métaux lourds de type P-ATPase (MESS2v1_980073 pour STM 2683 et MESS4v1_610026 pour STM 4661) est présent seulement chez *M. ciceri* bv. *biserrulae* et *M. huakuii*. Ce résultat est étonnant car ZntA est décrit comme un système d'efflux participant à l'homéostasie du Zn dans les cellules bactériennes (Rensing *et al.,* 1997). On s'attend alors à ce qu'il soit présent chez toutes les bactéries. *M. amorphae, M. opportunistum* et *M. australicum* possèdent probablement un système d'export du Zn différent de ZntA, tels que CzcD décrit dans l'export de Zn (Anton *et al.,* 1999), qui est d'ailleurs présent chez toutes les souches de *Mesorhizobium*. Le gène

*cad*A1 codant pour un système d'efflux des métaux lourds de type P-ATPase identifié dans le chapitre II et fonctionnellement décrit dans la résistance au Zn chez STM 2683 (MESS2v1_740030 pour STM 2683 et MESS4v1_360013 pour STM 4661) suivi du gène *ccd*A codant pour un cytochrome c (MESS2v1_740029 pour STM 2683 et MESS4v1_360014 pour STM 4661), le gène *zit*B/*czc*D codant probablement pour un système d'efflux de type CDF (MESS2v1_730269 pour STM 2683 et MESS4v1_360039 pour STM 4661) et le gène non annoté mais présentant un homologue chez CH34 impliqué dans la résistance au Pb (MESS2v1_740019 pour STM 2683 et MESS4v1_360023 pour STM 4661) ne sont pas présents dans les génomes des autres souches de *Mesorhizobium* ni même dans celui de la souche métallicole de *M. amorphae*. L'absence de ces quatre gènes chez la souche métallicole de *M. amorphae* peut s'expliquer par son environnement physique et sa distance géographique de celui des souches associées à *Anthyllis*. *M. amorphae* a été décrite comme résistante au Cu et isolée d'une mine Zn-Pb contaminée en Cu, Zn et Cr en Chine (Hao *et al.,* 2012). Par ailleurs, il n'y a aucune autre information dans la bibliographie concernant cette souche (niveaux de résistance aux concentrations métalliques). Les quatre gènes mis en évidence ici, apparaissent alors spécifiques des souches métallicoles de *Mesorhizobium* isolées des nodosités d'*Anthyllis* et provenant de sites miniers géographiquement assez proches. Ils pourraient alors être testés comme marqueurs pour rechercher des souches métallicoles et symbiotiques d'*Anthyllis* dans des sites miniers contaminés en Zn, Cd et Pb de la France. En tant que marqueurs fonctionnels, ils pourraient permettre d'étudier la diversité et la répartition des souches de *Mesorhizobium* associées à *Anthyllis* sur divers sites français.

Le nombre de systèmes d'efflux impliqués dans le transport des métaux lourds a été comptabilisé pour chaque génome de *Mesorhizobium.* L'annotation automatique a montré que les génomes des trois souches de *Mesorhizobium* résistantes aux métaux lourds contiennent entre 27 et 29 gènes codant pour des systèmes d'efflux impliqués dans le transport des métaux lourds alors que les génomes des *Mesorhizobium* non métallicoles n'en possèdent qu'entre 10 et 15 (Tableau III-9). Les souches de *Mesorhizobium* métallicoles possèdent cependant moins de systèmes d'efflux des métaux lourds que la souche CH34, ce qui est probablement dû au manque d'annotation experte de ces génomes et au fait que *C. metallidurans* CH34 est une souche bactérienne qui résiste à plus de métaux lourds que les souches de *Mesorhizobium* étudiées. Comme l'annotation des génomes des souches de *Mesorhizobium* est essentiellement automatique, il est difficile de conclure sur le nombre exact de systèmes d'efflux des métaux lourds présents. Cependant on constate déjà une tendance : les trois génomes des souches de *Mesorhizobium* métallicoles contiennent deux fois plus de systèmes

d'efflux des métaux lourds que les souches de *Mesorhizobium* non métallicoles, et ce après une annotation automatique utilisant des paramètres identiques pour chaque souche. Pour confirmer l'existance d'une corrélation entre le phénotype de la résistance métallique et le nombre de systèmes d'efflux des métaux lourds (von Rozycki *et al.,* 2009), il serait souhaitable que les génomes soient annotés de façon experte pour réaliser ce travail de comparaison sur un plus grand nombre de souches bactériennes métallicoles et non métallicoles.

Tableau III-6 : Caractéristiques des sept génomes des souches de Mesorhizobium actuellement séquencés.

Espèces bactériennes	**Nb plasmide**	**Taille génome kb (taille réplicon)**	**% GC génome (% GC réplicon)**	**Nb gènes génome**	**Nb ARNr**	**Nb ARNt**	**Proportion génome codant %**	**Hôte légumineux**
M. metallidurans STM 2683[T a]	1	6254,13 (6020,20 chr[c] ; 233,93 pl[d])	61,53 (62,53 chr ; 60,53 pl)	6843	3	45	87,13	*Anthyllis vulneraria*
Mesorhizobium sp. STM 4661 [a]	1	6556,10 (6304,31 chr ; 251,79 pl)	61,48 (62,44 chr ; 60,53 pl)	6993	3	49	87,56	*Anthyllis vulneraria*
M. amorphae CCNWGS0123 [a]	ND[b]	7543,28	62,88	7679	3	50	88,60	*Robinia pseudoacacia*
M. ciceri bv. *biserrulae* WSM1271	1	6690,03 (6264,49 chr ; 425,54 pl)	61,63 (62,69 chr ; 60,68 pl)	7051	6	52	84,10	*Biserrula pelecinus*
M. opportunistum WSM2075	ND	6884,44	62,87	7298	3	53	87,10	*Biserrula pelecinus*
M. huakuii MAFF303099	2	7596,30 (7036,07 chr ; 208,32 pl1 ; 351,91 pl2)	60,55 (62,75 chr ; 59,90 pl1 ; 59,30 pl2)	8149	6	50	86,30	*Lotus corniculatus*
M. australicum WSM2073	ND	6204,90	62,85	6471	3	49	89,00	*Biserrula pelecinus*

[a] Souches décrites comme résistantes aux métaux lourds.
[b] ND, Non Détecté car méthode d'assemblage de type Whole Genome Shotgun (WGS)
[c] chr, chromosome.
[d] pl, plasmide.

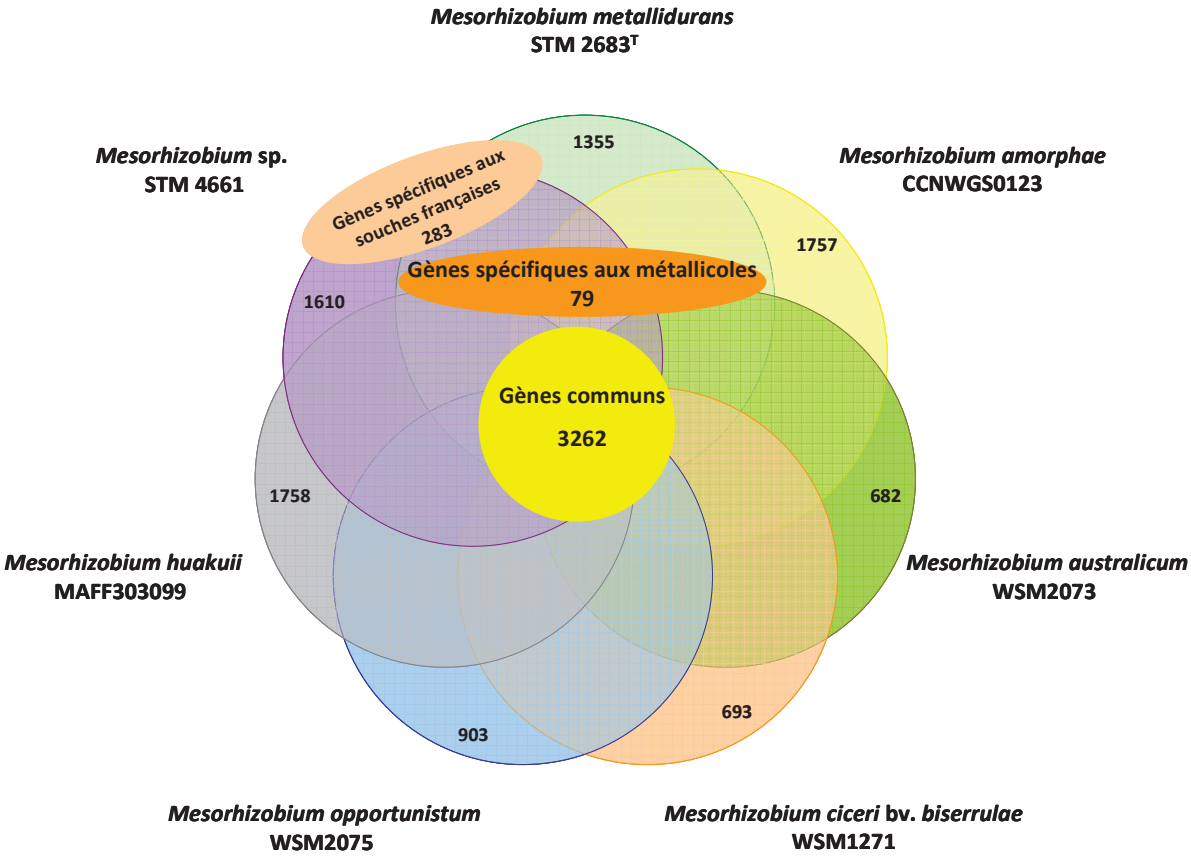


Figure III-7 : Diagramme de Venn réalisé avec les génomes des sept souches de *Mesorhizobium.*
Le nombre de gènes communs aux sept souches, est présenté au centre, le nombre de gènes spécifiques aux trois souches métallicoles, ou spécifiques aux deux souches françaises ainsi que le nombre de gènes spécifiques à chaque souche est indiqué dans le diagramme.

Tableau III-7 : Identification des gènes spécifiques aux trois souches de *Mesorhizobium* métallicoles (*M. metallidurans* STM 2683, *M. amorphae* et *Mesorhizobium* sp. STM 4661). Les gènes inconnus ne sont pas représentés ici.

Nom gènes STM 2683	Produit	Orthologue chez *M. amorphae*	Orthologue chez STM 4661
Transport de métaux lourds			
MESS2v1_330019	Putative metal cation transporter	MEAMCv1_80043	MESS4v1_360032
MESS2v1_760006	RND transporter family, MFP subunit	MEAMCv1_1090005	MESS4v1_340192
Transport de monosaccharides et sucres			
MESS2v1_80102	Monosaccharide-transporting ATPase	MEAMCv1_710031	MESS4v1_380011
MESS2v1_730217	Sugar ABC transporter	MEAMCv1_830013	MESS4v1_750234
MESS2v1_730218	Sugar ABC transporter	MEAMCv1_830012	MESS4v1_750235
MESS2v1_730219	Sugar ABC transporter	MEAMCv1_830011	MESS4v1_750236
Autres transports			
MESS2v1_60008	ABC transporter related	MEAMCv1_450041	MESS4v1_750264
MESS2v1_90004	ABC transporter, permease component	MEAMCv1_720027	MESS4v1_380050
MESS2v1_90006	Putative ABC transporter, permease	MEAMCv1_720025	MESS4v1_380052
MESS2v1_p130007	Glycine betaine/proline ABC transporter, permease protein	MEAMCv1_610040	MESS4v1_p20100
Séquestration de cations			
MESS2v1_320016	ABC-type amino acid transporter, extracellular solute-binding protein 3	MEAMCv1_170016	MESS4v1_530072
MESS2v1_760083	Glutathione synthetase (GshB), cation binding	MEAMCv1_320001	MESS4v1_750163
MESS2v1_1140035	Amidohydrolase, metal-binding; Zn homeostasis	MEAMCv1_450005	MESS4v1_120153
MESS2v1_1140033	Phenylhydantoinase (HyuA), metal-binding	MEAMCv1_450011	MESS4v1_120152
MESS2v1_410021	Phosphonoacetaldehyde hydrolase (PhnX), phosphatase, metal binding	MEAMCv1_1010002	MESS4v1_580110
MESS2v1_80113	trimethylamine N-oxide reductase system III (TorZ), catalytic subunit, selenocysteine-containing, binding activity	MEAMCv1_790020	MESS4v1_380029
MESS2v1_330018	Multicopper oxidase III, Cu binding	MEAMCv1_80042	MESS4v1_360033
Régulateurs transcriptionnels			
MESS2v1_220031	TetR family transcriptional regulatory protein (fragment)	MEAMCv1_50157	MESS4v1_490039
MESS2v1_90002	Putative GntR transcriptional regulator	MEAMCv1_720030	MESS4v1_380048
MESS2v1_800020	Transcriptional regulator, LuxR family	MEAMCv1_1220013	MESS4v1_830145

Oxydoréduction			
MESS2v1_410020	Putative FAD-dependent oxidoreductase	MEAMCv1_1010003	MESS4v1_580109
Resistance antibiotique			
MESS2v1_1450011	Glyoxalase/bleomycin resistance protein/dioxygenase	MEAMCv1_810003	MESS4v1_280011
MESS2v1_1180006	N-carbamoyl-D-amino acid hydrolase, Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase	MEAMCv1_450012	MESS4v1_130019
Synthèse acides aminés			
MESS2v1_690022	Tryptophan 2,3-dioxygenase	MEAMCv1_410067	MESS4v1_740002
MESS2v1_730054	Dihydrodipicolinate synthetase, lysine biosynthesis	MEAMCv1_410041	MESS4v1_750065
MESS2v1_1180003	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase family protein, NAD(P)-binding domain, serine biosynthesis	MEAMCv1_450019	MESS4v1_130016
MESS2v1_430002	Putative hydrolase (YcaC)	MEAMCv1_90089	MESS4v1_120312
MESS2v1_1480090	Putative Alpha3-fucosyltransferase, Glycosyl transferase, protein amino acid glycosylation	MEAMCv1_490038	MESS4v1_290015
Non classés			
MESS2v1_610070	Pentapeptide repeat protein (fragment)	MEAMCv1_470032	MESS4v1_680142
MESS2v1_670008	Putative Coat protein	MEAMCv1_2110002	MESS4v1_720111
MESS2v1_730091	Putative protein with ankyrin domain	MEAMCv1_310034	MESS4v1_750104
MESS2v1_80105	Putative Xylulose kinase (XylB), carbohydrate kinase	MEAMCv1_710036	MESS4v1_380015
MESS2v1_730194	Metal-dependent phosphohydrolase HD region	MEAMCv1_120064	MESS4v1_430016
MESS2v1_1100042	Dihydroxyacetone kinase (DhaL), C-terminal domain, glycerol degradation	MEAMCv1_330041	MESS4v1_120031

Tableau III-8 : Présence (+) ou absence (-) de 13 gènes identifiés dans les transcriptomes des souches *M. metallidurans* STM 2683 et *Mesorhizobium* sp. STM 4661 (homologues entre les deux souches et significativement induit par le Zn et/ou Cd) au sein des génomes des souches de *Mesorhizobium* actuellement séquencés.

Gène homologue STM 2683	**Gène homologue STM 4661**	**Produit**	***M. amorphae***	***M. ciceri* bv. *biserrulae***	***M. opportunistum***	***M. huakuii***	***M. australicum***
MESS2v1_p180001[b]	MESS4v1_360039[a]	Cation efflux system protein czcD-type (fragment)	+	+	+	+	+
MESS2v1_300037[a]	MESS4v1_520016	ABC transporter, periplasmic binding protein, Zn import	+	+	+	+	+
MESS2v1_300038	MESS4v1_520017	ABC transporter, permease protein, Zn import	+	+	+	+	+
MESS2v1_300039	MESS4v1_520018	ABC transporter related protein, Zn import	+	+	+	+	+
MESS2v1_740030	MESS4v1_360013	Heavy metal translocating P-type ATPase CadA1	-	-	-	-	-
MESS2v1_980073	MESS4v1_610026	Zinc, cobalt and lead efflux system ZntA	-	+	-	+	-
MESS2v1_730269	MESS4v1_360039	Putative cation efflux system protein (Cobalt-zinc-cadmium resistance CzcD-like), CDF family (fragment)	-	-	-	-	-
MESS2v1_p180003	MESS4v1_360040	conserved and cytoplasmic protein of unknown function, contains 2 CPX Zn finger domain	-	+	+	+	+
MESS2v1_730267	MESS4v1_360040	conserved and cytoplasmic protein of unknown function, contains 2 CPX Zn finger domain	-	+	+	+	+
MESS2v1_310036	MESS4v1_520093	Cyclic beta glucan succinyl transferase OpgC, cytoplasmic membrane	+	+	+	+	+
MESS2v1_740029	MESS4v1_360014	Cytochrome c biogenesis protein, transmembrane region CcdA, putative involved in reduction as Zn or Cd Sulfides	-	-	-	-	-
MESS2v1_740019	MESS4v1_360023	Signal peptidase II. Aspartic peptidase. MEROPS family A08, located in cytoplasmic membrane	-	-	-	-	-
MESS2v1_790137	MESS4v1_830086	conserved exported protein of unknown function, putative succinate dehydrogenase/fumarate reductase, flavoprotein subunit	+	+	+	-	+

[a] MESS2v1_ ou MESS4v1_ correspond au nom de gènes annotés sur le chromosome.
[b] MESS2v1_p correspond au nom de gènes annotés sur le plasmide.

Tableau III-9 : Nombre de systèmes d'efflux annotés comme transporteurs de métaux lourds chez les génomes des sept souches de *Mesorhizobium* actuellement séquencés et chez *Cupriavidus metallidurans* CH34 pour référence.

Espèces	P_{IB}-ATPase	HME-RND[a]	CDF[b]	MerTP[c]	MFP[d]	MIT[e]	NiCoT[f]	OMF[g]	OMR[h]	CHR[i]	ZIP[j]	Total	proteine/Mb
M. metallidurans STM 2683^T	7	3	2	2	8	0	3	1	1	1	0	**28**	**4,5**
Mesorhizobium sp. STM 4661	8	0	1	0	10	1	5	2	2	0	0	**29**	**4,4**
M. amorphae CCNWGS0123	6	1	1	0	8	1	5	4	1	0	0	**27**	**3,6**
M. ciceri bv. *biserrulae* WSM1271	4	0	0	0	0	4	3	0	0	2	0	**13**	**1,9**
M. opportunistum WSM2075	3	0	0	0	0	4	3	0	0	2	0	**12**	**1,7**
M. huakuii MAFF303099	2	0	0	0	4	0	3	0	0	1	0	**10**	**1,3**
M. australicum WSM2073	4	0	1	0	1	3	4	1	1	0	0	**15**	**2,4**
Cupriavidus metallidurans CH34	13	12	3	6	18	3	1	17	5	4	1	**83**	**12**

[a] HME-RND, Heavy Metal Efflux Resistance Nodulation and cell-Division.
[b] CDF, Cation Diffusion Facilitor family.
[c] MerTP, Mercuric Ion Permease (MerT) and binding (MerP) family.
[d] MFP, Membrane Fusion Protein.
[e] MIT, CorA Metal Ion Transporter family.
[f] NiCoT, Ni^{2+}-Co^{2+} Transporter family.
[g] OMF, Outer Membrane Factors.
[h] OMR, Outer Membrane Receptor.
[i] CHR, Chromate Ion Transporter family.
[j] ZIP, Zinc-Iron Permease family.

En conclusion, ce travail de génomique comparative effectué sur les sept génomes de *Mesorhizobium* actuellement disponibles dans les bases de données (*M. ciceri* bv. *biserrulae* WSM 1271, *M. opportunistum* WSM 2075, *M. australicum* WSM 2073, *M. huakuii* MAFF303099, *M. amorphae* CCNWGS0123, *M. metallidurans* STM 2683^{T} et *Mesorhizobium* sp. STM 4661) a permis de révéler d'une part, des gènes communs communs à toutes les espèces de *Mesorhizobium* comme les gènes impliqués dans la nodulation et la fixation d'azote et d'autre part les gènes potentiellement liés à l'adaptation aux métaux lourds avec notamment les gènes impliqués dans leur transport ou leur séquestration. Parmi les gènes identifiés en transcriptomique chez les deux souches de *Mesorhizobium* associées à *Anthyllis* (*M. metallidurans* et *Mesorhizobium* sp. STM 4661), les gènes *cad*A1, *ccd*A, *czc*D/*zit*B et le gène présentant un homologue chez CH34 impliqué dans la résistance au Pb, semblent spécifiques à ces deux souches bactériennes. Ils pourraient servir de marqueurs fonctionnels pour étudier la diversité et la répartition des souches de *Mesorhizobium* associées à *Anthyllis* sur divers sites miniers français. Cette étude suggère que les génomes des souches métallicoles de *Mesorhizobium* sont particulièrement bien adaptés aux conditions environnementales avec la présence d'un plus grand nombre de systèmes d'efflux des métaux lourds et la présence de gènes spécifiques susceptibles de jouer un rôle dans l'adaptation métallique. Afin de confirmer les hypothèses avancées dans ce travail de génomique comparative, il sera nécessaire d'annoter de manière experte l'ensemble des génomes de *Mesorhizobium* et d'étudier fonctionnellement quelques candidats potentiellement impliqués dans l'adaptation aux métaux lourds.

III-4- Synthèse :

Afin d'identifier les gènes potentiellement impliqués dans l'adaptation aux métaux lourds de souches de *Mesorhizobium* métallicoles, des travaux de génomique et de transcriptomique comparative ont été réalisés. Notre étude a permis de caractériser d'une part un ensemble de gènes portés spécifiquement par les *Mesorhizobium* métallicoles connus à ce jour, et d'autre part, la réponse génomique globale des souches STM 2683 et 4661 (isolées des nodosités d'*Anthyllis vulneraria*), à un stress modéré de Zn ou de Cd. L'approche de transcriptomie comparative a montré que près de 1 % (72/6 844 et 68/6 994 des CDS prédites chez STM 2683 et STM 4661 respectivement) des gènes prédits sont significativement régulés par le Zn et/ou Cd (*p-value* ajustée FDR < 0.1). De plus, un faible nombre des gènes

significativement régulés par les métaux semblent impliqués dans une réponse aspécifique. Ce résultat suggére que la méthode de type RNAseq utilisée dans les conditions expérimentales choisies est fiable et permet d'identifier les gènes qui répondent spécifiquement aux métaux lourds. Ces gènes répondant spécifiquement aux métaux sont répartis dans six catégories : transport, séquestration, régulation, oxydo-réduction, autres (correspondant potentiellement à une réponse non-spécifique des métaux lourds) et non classés (correspondant à des gènes non annotés ou inconnus). Après le groupe des gènes « non classés », les deux groupes « transport » et « séquestration » sont les plus sur-représentées parmi les données d'intérêt chez les deux souches de *Mesorhizobium*. Treize des gènes significativement régulés (13/72 gènes pour STM 2683 et 13/68 pour STM 4661) présentent des homologues chez les deux souches bactériennes et présentent des homologies avec des gènes impliqués dans la réponse métallique tels que les gènes codant pour un système ABC d'import de haute affinité au Zn, un gène homologue à *znu*ABC, fortement régulé (induit ou réprimé par le Cd ou le Zn respectivement) et probablement impliqué dans l'homéostasie du Zn comme cela a été montré chez *E. coli* (Hantke, 2001). D'autres gènes régulés par les métaux lourds et homologues entre les deux souches codent pour des systèmes d'efflux tels que la P_{IB}-ATPase CadA1 (précédemment décrite chez STM 2683 potentiellement impliquée dans l'efflux de Zn et Cd (chapitre II)), ou alors une protéine de la famille HME-RND homologue à CzcD/ZitB (potentiellement impliqué dans le transport spécifique du Zn) (Grass *et al.,* 2001b) ont également pu être mis en évidence. Ces transporteurs peuvent être impliqués dans la détoxification du cytoplasme par export de cations métalliques en utilisant l'ATP ou un gradient chimiosmotique comme source d'énergie. Parmi les gènes régulés et homologues codant potentiellement pour des systèmes de séquestration des métaux lourds, on retrouve le gène *opg*C, inductible par le Cd, qui code pour une protéine membranaire catalysant le transfert d'un résidu succinate sur la chaîne du glucane périplasmique (Kawaharada *et al.,* 2010), lui conférant alors une charge négative dans le périplasme susceptible de lier des cations métalliques chargés positivement. Des gènes codant pour des protéines à domaines doigts de Zn et riches en résidus histidines ou cystéines et homologues chez les deux souches sont aussi présents dans les listes de gènes significativement induits par le Zn et/ou le Cd. Ce type de protéine est connu pour séquestrer les cations métalliques et limiter leur biodisponibilité et donc leur toxicité dans la cellule (Blindauer *et al.,* 2002 ; Yamamoto *et al.,* 2005). Enfin d'autres gènes codant pour des systèmes de précipitation des cations métalliques par des phosphates ou sulfures semblent impliqués pour réduire la biodisponibilité des métaux dans les cellules (Aiking *et al.,* 1982 ; Macaskie *et al.,* 2000) Les deux souches de

Mesorhizobium étudiées présentent aussi des caractéristiques uniques telles que l'expression de la P_{IB}-ATPase ZntA, impliquée dans le transport de Zn (Rensing *et al.,* 1997) qui est différentiellement régulée chez les deux souches : elle est inductible par les deux métaux testés chez STM 2683 alors que chez STM 4661, seul le Zn induit son expression. Aussi les régulateurs transcriptionnels sont beaucoup plus nombreux dans le génome de la souche STM 2683 que dans celui de STM 4661.

La génomique comparative réalisée avec les quatre génomes de *Mesorhizobium* sensibles (*M. australicum, M. huakuii, M. opportunistum* et *M. ciceri* bv. *biserrulae*) et les trois génomes de *Mesorhizobium* métallicoles (*M. amorphae, M. metallidurans* et *Mesorhizobium* sp. STM 4661) confirme le fait que les génomes des bactéries métallicoles sont particulièrement bien adaptés aux conditions environnementales avec la présence de gènes spécifiques de l'adaptation métallique (codant pour des transporteurs et des agents chélatants) comme cela a été montré auparavant dans les données de transcriptomie. Parmi les gènes spécifiques identifiés au sein des souches métallicoles de *Mesorhizobium*, 56,96 % ne sont pas annotés et représentent potentiellement de nouveaux gènes impliqués dans l'adaptation aux métaux. Pour compléter ce travail, il serait intéressant d'annoter de façon experte les trois génomes de *Mesorhizobium* métallicoles et d'ajouter de nouvelles souches afin d'identifier les gènes spécifiques qui pourraient servir de marqueurs pour rechercher des souches de *Mesorhizobium* symbiotiques et métallicoles. Par ailleurs, parmi les 13 gènes identifiés en transcriptomique dans les génomes des deux souches de *Mesorhizobium* métallicoles et symbiotiques isolées des nodosités d'*Anthyllis*, les gènes *cad*A1, *ccd*A, *czc*D/*zit*B et le gène présentant un homologue chez la souche CH34 impliqué dans la résistance au Pb sont présents uniquement chez les deux souches associées à *Anthyllis*. Ces derniers sont de bons candidats pouvant être utilisés en tant que marqueurs fonctionnels pour étudier la diversité et la répartition des souches de *Mesorhizobuim* associées à *Anthyllis* sur divers sites miniers français.

En résumé, ce travail a permis de mettre en évidence les gènes impliqués dans la réponse globale aux métaux lourds de deux souches de *Mesorhizobium* métallicoles phylogénétiquement proches : *M. metallidurans* STM 2683 (provenant du site minier des Avinières) et *Mesorhizobium* sp. STM 4661 (provenant du site d'Eylie). Plus particulièrement, cette étude a permis d'identifier des gènes spécifiques de l'adaptation métallique ainsi que les gènes spécifiques des deux souches de *Mesorhizobium* métallicoles associées à *A. vulneraria*, tels que le gène *cad*A1 codant pour un système d'efflux des métaux

lourds. Une étude sur la diversité et la répartition du gène *cad*A1 qui fait partie des déterminants de la résistance aux métaux chez STM 2683 (chapitre II) et qui est fortement régulé chez les deux symbiotes métalicolles d'*A. vulneraria* étudiés (chapitre III), chez des bactéries associées à *A. vulneraria* isolés de divers sites miniers ou non pollués permettra d'établir si ce gène peut être utilisé comme marqueur moléculaire et fonctionnel ; ce qui fera l'objet du **Chapitre IV**.

Chapitre IV

Diversité génétique et répartition des symbiotes d'*Anthyllis vulneraria* sur sols miniers Zn/Cd et non contaminés

IV-1- Introduction :

Le travail présenté dans le **chapitre III** a permis de mettre en évidence les gènes impliqués dans la réponse aux métaux lourds chez des souches métallicoles de *Mesorhizobium* dont des gènes codant pour des systèmes d'efflux ou de séquestration. Parmi ces gènes, quatre se sont révélés intéressants car ils font partie des gènes dont l'expression répond le plus fortement à la présence de Zn et/ou Cd et car ils apparaissent spécifiques à deux souches métallicoles de *Mesorhizobium* associées à *Anthyllis* et provenant de sites miniers français appartenant à deux massifs montagneux distincts (M. *metallidurans* STM 2683 (Avinières, Cévennes) et *Mesorhizobium* sp. STM 4661 (Eylie, Pyrénées ariégeoises)). Ces quatre gènes sont : le gène *cad*A1 codant pour un système d'efflux de Zn et de Cd de type P_{IB}-ATPase, le gène *ccd*A codant pour un cytochrome c, le gène *czc*D/*zit*B codant pour un système d'efflux de métaux de type CDF et un gène (signal peptidase II, aspartique peptidase appartenant à la famille MEROPS A08) présentant un homologue chez CH34 impliqué dans la résistance au Pb. Plus particulièrement, le gène *cad*A1 appartenant au groupe des quatre gènes les plus induits par le Zn et/ou le Cd, a été fonctionnellement décrit et participe à la résistance au Zn de *M. metallidurans* STM 2683^T (**chapitre II**). *cad*A1 apparait être un marqueur potentiellement intéressant pour étudier des populations symbiotiques d'*Anthyllis* sur sols miniers et pouvoir détecter éventuellement les souches résistantes.

*A. vulnerar*ia est une légumineuse de la famille des Fabacées qui peut être considérée comme une espèce facilitatrice de la revégétalisation des anciens sites miniers (Frérot *et al.,* 2006). Son succès écologique est du à son association privilégiée avec des rhizobia appartenant principalement au genre *Mesorhizobium* (Jarvis *et al.,* 1982; Ampomah and Huss-Danell, 2011). Des études antérieures ont permis d'isoler de nodosités d'*A. vulneraria* sur sol minier, des souches de *M. metallidurans* (Vidal *et al.,* 2009) ainsi que des souches appartenant au genre *Aminobacter* (Vidal, 2008). Cependant, nous ne disposons pas d'informations précises sur la capacité de souches d'*Aminobacter* à noduler et à fixer l'azote. Ces dernières seront alors étudiées dans ce chapitre dans la partie IV-2.

Pour que la symbiose *A. vulneraria*/*M. metallidurans* soit efficace et participe à une végétalisation durable, il est important de connaître la diversité et la répartition des symbiotes associés à *Anthyllis* dans les sites miniers. La contrainte métallique exercée par les environnements pollués est potentiellement capable de générer une réduction de la diversité génétique (Castro *et al.,* 1997), de la biomasse microbienne et d'inhiber l'activité biologique

(Wang *et al.,* 2007b; Khan *et al.,* 2010), telle que la nodulation et la fixation d'azote chez les rhizobia (Stan *et al.,* 2011). Cependant, l'étude de Delorme *et al.* (2003) précise qu'une contamination métallique sur du long terme (environ 10 ans) n'entraine pas forcément une réduction de la diversité, telle que l'avait avancé Hirsh *et al.* (1993) et peut exercer une pression de sélection favorable à une meilleure adaptation des microorganismes aux conditions environnementales (Baath, 1992; Baath *et al.,* 1998; Lakzian *et al.,* 2002; Delorme *et al.,* 2003). Aussi, la nature des métaux lourds, la concentration et la durée d'exposition influent sur la composition et la diversité microbienne (Khan and Joergensen, 2010).

L'objectif de ce chapitre est d'étudier la diversité et la répartition des populations bactériennes associées à *A. vulneraria* issues de différents sites pollués en métaux lourds et de les comparer avec des rhizobia provenant de sites modérément pollués ou non pollués. Pour cela nous avons analysé au total 114 symbiotes d'*A. vulneraria* sur la base de la détermination de leur tolérance au Zn et au Cd et de l'analyse de marqueurs chromosomiques (ADNr 16S, *rec*A et *atp*D), d'un marqueur symbiotique (*nod*A) et de résistance aux métaux lourds (*cad*A1). Lors de cette étude, nous avons constaté que les sites contaminés ne contenaient pas seulement des souches appartenant à l'espèce *M. metallidurans* comme il l'avait été suggéré (Vidal *et al.,* 2009) et que certaines souches étaient proches du genre *Aminobacter* qui ne contenait pas jusqu'alors d'espèce bactérienne nodulant des légumineuses. Ces souches particulières ont fait l'objet d'un article scientifique dans *Systematic and Applied Microbiology* permettant de définir une nouvelle espèce bactérienne (partie IV-2). L'étude de la diversité et de la répartition des populations symbiotiques d'*A. vulneraria* provenant de différents sites métallicoles ou non métallicoles, avec l'analyse de marqueurs chromosomiques, fonctionnels et phénotypiques (tolérance aux métaux lourds), est rédigé sous la forme d'un article scientifique pour une future soumission (partie IV-3).

IV-2- Article accepté dans *Systematic and Applied Microbiology* :

Molecular and phenotypic characterization of strains nodulating *Anthyllis vulneraria* in mine tailings, and proposal of *Aminobacter anthyllidis* sp. nov., the first definition of *Aminobacter* as legume-nodulating bacteria

Géraldine Maynaud [a], Anne Willems [b], Souhir Soussou [c], Céline Vidal [a], Lucette Mauré [a], Lionel Moulin[d], Jean-Claude Cleyet-Marel [a] and Brigitte Brunel[c,*]

[a] INRA, USC1242, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes IRD/INRA/CIRAD/Montpellier SupAgro/Université Montpellier II, TA A-82/J, F-34398, Montpellier Cedex 5, France.

[b] Laboratorium voor Microbiologie, Faculteit Wetenschappen, Universiteit Gent, Belgium

[c] Montpellier SupAgro, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, IRD/INRA/ CIRAD/Montpellier SupAgro/Université Montpellier II, TA A-82/J, F-34398, Montpellier Cedex 5, France.

[d] IRD, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, IRD/INRA/CIRAD/Montpellier SupAgro/ Université Montpellier II, TA A-82/J, F-34398, Montpellier Cedex 5, France.

[*] Corresponding author, Tel.: +33 4 99 61 22 91; fax: +33 4 67 59 38 02, E-mail address: brunel@supagro.inra.fr

Accession numbers: Nucleotide sequence data reported are available in the Genbank database under the following accession numbers: (i) 16S rDNA: FR869633 (from strain STM 4645^T, this sequence is identical to those of isolates STM 4640-41, STM 4643, STM 4644, STM 4653, STM 4646 and STM 6499), FR869634 from strain STM 6498; (ii) for partial *atp*D gene sequences : FR869648-59 from strain STM 4640-41, STM 4643-46, STM 4653, STM 6498-99, STM 4662-64 and strain STM 2150^T; (iii) for partial *rec*A gene sequences: FR869637-46 from strain STM 4640-41, STM 4643-46, STM 4653, STM 6498-99, strain STM 2150^T and STM 3600^T; (iv) for partial *dna*K gene sequences: FR869660-72 from strain STM 4640-41, STM 4643-46, STM 4653, STM 6498-99, STM 4662-64 and strain STM 2150^T, STM 3600^T and (v) for partial *nod*A gene sequences: FN436265-66 from two copies of STM 2683^T, FR869673-83 from strain STM 4640-41, STM 4643-46, STM 4653, STM 6498-99 and STM 4662-64.

Abstract

Bacterial strains from Zn–Pb mine tailings were isolated by trapping with *Anthyllis vulneraria*, a legume-host suitable for mine substratum phytostabilisation. Sequence analysis of the 16S rRNA gene and three housekeeping genes (*atp*D, *dna*K and *rec*A) showed that they were related to those of the genus *Aminobacter*. DNA–DNA relatedness of representative isolates supported the placement of novel strains in *Aminobacter* as a new species. Phenotypic data emphasize their differentiation from the other related species of *Aminobacter* and *Mesorhizobium*. *Aminobacter* isolates exhibited *nod*A sequences tightly related with *M. loti* as

the closest *nod*A relative. By contrast, their *nod*A sequences were highly divergent from those of *M. metallidurans*, another species associated with *A. vulneraria* that carries two complete copies of *nod*A. Therefore, the novel bacterial strains efficient on *A. vulneraria* represented the first occurrence of legume symbionts in the genus *Aminobacter*. They represent a new species for which the name *Aminobacter anthyllidis* sp. nov. is proposed (type strain STM4645^T = LMG26462^T = CFBP7437^T).

Keywords

Mesorhizobium, *Anthyllis vulneraria*, Heavy-metal tolerance, Multilocus sequence analysis, Housekeeping genes, *nod*A gene, N_2-fixation

Introduction

Mediterranean and metalliferous mine environments are highly vulnerable to soil erosion responsible for extensive air and water pollution. Re-vegetation or phytostabilisation strategies [18] for erosion control rely in most cases on the establishment of plants adapted to reduced water conditions, heavy metal toxicity and limited soil nutrients. Promising plants for phytostabilisation (*Anthyllis vulneraria*, *Festuca rubra* and *Koelaria pratensis*) were identified in a first study in the South of France [5]. *Anthyllis vulneraria* belongs to the Fabaceae family that is able to capture nitrogen biologically and therefore could facilitate, in N-deficient substratum, the growth of associated and succeeding non-nitrogen fixing plant species, allowing a sustainable vegetation cover to limit mine impacts. *Anthyllis* is known as Mediterranean forage and was identified elsewhere for vegetation recovery in reclamation strategies [17] and [22] such as mines, as some ecotypes are metal-tolerant. Ecological success of *Anthyllis* on heavy metal wastes relies on compatible rhizobia and a first rhizobial species named *Mesorhizobium metallidurans* efficient on *A. vulneraria* plant-host and resistant to Zn and Cd was characterized [10] and [24]. In the course of enlarging phytostabilisation strategies based on *Anthyllis*-rhizobium pair for ancient Zn–Pb mines, we obtained root-bacteria that were different from *M. metallidurans* and preliminary data related them to the genera of *Mesorhizobium* or *Aminobacter* (unpublished data).

Mesorhizobium and *Aminobacter* are two closely related genera of the Phyllobacteriaceae family among the *Alphaproteobacteria*. Nowadays, the genus *Mesorhizobium* comprises 22 recognized species (http://www.bacterio.cict.fr) whereas the genus *Aminobacter* comprises 5 species [9] and [23]: *A. aminovorans*, *A. aganoensis*, *A. niigataensis*, *A. ciceronei* and *A. lissarensis*. The genus *Aminobacter* comprises aerobic

Gram-negative, rod-shaped bacteria that can use ammonia, nitrate, urea, peptone and methylamine as nitrogen sources. No information exists about the capacity of *Aminobacter* species to fix nitrogen or to nodulate legumes. Yet, some isolates originating from *L. tenuis* were detected closer to *Aminobacter aminovorans* [4], suggesting the genus *Aminobacter* could contain legume-nodulating members.

In this study, we define the taxonomical position of new bacterial symbionts of *A. vulneraria* able to grown on heavy-metal mines, propose *Aminobacter anthyllidis* as a new species and demonstrate for the first time that the genus *Aminobacter* harbours legume-nodulating bacteria.

Materials and methods

Isolation of strains, growth conditions

Seeds of *A. vulneraria* subsp. *pyrenaica* were collected from the Eylie mine (France), where natural populations of *A. vulneraria* subsp. *pyrenaica* were growing. Seeds were germinated and plantlets were grown in tubes containing 10 g of mine soil on top of clay granules and 6 weeks later, nodules were recovered and surface-sterilized with 3 % Na hypochloride (2 min), thoroughly rinsed and crushed into sterile water [24]. The bacterial suspensions were streaked on Yeast Extract Mannitol (YEM) agar plates and incubated (28°C). Bacterial colonies were observed after 1–3 weeks and single colonies were checked for purity. In addition, two strains were obtained from root-nodules of *A. vulneraria* subsp. *carpatica* collected on the mine of Breinic (Germany), as described above. *A. vulneraria* subsp. *carpatica* was the only *A. vulneraria* subspecies detected at Breinic mine whereas the subspecies *pyrenaica* was the only one recorded at the Eylie site. Chemical characteristics of both mine soils are given in Table IV-S1. All isolates are listed in Table IV-S2 and were stored in 20 % glycerol (V/V) at −80 °C.

DNA extraction, sequencing, phylogenetic analyses

Genomic DNA was extracted according to a standard phenol–chloroform extraction method [3]. Near full-length 16S rRNA genes and partial *rec*A and *atp*D sequences were PCR-amplified as previously described [24]. A *dna*K fragment was amplified with the primers TSdnaK4r/TSdnaK2f [20] and a hybridization step of 56 °C (30 s). Sequencing was completed for housekeeping gene fragments of *A. lissarensis* CIP108660^T (=STM3600^T) and *A. aminovorans* STM2150^T (=LMG2122^T). For *nod*A, DNAs were amplified with the primers nodAF21Meso (TGGARGYTRTGCTGGGAAAA) and nodAR591Meso

(TCATAGYTCYGRACCGTTCCG) by using a hybridization of 55 °C (30 s). PCR products were run on 1 % agarose gels, the corresponding bands excised, purified with QIAGEN kit and then sequenced by GenoScreen Company (France). For *M. metallidurans* STM2683^T, *nod*A amplified products were cloned before sequencing in pGEM-T Easy vector (Promega). The obtained sequences were aligned using ClustalX 1.83 and optimized manually with GeneDoc 2.7.00. Phylogenetic trees were inferred by the neighbour-joining (NJ) method using Kimura 2 parameters distances with Mega 4 [21] or by the maximum likelihood (ML) method using PhyML (www.phylogeny.fr). Confidence of the nodes was estimated with 1000 (NJ) or 500 (ML) bootstrap replications.

DNA G+C content and DNA-DNA hybridization

The DNA G + C content was determined by HPLC [11]. DNA–DNA hybridizations were carried out by fluorometric method using photobiotin-labelled DNA probes as described before [26]. Hybridizations were performed at 45 °C in 2X SSC in presence of 50 % formamide. Five strains showing *recA* and *atpD* sequences with the highest dissimilarities were used. At least four repetitions were done and reciprocal reactions were performed for every DNA pair.

Biochemical characterization

Substrate utilizations were performed on all new isolates and type strains STM2150^T, STM3600^T and STM2683^T, using API20NE, API50CH (BioMerieux) and PM1 MicroPlate (AES Chemunex). The tests were carried out according to manufacturer's instructions and were incubated for 1 week except for API50CH galleries (2 weeks).

Intrinsic antibiotic resistance was examined by measuring growth inhibition zone diameters of cells spread on YEM agar plates with BioMerieux discs containing the following antibiotics (μg): nalidixic acid (30), neomycin (30), ciprofloxacin (5), polymyxin B (300 IU), streptomycin (300), penicillin G (10 IU), rifampicin (30), cefuroxim (30), kanamycin (30), erythromycin (15), gentamicin (10), tetracycline (30), ampicillin (10), chloramphenicol (30) and vancomycin (30). Tolerance to different concentrations of NaCl (1–5%), temperature of growth (28 °C, 37 °C and 42 °C) and pH ranges (4–12) for growth were performed on YEM medium. All bacterial growths were assessed after 1 week.

The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was used to define the lowest concentration of heavy metal that inhibits the visible growth of bacteria [2]. The MIC of Zn and Cd were determined in triplicate, by transferring a single colony to YEM broth, in a microwell plate

and using increase concentrations of $ZnSO_4$ (from 0.5 to 24 mM) and $CdCl_2$ (from 0.025 to 3 mM). Growth was measured at 600 nm 1 week after incubation (28 °C, agitation at 450 r.p.m).

Nodulation and fixation tests

Representative isolates and reference strains were tested for nitrogen fixation on *A. vulneraria* subspecies *pyrenaica* and *carpatica*. Seeds, plants and bacteria were prepared as previously described [24]. Seedlings were grown in glass tubes containing sterile clay granules as rooting substrate with a nitrogen-free nutritive solution. Tubes with plants (10 per treatment) were kept in a growth chamber at 22 °C during the day and 18 °C at night, with a 16-h photoperiod and 60–70% relative humidity. Plants were recorded for nodule formation after a 9-week period. N_2-effectiveness was estimated by weighing plant dry matter and by measuring chlorophyll content with a SPAD52 (Minolta Soil-Plant Analyses Development). Uninoculated plants and plants fertilized with $Ca(NO3)_2$ were included as controls. Analyses of variance were performed using XLSTAT 2010.

Results

Isolation of rhizobia, characteristics of growth and metal tolerance

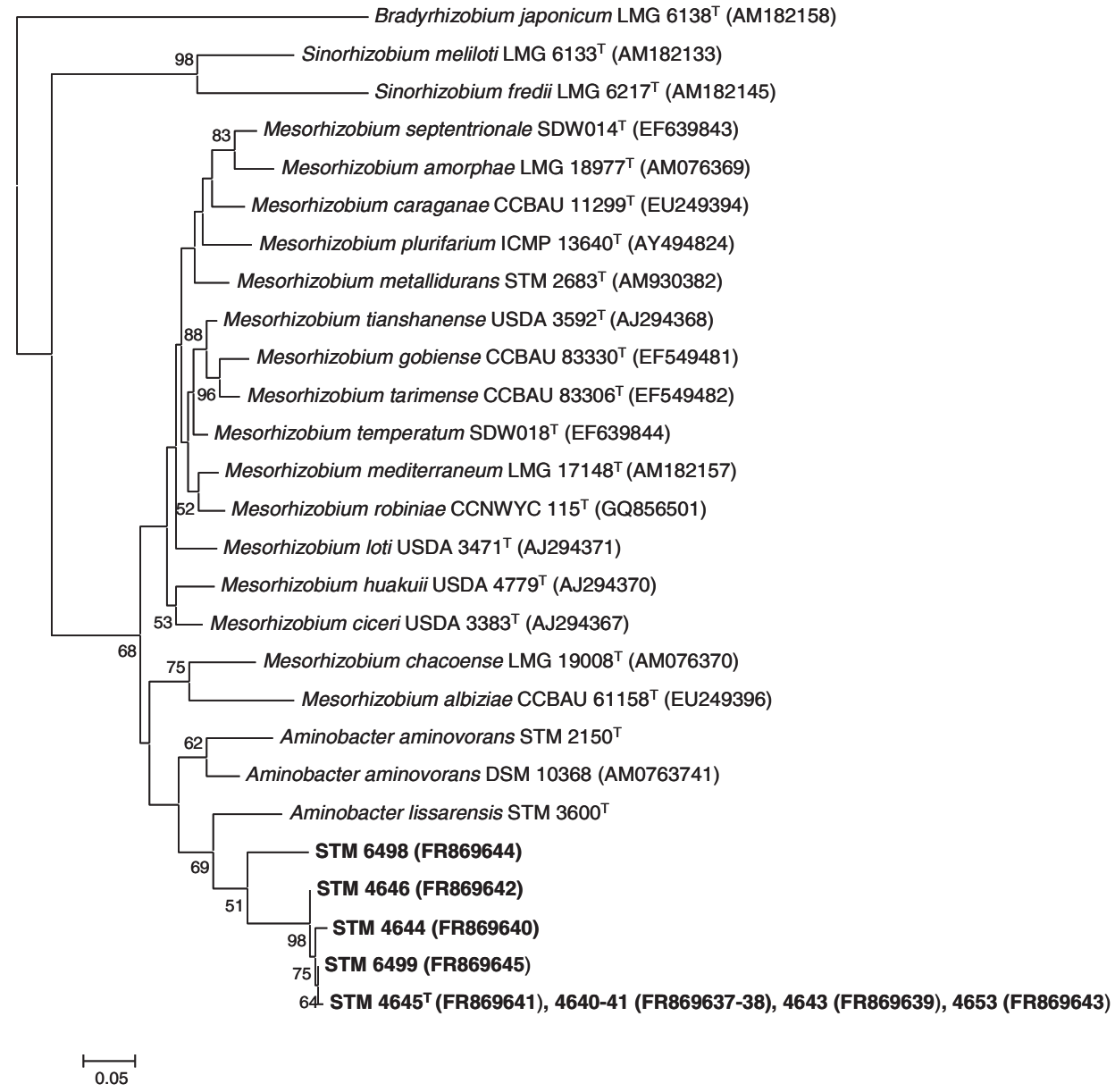
Eleven rhizobial isolates were obtained from nodules of *A. vulneraria* growing on Zn–Pb mine tailings. When grown on YEM agar medium, colonies were 1–3 mm in diameter after 2–3 days incubation (28 °C), except for two isolates that displayed a slower growth (Table IV-S2). *Anthyllis* isolates tolerated Cd (MIC = 0.3–1 mM) while they rather had a low level of Zn resistance (MIC = 1–3 mM), compared to the sensitive strain of *M. tianshanense*^{T} and the resistant strain of *M. metallidurans*^{T} isolated from a Zn–Pb mine [24]. Similar MICs were exhibited by *Aminobacter* isolates and *A. aminobacter*^{T} and *A. lissarensis*^{T} (Table IV-S2).

Phylogenies of 16S rDNA, recA, dnaK and atpD sequences

The 16S rDNA sequences of all isolates showed two distant clusters (Figure IV-S1). The first one belongs to the *Aminobacter* group and contains nine isolates showing a unique 16S rDNA sequence (STM4640-41, 4643-46, 4653 and 6499) but one (STM6498) with one base of divergence. The second one (STM4662, 4664) belongs to the *Mesorhizobium* group and displays the same 16S rDNA sequence as *M. gobiense*^{T} and *M. metallidurans*^{T}. The eight *Aminobacter* strains sharing a 100% identity 16S rDNA sequence, were closer to *A.*

lissarensis^T (8 base mismatches/1457 bases), then to *A. aminovorans*^{T} (10 mismatches), *A. agonoensis*^{T}/*A. niigataensis*^{T} (11 mismatches), and *A. ciceronei*^{T} (9 mismatches/1271 bases). 16S rDNA-based identification was refined with three supplementary housekeeping genes. The position of the two *Mesorhizobium* sp. isolates in the *Mesorhizobium* genus was consolidated by *rec*A, *atp*D and *dna*K (Figure IV-1 and IV-S2) phylogenies. Yet their close proximity to *M. metallidurans* or *M. gobiense* was not validated by *atp*D phylogeny. The 16S rDNA phylogenetic position of the nine *Aminobacter* strains from *A. vulneraria* within the genus *Aminobacter* was confirmed by *atp*D, *rec*A and *dna*K analyses (Figure IV-1A–B and IV-S2) showing closer relations with the type strains of *A. lissarensis* and *A. aminovorans*. Contrary to the 16S rDNA sequence that was identical for eight *Anthyllis* isolates (STM 4640-41, 4643-46, 4653 and 6499), sequences *of rec*A, *atp*D and *dna*K fragments displayed some variability and altogether allow distinction of four closely related branches (Figure IV-1A–B and IV-S2). These eight strains showed a divergence with *A. lissarensis*^{T} (90.8–91.2% similarity for *dna*K fragments; 97.3% for *atp*D; 88.6–89.4% for *rec*A) and with *A. aminovorans*^{T} (88.9–89.3% similarity for *dna*K; 88.4–88.89% for *atp*D; 88.3–88.9% for *rec*A).

A


Bradyrhizobium japonicum LMG 6138^T (AM182158)
98
Sinorhizobium meliloti LMG 6133^T (AM182133)
Sinorhizobium fredii LMG 6217^T (AM182145)
83
Mesorhizobium septentrionale SDW014^T (EF639843)
Mesorhizobium amorphae LMG 18977^T (AM076369)
Mesorhizobium caraganae CCBAU 11299^T (EU249394)
Mesorhizobium plurifarium ICMP 13640^T (AY494824)
Mesorhizobium metallidurans STM 2683^T (AM930382)
Mesorhizobium tianshanense USDA 3592^T (AJ294368)
88
Mesorhizobium gobiense CCBAU 83330^T (EF549481)
96
Mesorhizobium tarimense CCBAU 83306^T (EF549482)
Mesorhizobium temperatum SDW018^T (EF639844)
Mesorhizobium mediterraneum LMG 17148^T (AM182157)
52
Mesorhizobium robiniae CCNWYC 115^T (GQ856501)
Mesorhizobium loti USDA 3471^T (AJ294371)
Mesorhizobium huakuii USDA 4779^T (AJ294370)
53
Mesorhizobium ciceri USDA 3383^T (AJ294367)
68
75
Mesorhizobium chacoense LMG 19008^T (AM076370)
Mesorhizobium albiziae CCBAU 61158^T (EU249396)
62
Aminobacter aminovorans STM 2150^T
Aminobacter aminovorans DSM 10368 (AM0763741)
Aminobacter lissarensis STM 3600^T
STM 6498 (FR869644)
69
STM 4646 (FR869642)
51
STM 4644 (FR869640)
98
STM 6499 (FR869645)
75
64
STM 4645^T (FR869641), 4640-41 (FR869637-38), 4643 (FR869639), 4653 (FR869643)
0.05

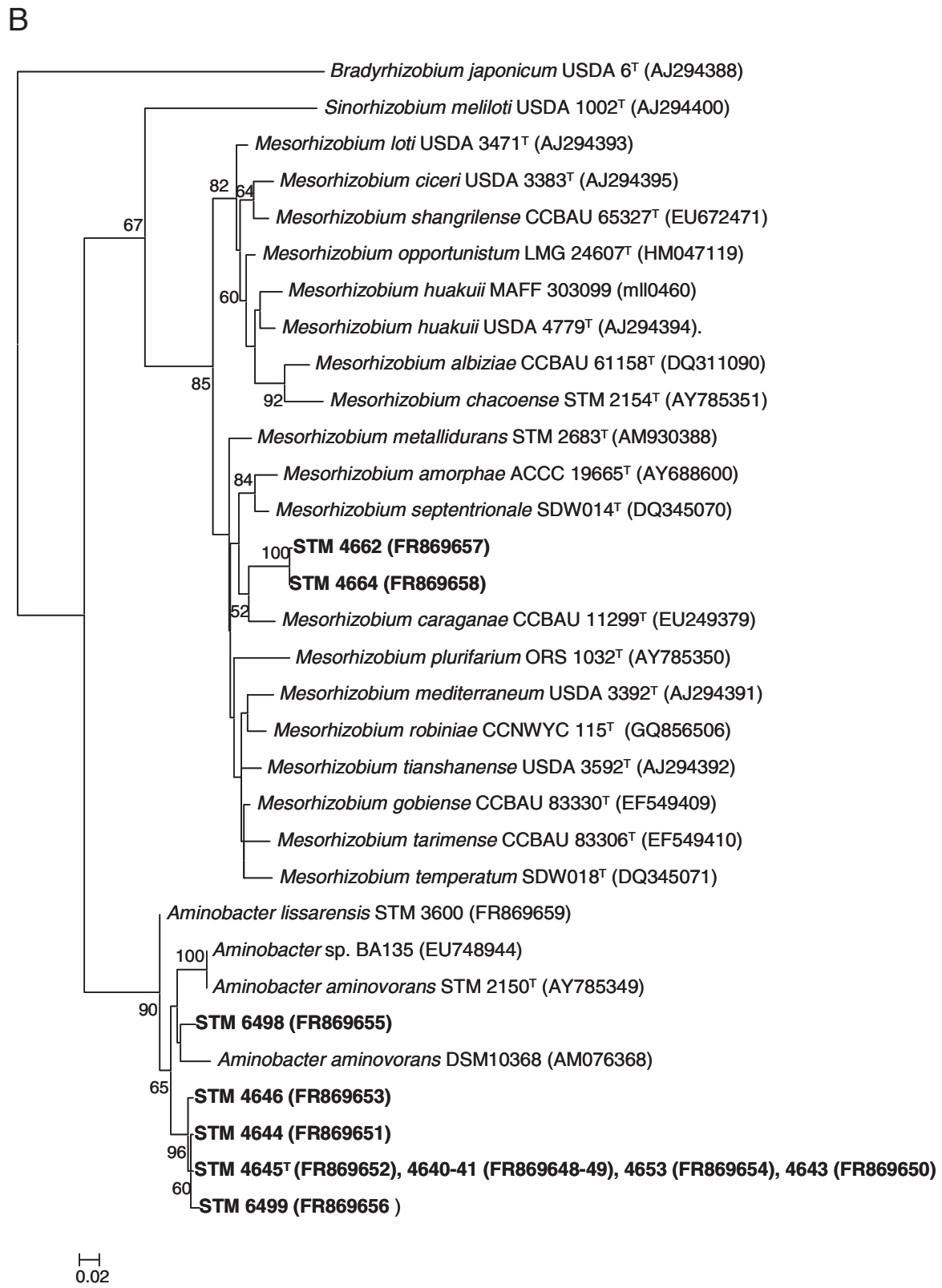


Figure IV-1: Maximum-likelihood phylogenetic trees on *rec*A (A) and *atp*D (B) gene sequences showing the relationships between *A. vulneraria* isolates obtained in this study, and reference strains. The analysis was based on 386 nt for *rec*A sequences (A) and 401 nt for *atp*D sequences (B). Genbank accession numbers are given beside the strain numbers and the significance of each branch is indicated by bootstrap value calculated for 500 subsets (above 50 %) at the major branch-points. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per 100 nucleotides. New *Anthyllis vulneraria* nodule isolates are shown in bold.

GC content and DNA-DNA relatedness

Four representative strains (STM4641, 4645-46 and 6499) were chosen among the eight *Aminobacter* isolates from *A. vulneraria* sharing a common 16S rDNA sequence, to define more precisely their taxonomic position. They were compared to the type strains of *A. lissarensis* and *A. aminovorans*, their closest relatives. Their G + C content of genomic DNA was 62.6–63.0 mol% (Table IV-1). These values were in the range reported for the recognized *Mesorhizobium* species (59–64 mol%) [8] and *Aminobacter* species (62–63.7 [9]) which supported the fact that *Anthyllis* rhizobia could belong to the genus *Aminobacter*.

Table IV-1: % GC and DNA:DNA hybridization values between four *Aminobacter* strains isolated from *A. vulneraria* and *A. aminovorans* LMG2122^T and *A. lissarensis* CIP 108661^T.

Name	**Strain**	**%GC**	**STM 4641**	**STM 4645**	**STM 4646**	**STM 6499**	**CIP 108661^T**	**LMG 2122^T**
Aminobacter anthyllidis sp. nov.	STM 4641	62.7	100	96.5	84.9	81	53.6	55
Aminobacter anthyllidis sp. nov.	STM 4645^T	62.6	96.1	100	80.9	83.7	59.5	59.1
Aminobacter anthyllidis sp. nov.	STM 4646	62.9	81.6	80.2	100	97.2	55.4	64.6
Aminobacter anthyllidis sp. nov.	STM 6499	63.0	87.7	81.2	96.7	100	57.6	59.4
Aminobacter lissarensis	CIP 108661^T	62.6	49.7	53.7	51.6	54.6	100	61.1
Aminobacter aminovorans	LMG 2122^T	63.2	50.8	53.7	60.4	60	53.4	100

DNA–DNA hybridization data showed a high relatedness of 80.2–97.2% between the four new *Aminobacter* strains isolated from root-nodule of *A. vulneraria*, and lower values of 49.7–64.6% between these latter strains and *A. aminovorans* and *A. lissarensis* (Table IV-1). Taking into account recommendation of a threshold value of 70% DNA–DNA relatedness for the definition of a species [25], these results indicate that strains (STM4640-41, 4643, 4644-46, 4653, 6499) isolated from root nodule of *A. vulneraria* should be considered as a new species. One strain (STM6498) that shows a higher genetic distance (Figure IV-1, IV-S1-2) was not included in the new species and remains designated as *Aminobacter* sp.; a larger sampling containing closely related strains and further taxonomic characterization are needed to resolve its position.

Biochemical and physiological characteristics

The nine *Aminobacter* isolates and reference strains were examined for 164 phenotypic characteristics. All eight isolates of *Aminobacter* sp. nov. presented similar phenotypic properties and could be distinguished from *A. lissarensis* by several characters (substrate assimilation and antibiotic sensitivity) as summarized in Table IV-2. All isolates and references grew at 28 °C, 37 °C but not at 42 °C and at pH range of 5–11 but not at pH 4.0 and 12.0. They also grew in YEM broth with 2% NaCl but not at 3% NaCl, except for STM4644, STM6498 and the *A. lissarensis* type strain that grew at 2 and 3% NaCl concentrations.

Table IV-2: Differential phenotypic characteristics among *Aminobacter anthyllidis* (STM4645^T, 4640-41, 4643-44, 4646, 4653, 6499), another *Aminobacter* strain isolated from *A. vulneraria* and reference strains. 1, five *Aminobacter* sp. nov. (STM4645^T, 4643, 4640-41, 4653); 2, STM6499; 3, STM4644; 4, STM4646; 5, STM6498; 6, *A. lissarensis* STM3600^T; 7, *A. aminovorans* STM2150^T and 8, *M. metallidurans* STM2683^T.

Characteristics	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
Assimilation of [a]								
l-Arabinose	+	+	+	+	−	+	+	+
Malic acid	+	−	+	−	−	−	−	−
Acidification of [a]								
Erythritol	−	−	−	+	−	+	−	−
l-Xylose	−	−	−	−	−	+	−	+
d-Adonitol, d-maltose, d-lactose	−	−	−	−	−	−	−	+
d-Galactose, d-fructose, d-mannitol	+	−	+	+	−	+	+	+
d-Mannose	+	+	+	+	+	+	−	+
l-Sorbose	−	−	−	−	+	+	−	−
l-Rhamnose	+	+	+	+	−	+	−	+
Inositol	+	+	+	+	−	+	+	+
d-Sorbitol	+	−	−	+	−	+	+	+
d-Tyranose, d-lyxose	−	−	−	−	−	+	−	−
Fucose	w	+	+	+	−	+	+	+
d-Arabitol	w	+	−	+	−	+	+	+
Utilization of								
Potassium nitrate	−	−	−	−	−	+	−	−
4 nitrophenyl beta d-galactopyranoside, dulcitol, l-lactic acid, alpha methyl d-galactonide, alpha d-lactose, lactulose	−	−	−	−	−	−	−	+
l-Aspartic acid	w	−	−	−	+	+	−	−
d-Alanine	−	−	−	−	−	+	−	+
l-Glutamic acid	w	+	+	−	+	−	−	−
d-Galactonic acid gamma lactone	−	−	−	−	−	+	−	−
Thymidine	w	−	+	−	−	−	+	+
l-Asparagine butyric	w	+	−	−	−	−	−	−
d-Glucosamine acid	w	+	+	+	+	+	−	−
Alpha keto acid	w	+	−	−	+	−	−	−
Uridine	+	+	+	−	−	−	+	−
l-Glutamine	−	+	−	−	−	−	−	+
Alpha hydroxy butyric acid	−	+	−	−	+	−	−	−
Beta methyl d-glucoside	w	+	+	+	−	+	+	+

Characteristics	1	2	3	4	5	6	7	8
Adonitol	−	−	−	−	+	−	−	+
Propionic acid	−	+	−	−	−	−	−	−
Inosine	w	+	+	−	−	+	+	−
l-Serine	w	−	+	−	−	−	−	−
l-Threonine, l-alanine, l-alanyl glycine	+	+	+	+	+	+	+	−
N acetyl beta d-mannosamine	−	−	+	+	−	+	−	−
Mono methyl succinate, methyl pyruvate	−	−	−	−	−	−	−	+
Glycyl l-proline	+	+	+	+	+	+	+	−
d hydroxy phenyl acetic acid	−	−	−	+	−	−	−	−
l-lyxose	−	−	−	−	−	−	−	+
Pyruvic acid	+	+	+	+	+	+	−	+
2 amino-ethanol	+	+	+	+	−	+	+	−
Antibiotic susceptibility [b]								
Nalidixic acid	S	S	S	S	S	S	S	R
Neomycin	R	R	R	R	R	R	R	I
Ciprofloxacin	v	v	S	S	v	R	R	v
Streptomycin	S	v	S	S	S	v	S	S
Penicillin G	v	v	R	S	S	v	S	I
Kanamycin	R	R	R	R	R	R	R	S
Vancomycin	v	v	R	S	S	v	S	I

[a] +: positive; −: negative and w: weakly positive.
[b] Results of antibiotic tests are indicated as follows: R: resistant (diameter of the inhibition zone: <13 mm for neomycin and streptomycin; <15 mm for nalidixic acid, polymycin B and kanamycin; <16 mm for gentamycin and ampicillin; <17 mm for erythromycin, tetracycline and vancomycin; <18 mm for penicillin G; <19 mm for rifampicin; <22 mm for cefuroxim and ciprofloxacin; <23 mm for chloramphenicol); S: sensitive (diameter of the inhibition zone: ≥14 mm for rifampicin; 15 mm for streptomycin and polymycin B; 17 mm for neomycin, kanamycin and vancomycin; 18 mm for gentamycin; 19 mm for tetracycline and ampicillin; 20 mm for nalidixic acid; 22 mm for cefuroxim, erythromycin; 23 mm for chloramphenicol; 25 mm for ciprofloxacin; 29 mm for penicillin G); I: intermediate; v: variable.

Analysis of nodA sequences

PCR amplification of *nod*A was successful for all *Aminobacter* isolates whereas *nod*C amplification was not possible in the conditions we used, except for the *M. metallidurans* STM2683^T. All the novel *Aminobacter* and *Mesorhizobium* isolates obtained from *Anthyllis* nodules displayed a *nod*A sequence falling into the cluster containing the *Mesorhizobium* biovar "loti" representatives and shared all together a high similarity of 92% well-supported by bootstrapping. Inside this biovar "loti" cluster, new isolates belonged to four closely related branches (98% identity) (Figure IV-2). First, the five isolates (STM4640-41, 4643, 4645, 4653) with identical housekeeping genes also carry an identical *nod*A gene, confirming their stronger genetic relatedness. The *nod*A of these five similar strains, groups also with that of STM6499 which is differentiated by *atp*D, *rec*A and *dna*K typing. Secondly, STM6498, 4646 and 4662 share an identical *nod*A fragment whereas they are distinguishable by each of the four core genome genes tested. The two last branches comprised a single strain each:

Aminobacter STM4644 which also differed in *atp*D, *rec*A and *dna*K genes and *Mesorhizobium* STM4664 showing the same housekeeping background as STM4662. Thus the different gene groupings show that the *nod*A phylogeny is not in agreement with that of the housekeeping genes tested.

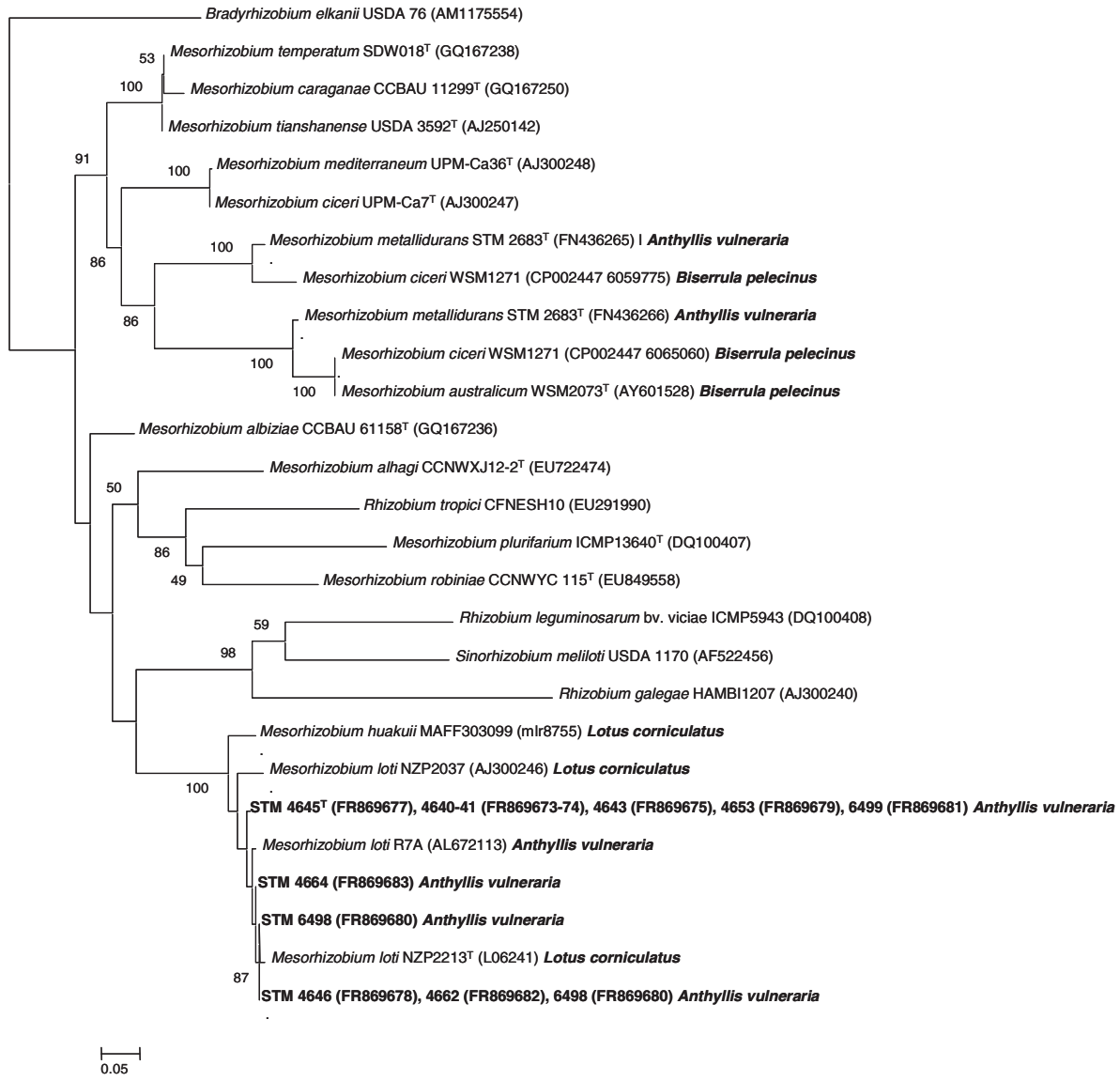


Figure IV-2: Maximum-likelihood phylogenetic tree based on *nod*A gene sequences (435 nt) showing the relationships between *A. vulneraria* isolates obtained in this study, and reference strains. Genbank accession numbers are given beside the strain numbers and the significance of each branch is indicated by bootstrap value calculated for 500 subsets (above 50 %) at the major branch-points. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per 100 nucleotides. New *Anthyllis vulneraria* nodule isolates are shown in bold.

M. metallidurans STM2683^T surprisingly exhibited two distinct and complete copies of *nod*A sharing a 78.5 % DNA identity (73.5 % protein identity). One copy was closer to the *nod*A sequences (Figure IV-2) of *M. australicum*^{T} (94 % identity) and *M. ciceri* WSM1721 (95 % identity), both isolated from *Biserrula pelecinus* [12] and [13] and the second copy was closer first to a *nod*A gene of *M. ciceri* WSM1721 (94 % identity) and then to *M. ciceri*/*M.*

mediterraneum (81 % identity). The *M. metallidurans* type strain displays two divergent sequences of *nod*A genes compared to *nod*A of new *Aminobacter* sp. nov. and *Mesorhizobium* sp. isolates although all these bacterial members are efficient symbionts of the same host *A. vulneraria*.

Infectivity and fixation properties

Representative isolates of the *Aminobacter* sp. nov. were able to nodulate and fix nitrogen on the two subspecies of *A. vulneraria* (subsp *pyrenaica* and *carpatica*) (Table IV-3). Evidence of N_2-fixation was highly significant by measuring leaf chlorophyll contents on both subspecies. The inoculation effects on dry plant weights were significant only for STM4646 which appears to produce more nodules than the other *Aminobacter* sp. nov. isolates (significant on *pyreneica* subspecies). For the three other *Aminobacter* sp. nov. strains, although the plant weights were higher than the uninoculated control, only the root biomasses were significantly different for STM4643 and 4645 inoculated on subspecies carpatica. Indeed, the variability of the dry plant biomasses was high and this could be explained by natural genetic diversity of wild *A. vulneraria* seeds we collected. *A. lissarensis* and *A. aminovorans* type strains did not nodulate either *A. vulneraria* subspecies and had no effect on plants.

Table IV-3: Nodulation and nitrogen fixation parameters (means ± standard deviation ($n = 10$ plants)) on two *A. vulneraria* subspecies inoculated with *Aminobacter anthyllidis* isolates, reference strains and two nitrogen- or uninoculated controls.

Treatment	*A. vulneraria* subspecies carpatica				*A. vulneraria* subspecies pyreneica			
	Nodule numbers (per plant)	Dry shoot biomass (mg)	Dry root biomass (mg)	Chlorophyll (SPAD units)	Nodule numbers (per plant)	Dry shoot biomass mg	Dry root biomass mg	Chlorophyll (SPAD units)
Aminobacter sp. nov. STM 4641	**43.7±19.0** [*a]	133±35 [cd]	75±22 [bc]	**53.6±4.8** [a]	**27.4±20.3** [a]	128±47 [c]	24±13 [bc]	**22.0±3.5** [a]
Aminobacter sp. nov. STM 4643	**47.9±16.2** [a]	138±43 [cd]	**79±27** [b]	**52.1±5.1** [a]	**30.3±22.8** [a]	131±72 [c]	22±17 [b]	**21.1±4.6** [a]
Aminobacter sp. nov. STM 4645	**49.3±16.3** [a]	144±41 [c]	**87±23** [b]	**52.3±8.5** [a]	**29.9±26.7** [a]	97±52 [c]	21±12 [b]	**20.5±2.9** [a]
Aminobacter sp. nov.STM 4646	**57.8±39.5** [a]	**235±98** [b]	**117±44** [a]	**56.5±8.8** [a]	**61.2±35.7** [b]	**282±137** [b]	**63±35** [a]	**30.2±7.0** [a]
A. lissarensis [T]	0	81±17 [d]	48±12 [c]	36.6±5.1 [c]	0	103±29 [c]	15±7 [c]	15.5±3.6 [c]
A. aminovorans [T]	0	91±18 [cd]	50±12 [c]	43.5±7.1 [bc]	0	88±32 [c]	12±4 [c]	15.8±1.2 [b]
Nitrogen control [b]	0	**291±37** [a]	**115±22** [a]	**53.1±3.0** [a]	0	**522±118** [a]	**93±23** [a]	**33.8±2.5** [a]
Uninoculated control	0	96±17 [cd]	59±12 [bc]	39.6±6.2 [bc]	0	110±52 [c]	15±7 [bc]	16.1±2.8 [bc]

[a] Means within rows followed by the same superscript letter are not significantly different (Newman and Keuls). Data in bold are significantly higher than the uninoculated control ($p < 0.001$).
[b] 2.5 or 5 mM of N-$Ca(NO3)_2$ were added for subsp. *carpatica* and *pyrenecia*, respectively.

Discussion

We isolated novel strains able to nodulate and fix nitrogen with *A. vulneraria*, a legume of interest for soil vegetalisation in Mediterranean areas. Their characterization based on DNA–DNA relatedness, 16S rDNA, *rec*A, *atp*D and *dna*K sequence analyses and phenotypic tests, supported their classification in a new taxon, and the name of *Aminobacter anthyllidis* is proposed. This increases the number of genera among *Alphaproteobacteria*, containing species able to nodulate legumes to 11 (*Ensifer*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Methylobacterium*, *Azorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Shinella*, *Phyllobacterium*, *Devosia*, *Aminobacter*) and extends the number of genera and species containing nonrhizobial representatives. The genus *Aminobacter* contains potentially more bacterial species that may be symbionts of legumes such as *Lotus* [4] and *Anthyllis* (strain STM6498) which can be differentiated by their 16S DNA, *atp*D, *rec*A and *dna*K sequences from members of *A. anthyllidis*. Furthermore, we found two new *Mesorhizobium* sp. isolates close to *M. metallidurans* but different based on *rec*A and *atp*D analyses, and therefore they could belong to another new species of *Mesorhizobium*. Symbionts of *Anthyllis* will probably encompass more diversity than has been described so far.

The novel strains associated with *A. vulneraria* subsp. *pyreneica* and *carpatica*, were highly divergent from the ones we previously trapped on the same plant host (subspecies carpatica) and that belonged to *M. metallidurans* species [24]. *M. metallidurans* strains showed a higher resistance to Zn and Cd, compared to *Aminobacter* strains whose metal tolerance was moderate. The Avinières mine soil where *M. metallidurans* was found, is extremely enriched with toxic heavy metals [10] compared to the Eylie mine site (about 2.5× of EDTA-extractible Zn, 6× of extractible Pb and 1.4× of extractible Cd) and these particular conditions could explain the dominance of *M. metallidurans* at the settling basin of the Avinières mine. This hypothesis calls for more studies about the distribution of *Aminobacter* and *Mesorhizobium* populations along heavy metal concentration gradients.

A. lissarensis and *A. aminovorans* type strains revealed an intrinsic Zn and Cd tolerance similar to those of *A. anthyllidis* strains although they did not originate from a known metal-polluted environment. Yet, the genus *Aminobacter* contains species with particular metabolism allowing them to colonize anthropic terrestrial ecosystems containing toxic compounds such as pesticides [9], [15] and [19], trichloroethylene [6] or arsenic [16]. Therefore members of *Aminobacter* species could have phenotypic characters allowing them to colonize mine tailing substratum.

A. anthyllidis and new *Mesorhizobium* sp. isolates from *A. vulneraria* all harbour a *nod*A gene typical of those of the biovar "loti" cluster. This is in agreement with recently found isolates originated from *A. vulneraria* nodules in Sweden, that were able to efficiently nodulate *Lotus corniculatus* and that showed *nod*A sequences intermingled with reference strains of *Mesorhizobium* nodulating *Lotus* [1]. Previously mentioned plant test data confirmed that strains originated from *Anthyllis* and *Lotus* could belong to the same cross-inoculation group [7] and [14]. By contrast, the *nod*A copies of *M. metallidurans* symbiont of *Anthyllis* are divergent from the cluster of biovar "loti" revealing more diverse symbiotic genes that could reflect a different host-spectrum among particular *Anthyllis* symbionts. The *nod*A genes of *M. metallidurans* are similar to those to two *M. ciceri* and one *M. australicum* strains all nodulating *Biserrula pelecinus* a legume that phylogenetically belongs to the Galegeae tribe, close to the Loteae tribe containing *Anthyllis* and *Lotus*. The species *M. metallidurans* and *M. ciceri* biovar biserrulae could share the same hosts. In addition, these two latter species exhibits the rare trait to possess two complete copies of *nod*A, a unique feature among rhizobial species examined so far. The different *nod*A genes of *M. metallidurans* may have evolved to optimize the interaction with different host plants by offering diverse Nod factors or diverse flavonoid induction responses.

We show that *A. vulneraria* can establish an effective symbiosis with the new bacterial species *A. anthyllidis* in addition to *M. metallidurans* described earlier. Symbionts display diversity not only at the taxonomic level but also on accessory genes such as *nod* genes and for heavy-metal tolerance. This questions the adaptation of these different bacterial members with regard to *A. vulneraria* uses for vegetalisation in different mine environments.

***Description of Aminobacter anthyllidis* sp. nov.**

Aminobacter anthyllidis (an.thyl'li.dis. L. n. anthyllis -idis, the name of a plant and also a scientific generic name (*Anthyllis*); L. gen. n. anthyllidis, of *Anthyllis*), referring to the symbiosis of bacterial strains of the species with the *Anthyllis vulneraria* legume.

Gram-negative, aerobic and non spore forming rods. Colonies appearing on YEM agar medium within 2–3 days of incubation (28 °C) are circular, opaque, convex, have creamy colour and usually a diameter of 2–3 mm. The maximum temperature for aerobic growth is 37 °C, no growth at 42 °C. The strains tolerate 2% NaCl and grow over a pH range of 5–11. Nodulate the legume *A. vulneraria* subsp. *carpatica* and subsp. *pyrenaica*. Tolerate 1–2 mM of Zn and 0.3–1 mM of Cd in YEM broth after one week. More phenotypic characteristics based on substrate assimilation and antibiotic sensitivity are summarized in Table IV-2. The

G + C content of the genomic DNA is 62.6–63.0 mol%. The type strain is STM4645^T (=LMG26462^T=CFBP7437^T) isolated from Zn–Pb mine (Eylie, France) after trapping with *A. vulneraria* subspecies *pyrenaica*.

Acknowledgements

This work was partly supported by ADEME and the ANR (CES-APTITUDE) from the French Government. G.M., received a Ph-D grant from the Ministère de la Recherche et de l'Education Nationale. We thank Liesbeth Lebbe for excellent technical assistance and Pr. J.P. Euzéby (http://www.bacterio.cict.fr) for bacterial nomenclature. We thank G. Delmot for providing seeds.

References

[1] Ampomah, O.Y., Huss-Danell, K. (2011) **Genetic diversity of root nodule bacteria nodulating Lotus corniculatus and *Anthyllis vulneraria* in Sweden**. Syst. Appl. Microbiol. 34, 267-275.

[2] Andrews, J.M. (2001) **Determination of minimum inhibitory concentrations.** J. Antimicrob. Chemother. 48, 5-16.

[3] Chen, W., Kuo, T. (1993) **A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA**. Nucleic acids research 21, 2260.

[4] Estrella, M.J., Munoz, S., Soto, M.J., Ruiz, O., Sanjuán, J. (2009) **Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado River Basin (Argentina)**. Appl. Environ. Microbiol. 75, 1088–1098.

[5] Frérot, H., Lefèbvre, C., Gruber, W., Collin, C., Dos Santos, A., Escarré, J. (2006). **Specific interactions between local metallicolous plants improve the phytostabilization of mine soils**. Plant and Soil 282, 53–65.

[6] Futamata, H., Nagano, Y., Watanabe, K., Hiraishi, A. (2005) **Unique kinetic properties of phenol-degrading variovorax strains responsible for efficient trichloroethylene degradation in a chemostat enrichment culture**. Appl. Environ. Microbiol. 71, 904-911.

[7] Jarvis, B.D.W., Pankhurst, C.E., Patel, J.J. (1982) ***Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria.** Int. J. Syst. Bacteriol. 32, 378–380.

[8] Jarvis, B.D.W., Van Berkum, P., Chen, W.X., Nour, S.M., Fernandez, M.P., Cleyet-Marel, J.C., Gillis, M. (1997) **Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium***

***ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov.** Int. J. Syst. Bacteriol. 47, 895-898.

[9] MacDonald, I.R., Kampfer, P., Topp, E., Warner, K.L., Cox, M.J., Hancock, T.L.C., Miller, L.G., Larkin, M.J., Ducrocq, V., Coulter, C., Harper, D.B., Murrell, J.C., Oremland, R.S. (2005) ***Aminobacter ciceronei* sp. nov. and *Aminobacter lissarensis* sp. nov., isolated from various terrestrial environments**. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 1827-1832.

[10] Mahieu, S., Frérot, H., Vidal, C., Galiana, A., Heulin, K., Maure, L., Brunel, B., Lefèbvre, C., Escarré, J., Cleyet-Marel J.-C. (2011) ***Anthyllis vulneraria/ Mesorhizobium metallidurans*, an efficient symbiotic nitrogen fixing association able to grow in mine tailings highly contaminated by Zn, Pb and Cd**. Plant and Soil 342, 405-417

[11] Mesbah, M., Premachandran, U. & Whitman, W. B. (1989). **Precise measurement of the G-C content of deoxyribonucleic acid by high performance liquid chromatography**. Int. J. Syst. Bacteriol. 39, 159-167.

[12] Nandasena, K.G., O'Hara, G.W., Tiwari, R.P, Willlems, A., Howieson J.G. (2007) ***Mesorhizobium ciceri* biovar *biserrulae*, a novel biovar nodulating the pasture legume *Biserrula pelecinus* L.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57, 1041–1045.

[13] Nandasena, K. G., O'Hara, G.W., Tiwari, R. P., Willems, A., Howieson, J. G. (2009). ***Mesorhizobium australicum* sp. nov. and *Mesorhizobium opportunistum* sp. nov., isolated from *Biserrula pelecinus* L. in Australia**. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59, 2140–2147.

[14] Novikova, N., Pavlova, E.A., Limeshchenko, E.V. (1993) **Phage sensitivity and host range of *Rhizobium* strains isolated from root nodules of temperate legumes**. Plant and Soil 1, 45–53.

[15] Osborn, R.K., Haydock, P.P.J., Edwards, S.G. (2010). **Isolation and identification of oxamyl-degrading bacteria from UK agricultural soils**. Soil Biol. Bioch., 42, 998-1000

[16] Quemeneur, M., Heinrich-Salmeron A., Muller, D., Lievremont, D., Jauzein, M., Bertin, P. N., Garrido F., Joulian, C. (2008) **Diversity Surveys and Evolutionary Relationships of *aoxB* Genes in Aerobic Arsenite-Oxidizing Bacteria**. Appl. Environ. Microbiol. 74, 4567–4573

[17] Requena, N, Perez-Solis E, Azcón-Aguilar C, Jeffries P, Barea JM (2001) **Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified**. Appl. Environ. Microbiol. 67, 495–498

[18] Sheoran, V., Sheoran, A. S., Poonia, P. (2010) **Soil Reclamation of Abandoned Mine Land by Revegetation: A Review**. Int. J. of Soil, Sediment and Water 3, 1940-3259.

[19] Sjoholm, O.R., Aamand, J., Sorensen, J., Nybroe O. (2010). **Degrader density determines spatial variability of 2,6-dichlorobenzamide mineralisation in soil**. Environ. Pol. 158, 292–298.

[20] Stepkowski, T., Hughes, C.E., Law, I.J., Markiewicz, L., Gurda, D., Chlebicka, A., Moulin, L. (2007) **Diversification of lupin *Bradyrhizobium* strains: evidence from nodulation gene trees.** Appl. Environ. Microbiol. 73, 3254–3264.

[21] Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007) **MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.** Mol. Biol. Evol. 24, 1596–1599.

[22] Turnau, K., Ostachowicz, B., Wojtczak, G., Anielska, T., Sobczyk, L. (2010) **Metal uptake by xerothermic plants introduced into Zn-Pb industrial wastes**. Plant and Soil 33, 299-311.

[23] Urakami, T., Araki, H., Oyanagi, H., Suzuki, K.-I., Komagata, K. (1992) **Transfer of *Pseudomonas aminovorans* (den Dooren de Jong 1926) to *Aminobacter* gen. nov. as *Aminobacter aminovorans* comb. nov. and description of *Aminobacter aganoensis* sp. nov. and *Aminobacter niigataensis* sp. nov**. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 42, 84-92.

[24] Vidal, C., Chantreuil, C., Berge, O., Maure, L., Escarre, J., Bena, G., Brunel, B., Cleyet-Marel, J.-C. (2009) ***Mesorhizobium metallidurans* sp. nov., a metal-resistant symbiont of *Anthyllis vulneraria* growing on metallicolous soil in Languedoc, France**.Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59, 850-855.

[25] Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P.A.D, Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H, Moore, W.E.C, Murray, R.G.E, Stackebrandt, E., Starr, M.P., Trüper, H.G (1987). **Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics**. Int. J. Syst. Bacteriol. 37, 463-464.

[26] Willems, A., Doignon-Bourcier, F., Goris, J., Coopman, R., de Lajudie, P., De Vos, P., Gillis, M. (2001). **DNA-DNA hybridization study of *Bradyrhizobium* strains**. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 1315-1322.

Supplementary data

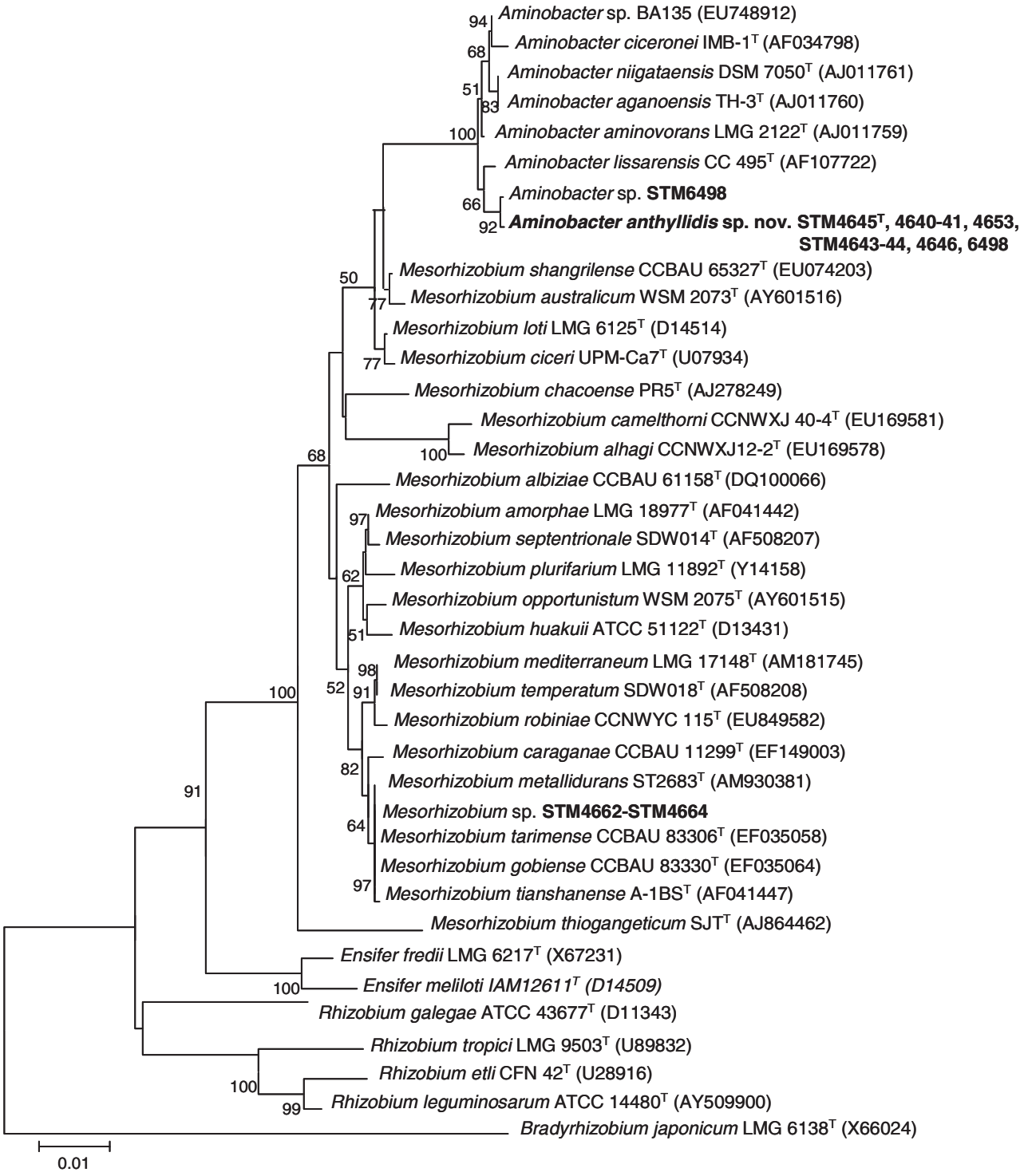


Figure IV-S1: Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences, showing the relationships between isolates from *Anthyllis vulneraria* subspecies and reference strains. The analysis was based on 1317 nt. Genbank accession numbers are given beside the strain numbers and the significance of each branch is indicated by a bootstrap value (above 50 %) calculated for 1000 subsets. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per 100 nucleotides. New *Anthyllis vulneraria* nodule isolates are shown in bold.

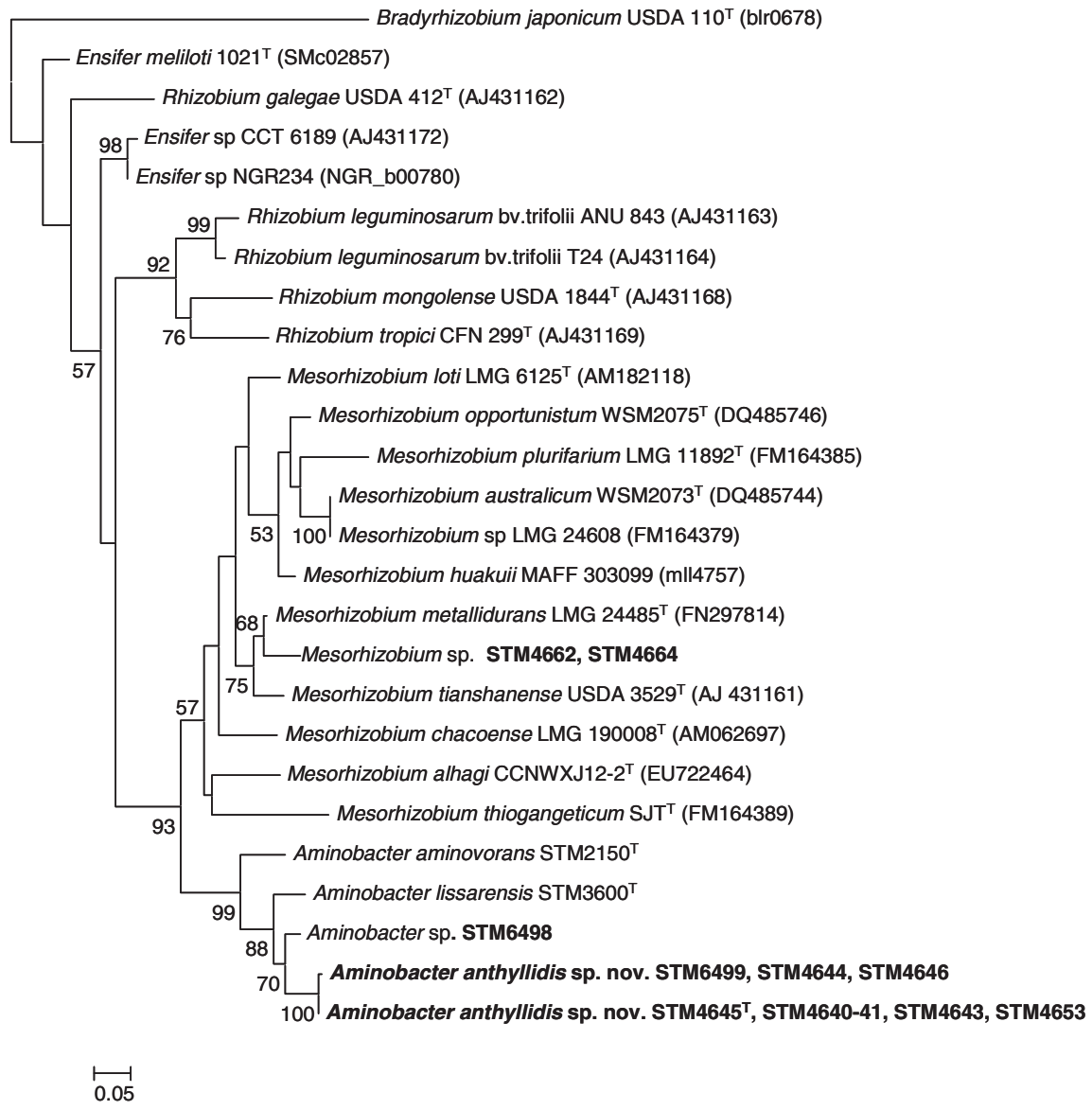


Figure IV-S2: Maximum-likelihood phylogenetic tree based on *dnaK* gene sequences (261 nt) showing the relationships between *A. vulneraria* isolates obtained in this study, and reference strains. Genbank accession numbers are given beside the strain numbers and the significance of each branch is indicated by bootstrap value calculated for 100 subsets (above 50 %) at the major branch-points. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per 500 nucleotides. New *Anthyllis vulneraria* nodule isolates are shown in bold.

Table IV-S1: Chemical characteristics of mine soils used for bacterial isolation with *A. vulneraria.*

Characteristics	Mine of Eylie (France)	Mine of Breinic (Germany)
Organic carbon ($g.kg^{-1}$)	19.9	33.2
Organic nitrogen ($g.kg^{-1}$)	1.79	3.38
pH (water)	8.03	7.6
EDTA-extractible[a] Zn ($mg.\ kg^{-1}$)	12 299	1 537
EDTA-extractible Pb ($mg.\ kg^{-1}$)	4 256	2 023
EDTA-extractible Cd ($mg.\ kg^{-1}$)	23	27

[a] as described previously [10]

Table IV-S2: Bacterial isolates used in this study, growth characteristic and heavy-metal sensitivity.

Bacterial strain number	Subspecies of the host plant *A. vulneraria*	Geographical Origin	Growth [a] on solid YEM (days)	MIC [b] (mM) of Zn; Cd
STM 4640	*pyrenaica*	Pyrénées (France)	2-3	1; 0.8
STM 4641	*pyrenaica*	Pyrénées (France)	2-3	2; 0.5
STM 4643	*pyrenaica*	Pyrénées (France)	2-3	1; 0.8
STM 4644	*pyrenaica*	Pyrénées (France)	2-3	1; 0.5
STM 4645^T	*pyrenaica*	Pyrénées (France)	2-3	2; 0.5
STM 4646	*pyrenaica*	Pyrénées (France)	2-3	1; 1
STM 4653	*pyrenaica*	Pyrénées (France)	2-3	1; 0.3
STM 4662	*pyrenaica*	Pyrénées (France)	10	3; 1
STM 4664	*pyrenaica*	Pyrénées (France)	10	3; 1
STM 6498	*carpatica*	Breinic (Germany)	2-3	1; 0.5
STM 6499	*carpatica*	Breinic (Germany)	2-3	1; 0.5

[a] colonies of 1-3 mm diameter. In the same cultural conditions, growth of references was: *M. metallidurans* type strain: 5 days and type strains *A. aminovorans* and *A. lissarensis*: 2-3 days.
[b] minimal inhibitory concentration obtained from cells grown in liquid YEM one week after incubation. CMI of the reference strains were: *A. aminobacter*^{T} (0.8 mM for Cd; 1 mM for Zn), *A. lissarensis*^{T} (0.8 mM for Cd; 1.5 mM for Zn), *M. tianshanense*^{T} (0.1 mM for Cd; 1 mM for Zn) and *M. metallidurans*^{T} (0.8 mM for Cd; 8 mM for Zn) isolated from a Zn-Pb mine [24].

IV-3- Article en préparation :

Genetic diversity and distribution of *Anthyllis vulneraria* rhizobial symbionts from Zn-Pb mine soils and from unpolluted soils

Geraldine Maynaud[1*], Roba Mohamad[2], Celine Vidal[1], Antoine Le-Quere[2,†], Lucette Maure[1], Agnieszka Klonowska[2], Jean-Claude Cleyet-Marel[1] and Brigitte Brunel[3]

[1] *INRA USC1242,* [2] *IRD,* [3] *Montpellier SupAgro, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes UMR113, IRD/INRA/CIRAD/Montpellier SupAgro/Université Montpellier II, TA A-82/J, 34398 Montpellier Cedex 5, France.*

[†] *Present address: Laboratoire Mixte International, Biotechnologie Microbienne et Végétale, Rabat, Maroc.*

* Correspondence. Geraldine Maynaud, Tel. (+33) 4 67 59 38 01; Fax (+33) 4 67 59 38 02; E-mail maynaud@supagro.inra.fr.

Running title: Diversity of Anthyllis-nodulating rhizobia

Keywords: *Mesorhizobium*, *Anthyllis vulneraria*, heavy metal tolerance, multilocus sequence analysis, *nod*A gene, P_{IB}-type ATPase.

Abstract

Anthyllis vulneraria is a legume associated with nitrogen-fixing rhizobia. Together, they offer an adapted biological material for mine soil phytostabilisation by limiting mining activity impacts. Using *A. vulneraria* plant trapping, we investigated the genetic structure of 114 rhizobial isolates from mine soils highly contaminated by Zn and Cd (Avinières 1, St Bresson 1, Breinic and Eylie), mine-border soils moderately contaminated by Zn and Cd (Avinières 2 and St Bresson 2) and non-mining soils considered as unpolluted (Col du vent and La Prunarède). Isolates from mine soils are phenotypically and phylogenetically different from isolates from non-mining soils. Mine soils contained a majority of metal-tolerant or intermediately tolerant isolates, characterized by the presence of the *cad*A1 gene which encodes an efflux transporter. They all belonged to the genera *Aminobacter* or *Mesorhizobium*. Within the *Mesorhizobium* genus, they belonged to the *M. metallidurans*

species, or were very close to it. By contrast, isolates from non-mining soils were all metal-sensitive and *cad*A1 was not detected. They probably belonged to at least four other *Mesorhizobium* species according to our 16S rRNA analysis. The mine-border soils of Avinières 2 and St Bresson 2 both contained metal-sensitive isolates that grouped with those from non-mining sites (all isolates from Avinières 2 and 58 % from St Bresson 2) and metal-tolerant isolates that belonged to *M. metallidurans* (42 % from St Bresson 2). According to *nod*A phylogeny, isolates from the Cévennes area (Avinières 1, Avinières 2, Col du Vent and La Prunarède) exhibited two complete copies of the *nod*A gene; but the two St Bresson sites harbored a single copy of it, tightly related to the biovar *loti* strains found in isolates from Eylie and Breinic mines. Such *nod*A diversity among *Anthyllis* isolates may mirror different symbiotic behaviors between *Anthyllis* and *Lotus* legumes. Although Eylie mine had a few characteristics in common with the other mine sites studied, its bacterial diversity differed from that of Avinières 1 mine, probably due to different pedoclimatic conditions.

In conclusion, high metal pollution in soils drives the composition and distribution of *Anthyllis* isolates according to their metal-tolerance phenotype and to rhizobial species, while plant hosts seem to impact symbiotic diversity independently of the metal-tolerant property. Additionally, the intrinsic properties of each site could influence the distribution of isolates.

Introduction

Heavy metals released by anthropogenic activities as in metalliferous mine environments are a major cause of environmental pollution due to their toxicity, and mining environments are highly vulnerable to soil erosion at the origin of extensive air and water pollution (Sheoran *et al.,* 2010). As heavy metals cannot be degraded or destroyed, they persist within natural environments and disturb ecosystem dynamics. As a consequence, they pose a significant threat to public health (Kampa and Castanas, 2008) and to natural environments (Nwuche and Ugoji, 2008). To limit metal pollution, it is necessary to rehabilitate heavy metal-contaminated soils as thoroughly as possible. In most cases, re-vegetation or phytostabilisation strategies for erosion control rely on the settling of plants adapted to reduced water conditions, heavy metal toxicity and limited soil nutrients (Ghosh and Singh, 2005).

A leguminous plant named *Anthyllis vulneraria*, of the *Fabaceae* family, was identified in the mining area of the Cévennes region (France). Previous studies showed that in nitrogen-deficient substrata, it can facilitate the growth of other plants associated or not to nitrogen-fixing bacteria and thus allow for a sustainable vegetation cover and limit heavy-

metal impacts (Frérot *et al.,* 2006). The ecological success of *Anthyllis* on heavy-metal wastes relies on compatible rhizobia like the recently described *Mesorhizobium metallidurans*, a rhizobium species that is efficient on *A. vulneraria* plant-host and resistant to Zn and Cd (Vidal *et al.,* 2009; Mahieu *et al.,* 2011). *Anthyllis* has so far been described as mainly nodulated by *Mesorhizobium* (Jarvis *et al.,* 1982; Ampomah and Huss-Danell, 2011) and the recently characterized *Aminobacter* (Maynaud *et al.,* 2012).

Some publications show that heavy metals influence microbial populations, affecting their growth, abundance, diversity (Giller *et al.,* 1998; Lakzian *et al.,* 2002; Stan *et al.,* 2011) and activity (Khan *et al.,* 2010). Metals exert a selective pressure on microorganisms that results in the emergence of microbial populations with higher tolerance to metals but with lower diversity when compared to unpolluted neighboring areas (Baath, 1992; Baath *et al.,* 1998; Giller *et al.,* 1998). However, some publications report that for long-term metal contaminations, the presence of metals such as Zn and Cd did not lead to a decrease in rhizobial diversity (Delorme *et al.,* 2003) or in rhizobium numbers (Chaudri *et al.,* 2008) as observed by Hirsh *et al.* (1993).

In this work, we study the diversity and the distribution of rhizobia that nodulate *A. vulneraria* in different mine soils and compare it with rhizobia from mine-border soils and non-mining soils. To analyze diversity and distribution, we carried out chromosomal, symbiotic and functional metal-resistant marker studies and phenotypical tests for metal tolerance.

Materials and methods

Soil sampling and characteristics

Six sites from the Cévennes area (France) and two distinct geographical sites (Pyrénées Ariégeoises (France) and Breinic (Germany) were sampled. Four mine-soil samples were collected from two mines of the St-Laurent-le-Minier district in the Cévennes area (one at Avinières 1 and one at St Bresson 1), one mine in the Pyrénées ariégeoises (Eylie) and one mine in Germany (Breinic). Two soil samples from mine borders were collected in the Cévennes area (one at Avinières 2 and one at St Bresson 2). Finally, two soil samples from non-mining soils were collected in the Cévennes area, 25 kilometers SW from St-Laurent-le-Minier (one at the Col du Vent and one at La Prunarède).

Soil analyses

For each of the eight sites, five to 10 soil sub-samples were sampled across the site at a depth of 50-100 mm, homogenized and sifted through 2-mm mesh sieves for further chemical soil analyses ($pH_{(H2O)}$, organic carbon and organic nitrogen, Cation Exchange Capacity (CEC)). Heavy metal concentrations were determined from 20 g of air-dried soil that were shaken for 30 min with 100 ml of extracting solution (0.5 M ammonium acetate, 0.5 M acetic acid, 0.02 M EDTA, pH 4.65). The extracts were filtered on folded Schleicher & Schull 595 1/2 filters (125-mm diameter) and analyzed by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES, Varian Vista MPX).

Rhizobium isolation

Seeds of a natural population of *A. vulneraria* were collected in the Avinières mine. Germinated seeds were grown in tubes containing about 10 g of soil samples on top of clay granules. Six weeks later, nodules were recovered and surface-sterilized with 300 µl of 3 % Na hydrochloride for 2 min, rinsed 5 times with distilled water and crushed in 50 µl of sterile distilled water (Vidal *et al.,* 2009). The bacterial suspensions were streaked on Yeast Extract Mannitol (YEM) agar plates and incubated at 28°C. Bacterial colonies appeared after 2-4 weeks incubation and single colonies were checked for purity by repeated streaking on Yeast Extract Mannitol (YEM) agar. Isolates were stored at -80°C in 50 % glycerol (V/V). We also included previously isolated rhizobia from the mine soils of Avinières, Eylie and Breinic (Vidal *et al.,* 2009; Maynaud *et al.,* 2012). New isolates and previously isolated *Anthyllis* rhizobia are listed in Table IV-4.

Table IV-4: Description of the isolates and reference strains used in this study.

Sites	Isolate names	MIC Zn (mM)	MIC Cd (mM)	*cad*A1 PCR amplification	Phylogenetic group					Reference
					16S rRNA	*rec*A	*atp*D	CadA1	*nod*A	
Avinières 1 (n*=12)	STM 2683^{T}, 3292	20	0.5	+	16S2	R1	A1	C1	N1	Vidal *et al.*, 2009
	STM 3301	10	0.8	+	16S2	R1	A1	C1	N1	Vidal *et al.*, 2009
	STM 3304	16	0.8	+	16S2	R1	A1	C1	N1	Vidal *et al.*, 2009
	STM 3305	12	1	+	16S2	R1	A1	C1	N1	Vidal *et al.*, 2009
	STM 3310, 3316	10	3	+	16S2	R1	A1	C1	N1	Vidal *et al.*, 2009
	STM 3311	8	0.8	+	16S2	R1	A1	C1	N1	Vidal *et al.*, 2009
	STM 3313	10	0.1	+	16S2	R1	A1	C1	N1	Vidal *et al.*, 2009
	STM 3314	18	7	+	16S2	R1	A1	C1	N1	Vidal *et al.*, 2009
	STM 3315	10	0.3	+	16S2	R1	A1	C1	N1	Vidal *et al.*, 2009
	STM 3317	16	5	+	16S2	R1	A1	C1	N1	Vidal *et al.*, 2009
St Bresson 1 (n=14)	STM 3443	18	0.8	+	16S2	R1	A1	C1	N2	This study
	STM 3445	16	5	+	16S2	R1	A1	C1	N2	This study
	STM 3447, 3448	16	1	+	16S2	R1	A1	C1	N2	This study
	STM 3453	16	0.3	+	16S2	R1	A1	C1	N2	This study
	STM 3454, 3456, 3459	12	0.5	+	16S2	R1	A1	C1	N2	This study
	STM 3457, 3458, 3460	12	0.8	+	16S2	R1	A1	C1	N2	This study
	STM 3463	16	0.8	+	16S2	R1	A1	C1	N2	This study
	STM 6539	18	0.3	+	16S2	R1	A1	C1	N2	This study
	STM 6540	10	2	+	16S2	R1	A1	C1	N2	This study
Breinic (n=17)	STM 6520	6	0.8	+	16S2	R1	A1	C1	N2	This study
	STM 6521	18	1.5	+	16S2	R1	A1	C1	N2	This study
	STM 6522, 6526	12	1.5	+	16S2	R1	A1	C1	N2	This study
	STM 6523, 6525, 6528, 6535	8	1.5	+	16S2	R1	A1	C1	N2	This study
	STM 6524	6	1.5	+	16S2	R1	A1	C1	N2	This study
	STM 6527	8	1	+	16S2	R1	A1	C1	N2	This study
	STM 6529	8	3	+	16S2	R1	A1	C1	N2	This study
	STM 6530	12	5	+	16S2	R1	A1	C1	N2	This study

	STM 6531	10	1.5	+	16S2	R1	A1	C1	N2	This study
	STM 6534	12	3	+	16S2	R1	A1	C1	N2	This study
	STM 6536	16	5	+	16S2	R1	A1	C1	N2	This study
	STM 6498	1	0.3	+	16S8	R4	A3	C2	N2	This study
	STM 66499	1	0.3	+	16S9	R4	A3	C2	N2	Maynaud *et al.*, 2012
Eylie (n=16)	STM 4636, 6437	20	10	+	16S2	R1	A2	C1	N2	This study
	STM 4640, 4644, 4653	1	0.3	+	16S9	R4	A3	C2	N2	Maynaud *et al.*, 2012
	STM 4641, 4645^{T}	2	0.3	+	16S9	R4	A3	C2	N2	Maynaud *et al.*, 2012
	STM 4642	12	10	+	16S1	R3	A3	C2	N2	This study
	STM 4643	1	0.5	+	16S9	R4	A3	C2	N2	Maynaud *et al.*, 2012
	STM 4646	1	0.1	+	16S9	R4	A3	C2	N2	Maynaud *et al.*, 2012
	STM 4647	0.5	0.8	+	16S1	R3	A2	C1	N2	This study
	STM 4655	18	10	+	16S2	R1	A2	C1	N2	This study
	STM 4658, 4661	16	10	+	16S2	R1	A2	C1	N2	This study
	STM 4662, 4664	10	3	+	16S2	R1	A2	C1	N2	Maynaud *et al.*, 2012
Avinières 2 (n=16)	STM 4610, 4613, 4614, 4633	0.1	0.3	-	16S6	R2	A2	C3	N1	This study
	STM 4611	0.5	0.3	-	16S6	R2	A2	C3	N1	This study
	STM 4612, 4623, 5968, 5971	0.05	0.05	-	16S6	R2	A2	C3	N1	This study
	STM 4615, 5973	0.05	0.1	-	16S6	R2	A2	C3	N1	This study
	STM 4616	0.1	0.8	-	16S6	R2	A2	C3	N1	This study
	STM 4619	0.3	0.5	-	16S6	R2	A2	C3	N1	This study
	STM 4622	0.1	0.1	-	16S4	R2	A2	C3	N1	This study
	STM 4627	0.05	0.02	-	16S6	R2	A2	C3	N1	This study
	STM 4629	0.05	0.8	-	16S4	R2	A2	C3	N1	This study
St Bresson 2 (n=12)	STM 3880	16	0.5	+	16S2	R1	A1	C1	N2	This study
	STM 3881	16	1	+	16S2	R1	A1	C1	N2	This study
	STM 3887	16	0.8	+	16S2	R1	A1	C1	N2	This study
	STM 3888	10	0.5	+	16S2	R1	A1	C1	N2	This study
	STM 3976	16	1.5	+	16S2	R1	A1	C1	N2	This study
	STM 3973	0.5	0.1	-	16S2	R2	A2	C3	N2	This study
	STM 3971	0.5	0.1	-	16S2	R3	A2	C3	N2	This study
	STM 3972	1	0.3	-	16S2	R2	A2	C3	N2	This study
	STM 3891, 3988, 3974	1	0.3	-	16S3	R2	A2	C3	N2	This study

	STM 3991	0.5	0.3	-	16S3	R2	A2	C3	N2	This study
Col du Vent (n=10)	STM 4912, 5068	0.05	0.02	-	16S6	R2	A2	C3	N1	This study
	STM 4916, 4924, 4926, 4929, 5071	0.05	0.05	-	16S6	R2	A2	C3	N1	This study
	STM 4919	0.1	0.02	-	16S6	R2	A2	C3	N1	This study
	STM 4921	0.02	0.05	-	16S6	R2	A2	C3	N1	This study
	STM 5067	0.1	0.05	-	16S6	R2	A2	C3	N1	This study
La Prunarède (n=17)	STM 2682, 4668, 4879, 4894	0.05	0.05	-	16S6	R2	A2	C3	N1	This study
	STM 4673	0.8	0.3	-	16S5	R2	A2	C3	N1	This study
	STM 4863, 4893	0.1	0.05	-	16S6	R2	A2	C3	N1	This study
	STM 4875	0.1	0.05	-	16S5	R2	A2	C3	N1	This study
	STM 4876	0.1	0.3	-	16S7	R2	A2	C3	N1	This study
	STM 4864, 4872	0.02	0.02	-	16S6	R2	A2	C3	N1	This study
	STM 4871, 4878	0.3	0.05	-	16S6	R2	A2	C3	N1	This study
	STM 4874, 4890	0.1	0.02	-	16S6	R2	A2	C3	N1	This study
	STM 4880	0.05	0.02	-	16S6	R2	A2	C3	N1	This study
	STM 4889	0.05	0.3	-	16S6	R2	A2	C3	N1	This study

* n, total number of isolates for each soil sample.
16S1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 9: groups of 16S rRNA phylogeny, each corresponding to a different sequence, 16S1-3 corresponds to cluster I and 16S4-7 to cluster II; 16S8-9 corresponds to the *Aminobacter* cluster.
R1, isolates belonging to cluster A of *rec*A phylogeny; R2, belonging to cluster B; R3, *Aminobacter* cluster.
A1, isolates belonging to cluster A of *atp*D phylogeny; A2 belonging to cluster B; A3, *Aminobacter* cluster.
C1, mesorhizobial isolates containing CadA1; C2, *Aminobacter* isolates containing CadA1; C3, isolates that do not contain CadA1.
N1, isolates containing two copies of the *nod*A gene; N2, isolates containing one copy of the *nod*A gene.

DNA extraction and sequencing

Genomic DNA was extracted according to a standard phenol-chloroform extraction method (Chen and Kuo, 1993) and stored at -20°C. Near full-length 16S rRNA genes were amplified by PCR as previously reported (Vidal *et al.,* 2009). Approximately 500 bp of *rec*A (encoding part of the DNA recombination and repair system), *atp*D (encoding the beta chain of a part of ATP synthase) were amplified by using primer pairs *rec*A 63f/504r and *atp*D 294f/771r (Gaunt *et al.,* 2001) with a hybridization step of 30 seconds at 57°C. For *nod*A, 500-bp fragments were amplified with *nod*A F21Meso/R591Meso primers (Laguerre *et al.,* 2001) using a hybridization step of 30 seconds at 55°C. Some isolates were characterized by the presence of two copies of the *nod*A gene. In that case, specific primers were used, designed on the basis of the STM 2683 genome (Maynaud *et al.,* in preparation) to amplify 700 bp. To amplify the *nod*A1 gene, which corresponds to the copy of *nod*A inside the *nod*ABC operon, primers STM 3315 forward (5' TCTGCTCGACGCGACAAGC 3') and STM 3316 reverse (5' TCTTCGGTGCCGTCAGCG 3') were used. To amplify *nod*A2, which corresponds to the copy of *nod*A outside the *nod*ABC operon, primers STM 3313 forward (5' TGCCTCTATGCCGCGATGAGC 3') and STM 3314 reverse (5' ATGAGTCCGGCTGGTCTGCG 3') were used with a hybridization step of 45 seconds at 57°C. A 700-bp fragment of the *cad*A1 metal-resistance gene encoding a P_{IB}-type ATPase efflux transporter (Maynaud *et al.,* in preparation) was amplified using primers designed from the STM 2683^T genome, between the Metal-Binding Site from the TM6 (CPC) motif and the ATP-binding domain from the H8 (GDGXNDXP) motif: STM 2612 forward (5' GACCGAGCGGTTCATCG 3') and STM 2613 reverse (5' CGGTCAGCATCACAGCAG 3') primers were used with a hybridization step of 45 seconds at 57°C. All PCR amplifications were performed using *Taq* polymerase (Invitrogen). PCR products were run on 1 % agarose gels stained with ethidium bromide in TAE 1X. The corresponding bands were gel-extracted, purified with the QIAGEN kit and then sequenced by GenoScreen Company (Lille, France) using the BigDye Terminator v3.1. kit.

Estimation of bacterial tolerance to metals

Minimal Inhibitory Concentrations (MICs) were determined in liquid medium. MIC was defined as the lowest metal concentration that inhibited visible growth. Rhizobial strains were pre-cultured for 4 days, and each culture was adjusted at OD_{600nm}= 0.5 before inoculation. One hundred and fifty microlitres of medium containing increasing metal concentrations (0.02, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 18, 20, 24 and 32 mM $ZnSO_4$ and 0.02, 0.05,

0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1, 1.5, 2, 3, 5, 7, 10 and 12 mM $CdCl_2$) or no metal (positive control) were inoculated with 10 µl of pre-culture and incubated at 28°C with orbital shaking (150 rpm). Growth was monitored for 2 weeks by reading the OD_{600nm} using a spectrofluorometer (TECAN Infinite M200). MIC assays were performed in triplicate for each isolate.

Phylogenetic analyses

Phylogenetic analysis of 16S rRNA, *rec*A, *atp*D and *nod*A were performed using nucleotide sequences, and phylogenetic analysis of *cad*A1 using protein sequences. Sequence alignments were performed with ClustalX v1.83 and optimized manually with GeneDoc v2.7.00. Phylogenetic trees were inferred by the Neighbor-Joining method using Kimura two-parameter distances, or by the Maximum Likelihood method using General Time Reversible (GTR) or Whelan And Goldman (WAG) models, using Mega 5 v5.1.1.0426 software. Confidence of the tree branches was estimated with 1,000 bootstrap repetitions. Trees were rooted using *Bradyrhizobium japonicum* for 16S rRNA, *rec*A and *atp*D phylogenies, *B. elkanii* for *nod*A phylogeny and *Cupriavidus metallidurans* for CadA1 phylogeny as outgroups.

Results

Soil analyses

The metal contents of the eight soil samples and their physico-chemical characteristics are presented in Table IV-5. First, the mine soils from Avinières 1, St Bresson 1, Breinic and Eylie sites contained the highest metal concentrations (1,537-40,237 mg kg^{-1} Zn, 23-82 mg kg^{-1} Cd and 2,023-15,551 mg kg^{-1} Pb). The Avinières 1 soil samples contained the highest Zn concentration. Second, the two soil samples collected from the borders of Avinières and St Bresson mines (Avinières 2 and St Bresson 2) displayed moderate Zn and Cd contents (111-207 mg kg^{-1} Zn and 6.1-9 mg kg^{-1} Cd). However, a difference was observed concerning Pb levels. St Bresson 2 soil contained high levels of Pb (3,675 mg kg^{-1}) roughly the same as in mine soil samples. Finally, the two non-mining sites of Col du Vent and La Prunarède showed low metal levels corresponding to unpolluted soils (14-15 mg kg^{-1} Zn, 1.3 mg kg^{-1} Cd and 46-55 mg kg^{-1} Pb), as expected. All soils were neutral to alkaline. The organic carbon and the total nitrogen contents were higher in the two mine border soils of Avinières 2 and St Bresson 2 than in the corresponding mine soils (Avinières 1 and St Bresson 1) (2.7- to 3-fold higher for organic carbon contents and 5- to 5.6-fold higher for total nitrogen contents). Eylie and

Breinic mine soils contained more organic carbon than the other mine soils (Avinières 1 and St Bresson 1) (1.6- to 3.6-fold higher). CEC values increased with organic matter contents.

Table IV-5: Physico-chemical characteristics of the soils we studied. Soil metals were extracted using the EDTA method

Soil samples	**Plant nodulation %**	**Geographical origin**	**Zn mg kg^{-1}**	**Pb mg kg^{-1}**	**Cd mg kg^{-1}**	**pH water**	**Organic C g kg^{-1}**	**Total N g kg^{-1}**	**CEC cmol kg^{-1}**
Avinières 1	52	Cévennes (France), Zn-Pb mine	40 237	15 551	44	7.0	8.8	0.5	3.0
St Bresson 1	17	Cévennes (France), Zn-Pb mine	4 701	3 734	82	7.6	12.0	1.4	6.2
Breinic	100	Germany, Zn-Pb mine	1 537	2 023	27	7.6	32.2	3.4	11.0
Eylie	100	Pyrénées (France), Zn-Pb mine	14 299	4 256	23	8.03	19.9	1.8	6.0
Avinières 2	80	Cévennes (France), mine border	111	170	6.1	7.9	25.8	2.5	8.4
St Bresson 2	82	Cévennes (France), mine border	207	3 675	9	7.7	32.8	4.0	15.4
Col du Vent	100	Cévennes (France), Non-mining area	15	46	1.3	7.9	15.6	1.7	6.8
La Prunarède	100	Cévennes (France), Non-mining area	14	55	1.3	7.4	36	6.4	8.8

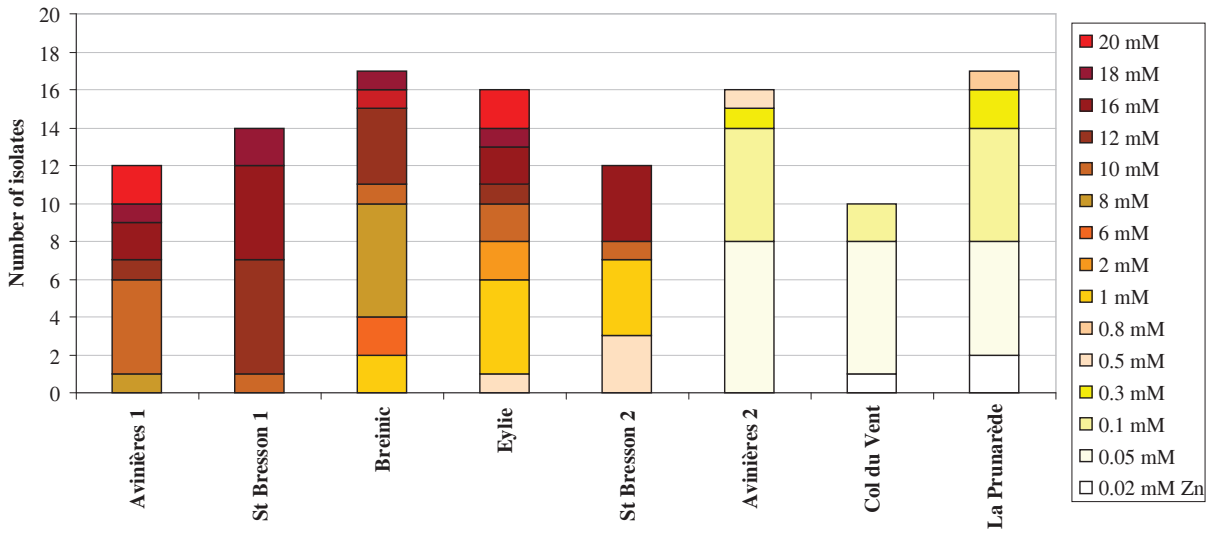
Rhizobium isolation and metal-tolerance characterization

The numbers of nodulated *Anthyllis* plants used for rhizobium trapping varied depending on soils. One hundred percent of the plants were nodulated in Breinic, Eylie, Col du Vent and La Prunarède soils, while 90 % were nodulated in Avinières 2 soils, 52 % in Avinières 1, 82 % in St Bresson 2 and 17 % in St Bresson 1 soils (Table IV-5). A total of 91 isolates was obtained: 36 from mine soils (14 from St Bresson 1, 15 from Breinic and 7 from Eylie), 28 from mine-border soils (12 from St Bresson 2 and 16 from Avinières 2) and 27 from non-mining soils (10 from Col du Vent and 17 from La Prunarède).

For phenotypic analyses, 114 isolates were used (91 newly isolated isolates and 23 previously described isolates (Vidal *et al.,* 2009, Maynaud *et al.,* 2012)) (Table IV-4). All *Anthyllis* isolates were screened on growth media containing increasing metal concentrations in order to determine Zn- and Cd-MIC values (Table IV-4 and Figure IV-3). Rhizobium isolates from mine soils (Avinières 1, St Bresson 1, Breinic and Eylie) had a higher Zn MIC (MIC = 6-20 mM) than isolates from the non-mining soils of La Prunarède and Col du Vent (MIC = 0.02-0.8 mM) (Figure IV-3A). Rhizobium isolates from mine soils had more extended Cd MIC values (MIC = 0.1-10 mM) than Zn MIC values, and Eylie site contained the isolates with highest Cd tolerance (MIC = 10 mM) (Figure IV-3B). Conversely, isolates from non-mining soils exhibited the lowest Cd MIC values (MIC = 0.02-0.3 mM) (Figure IV-3B). One isolate from Eylie soil (STM 4647) had a Zn MIC value similar to those of isolates from non-mining soils (MIC = 0.5 mM), and it had a Cd MIC value of 0.8 mM, which was higher than those of all the rhizobia from the non-mining soils (Figure IV-3). Nine isolates corresponding to *Aminobacter* strains from Breinic and Eylie mines exhibited an intermediate Zn MIC value (MIC = 1-2 mM) half-way between the values of the isolates from mining and from non-mining soils, and a Cd MIC value similar to those of isolates from non-mining soils (MIC = 0.1-0.5 mM) (Figure IV-3). Metal phenotypes indicated that rhizobium isolates from mine soils tolerated metals more than isolates from non-mining soils, which are considered as metal-sensitive. *Aminobacter* isolates can be described as intermediately metal-tolerant, in-between isolates from mines and from non-mining soils. Concerning isolates from mine-border soils, 13/16 isolates from Avinières 2 had Zn and Cd MIC values similar to those of isolates from non-mining soils (MIC = 0.05-0.5 mM Zn, MIC = 0.05-0.8 mM Cd) and 3/16 isolates (STM 4629, 4616 and 4619) exhibited higher Cd MIC values than those of isolates from non-mining soils (Figure IV-3). Metal phenotypes also indicated that isolates from St Bresson 2 contained two bacterial populations: (i) a first population of five isolates (STM 3880-81, 3887-88 and 3976) with a Zn MIC value similar to those of isolates from mine soils

(MIC = 10-16 mM) and a higher Cd MIC value than those of isolates from non-mining soils, and (ii) a second population of seven isolates (STM 3971-74, 3891, 3988 and 3991) with Zn and Cd MIC values similar to those of isolates from non-mining soils (MIC = 0.5-1 mM Zn, MIC = 0.1-0.3 mM Cd), (Figure IV-3).

A



B

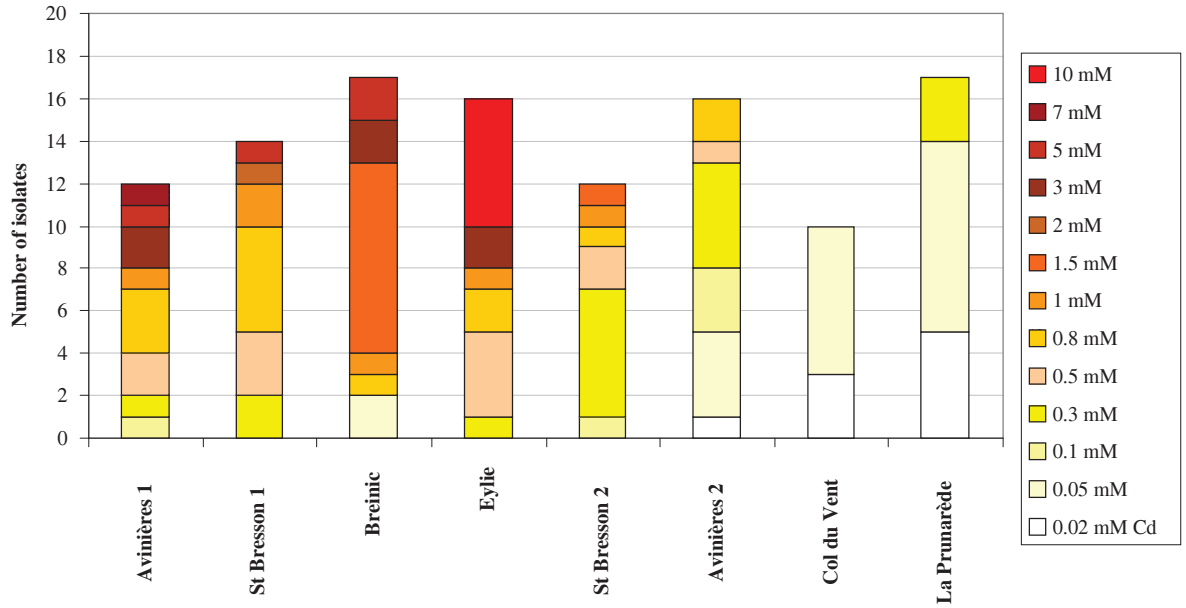


Figure IV-3: Zn (A) and Cd (B) MIC assays of the 114 *Anthyllis* rhizobia studied, depending on the original sites. The OD_{600nm} was assessed after two weeks growth in YEM medium. The results are the means of three replicates. Bars indicate the standard deviations from the means (±SD).

Phylogenies of 16S rRNA,* rec*A and* atp*D gene sequences

The 16S rRNA gene sequences obtained from the 91 new rhizobial symbionts of *A. vulneraria* were all assigned to the *Mesorhizobium* genus, together with 12 *M. metallidurans* strains previously isolated from Avinières 1 and the two *Mesorhizobium* sp. strains obtained from Eylie (STM 4662 and 4664) (Figure IV-4 and Table IV-6). They fell into two distant clusters, named Clusters I and II in Figure IV-4 separated by at least 8/1,219 nucleotides. Cluster I contained three phylogenetic groups: 16S1, 16S2 and 16S3 (Table IV-6). All isolates from the mine soils of Avinières 1, Breinic and St Bresson 1, seven isolates from Eylie mine (STM 4661-62, 4664, 4636-37, 4655 and 4658) and eight isolates from the mine border of St Bresson 2 (metal-tolerant STM 3880-81, 3887-88 and 3976 and metal-sensitive STM 3971-73) displayed sequences with 100 % identity to the partial 16S rRNA gene sequence of *M. metallidurans*, *M. tarimense* and *M. gobiense* type strains (16S2 group). Two isolates from Eylie mine (STM 4642 and 4647, belonging to the 16S1 group) presented sequences with only one nucleotide differing from sequences belonging to the 16S2 group in Table IV-6. Four metal-sensitive isolates from St Bresson 2 (STM 3891, 3988, 3974 and 3991, belonging to the 16S3 group) in turn displayed one nucleotide differing from sequences of 16S2 group. Cluster II of 16S rRNA phylogeny in Figure IV-4 contained four phylogenetic groups; 16S4, 16S5, 16S6 and 16S7 (Table IV-6). All the sequences of the Col du Vent isolates (non-mining soil), 14 sequences of the La Prunarède isolates (non-mining soil) and 14 sequences of Avinières 2 isolates (mine border) harbored a similar partial 16S rRNA gene sequence related to *M. robiniae* type-strain (99.3 % identity, *i.e.* 8 differing nucleotides) (16S6 group). Three isolates from La Prunarède (STM 4673 and 4875 from the 16S5 group and STM 4876 from the 16S7 group) contained a sequence with one nucleotide differing from the sequences of 16S6 group. Two isolates from Avinières 2 (STM 4622 and 4629 from the 16S4 group) were characterized by 100 % identity with the partial 16S rRNA sequence of *M. temperatum* and *M. mediterraneum* type-strains and exhibited two nucleotides differing from the other sequences of Avinières 2 isolates (16S6 group).

Table IV-6: Number of isolates from *Anthyllis* nodules (n=114) belonging to each phylogenetic group defined by 16S rRNA, *rec*A, *atp*D, CadA1 and *nod*A typing.

Soil samples	**n***	**Numbers of isolates belonging to each phylogenetic group**																				
		16S rRNA									***rec*A**				***atp*D**			**CadA1**			***nod*A**	
		16S1	16S2	16S3	16S4	16S5	16S6	16S7	16S8	16S9	R1	R2	R3	R4	A1	A2	A3	C1	C2	C3	N1	N2
Avinières 1	**12**	0	12	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0	12	0	0	12	0	0	12	0
St Bresson 1	**14**	0	14	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	0	14	0	0	14	0	0	0	14
Breinic	**17**	0	15	0	0	0	0	0	1	1	15	0	0	2	15	0	2	15	2	0	0	17
Eylie	**16**	2	7	0	0	0	0	0	0	7	7	0	2	7	0	9	7	9	7	0	0	16
Avinières 2	**16**	0	0	0	2	0	14	0	0	0	0	16	0	0	0	16	0	0	0	16	16	0
St Bresson 2	**12**	0	8	4	0	0	0	0	0	0	5	6	1	0	5	7	0	5	0	7	0	12
Col du vent	**10**	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10	10	0
La Prunarède	**17**	0	0	0	0	2	14	1	0	0	0	17	0	0	0	17	0	0	0	17	17	0
Total	**114**	**2**	**56**	**4**	**2**	**2**	**38**	**1**	**1**	**8**	**53**	**49**	**3**	**9**	**46**	**59**	**9**	**55**	**9**	**50**	**55**	**59**

* n, total number of isolates for each soil sample.
16S1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 9 : groups of 16S rRNA phylogeny, each corresponding to a different sequence, 16S1-3 corresponds to cluster I and 16S4-7 to cluster II; 16S8-9 corresponds to the *Aminobacter* cluster.
R1, isolates belonging to cluster A of *rec*A phylogeny; R2, belonging to cluster B; R3, *Aminobacter* cluster.
A1, isolates belonging to cluster A of *atp*D phylogeny; A2 belonging to cluster B; A3, *Aminobacter* cluster.
C1, mesorhizobial isolates containing CadA1; C2, *Aminobacter* isolates containing CadA1; C3, isolates that do not contain CadA1.
N1, isolates containing two copies of the *nod*A gene; N2, isolates containing one copy of the *nod*A gene.

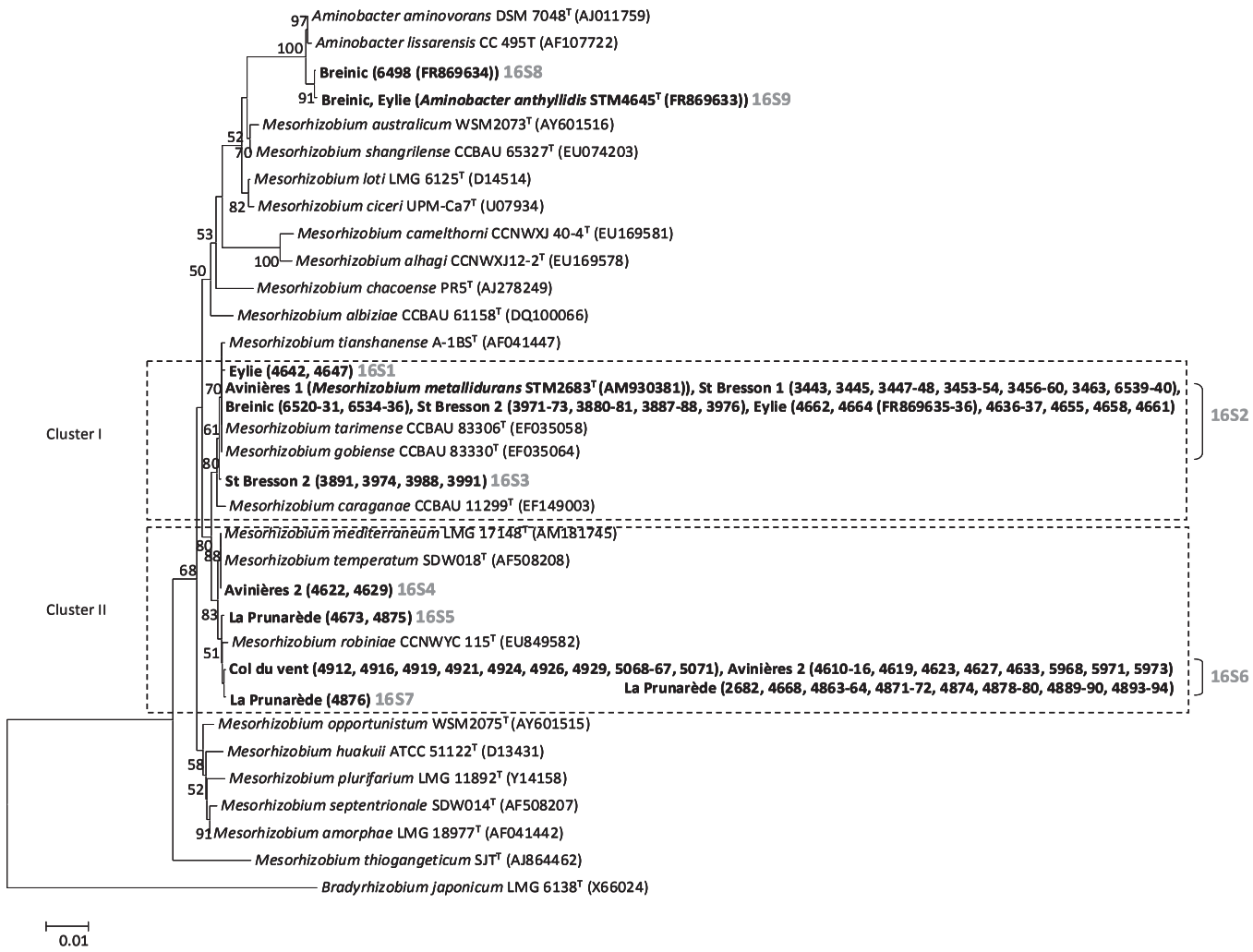
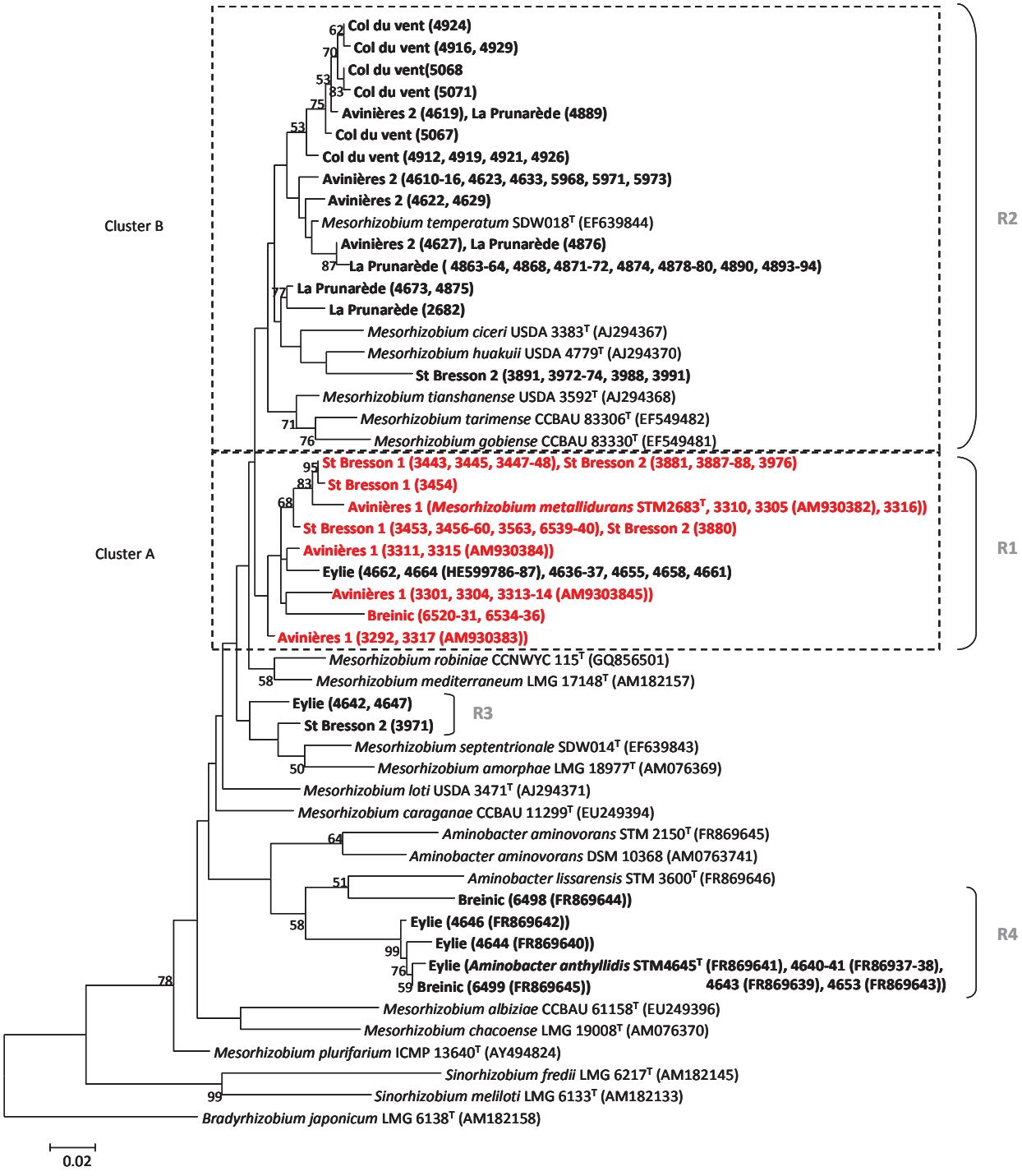


Figure IV-4: Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences, showing the relationships between isolates from *Anthyllis vulneraria* and reference strains. The analysis was based on 1,219 nt. Genbank accession numbers are given next to strain numbers and the significance of each branch is indicated by a bootstrap value (> 50 %) calculated for 1,000 subsets. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions *per* 100 nucleotides. *A. vulneraria* nodule isolates are shown in bold. The 16S rRNA phylogenetic group of each sequence is given in gray.

The 16S rRNA gene sequence analysis was complemented with the analysis of two housekeeping genes (*rec*A and *atp*D) to improve the reliability of the core gene phylogeny. The trees built from *rec*A and *atp*D gene sequences separated isolates into two major distant clusters, named Clusters A and B in Figure IV-5, and allowed for refining phylogenetic relationships (Table IV-6). The differences in diversity and grouping observed in comparison with the 16S rRNA phylogeny concerned the isolates from Eylie mine and St Bresson 2 mine border. Concerning *rec*A phylogeny (Figure IV-5A), most mesorhizobium isolates from Eylie mine belonged to Cluster A (R1 phylogenetic group in Table IV-6), which encompasses sequences of isolates from mine soils related to *M. metallidurans* (95.6 % identity with STM 2683^T). Two isolates from Eylie (STM 4642 and 4647, from the R2 group in Table IV-6) had a *rec*A sequence that differed from those of *M. metallidurans* (94.7 % identity with STM 2683^T) and related to *M. septentrionale* and *M. amorphae* (95.6 % identity). According to *rec*A phylogeny, metal-tolerant and sensitive isolates from St Bresson 2 did not group into the same cluster. Metal-tolerant isolates (five isolates) belonged to Cluster A that contained *M. metallidurans* STM 2683^T (R1 group in Table IV-6), whereas metal-sensitive isolates belonged to Cluster B (R2 group in Table IV-6) that contained isolates from non-mining soils, except one metal-sensitive isolate (STM 3971, from R3 in Table IV-6). STM 3971 was phylogenetically separated from other isolates: it did not belong to Clusters A or B and was related to *M. septentrionale* and *M. amorphae* (96.4 % identity). Concerning *atp*D phylogeny (Figure IV-5B), all mesorhizobium isolates from Eylie belonged to Cluster B (A2 group in Table IV-6), that contained only isolates from non-mining soils and isolates from Avinières 2 mine border, contrary to *rec*A phylogeny. As showed in *rec*A phylogeny, isolates from St Bresson 2 did not group into the same cluster. Metal-tolerant isolates (five isolates) grouped into cluster A (A1 group in Table IV-6) that contained *M. metallidurans* (97.6 % identity with STM 2683^T) and sensitive isolates (seven isolates) belonged to cluster B (A2 group in Table IV-6) that contained isolates from the non-mining soils of Avinières 2 and Eylie.

A


Cluster B
Cluster A
R2
R1
R3
R4
Col du vent (4924)
Col du vent (4916, 4929)
Col du vent(5068
Col du vent (5071)
Avinières 2 (4619), La Prunarède (4889)
Col du vent (5067)
Col du vent (4912, 4919, 4921, 4926)
Avinières 2 (4610-16, 4623, 4633, 5968, 5971, 5973)
Avinières 2 (4622, 4629)
Mesorhizobium temperatum SDW018T (EF639844)
Avinières 2 (4627), La Prunarède (4876)
La Prunarède (4863-64, 4868, 4871-72, 4874, 4878-80, 4890, 4893-94)
La Prunarède (4673, 4875)
La Prunarède (2682)
Mesorhizobium ciceri USDA 3383T (AJ294367)
Mesorhizobium huakuii USDA 4779T (AJ294370)
St Bresson 2 (3891, 3972-74, 3988, 3991)
Mesorhizobium tianshanense USDA 3592T (AJ294368)
Mesorhizobium tarimense CCBAU 83306T (EF549482)
Mesorhizobium gobiense CCBAU 83330T (EF549481)
St Bresson 1 (3443, 3445, 3447-48), St Bresson 2 (3881, 3887-88, 3976)
St Bresson 1 (3454)
Avinières 1 (Mesorhizobium metallidurans STM2683T, 3310, 3305 (AM930382), 3316))
St Bresson 1 (3453, 3456-60, 3563, 6539-40), St Bresson 2 (3880)
Avinières 1 (3311, 3315 (AM930384))
Eylie (4662, 4664 (HE599786-87), 4636-37, 4655, 4658, 4661)
Avinières 1 (3301, 3304, 3313-14 (AM9303845))
Breinic (6520-31, 6534-36)
Avinières 1 (3292, 3317 (AM930383))
Mesorhizobium robiniae CCNWYC 115T (GQ856501)
Mesorhizobium mediterraneum LMG 17148T (AM182157)
Eylie (4642, 4647)
St Bresson 2 (3971)
Mesorhizobium septentrionale SDW014T (EF639843)
Mesorhizobium amorphae LMG 18977T (AM076369)
Mesorhizobium loti USDA 3471T (AJ294371)
Mesorhizobium caraganae CCBAU 11299T (EU249394)
Aminobacter aminovorans STM 2150T (FR869645)
Aminobacter aminovorans DSM 10368 (AM0763741)
Aminobacter lissarensis STM 3600T (FR869646)
Breinic (6498 (FR869644))
Eylie (4646 (FR869642))
Eylie (4644 (FR869640))
Eylie (Aminobacter anthyllidis STM4645T (FR869641), 4640-41 (FR86937-38), 4643 (FR869639), 4653 (FR869643))
Breinic (6499 (FR869645))
Mesorhizobium albiziae CCBAU 61158T (EU249396)
Mesorhizobium chacoense LMG 19008T (AM076370)
Mesorhizobium plurifarium ICMP 13640T (AY494824)
Sinorhizobium fredii LMG 6217T (AM182145)
Sinorhizobium meliloti LMG 6133T (AM182133)
Bradyrhizobium japonicum LMG 6138T (AM182158)
0.02

B

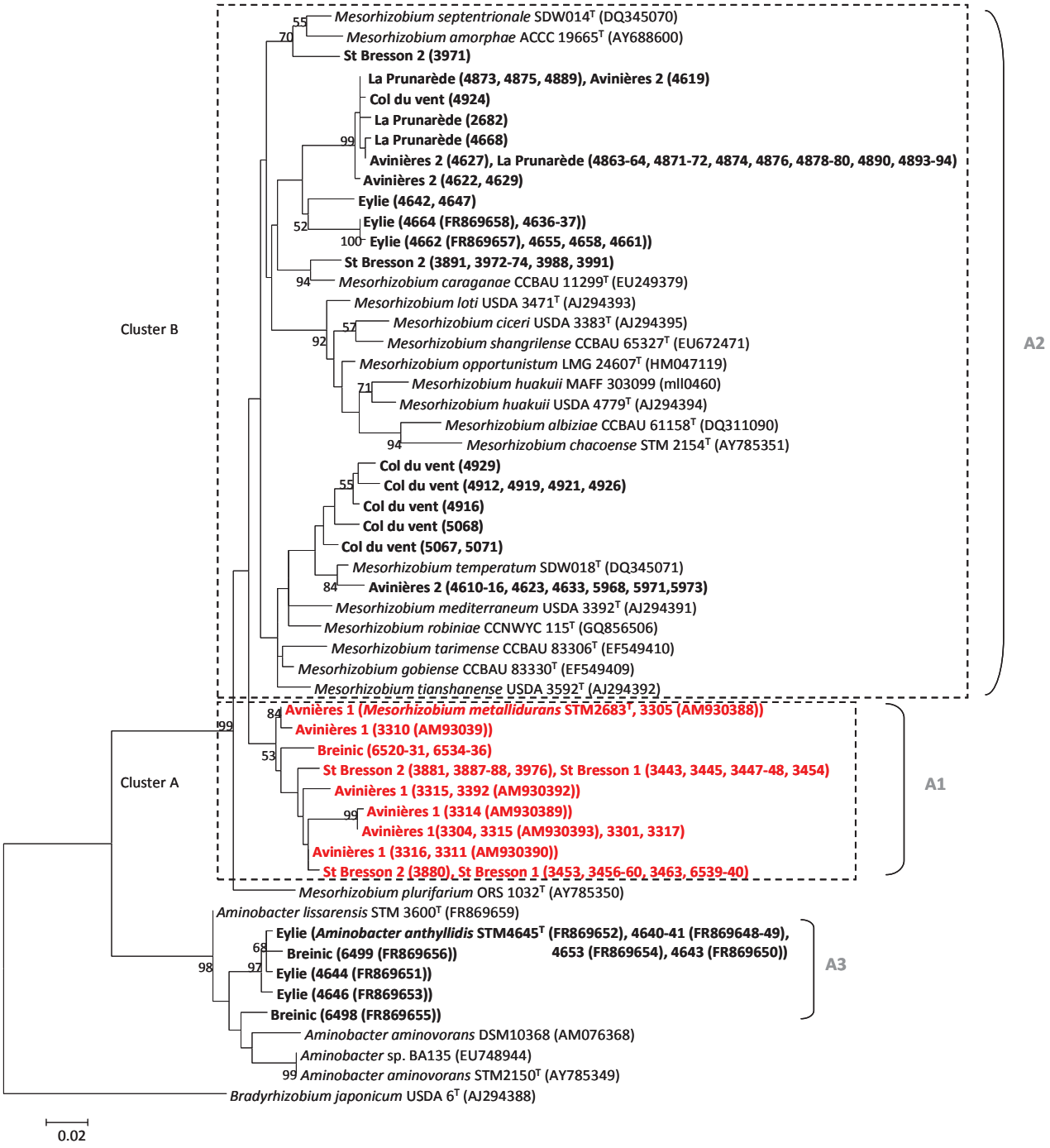


Figure IV-5: Maximum-likelihood phylogenetic trees of the *rec*A (A) and *atp*D (B) gene sequences showing the relationships between the *Anthyllis vulneraria* isolates obtained in this study and reference strains. The analysis was based on 362 nt for *rec*A sequences (A) and 386 nt for *atp*D sequences (B). Genbank accession numbers are given next to strain numbers and the significance of each branch is indicated by a bootstrap value calculated for 1,000 subsets (> 50 %) at the major branching-points. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions *per* 100 nucleotides. *A. vulneraria* nodule isolates are shown in bold. Strains from sequences FN436266 (*nod*A1) and FN436265 (*nod*A2) belong to the *M. metallidurans* species (Vidal *et al.*, 2009). The *rec*A and *atp*D phylogenetic groups of each sequence are given in gray. *M. metallidurans* isolates are in red.

Analysis of the metal-resistance CadA1 protein sequences

The *cad*A1 gene was amplified in all *Mesorhizobium* isolates from mine soils (Avinières 1, St Bresson 1, Eylie and Breinic) and in the isolates from the mine border (St Bresson 2) that displayed high Zn and Cd MIC values (MIC ≥ 6 mM Zn and ≥ 0.8 mM Cd) (Figure IV-6). The PCR-amplified sequences of *Mesorhizobium* isolates showed high identity with CadA1 of STM 2683 (84-100 % out of 203-271 amino acids). Additionally, the *cad*A1 gene was successfully amplified in nine *Aminobacter* strains from Breinic and Eylie soils (Figure IV-6 and Table IV-6) previously identified as intermediately metal-tolerant (MIC = 1-2 mM Zn and 0.1-0.5 mM Cd). Their PCR products showed lower identity (72-74 % identity out of 199-224 amino acids) with STM 2683, showing the presence of another efflux protein. By contrast, the *cad*A1 fragment was not amplified in any isolate from the non-mining soils (Col du Vent and La Prunarède) or from the mine border soils (St Bresson 2 and Avinières 2) (Figure IV-6 and Table IV-6), which displayed low Zn and/or Cd MIC values. From the phylogenetic tree built from the CadA1 protein sequences, all the CadA1 sequences of our isolates were closely related to CadA1 of *M. metallidurans* STM 2683^T (CCI51008), and formed a group related by a high bootstrap value of 96 % (Figure IV-7). However, *Aminobacter* isolates formed a distant group from mesorhizobial isolates (Figure IV-7 and Table IV-6). Comparison with several P_{IB}-type ATPases homologous to CadA1 (> 60 % identity) identified in rhizobia, and with the sequences of three strains found in related genera (*Agrobacterium*, *Chelativorans* and *Rhodopseudonomas*) showed that CadA1 of our *Mesorhizobium* and *Aminobacter* isolates were close to the P_{IB}-type ATPase (YP665761) of *Chelativorans multitrophicus* BNC1, an EDTA-degrading strain (Doronina *et al.,* 2009) (66.3-67.8 % identity, *i.e*. 65-68 different amino acids out of 202) (Figure IV-7).

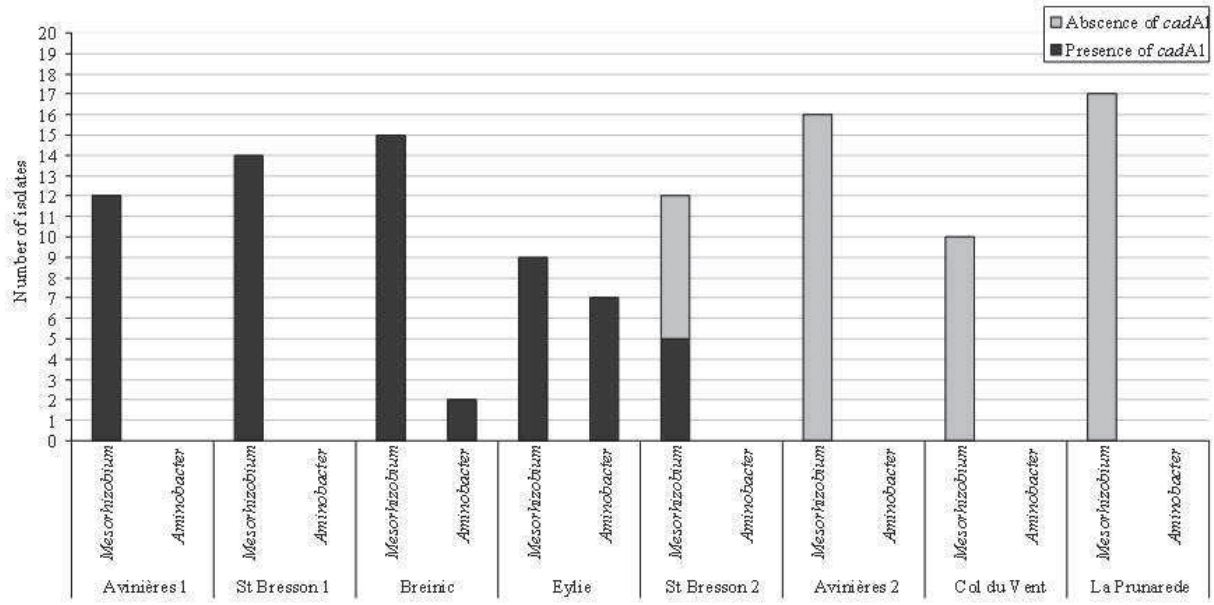


Figure IV-6: Presence (black bars) or absence (grey bars) of the *cad*A1 gene by PCR amplification in our *Mesorhizobium* isolates and *Aminobacter* strains from *A. vulneraria* nodules isolated from eight soils displaying different degrees of metal pollution (mine soils of Avinières 1, St Bresson 1, Breinic and Eylie, mine-border soils of Avinières 2 and St Bresson 2 and non-mining soils of Col du Vent and La Prunarède).

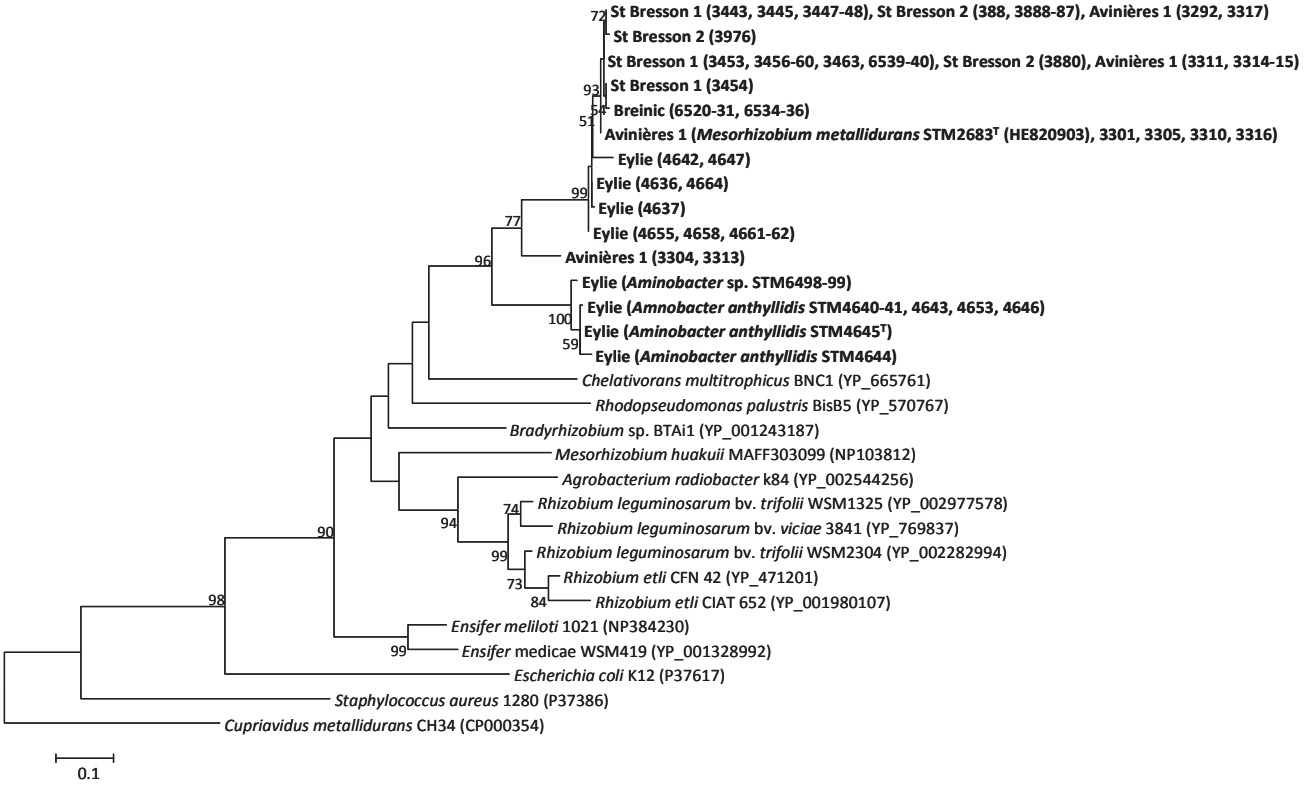


Figure IV-7: Maximum-likelihood phylogenetic tree based on partial CadA1 protein sequences (202 amino acids) showing the relationships between the *Anthyllis vulneraria* isolates obtained in this study and reference strains. Genbank accession numbers are given next to strain numbers and the significance of each branch is indicated by a bootstrap value calculated for 1,000 subsets (> 50 %) at the major branching-points. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions *per* 100 nucleotides. *A. vulneraria* nodule isolates are in bold.

Analysis of the* nod*A symbiotic sequences

The isolates from Avinières 1, Avinières 2, Col du Vent and La Prunarède were special in that they contained two copies of the *nod*A gene (*nod*A1 and *nod*A2), related to the double copy contained in the genome of *M. metallidurans* STM 2683^T isolated from Avinières 1 (Figure IV-8 and Table IV-6). The partial *nod*A1 gene of these *Anthyllis* isolates shared 99-100 % identity with the *nod*A1 gene sequence of *M. metallidurans* STM 2683^T. The partial *nod*A2 gene found in the isolates shared 99.5-100 % identity with the *nod*A2 sequence of STM 2683^T. The two *nod*A1 copies are different and share 76.6-77.8 % identity. The *nod*A1 gene presents more nucleotide diversity (0-5 different nucleotides out of 424 bp) than the *nod*A2 gene (0-2 different nucleotides out of 424 bp) (Figure IV-8). This diversity can represent 0-1-aa difference. The two *nod*A copies are related to the two copies of *M. ciceri* bv. *bisserulae*, *M. opportunistum* and *M. australicum* isolated from *Biserrula pelecinus* L. in Australia (Nandasena *et al.,* 2009) (Figure IV-8). All isolates from Breinic, Eylie, St Bresson 1 and St Bresson 2 contained only one copy of the *nod*A gene, related to those of the *Mesorhizobium* strains isolated from *Lotus* and falling into the *loti* biovar (Figure IV-8 and Table IV-6). Within the *loti* biovar cluster, the 424-bp *nod*A sequences we found differed by up to 30 nucleotides.

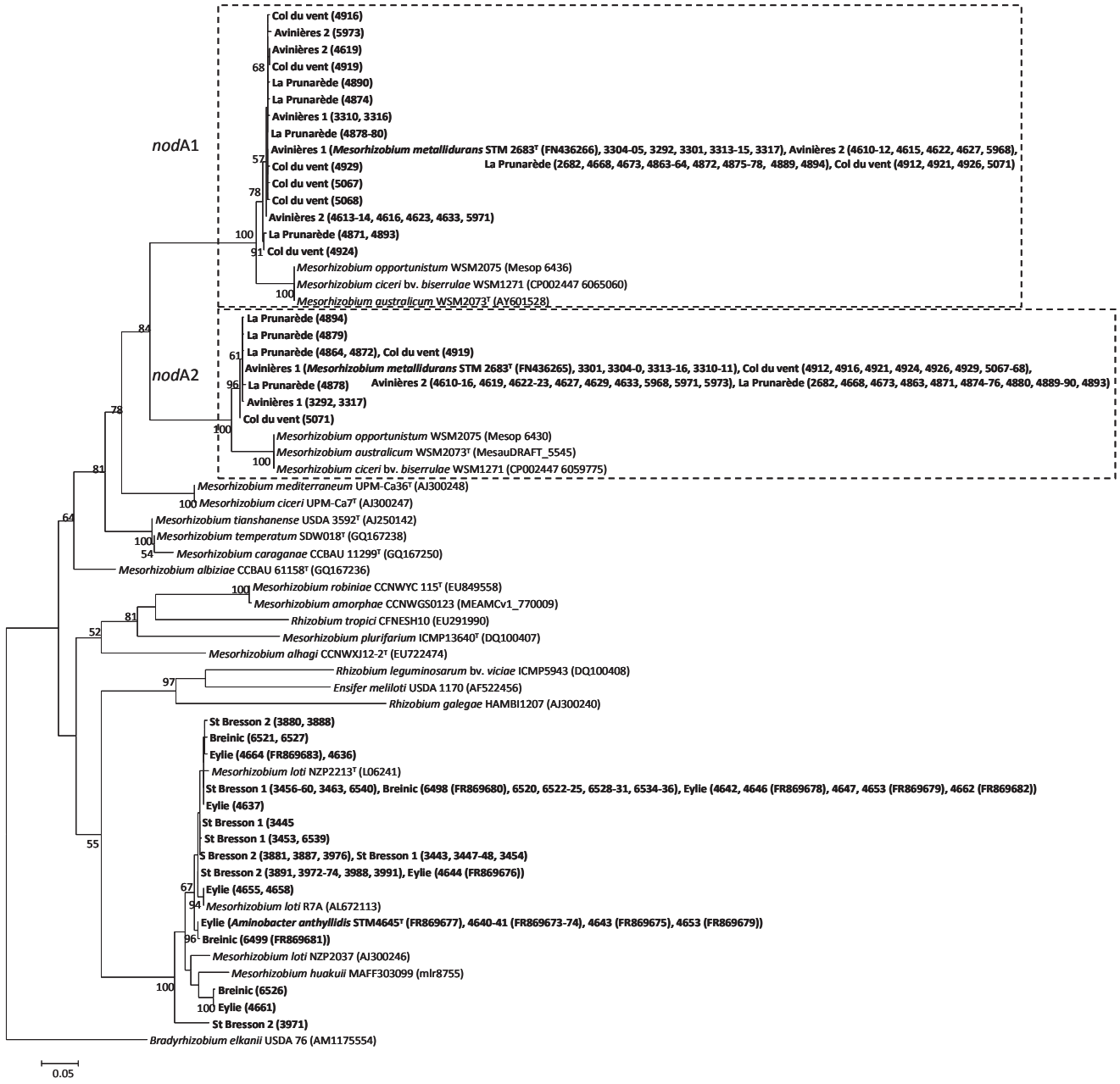


Figure IV-8: Maximum-likelihood phylogenetic tree based on partial *nod*A gene sequences (424 nt) showing the relationships between the *Anthyllis vulneraria* isolates obtained in this study and reference strains. Genbank accession numbers are given next to strain numbers and the significance of each branch is indicated by a bootstrap value calculated for 1,000 subsets (> 50 %) at the major branching-points. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions *per* 100 nucleotides. *A. vulneraria* nodule isolates are in bold.

Discussion

Rhizobia associated to *Anthyllis* are important symbionts responsible for the entry of biologically fixed nitrogen into the plant and for the activation of post-mining restoration. In that respect, we conducted a phenotypic, phylogenetic and genetic comparison of rhizobia isolated from *Anthyllis vulneraria* nodules and originating from mining soils highly contaminated by metals (Avinières, St Bresson 1, Breinic and Eylie), from moderately Zn-

and Cd-contaminated soils collected at mine-borders (Avinières 2 and St Bresson 2) and from non-mining soils (Col du Vent and La Prunarède).

Compared to the non-mining sites, Avinières 1, St Bresson 1, Breinic and Eylie mines, which are highly contaminated by Zn, Cd and Pb, contained a high proportion of metal-tolerant rhizoba. Eighty-three of the rhizobia isolated from the mine sites were Zn-tolerant with MIC values ≥ 6 mM Zn, and 69.5 % were Cd-tolerant with MIC values ≥ 0.8 mM Cd. All of the rhizobia isolated from the non-mining sites were Zn- and Cd-sensitive (MIC values < 1 mM Zn and ≤ 0.3 mM Cd). Higher numbers of metal-tolerant bacteria in metal-contaminated environments have been reported in some publications (Chaudri *et al.,* 2008; Delorme *et al.,* 2003). In our case, we observed a higher proportion of Zn-tolerant than of Cd-tolerant rhizobia that can be explained by the high levels of Zn in our mine soils (100- to 500-fold higher than in non-mining sites) compared to Cd levels (18- to 34-fold higher than in non-mining sites). This observation is in accordance with Baath *et al.* (1998), who report that an increase in metal tolerance is commonly correlated with increasing levels of metals in the environment. As a result, metal-tolerant bacteria can be used as bio-indicators of environmental contamination (Diaz-Ravina and Baath, 2001). The other rhizobia from our mine soils are considered as intermediately metal-tolerant, with MIC values in-between those of highly tolerant isolates from mine soils and those of sensitive isolates from non-mining soils (1 mM ≤ MIC Zn ≤ 2 mM). Concerning the mine border isolates of Avinières 2 and St Bresson 2, 100 % of the isolates from Avinières 2 were Zn- and Cd-sensitive like those from non-mining soils, 42 % of the isolates from St Bresson 2 were Zn-tolerant like those from our mine soils, and 58 % were Zn- and Cd-sensitive. Mine border soils were much less contaminated compared to mine soils and contained high levels of organic carbon and nitrogen. These two observations can account for the high proportion of metal-sensitive isolates we found. Organic matter could decrease metal mobility and in turn metal availability in soils (McGrath *et al.,* 1995). The presence of metal-tolerant isolates at St Bresson 2 can be explained by the high levels of Pb contained in the soil, which were similar to those of mine soils. Zn tolerance is often associated with Cd and/or Pb tolerance. Therefore the higher number of metal-tolerant phenotypes we found in St Bresson 2 can result from the selection pressure exerted by Pb. For example, the P_{IB}-type ATPase ZntA or CadA efflux transporters can confer resistance to Zn, Cd and Pb (Nies, 2003). The higher numbers of metal-tolerant phenotypes in metal-contaminated soils can be related to the acquisition of metal-resistant markers such as efflux transporters (Lakzian *et al.,* 2002). The presence of *cad*A1, previously identified as conferring high Zn-resistance to *M. metallidurans* STM 2683^T (Maynaud *et al.,*

in preparation), was only detected in the metal-tolerant populations from our mine soils and from St Bresson 2 (42 % of the population), with high or intermediate tolerance levels. All CadA1 sequences shared a high percentage of identity with CadA1 of STM 2683 (≥ 84 %) that agreed with the metal-tolerant phenotype. No detection of *cad*A1 was related to the metal-sensitive isolates from our non-mining sites and from Avinieres 2 and St Bresson 2 (58 % of population). Additionally, *cad*A1 was not found in the available sequenced genomes of five *Mesorhizobium* strains; one metallicolous strain (*M. amorphae* CCNWGS0123 (Hao *et al.,* 2012)) and four strains that have not been described as metal-tolerant (*M. ciceri* bv. *biserrulae* WSM 1271, *M. opportunistum* WSM 2075, *M. huakuii* MAFF303099, *M. australicum* WSM 2073). In the study by Diels and Mergeay (1990), the authors suggest a correlation between heavy metal contents in contaminated soils and the presence of heavy-metal-resistant megaplasmid-bearing *Cupriavidus eutrophus* strains. The DNA fragment that encodes resistance to Cd^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+} (*czc*) was used as a probe in colony-hybridization procedures with bacteria isolated from polluted environments such as a Zn-factory area and mine areas in Zaire, and from nonferrous-steelworks sediment from a factory in Belgium. The results showed that *czc* was detected in 75 %, 85-90 % and 60 % of the bacteria from the Zn-factory area, the nonferrous-steelworks sediment and the Zaire mine, respectively. In our case, with 100 % of *cad*A1 detection in the metal-tolerant isolates from mine soils, *cad*A1 appears as a good marker of metal-tolerant isolates. Moreover, *cad*A1 was amplified in intermediately metal-tolerant *Aminobacter* isolates from our mine soils, but its protein sequence had a lower percentage of identity with CadA1 of STM 2683 (72-74 %). We previously demonstrated that *cad*A1 was not to the only gene that conferred high Zn-resistance in *M. metallidurans* (Maynaud *et al.,* in preparation). The presence of *cad*A1 in intermediately metal-tolerant populations and its absence in sensitive isolates suggests that *cad*A1 is involved in metal resistance but not in cell homeostasis.

In this study, the 114 isolates trapped with *A. vulneraria* from French sites mainly belonged to the *Mesorhizobium* genus (about 92 %) suggesting, that *Anthyllis* preferably associates with isolates from the *Mesorhizobium* genus. Until recently, *Mesorhizobium* was the only rhizobial genus known to be associated to *Anthyllis* (Jarvis *et al.* 1982; Ampomah and Huss-Danell, 2011). We also isolated a few bacteria from the *Aminobacter* genus (8 %, from Eylie and Breinic mines) previously described as nodulating legumes (Maynaud *et al.,* 2012). The non-mining sites and the mine sites displayed bacterial compositions that differed according to the 16S rRNA, *rec*A and *atp*D phylogenies. Our non-mining sites contained exclusively metal-sensitive isolates that belonged to the cluster of the *M. robinia, M.*

temperatum and *M. mediterraneum* species, whereas our mine sites contained metal-tolerant or intermediate isolates that belonged to the cluster of the *M. metallidurans, M. tarimense* and *M. gobiense* species. Based on *M. metallidurans* characteristics (Vidal *et al.,* 2009), mesorhizobial isolates from the mine soils of St Bresson 1 and Breinic belonged to the *M. metallidurans* species according to *rec*A and *atp*D phylogenies. Isolates from Eylie were close to *M. metallidurans* members (only their *atp*D sequences were distinct) and therefore seemed to be a different species from *M. metallidurans.* However, supplemental genomic analyses will be necessary to confirm that the species are different (DNA-DNA hybridization) or a gene transfer hypothesis (Zhang *et al.,* 2012). *Anthyllis* mesorhizobia were phylogenetically separate according to their metal phenotypes. Our results showed specific and different bacterial compositions between isolates from mine soils and from non-mining soils, contrary to Delorme *et al.* (2003) who did not observe a significant difference between metal-contaminated soils and unpolluted soils. The isolates from our non-mining soils are characterized by at least four new *Mesorhizobium* species according to 16S rRNA phylogeny. The cluster that contains the metal-tolerant mesorhizobia from Breinic and Eylie mine sites (three 16S rRNA phylogenetic groups) seems to be as diversified as the cluster of the sensitive mesorhizobia from non-mining sites. This suggests that in Breinic and Eylie mine soils, high metal concentrations did not reduce bacterial diversity. By contrast, the mine sites of Avinières 1 and St Bresson 1 contained only *M. metallidurans* species, suggesting that diversity was reduced, as presumed in some publications (Hirsh *et al.,* 1993; Stan *et al.,* 2011). This is probably due to the higher metal concentrations in those soils than in the other mine soils. Our results show that the metal phenotype and the phylogenetic distribution of isolates are correlated. Metal-sensitive isolates from Avinieres 2 are grouped with sensitive isolates from non-mining soils. A different situation was observed in the case of St Bresson 2, where two types of metal phenotypes were detected: St Bresson 2 contained metal-sensitive isolates that belonged to the same cluster as isolates from the non-mining sites and Avinières 2, and also metal-tolerant isolates that belonged to the same cluster as *M. metallidurans*. Isolating metal-sensitive isolates from metal-contaminated soils was no surprise as St Bresson 2 contained higher organic carbon and nitrogen contents that could allow for the growth of metal-sensitive rhizobia by protecting them in micro-niches against high metal concentrations (Ibekwe *et al.,* 1997; Delorme *et al.* 2003). The distribution we obtained using the *nod*A marker differed from that obtained using 16S rRNA or the two housekeeping genes, as often showed among rhizobia where *nod*A gene phylogeny reflects symbiotic properties, not taxonomy. Isolates from the Cévennes area (Avinières 1, Avinières 2, Col du Vent and La

Prunarède) exhibited two complete copies of the *nod*A gene related to those of *M. metallidurans* STM 2683^T. By contrast, all the isolates from the three remaining sites (Eylie, Breinic and St Bresson 1 mines) harbored a single copy of the *nod*A gene tightly related to those of the *loti* biovar strains. The differences in *nod*A sequences between isolates from *Anthyllis* nodules can be explained by different host spectra or different symbiotic behaviors with *Anthyllis* or *Lotus* legumes. The legume host could influence the distribution of isolates according to its own distribution (Stepkowski *et al.,* 2001). Indeed, *L. corniculatus* is commonly found at the St Bresson 1, Eylie and Breinic sites, while none was found in Avinières 1 mine. *nod*A phylogeny suggests that *Lotus* symbionts from the Breinic, Eylie and St Bresson sites could have transferred the symbiotic island containing *nod* genes by horizontal transfer to *Mesorhizobium* isolates associated with *Anthyllis*. The first evidence of horizontal gene transfer into a *Mesorhizobium* population was demonstrated by Sullivan *et al.* (1998).

Eylie mine displayed similar characteristics to the other mine sites: (i) Eylie soil was highly contaminated by Zn, Cd and Pb, like Avinières 1, St Bresson 1 or Breinic soils; (ii) Eylie isolates belonged to the genera *Mesorhizobium* and *Aminobacter*, like Breinic site; (iii) all mesorhizobial isolates from Eylie were metal-tolerant and contained the *cad*A1 gene like isolates from other mines; and (iv) their *nod*A gene was similar to the *nod*A gene from Breinic and St Bresson isolates. But Eylie mine displayed a unique bacterial composition and diversity that differed from the other mines. Avinières 1, St Bresson and Breinic mine soils contained isolates that belonged to the *M. metallidurans* species, whereas no Eylie isolate belonged to it. Eylie mine displayed climatic, hydric and topographic properties that differed from the Cévennes area or Breinic mine. These environmental characteristics can explain the differences in bacterial composition and diversity observed in Eylie mine. Some publications report that environmental conditions can influence bacterial composition and diversity (Dalmastri *et al.,* 1999; Castro *et al.,* 2010). Our results suggest that the intrinsic properties of each site can influence the distribution of isolates, and our findings about Avinières mine cannot be applied to other Zn-Pb sites.

Conclusion

In this work, the comparison between isolates from mine soils, their border and non-mining soils suggests that our mine soils displayed specific characteristics such as (i) a high proportion of metal-tolerant phenotypes, (ii) bacterial composition with mainly *M. metallidurans* species, (iii) a relationship between metal phenotype distribution and

phylogenies, and (iv) reduced diversity or not. According to *nod*A phylogeny, the rhizobium populations isolated from *Anthyllis* nodules showed two different clusters, suggesting different plant-host symbiotic behaviors. Soils highly polluted by metals drive the composition and distribution of *Anthyllis* isolates according to their metal-tolerance phenotype and rhizobial species, whereas plant hosts seem to impact symbiotic diversity independently of the metal-tolerance property. The example of Eylie site bacterial diversity demonstrates that the intrinsic properties of each site influence the diversity and distribution of isolates and therefore suggests that the implementation of phytostabilization strategies to remediate metal contamination requires the use of native plants and microorganisms which are better adapted to local pedoclimatic conditions.

Acknowledgments

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche Programme « Contaminants, Ecosystèmes et Santé » (CES 2008-12, APTITUDE). G.M. received a PhD grant from the Ministère de la Recherche et de l'Education Nationale.

References

Ampomah O.Y. and Huss-Danell K. (2011) Genetic diversity of root nodule bacteria nodulating *Lotus corniculatus* and *Anthyllis vulneraria* in Sweden. *Syst Appl Microbiol* **34**: 267-275.

Baath E. (1992) Measurement of heavy metal tolerance of soil bacteria using thymidine incorporation into bacteria extracted after homogenization-centrifugation. *Soil Biol Biochem* **24**: 1167-1172.

Baath E., Díaz-Ravina M., Frostegard A. and Campbell C.D. (1998) Effect of Metal-Rich Sludge Amendments on the Soil Microbial Community. *Appl Environ Microbiol* **64**: 238-245.

Castro H.F., Classen A.T., Austin E.E., Norby R.J., Schadt C.W. (2010) Soil Microbial Community Responses to Multiple Experimental Climate Change Drivers. *Appl Environ Microbiol* **76:** 999-1007.

Chaudri A., McGrath S., Gibbs P., Chambers B., Carlton-Smith C., Bacon J. *et al.* (2008) Population size of indigenous *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in long-term field experiments with sewage sludge cake, metal-amended liquid sludge or metal salts: Effects of zinc, copper and cadmium. *Soil Biol Biochem* **40**: 1670-1680.

Chen W. and Kuo T. (1993) A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucl Acids Res* **21**: 2260.

Dalmastri C., Chiarini L., Cantale C., Bevivino A., Tabacchioni S. (1999) Soil Type and Maize Cultivar Affect the Genetic Diversity of Maize Root–Associated *Burkholderia cepacia* Populations. *Microbial Ecol* **38:** 273-284.

Delorme T.A., Gagliardi J.V., Angle J.S., van Berkum P. and Chaney R.L. (2003) Phenotypic and Genetic Diversity of Rhizobia Isolated from Nodules of Clover Grown in a Zinc and Cadmium Contaminated Soil. *Soil Sci Soc Am J* **67**: 1746-1754.

Diaz-Ravina M., Baath E. (2001) Response of soil bacterial communities pre-exposed to different metals and reinoculated in an unpolluted soil. *Soil Biol Biochem* **33**: 241-248.

Diels L., Mergeay M. (1990) DNA Probe-Mediated Detection of Resistant Bacteria from Soils Highly Polluted by Heavy Metals. *Appl Environ Microbiol* **56:** 1485-1491.

Doronina N.V., Kaparullina E.N., Trotsenko Y.A., Nortemann B., Bucheli-Witschel M., Weilenmann H.-U., and Egli T. (2009) *Chelativorans multitrophicus* gen. nov., sp. nov. and *Chelativorans oligotrophicus* sp. nov., aerobic, EDTA-degrading bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* **60:** 1044–1051.

Frérot H., Lefèbvre C., Gruber W., Colin C., Santos A.D. and Escarré J. (2006) Specific interaction between local metallicolous plants improve the phytostabilization of mine soils. *Plant Soil* **282**: 53-65.

Gaunt M., Turner S., Rigottier-Gois L., Lloyd-Macgilp S. and Young J. (2001) Phylogenies of *atp*D and *rec*A support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 2037-2048.

Ghosh M. and Singh S.P. (2005) A Review on Phytoremediation of Heavy Metals and Utilization of It's by Products. *Appl Ecol Environ Res* **3**: 1-18.

Giller K.E., Witter E. and McGrath S.P. (1998) Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol Biochem* **30**: 1389-1414.

Hao X., Lin Y., Johnstone L., Baltrus D.A., Miller S.J., Wei G. and Rensing C. (2012) Draft Genome Sequence of Plant Growth-Promoting Rhizobium *Mesorhizobium amorphae*, Isolated from Zinc-Lead Mine Tailings. *J Bacteriol* **194**: 736-737.

Hirsch P.R., Jones M.J., McGrath S.P. and Giller K.E. (1993) Heavy metals from past applications of sewage sludge decrease the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* populations. *Soil Biol Biochem* **25**: 1485-1490.

Ibekwe A.M., Angle J.S., Chaney R.L. and van Berkum P. (1995) Sewage Sludge and Heavy Metal Effects on Nodulation and Nitrogen Fixation of Legumes. *J Environ Qual* **24**: 1199-1204.

Jarvis B.D.W., Pankhurst C.E., Patel J.J. (1982) *Rhizobium loti*, a New Species of Legume Root Nodule Bacteria*. Int J Syst Bacteriol* **32:** 378-380.

Kampa M. and Castanas E. (2008) Human health effects of air pollution. *Environ Pol* **151**: 362-367.

Khan S., El-Latif Hesham A., Qiao M., Rehman S. and He J.-Z. (2010) Effects of Cd and Pb on soil microbial community structure and activities. *Environ Sc Pol Res* **17**: 288-296.

Laguerre G., Nour S.M., Macheret V., Sanjuan J., Drouin P., Amarger N. (2001) Classification of rhizobia based on *nod*C and *nif*H gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiol* **147**: 981-993.

Lakzian A., Murphy P., Turner A., Beynon J.L., Giller K.E. (2002) *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* populations in soils with increasing heavy metal contamination: abundance, plasmid profiles, diversity and metal tolerance. *Soil Biol Biochem* **34**: 519-529.

Mahieu S., Frérot H., Vidal C., Galiana A., Heulin K., Maure L. *et al.* (2011) *Anthyllis vulneraria*, *Mesorhizobium metallidurans*; an efficient symbiotic nitrogen fixing association able to grow in mine tailings highly contaminated by Zn, Pb and Cd. *Plant Soil* **342**: 405-417.

Maynaud G., Willems A., Soussou S., Vidal C., Mauré L., Moulin L. *et al.* (2012) Molecular and phenotypic characterization of strains nodulating *Anthyllis vulneraria* in mine tailings, and proposal of *Aminobacter anthyllidis* sp. nov., the first definition of *Aminobacter* as legume-nodulating bacteria. *Syst Appl Microbiol* **35**: 65-72.

McGrath S.P., Chaudri A.M., Giller K.E. (1995) Long-term effects of metals in sewage sludge on soils, microorganisms and plants. *J Ind Microbiol Biotechnol* **14**: 94-104.

Nandasena K.G., O'Hara G.W., Tiwari R.P., Willems A., Howieson J.G. (2009) *Mesorhizobium australicum* sp. nov. and *Mesorhizobium opportunistum* sp. nov., isolated from *Biserrula pelecinus* L. in Australia. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**: 2140-2147.

Nies D.H. (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 313-339.

Nwuche C.O., Ugoji E.O. (2008) Effects of heavy metal pollution on the soil microbial activity. *Int J Environ Sci Tech* **5**: 409-414.

Sheoran V., Sheoran A.S., Poonia P. (2010) Soil Reclamation of Abandoned Mine Land by Revegetation: A Review. *Int J Soil Sediment and Water* **3:** 13.

Stan V., Gament E., Cornea C.P., Voaides C., Dusa M., *et al.,* (2011) Effects of Heavy Metal from Polluted Soils on the *Rhizobium* Diversity. *Not Bot Hort Agrobot Cluj* **39**: 88-95.

Stępkowski T., Żak M., Moulin L., *et al.* (2011) *Bradyrhizobium canariense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the two dominant rhizobium species in root nodules of lupin and serradella plants growing in Europe. *Syst Appl Microbiol* **34**: 368-375.

Sullivan J.T., Patrick H.N., Lowther W.L., Scott D.B., Ronson C.W. (1995) Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc Natl Acad Sci* **92**: 8985-8989.

Vidal C., Chantreuil C., Berge O., Maure L., Escarre J., Bena G., *et al.* (2009) *Mesorhizobium metallidurans* sp. nov., a metal-resistant symbiont of *Anthyllis vulneraria* growing on metallicolous soil in Languedoc, France. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**: 850-855.

Zhang Y.M., Tian C.F., Sui X.H., Chen W.F., Chen W.X. (2012) Robust Markers Reflecting Phylogeny and Taxonomy of Rhizobia. *PLoS ONE* **7**: 1-6.

IV-4- Synthèse :

Le travail présenté dans ce chapitre a été consacré à l'étude de la diversité et de la répartition des populations symbiotiques associées à *Anthyllis vulneraria,* isolées de sites miniers fortement contaminés en Zn, Pb et Cd (Avinières 1, St Bresson 1, Eylie et Breinic), de sites situés en périphérie qui se sont avérés modérément contaminés en Zn et en Cd (Avinières 2 et St Bresson 2) et de sites non contaminés en métaux lourds (Col du Vent et La Prunarède). La diversité a été analysée à l'aide de marqueurs génétiques chromosomiques (ADNr 16S, *rec*A, *atp*D et *dna*K), d'un marqueur symbiotique (gène de nodulation *nod*A) et de résistance aux métaux lourds (*cad*A1).

Sur la base des données obtenues avec les marqueurs chromosomiques, 92 % des isolats d'*Anthyllis* appartiennent au genre *Mesorhizobium* et 8 % au genre *Aminobacter* (9 isolats sur 114). Ces derniers ont été décrits comme appartenant à une nouvelle espèce d'*Aminobacter,* dénommée *A. anthyllidis* capable de noduler *A. vulneraria* (partie IV-2). Les 92 % de mesorhizobia apparaissent assez diversifiés avec des isolats proches du cluster de l'ADNr 16S contenant les espèces de *M. metallidurans*, *M. tarimense*, et *M. gobiense* ou des souches proches du cluster *M. robiniae*, *M. temperatum* et *M. mediterraneum.* Nous n'avons pas observé dans notre étude de souches bactériennes symbiotes d'*A. vulneraria* appartenant à *M. australicum* ou *M. loti* comme précédemment décrits (Jarvis *et al.,* 1982 ; Ampomah *et al.,* 2011).

La comparaison des populations bactériennes des sites miniers avec celles des sites non pollués montre que les populations de *Mesorhizobium* des sites miniers possèdent une signature phénotypique et phylogénétique particulière, différente de celles des sites non pollués. Les sites miniers comportent une forte proportion de souches tolérantes au Zn et/ou Cd (83 % tolérantes au Zn avec CMI ≥ 6 mM et 69,5 % tolérantes au Cd avec CMI ≥ 0.8 mM), ce qui est en accord avec d'autres études (Delorme *et al.,* 2003; Chaudri *et al.,* 2008), alors que les sites non pollués contiennent 100 % de souches sensibles (CMI < 1 mM Zn et ≤ 0.3 mM Cd). Dans les sites périphériques qui sont potentiellement affectés par la diffusion de la pollution métallique engendrée par l'exploitation des sites miniers, nous avons observé des situations contrastées. Le site des Avinières 2 contient majoritairement des souches sensibles au Zn et/ou Cd alors que le site de St Bresson 2 contient quant à lui deux populations bactériennes : la première (42 % des souches) est tolérante au Zn et/ou Cd et la deuxième (58 %) est sensible aux métaux. Les sites périphériques contiennent une plus forte quantité de carbone organique et d'azote que les sites miniers et sont beaucoup moins contaminés en Zn et en Cd, ce qui peut expliquer la présence de souches bactériennes majoritairement sensibles aux métaux lourds (McGrath *et al.,* 1995). La présence de souches tolérantes aux métaux au sein du site de St Bresson 2 peut s'expliquer par la forte teneur en Pb qui est comparable à celle des sites miniers. La présence de souches tolérantes peut être le résultat d'une pression de sélection exercée par le Pb car la tolérance au Zn et/ou Cd est souvent associée à celle du Pb (Nies, 2003). Le phénotype de tolérance au Zn et/ou au Cd observé au sein des sites contaminés semble être corrélé à la présence du gène *cad*A1 codant pour une P_{IB}-ATPase impliquée dans la résistance au Zn chez *M. metallidurans* STM 2683^T (chapitre II). *cad*A1 est détecté chez toutes les souches tolérantes au Zn et/ou Cd des sites miniers et du site périphérique St Besson 2 (population tolérante au Zn) avec un très fort pourcentage d'identité (≥ 84 %) alors qu'aucune amplification n'a été détectée chez les souches sensibles des sites non pollués et périphériques des Avinières 2 et de St Bresson 2 (population sensible aux métaux). *cad*A1 apparait être un biomarqueur efficace pour détecter des souches tolérantes aux métaux lourds avec 100 % de détection au sein des populations tolérantes. *cad*A1 a été aussi amplifié chez les souches d'*Aminobacter* de tolérance intermédiaire au Zn, isolées d'Eylie et de Breinic, toutefois leurs sequences CadA1 présentent un plus faible pourcentage d'identité (72-74 %) suggérant une P_{IB}-ATPase différente de celle de CadA1 de STM 2683. L'absence de *cad*A1 chez les bactéries appartenant aux populations sensibles des sites non pollués et sa présence au sein des populations tolérantes et intermédiaires des sites

contaminés, semble indiquer que *cad*A1 participe plutôt à la résistance aux métaux des souches que dans l'homéostasie de la cellule.

Les sites miniers possèdent une composition bactérienne différente de celle des sites non pollués contrairement aux travaux de Delorme *et al.* (2003) qui ne montraient pas de différence significative entre les sites pollués et non pollués. Les sites non pollués mais aussi ceux situés à la périphérie des mines contiennent des populations bactériennes sensibles aux métaux appartenant au cluster de *M. robinia, M. temperatum* and *M. mediterraneum* d'après la phylogénie de l'ADNr 16S. Suite aux hybridations ADN-ADN réalisées pour la définition de l'espèce *M. metallidurans* avec des souches provenant de la mine des Avinières 1 (Vidal *et al.,* 2009), les mesorhizobia tolérants des sites miniers de Breinic et de St Bresson 1 et ainsi qu'une partie de ceux du site de St Bresson 2 appartiennent aussi à l'espèce de *M. metallidurans*. Quant aux souches d'Eylie, leur appartenance à *M. metallidurans* nécessite d'être confirmée par l'analyse d'autres gènes et des hybridations ADN-ADN car elles possèdent une séquence *atp*D différente des souches de *M. metallidurans*. Le cluster des souches tolérantes aux métaux lourds des mines de Breinic et d'Eylie semble autant diversifié que celui des souches sensibles des sites non pollués, réfutant l'hypothèse émise par Stan *et al.* (2011) et Hirsh *et al.* (1993) qui suggèrent que les métaux réduisent la diversité bactérienne. Par contre le cluster contenant les souches des mines des Avinières 1 et de St Bresson 1 est constitué uniquement de l'espèce *M. metallidurans* indiquant que cette réduction de la diversité bactérienne est sans doute liée à la forte teneur en Zn et en Cd de ces sites par rapport à Breinic et à Eylie.

L'analyse du gène de nodulation *nod*A montre que les souches isolées des sites cévenols (à l'exception de St Bresson) ont la particularité d'avoir deux copies du gène *nod*A dont les séquences sont très proches de celles de *M. metallidurans* STM 2683^{T} alors que les souches des sites de St Bresson, de Breinic et d'Eylie ne présentent qu'une seule copie de *nod*A dont la séquence est proche de celle des bactéries appartenant au cluster du biovar *loti*. Cette différence de séquence *nod*A au sein des symbiotes d'*Anthyllis* pourrait s'expliquer par un spectre d'hôte différent ou un comportement symbiotique divergent envers *Anthyllis* et *Lotus.* La plante hôte peut en effet, influencer la répartition des souches bactérienne selon sa propre répartition (Stępkowski *et al.,* 2011). *Lotus* est une légumineuse qui est présente sur les sites de Breinic, d'Eylie et de St Bresson alors qu'aucun écotype de *Lotus* n'a été détecté au sein du site des Avinières. La présence d'une seule copie de *nod*A suggère que les symbiotes de *Lotus* ont pu transférer leur gène *nod*A aux symbiotes d'*Anthyllis* par transfert horizontal

de l'îlot symbiotique comme cela a été montré pour une souche de *M. loti* nodulant *Lotus* (Sullivan *et al.,* 1995).

Le site minier d'Eylie possède des caractéristiques similaires aux autres sites miniers avec une teneur élevée en métaux lourds, la présence de souches de *Mesorhizobium* et d'*Aminobacter*, tolérantes au Zn et au Cd ou de tolérance intermédiaires, possédant toutes *cad*A1 et une séquence *nod*A proche de celle des souches de Breinic et de St Bresson. Par contre Eylie ne semble pas contenir de souches bactériennes appartenant clairement à l'espèce de *M. metallidurans* comme c'est le cas pour les sites miniers cévenols. Cette différence de composition et de diversité bactérienne peut être le résultat de propriétés environnementales particulières telles que le climat qui est plus humide et la présence d'une plus forte quantité de carbone organique et d'azote dans le substrat minier (Dalmastri *et al.,* 1999; Castro *et al.,* 2010).

En résumé, les sites miniers possèdent des caractéristiques spécifiques et différentes des sites non pollués telles que la forte proportion de phénotype métallicole, une composition bactérienne avec essentiellement des souches appartenant à l'espèce *M. metallidurans*, une répartition phylogénétique corrélée avec le phénotype de tolérance aux métaux lourds et une diversité bactérienne qui n'est pas forcément réduite. Cependant, chaque site minier possède des propriétés intrinsèques qui influencent la composition et la diversité bactérienne telles que la présence de la plante hôte ou bien des conditions pédoclimatiques particulières. Ce travail suggère alors que pour mettre en place des stratégies de revégétalisation durables et efficaces, il est important d'utiliser les espèces végétales et les microorganismes natifs du site en question car ils sont beaucoup mieux adaptés aux conditions environnementales locales.

Chapitre V

Discussion générale et perspectives

Les différents travaux de recherche réalisés au cours de ma thèse, ont permis de mieux comprendre l'adaptation des souches métallicoles de *Mesorhizobium* associées à la légumineuse *Anthyllis vulneraria* face à la contrainte métallique exercée par les environnements miniers riches en Zn, Cd et Pb. Pour cela, les déterminants génétiques impliqués dans l'adaptation aux métaux lourds ont été identifiés au sein de souches ciblées de *Mesorhizobium* et étudiés par des approches de génomique, de transcriptomique et de génétique moléculaire (**chapitre II et III**). Aussi, ce travail a permis de démontrer l'impact de la contrainte métallique sur la diversité et la répartition des populations symbiotiques d'*Anthyllis* isolées de sites contaminés et non contaminés en métaux lourds, à travers des études phylogénétiques et phénotypiques de tolérance aux métaux (**chapitre IV**).

Adaptation de *Mesorhizobium* au Zn et au Cd

Les environnements métalliques comme les sites miniers ont la particularité de favoriser le développement de microorganismes bien adaptés aux conditions métalliques extrêmes (Diaz-Ravina and Baath, 2001; Chaudri *et al.,* 2008). L'approche de génétique moléculaire réalisée sur la souche type de *M. metallidurans* STM 2683^T ainsi que l'approche transcriptomique (RNAseq) réalisée sur les souches métallicoles, STM 2683 (mine des Avinières) et STM 4661 (mine d'Eylie) ont permis d'identifier des déterminants génétiques impliqués dans l'adaptation au Zn et au Cd de ces souches dont la P_{IB}-ATPase CadA1 (chapitre II et III).

L'analyse de la séquence protéique de CadA1 a permis de démontrer son originalité par rapport à d'autres P_{IB}-ATPases. La séquence protéique de CadA1 a la particularité de contenir de nombreux Metal Binding Domains (MBDs) dont un double domaine Heavy Metal Associated (HMA) suivi d'un autre double domaine riche en histidines, en N-terminale de la séquence. Ces doubles domaines ont été décrits majoritairement chez des microorganismes isolés d'environnements industriels ou médicaux (Poston and Hee, 1991; Sultan and Hasnain, 2007; Doronina *et al.,* 2009) laissant suggérer un rôle de ces domaines dans la colonisation d'environnements métalliques par les bactéries. Dans la littérature, les N-MBDs sont impliqués dans la régulation de la pompe mais n'apparaissent pas essentiels pour son fonctionnement (Bal *et al.,* 2001; Mitra and Sharma, 2001; Mandal and Arguello, 2003; Banci *et al.,* 2006; Mandal *et al.,* 2008). Pour mieux comprendre le rôle de ces doubles domaines chez CadA1, il serait intéressant de muter spécifiquement la partie N-terminale de la séquence et/ou distinctement le double domaine HMA et le double domaine riche en histidines chez *M. metallidurans*. Ces mutagenèses nous permettraient d'en déduire le rôle de ces N-MBDs dans la spécificité des cations liés, le niveau de résistance et le fonctionnement de la pompe

(activité enzymatique de l'ATPase, phosphorylation, déphosphorylation) (Mana-Capelli *et al.,* 2003; Mandal and Arguello, 2003).

L'étude de la régulation de *cad*A1 dans un système rapporteur de type *gfp* et en condition *in vitro*, a montré que chez *M. metallidurans, cad*A1 était spécifiquement induit par le Zn et le Cd, et de façon non compétitive entre les deux cations. Il est donc probable que ce gène soit régulé par plusieurs voies de régulation. Cette régulation apparait atypique car généralement les P_{IB}-ATPases sont régulées par un seul régulateur transcriptionnel, comme c'est le cas pour ZntA ou CadA régulés respectivement par ZntR ou CadR (famille de régulateurs MerR) (Hantke, 2001; Brocklehurst *et al.,* 2003). Des cas atypiques de régulation des transporteurs comme l'opéron *mer* conférant une résistance au Hg ont été décrits. Cette régulation fait intervenir deux régulateurs (MerR et MerD) agissant sur le même opérateur de l'opéron (Mukhopadhyay *et al.,* 1991). Afin de mettre en évidence les différentes voies de régulation de *cad*A1, il serait intéressant de rechercher dans le génome de *M. metallidurans* STM 2683^T, les régulateurs transcriptionnels potentiels afin de réaliser des études d'expression et de mutagenèse dans STM 2683^T (Brocklehurst *et al.,* 1999; Brocklehurst *et al.,* 2003). Une séquence palindromique reconnue par un régulateur de type MerR a déjà été identifiée dans la région promotrice de *cad*A1, suggérant que la régulation est sous le contrôle d'au moins un régulateur de la famille MerR (Brown *et al.,* 2003).

Les études de mutagenèse par délétion de *cad*A1 ont démontré que *cad*A1 semblait essentiel pour maintenir une résistance maximale au Zn chez *M. metallidurans.* Les travaux préliminaires concernant l'étude de l'expression de *cad*A1 dans les nodosités d'*Anthyllis*, ont montré que le gène semblait être exprimé dans les nodosités suite à une exposition au Zn. Ces deux résultats suggèrent que le Zn entrerait dans la nodosité et que *cad*A1 jouerait probablement un rôle au cours de la symbiose avec *Anthyllis*. Pour vérifier cette hypothèse, il serait important de tester pour la nodulation et la fixation d'azote chez *A. vulneraria* sur sol contaminé en métaux lourds, la souche STM 2683^T contenant le gène *cad*A1 délété et de la comparer avec la souche sauvage. On peut émettre l'hypothèse que *M. metallidurans* participerait à la tolérance métallique de la plante hôte en mobilisant plusieurs processus. La bactérie pourrait limiter l'entrée ou réduire la biodisponibilité des métaux lourds, (i) par séquestration ou efflux des métaux lourds lors de la phase de vie libre dans la rhizosphère (Blindauer *et al.,* 2002; Nies, 2003; Figueira *et al.,* 2005) et/ou (ii) par absorption des métaux lourds *via* les nodosités et séquestration dans les nodosités ou dans la plante (Chen *et al.,* 2008) et/ou (iii) en favorisant l'efflux des métaux lourds hors de la nodosité. Pour tester ces différentes hypothèses, il serait intéressant dans un premier temps, d'étudier l'expression de

*cad*A1 lors des différentes étapes de la nodulation, ce qui permettrait de mieux apprécier son rôle au cours de la symbiose. L'analyse fine de la localisation et de la spéciation du Zn dans la nodosité par des techniques de rayonnements synchrotrons (Sarret *et al.,* 2009), permettrait également d'évaluer l'impact des rhizobia métallicoles dans l'adaptation de la plante aux métaux lourds. La plante pourrait participer comme la bactérie à la détoxification de la rhizosphère grâce à divers mécanismes de chélation ou de compartimentation des métaux lourds (Saraswat and Rai, 2011). Des analyses de localisation et de spéciation du Zn et du Cd chez *Anthyllis* sont en cours de réalisation dans le cadre de l'ANR SyMetal (Rhizostabilisation de déblais miniers à fortes teneurs en métaux par des plantes METALlicoles associées à leurs microorganismes SYMbiotiques, CES 2010). Afin de mettre en avant la relation potentielle entre les gènes bactériens symbiotiques et les gènes d'adaptation aux métaux lourds, il serait judicieux de réaliser des études transcriptomiques en condition de symbiose métallicole. Les ARNs devraient être directement extraits dans les nodosités de plants d'*Anthyllis* préalablement formées dans un sol minier et leurs expressions seraient comparées à celles des ARNs extraits de nodosités obtenues à partir d'un sol non contaminé.

Par ailleurs, les travaux de mutagenèse ont montré que *cad*A1 seul ne conférait pas une résistance complète au Zn chez STM 2683^{T}, suggérant que la résistance complète de *M. metallidurans* n'est pas due à un seul déterminant génétique mais à plusieurs, interagissant entre eux, comme précédemment décrit notamment chez *Cupriavidus metallidurans* CH34 (Monchy *et al.,* 2007; Taghavi *et al.,* 2009; Monsieurs *et al.,* 2011). L'étude de la réponse transcriptionnelle face à un stress métallique Zn/Cd des deux souches de *Mesorhizobium* métallicoles et symbiotiques d'*Anthyllis* (STM 2683 et 4661) a révélé l'expression de gènes impliqués (i) dans la séquestration intracellulaire ou extracellulaire (protéines à doigts de Zn et/ou riches en cystéines et histidines (Blindauer *et al.,* 2002; Yamamoto, 2005)), (ii) dans la précipitation des métaux lourds en sels insolubles (Aiking *et al.,* 1982; Macaskie *et al.,* 2000), (iii) dans l'immobilisation des métaux lourds sur la membrane cellulaire (Kawaharada *et al.,* 2010; Zhang and Min, 2010) et (iv) dans l'efflux des métaux lourds (Nies, 2003) dont CadA1 identifié par l'approche de génétique moléculaire (chapitre II). Ces différentes fonctions appartiennent aux principales stratégies utilisées par les bactéries pour faire face à un stress métallique en exportant des métaux lourds ou en réduisant leur biodisponibilité (Nies, 1999). Le gène *opg*C codant pour une protéine membranaire catalysant le transfert d'un résidu succinyl sur la chaine du glucane périplasmique osmorégulé (Kawaharada *et al.,* 2010) a attiré plus particulièrement notre attention car il est significativement surexprimé en présence de Cd

dans les données RNAseq et n'a pour le moment jamais été décrit dans l'adaptation aux métaux lourds. Il semble alors être un bon candidat pour élaborer une étude fonctionnelle plus approfondie, car il est susceptible de lier des cations métalliques. Parmi les gènes mis en évidence dans les données RNAseq qui sont surexprimés en présence de Zn et/ou de Cd, le gène *cad*A1 (codant pour une P_{IB}-ATPase, chapitre II), *ccd*A (codant pour un cytochrome c), *czc*D/*zit*B (codant pour une protéine de type CDF) et le gène prédit (signal peptidase II, aspartique peptidase appartenant à la famille MEROPS A08) présentant un homologue chez la souche *C. metallidurans* CH34 impliqué dans la résistance au Pb, semblent présents uniquement chez les deux souches associées à *Anthyllis* et seraient absents dans les autres génomes de *Mesorhizobium* séquencés et disponibles dans les bases de données. Ces quatre gènes apparaissent être de bons candidats pouvant être utilisés comme marqueurs fonctionnels pour étudier la diversité et la répartition des souches de *Mesorhizobuim* associées à *Anthyllis* sur divers sites miniers français. La description fonctionnelle de l'ensemble de ces gènes identifiés chez les deux souches de *Mesorhizobium* métallicoles permettrait à long terme de développer des outils pour détecter de façon rapide et efficace des rhizobia métallicoles dans un sol contaminé en métaux lourds.

Actuellement au laboratoire, les génomes de deux autres souches de *Mesorhizobium*, proches de *M. metallidurans*, isolées des nodosités d'*A. vulneraria,* sont actuellement en cours de séquençage : il s'agit d'une souche sensible au Zn et au Cd (STM 4623 provenant de la périphérie de la mine des Avinières) et d'une souche sensible au Zn et de tolérance intermédiaire au Cd (STM 4647 provenant de la mine d'Eylie). Leur comparaison avec les génomes des deux souches de *Mesorhizobium* métallicoles déjà séquencés (STM 2683 provenant du site minier des Avinières et STM 4661 provenant du site miner d'Eylie) permettra d'identifier les gènes spécifiques d'adaptation aux métaux lourds chez *Mesorhizobium* associé à *Anthyllis* et d'étudier non seulement leur origine évolutive mais aussi d'identifier les gènes spécifiques liés à l'origine géographique (Eylie, Avinières). L'analyse des clusters de gènes de résistance aux métaux lourds au sein des génomes déjà séquencés de STM 2683 et 4661, nous apprend que l'origine de ces gènes semble être ancienne car il y a très peu de traces d'événements de transfert contrairement à ce qui a été observé chez *C. metallidurans* (Janssen *et al.,* 2010).

Adaptation potentielle des *Mesorhizobium* métallicoles aux antibiotiques

Les données RNAseq révèlent l'induction significative des gènes *mdt*C et *mdt*A codant pour des systèmes d'efflux de type RND, impliqués dans l'export de différents éléments chimiques

tels que les antibiotiques (chapitre III). La tolérance aux métaux lourds au sein d'un environnement pourrait contribuer à maintenir la tolérance à des antibiotiques (Spain, 2003; Baker-Austin *et al.,* 2006). Une exposition des bactéries aux métaux lourds co-sélectionnerait des souches tolérantes à des antibiotiques. Les milieux chargés en métaux peuvent donc être considérés comme de véritables réservoirs naturels de bactéries tolérantes à des antibiotiques, susceptibles d'émerger chez des bactéries cliniquement importantes (D'Costa *et al.,* 2007). Un problème de santé publique pourrait apparaitre si la bactérie devenait potentiellement dangereuse pour l'Homme car il serait alors difficile de l'éliminer en utilisant des antibiotiques. Pour tester l'hypothèse d'une co-sélection, il serait nécessaire d'étudier et de comparer la tolérance à des antibiotiques de souches de *Mesorhizobium* tolérantes aux métaux lourds avec celle des souches sensibles. Des travaux préliminaires avaient révélé que les isolats bactériens tolérants à de fortes concentrations en Zn et en Cd isolés de nodosités d'*Anthyllis* sur sol minier, étaient aussi tolérants à de fortes concentrations en antibiotiques tels que l'érythromycine, la tétracycline et la carbenicilline ; antibiotiques impliqués dans la synthèse des protéines (érythromycine et tétracycline) et de la paroi bactérienne (carbenicilline) (Vidal, 2008). D'autres travaux ont montré que certains déterminants géniques étaient à la fois impliqués dans l'export de métaux lourds et d'antibiotiques tels que les systèmes d'efflux appartenant à la famille RND (Nishino *et al.,* 2007). De plus, des mécanismes de co-résistance (les gènes impliqués sont physiquement présents sur le même élément génétique (Hasman and Aarestrup, 2002)) ou de résistance croisée (le même système génique peut exporter à la fois les métaux lourds et les antibiotiques (Mata *et al.,* 2000)) ou encore de co-régulation (un contaminant peut entrainer l'expression d'un gène conférant la résistance à un autre contaminant différent (Perron *et al.,* 2004)) ont été identifiés. Pour mettre en évidence des mécanismes de co-résistance, de résistance croisée ou de co-régulation chez les souches métallicoles de *Mesorhizobium,* il faudrait (i) identifier au sein des génomes bactériens les éléments génétiques susceptibles de porter les gènes de résistance aux métaux lourds et à des antibiotiques, (ii) de vérifier s'ils sont co-localisés sur ce même élément génétique, (III) de muter spécifiquement les gènes impliqués dans l'adaptation aux métaux lourds, et d'étudier le phénotype de tolérance à des antibiotiques, et enfin (iv) d'étudier l'expression par qPCR des gènes de résistance aux métaux lourds suite à une exposition aux antibiotiques et inversement, d'étudier l'expression de gènes de résistance à des antibiotiques suite à une exposition aux métaux lourds.

Impact de la contrainte métallique sur la composition et la diversité des populations symbiotiques associées à *Anthyllis vulneraria*

L'étude de la diversité des rhizobia associés à *A. vulneraria* issus de sites contenant différents degrés de pollution métallique (sites miniers : Avinières 1, St Bresson 1, Breinic et Eylie ; sites situés en périphérie des mines : Avinières 2 et St Bresson 2 ; sites non pollués : Col du Vent et La Prunarède) a montré que les sites miniers possèdent une signature phénotypique et phylogénétique spécifique et différente de celle des sites non pollués (chapitre IV).

Suite aux analyses phénotypiques de tolérance au Zn et au Cd, les sites miniers sont caractérisés par une forte proportion de rhizobia présentant une tolérance aux métaux (CMI ≥ 1 mM Zn) par rapport aux sites non pollués qui contiennent exclusivement des rhizobia sensibles (CMI ≤ 0.8 mM Zn), ce qui est en accord avec de précédentes études (Chaudri *et al.,* 2008; Delorme *et al.,* 2003). Concernant les sites localisés en périphérie des mines, ils présentent une plus forte teneur en azote et en carbone organique et ils sont moins contaminés en Zn et en Cd par rapport aux sites miniers expliquant le développement de rhizobia majoritairement sensibles (McGrath *et al.,* 1995). Cependant sur le site de St Bresson 2, une population de rhizobia tolérants aux métaux lourds a été identifiée probablement due à la pression de sélection exercée par la forte concentration en Pb (contamination accidentelle ou fond géochimique) qui est comparable à celle des sites miniers. La tolérance au Zn est souvent associée à celle du Cd et du Pb comme en témoigne certains transporteurs des métaux lourds de type P_{IB}-ATPase qui transportent à la fois le Zn, le Cd et le Pb (Nies, 2003). La présence de rhizobia tolérants aux métaux lourds ainsi que leur proportion par rapport aux rhizobia sensibles peuvent être un bio-indicateur de l'état de contamination d'un sol et en particulier un bio-indicateur de la biodisponibilité et donc de la toxicité des métaux lourds (Diaz-Ravina and Baath, 2001).

La présence de phénotype de tolérance est généralement due à l'acquisition de gènes impliqués dans l'adaptation aux métaux lourds notamment ceux codant pour des systèmes d'efflux (Lakzian *et al.,* 2002). Le gène *cad*A1 précédemment identifié chez la souche STM 2683^T de *M. metallidurans* (chapitre II) a été détecté par amplification PCR chez tous les rhizobia tolérants aux métaux lourds (fortement et de niveau intermédiaire) des sites miniers et de St Bresson 2 (dans le cas de la population tolérante aux métaux) alors qu'il n'a pas été détecté au sein des rhizobia sensibles des sites non pollués ou périphériques. Récemment, nous avons obtenu la séquence génomique de la souche sensible au Zn et au Cd provenant des Avinières 2 (STM 4623). *cad*A1 n'a pas été retrouvé par BLAST dans le génome, ce qui va dans le sens d'une absence de ce gène au sein des symbiotes sensibles d'*Anthyllis*. Avec 100

% de détection dans les populations de rhizobia tolérantes et de tolérance intermédiaires au Zn et/ou Cd, *cad*A1 apparait alors être un marqueur efficace pour détecter des souches tolérantes ce qui ne semble pas être le cas pour d'autres marqueurs tels que *czc* utilisé pour détecter des souches métallicoles de *Cupriavidus eutrophus* dans différents sites pollués en métaux lourds (Diels *et al.,* 1995). En plus de *cad*A1, nous avons identifié d'autres gènes intéressants au cours de l'approche transcriptomique qui apparaissaient être spécifiques aux deux souches de *Mesorhizobium* métallicoles associées à *Anthyllis*, STM 2683 et 4661 (chapitre III). Parmi eux, trois gènes (*ccd*A, *zit*B/*czc*D et le gène prédit avec un signal peptidase II, peptidase aspartique appartenant à la famille MEROPS A08) sont présents uniquement dans les génomes des deux souches de *Mesorhizobium* métallicoles associées à *Anthyllis* (STM 2683, 4661) et absents dans les autres génomes de *Mesorhizobium* (chapitre III). Ils apparaissent alors intéressants pour être utilisés également comme marqueurs de détection de rhizobia tolérants associés à *Anthyllis,* en plus de *cad*A1. Avant de pouvoir les utiliser comme tels, il faudrait vérifier leur fonctionnalité dans l'adaptation aux métaux lourds puis confirmer leur spécificité chez les rhizobia métallicoles en les recherchant par PCR ou hybridation au sein des souches étudiées d'*Anthyllis*. L'ensemble de ces marqueurs de tolérance pourraient être alors intégré dans une puce à ADN de type fonctionnelle (Frye *et al.,* 2010), en plus de marqueurs symbiotiques, ce qui nous permettrait facilement de rechercher au sein d'un échantillon de sol ou de rhizosphère, des bactéries potentiellement tolérantes aux métaux lourds et fixatrices d'azote.

Suite aux analyses phylogénétiques, l'espèce *M. metallidurans* précédemment décrite au sein de la mine des Avinières (Vidal *et al.,* 2009) est aussi présente dans 100 % des souches étudiées dans le site minier de St Bresson 1 et à sa périphérie et aussi à 88 % au sein du site de Breinic. Concernant le site d'Eylie, les rhizobia semblent séparés du cluster des *M. metallidurans* (selon la phylogénie *atp*D) bien qu'ils soient aussi tolérants aux métaux lourds. L'analyse d'autres marqueurs de gènes de ménage et la réalisation d'hybridation ADN-ADN doivent être effectuées pour confirmer l'appartenance de ces souches à *M. metallidurans* ou à une nouvelle espèce de *Mesorhizobium* tolérants aux métaux lourds. Les sites miniers de Breinic et d'Eylie contiennent aussi une plus faible proportion de souches appartenant au genre *Aminobacter* (12 % et 31 %, respectivement) qui ont été précédemment décrites comme une nouvelle espèce d'*Aminobacter* nodulant *A. vulneraria* (*Aminobacter anthyllidis*, Maynaud *et al.,* 2012). Les sites non pollués présentent quant à eux, une composition bactérienne différente de celle des sites miniers, avec probablement plusieurs nouvelles espèces de *Mesorhizobium* sensibles aux métaux lourds et proches des espèces de *M. robinia,*

M. temperatum et *M. mediterraneum* (selon la phylogénie de l'ADNr 16S). Sur la base des résultats de l'ADNr 16S, les sites miniers de Breinic et d'Eylie contiennent une diversité bactérienne (en terme de nombre de groupes phylogénétiques) qui est comparable à celle des sites non pollués alors que les sites des Avinières 1 et de St Bresson 1 contiennent une diversité plus restreinte avec la présence exclusivement à l'espèce de *M. metallidurans*. Les sols des Avinières 1 et de St Bresson 1 sont beaucoup plus contaminés en Zn et en Cd et contiennent moins d'azote et de carbone organique que les sites de Breinic et d'Eylie, ce qui les rend beaucoup plus toxiques pour les organismes vivants. La forte toxicité en métaux lourds dans le sol pourrait alors expliquer la réduction de diversité bactérienne comme cela a été montré par Gan *et al,* (2005).

La plante hôte influence la répartition des populations symbiotiques associées à *Anthyllis vulneraria*

Contrairement aux analyses taxonomiques qui montrent que la contamination métallique exercée par les environnements miniers influence la composition et la diversité des symbiotes d'*Anthyllis*, l'analyse des gènes symbiotiques tels que *nod*A met en évidence un comportement symbiotique différent entre les isolats bactériens indépendamment de la contamination métallique des sites étudiés (chapitre IV). En effet, toutes les souches provenant des sites cévenols, métallicoles ou non, à l'exception du site de St Bresson, ont la particularité de posséder une double copie du gène de nodulation *nod*A, proche phylogénétiquement de la double copie *nod*A des souches isolées de *Biserrula pelecinus* (Nandasena *et al.,* 2009) ; légumineuse appartenant à la tribu des Galegae proche de celle des Lotae contenant les espèces *Anthyllis* et *Lotus.* En revanche, les souches provenant des trois autres sites miniers (Eylie, Breinic et St Bresson) possèdent une seule copie *nodA* proche de celle du biovar *loti.* Ce résultat traduit potentiellement un comportement symbiotique différent des souches envers *Lotus* et *Anthyllis*. Des travaux ont déjà montré que la plante hôte pouvait influencer la répartition des bactéries selon sa propre répartition (Jebara *et al.,* 2001 ; Stepkowski *et al.,* 2011). Des tests de nodulation préliminaires menés au laboratoire ont montré que deux souches possédant les doubles copies *nod*A ne nodulent pas *Lotus* alors que deux autres souches ne possédant qu'une seule copie nodulant fortement *Lotus* (Mohamad, 2012). Cependant aucune différence de nodulation sur *Anthyllis* n'a été détectée sur ces quatre souches bactériennes. Pour compléter ce travail déjà initié, il serait intéressant de réaliser des inoculations croisées entre *Anthyllis* et *Lotus* avec un plus grand nombre de souches bactériennes afin de vérifier que la présence de la double copie *nod*A est spécifique de la

symbiose avec *Anthyllis*. *Lotus* est répandue sur les sites d'Eylie, de St Bresson et de Breinic, alors qu'aucune espèce n'a été retrouvée sur le site minier des Avinières. Des souches associées à *Lotus* ont pu transférer leur îlot symbiotique portant les gènes de nodulation à des souches de *Mesorhizobium* associées à *Anthyllis* par transfert horizontal comme cela a été démontré par Sullivan *et al.* (2002). La comparaison des deux génomes en cours de séquençage des souches STM 4623 et 4647 avec ceux des deux souches de *Mesorhizobium* métallicoles déjà séquencés (STM 2683 et 4661) permettra d'étudier l'origine évolutive des gènes symbiotiques par la recherche et la caractérisation de l'îlot symbiotique (Mohamad, thèse en cours). De plus, la présence de deux gènes *nod*A au sein des rhizobia est assez rare : outre les mesorhizobia associés à *Anthyllis*, la double copie *nod*A a été observée chez d'autres rhizobia tels que les mesorhizobia de *B. pelecinus* (Nandasena *et al.,* 2009) et des *Rhizobium* isolés de *Mimosa* en Guinée française. Cependant leur rôle fonctionnel n'a pas été élucidé (Mishra *et al.,* 2012). Pour mieux comprendre le rôle fonctionnel de ces deux copies, il serait intéressant de les muter distinctement et d'étudier leurs effets sur la symbiose et la fixation d'azote chez *A. vulneraria* et chez d'autres légumineuses phylogénétiquement proches.

Le cas du site minier Zn-Pb d'Eylie dans les Pyrénées ariégeoises

Le site minier d'Eylie possède des caractéristiques communes avec les autres sites miniers des Avinières, de St Bresson et de Breinic, telles que le fond géochimique riche en Zn, Pb et Cd et la présence d'un écotype métallicole d'*A. vulneraria* associé à des souches bactériennes de *Mesorhizobium* ou d'*Aminobacter* tolérantes aux métaux lourds. Cependant la diversité et la composition bactérienne du site d'Eylie apparait différente de celle observée au sein des autres sites miniers (chapitre IV). Les souches de *Mesorhizobium* isolées semblent appartenir à une espèce bactérienne non décrite, différente de *M. metallidurans* laquelle a été isolée dans les autres sites miniers. Des relevés préliminaires effectués sur le site d'Eylie ont montré la présence d'autres légumineuses telles que *L. corniculatus* et *A. vulneraria* subsp. *boscii*. L'analyse des nodosités (Vidal, 2008) ont montré que ces dernières semblaient s'associer à des rhizobia appartenant à plusieurs genres bactériens (*Rhizobium, Mesorhizobium et Bradyrhizobium*), contrairement au site des Avinières où a été piégé avec la seule légumineuse présente *A. vulneraria* subsp. *carpatica*, une seule espèce de bactéries symbiotiques : *M. metallidurans*. La composition bactérienne du site minier d'Eylie peut aussi s'expliquer par les conditions pédoclimatiques propres au site. Eylie possède des caractéristiques particulières par rapport aux autres sites étudiés telles que le climat qui est plus humide. Plusieurs travaux ont montré que la répartition, la diversité et la composition

microbienne variaient en fonction des facteurs environnementaux tels que le climat (Castro *et al.,* 2010), le type et la structure du sol (Latour *et al.,* 1996; Dalmastri *et al.,* 1999), le pH (Fierer and Jackson, 2006) ou des facteurs biotiques tels que les plantes hôtes (Jebara *et al.,* 2001). Chaque plante sélectionne une population microbienne qui lui est spécifique avec notamment la sécrétion d'exsudats racinaires (Berg and Smalla, 2009). Afin de déterminer si la diversité des rhizobia métallicoles observée à Eylie est liée à la nature des légumineuses hôtes utilisées pour le piégeage bactérien ou bien si elle correspond à la diversité microbienne intrinsèque des sites, il serait judicieux d'étudier la diversité des rhizobia présente sur le site d'Eylie après piégeage avec toutes les légumineuses du site. Des marqueurs chromosomiques (ADNr 16S, *rec*A, *atp*D, *dna*K) et symbiotiques (*nod*A, *nod*C) seront annalysés afin d'avoir une meilleure représentativité de la diversité bactérienne associée à ce site et ainsi pouvoir la comparer avec celle des Avinières. Il serait également intéressant de compléter notre étude en utilisant les légumineuses d'Eylie pour piéger les rhizobia des Avinières et inversement, d'utiliser la légumineuse du site des Avinières pour piéger les rhizobia d'Eylie. L'exemple du site minier d'Eylie (échec de la végétalisation suite à des travaux de génie civil suivi d'un ensemencement avec des espèces végétales non adaptées au site) démontre qu'il est important pour revégétaliser de façon efficace et durable les sites miniers, d'utiliser des espèces végétales et microbiennes natives du site en question, qui seront beaucoup mieux adaptées aux conditions pédoclimatiques et donc beaucoup plus performantes pour les stratégies de phytostabilisation.

En conclusion, ce travail de thèse a permis d'identifier une liste de déterminants génétiques de *M. metallidurans* potentiellement impliqués dans sa tolérance aux conditions métalliques extrêmes des environnements miniers. Grâce à l'identification de ces déterminants, nous pourrons désormais étudier leur importance dans l'adaptation au Zn et au Cd (efflux, séquestration) par une approche de mutagenèse dirigée telle que celle décrite pour la P_{IB}-ATPase CadA1. L'ensemble de ces mécanismes d'adaptation peuvent être utilisés par la bactérie pour détoxifier le milieu des métaux lourds toxiques à la fois dans le sol et peut être au sein de la nodosité pouvant ainsi favoriser l'installation et le développement d'*A. vulneraria*. Cette dernière a été décrite comme facilitant l'installation d'autres espèces végétales et elle apparaît alors très utile dans une stratégie de revégétalisation. Ce travail a également permis de montrer que la pression de sélection exercée par les métaux lourds présents dans les sols miniers influence la composition et la diversité taxonomique des symbiotes d'*Anthyllis*, alors que la plante

hôte semble plutôt influencer la diversité symbiotique, indépendamment du phénotype de tolérance aux métaux lourds. Les propriétés intrinsèques de chaque site ont aussi un impact sur la répartition des isolats bactériens. Ce travail confirme l'importance et l'intérêt des espèces végétales natives et met en exergue la nécessité de prendre en compte les microorganismes associés aux plantes et adaptés aux conditions environnementales locales pour revégétaliser de façon efficace et durable les anciens sites miniers contaminés par les métaux lourds.

Références bibliographiques

Abou-Shanab, R.A.I., van Berkum, P., and Angle, J.S. (2007) Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. Chemosphere 68: 360-367.

Ahmad, E., Zaidi, A., Khan, M.S., and Oves, M. (2012) Heavy metal toxicity to symbiotic nitrogen-fixing microorganism and host legumes. *In* Toxicity of Heavy Metals to Legumes and Bioremediation, Springer-Verlag/Wien, pp. 29-44.

Aiking, H., Kok, K., van Heerikhuizen, H., and van 't Riet, J. (1982) Adaptation to cadmium by *Klebsiella aerogenes* growing in continuous culture proceeds mainly via formation of cadmium sulfide. Applied and Environmental Microbiology 44: 938-944.

Ampomah, O.Y., and Huss-Danell, K. (2011) Genetic diversity of root nodule bacteria nodulating *Lotus corniculatus* and *Anthyllis vulne*raria in Sweden. Systematic and Applied Microbiology 34: 267-275.

Anders, S., and Huber, W. (2010) Differential expression analysis for sequence count data. Genome Biology 11: R106.

Andreini, C., Bertini, I., Cavallaro, G., Holliday, G., and Thornton, J. (2008) Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. Journal of Biological Inorganic Chemistry 13: 1205-1218.

Andrews, J.M. (2001) Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 48, 5-16.

Anton, A., Grosse, C., Reissmann, J., Pribyl, T., and Nies, D.H. (1999) CzcD is a heavy metal ion transporter involved in regulation of heavy metal resistance in *Ralstonia* sp. strain CH34. Journal of Bacteriology 181: 6876-6881.

Arguello, J.M. (2003) Identification of ion-selectivity determinants in heavy-metal transport P1B-type ATPases. Journal of Membrane Biology 195: 93-108.

Axelsen, K.B., and Palmgren, M.G. (1998) Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. Journal of Molecular Evolution 46: 84-101.

Azmat, R., Hayat, A., Khanum, T., Talat, R., and Uddin, F. (2006) The inhibition of bean plant metabolism by Cd metal and atrazine III: effect of seaweed *Codium iyengarii* on metal, herbicide toxicity and rhizosphere of the soil. Biotechnology 5: 85-89.

Baath, E. (1992) Measurement of heavy metal tolerance of soil bacteria using thymidine incorporation into bacteria extracted after homogenization-centrifugation. Soil Biology and Biochemistry 24: 1167-1172.

Baath, E., Diaz-Ravina, M., Frostegard, A., and Campbell, C.D. (1998) Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. Applied and Environmental Microbiology 64: 238-245.

Baize, D. (1997) Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols. Etude et gestion des sols 4: 77-94.

Baker, A.J.M. (1981) Accumulators and excluders strategies in the response of plants to heavy metals. Journal of Plant Nutrition 3: 643-654.

Baker-Austin, C., Wright, M.S., Stepanauskas, R., and McArthur, J.V. (2006) Co-selection of antibiotic and metal resistance. Trends in Microbiology 14: 176-182.

Bal, N., Mintz, E., Guillain, F., and Catty, P. (2001) A possible regulatory role for the metal-binding domain of CadA, the *Listeria monocytogenes* Cd^{2+}-ATPase. FEBS Letters 506: 249-252.

Balestrasse, K.B., Gallego, S.M., and Tomaro, M.L. (2004) Cadmium-induced senescence in nodules of soybean (*Glycine max* L.) plants. Plant and Soil 262: 373-381.

Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Su, X.-C., Miras, R., Bal, N. *et al.* (2006) Structural basis for metal binding specificity: the N-terminal Cadmium Binding Domain of the P1-type ATPase CadA. Journal of Molecular Biology 356: 638-650.

Bani, A., Echevarria, G., Sulçe, S., Morel, J., and Mullai, A. (2007) In-situ phytoextraction of Ni by a native population of *Alyssum murale* on an ultramafic site (Albania). Plant and Soil 293: 79-89.

Barzanti, R., Colzi, I., Arnetoli, M., Gallo, A., Pignattelli, S., Gabbrielli, *et al.* (2011) Cadmium phytoextraction potential of different *Alyssum* species. Journal of Hazardous Materials 196: 66-72.

Bauer, D.W., and Collmer, A. (1997) Molecular cloning, characterization, and mutagenesis of a *pel* gene from *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* encoding a Member of the *Erwinia chrysanthemi* PelADE family of pectate lyases. Molecular Plant-Microbe Interactions 10: 369-379.

Beard, S.J., Hashim, R., Membrillo-Hernandez, J., Hughes, M.N., and Poole, R.K. (1997) Zinc(II) tolerance in *Escherichia coli* K-12: evidence that the *znt*A gene (o732) encodes a cation transport ATPase. Molecular Microbiology 25; 883-891.

Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995) Controlling the False Discovery Rate - a practical and powerful approach to multiple testing. Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological) 57: 289-300.

Berg, G., and Smalla, K. (2009) Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. FEMS Microbiology Ecology 68: 1-13.

Beringer, J.E. (1974) R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. Journal of General Microbiology 84: 188-198.

Bianucci, E., Fabra, A., and Castro, S. (2010) Cadmium accumulation and tolerance in *Bradyrhizobium* spp. (peanut microsymbionts). Current Microbiology 61: 96-100.

Binet, M.R.B., and Poole, R.K. (2000) Cd(II), Pb(II) and Zn(II) ions regulate expression of the metal-transporting P-type ATPase ZntA in *Escherichia coli*. FEBS Letters 473: 67-70.

Bissig, K.D., Wunderli-Ye, H., Duda, P.W., and Solioz, M. (2001) Structure-function analysis of purified *Enterococcus hirae* CopB copper ATPase: effect of Menkes/Wilson disease mutation homologues. Biochemistry Journal 357: 217-223.

Bizily, S.P., Rugh, C.L., Summers, A.O., and Meagher, R.B. (1999) Phytoremediation of methylmercury pollution: *mer*B expression in *Arabidopsis thaliana* confers resistance to organomercurials. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 96: 6808-6813.

Black, M., Moolhuijzen, P., Chapman, B., Barrero, R., Howieson, J., Hungria, M., *et al*. (2012) The genetics of symbiotic nitrogen fixation: comparative genomics of 14 rhizobia strains by resolution of protein clusters. Genes 3: 138-166.

Blencowe, D.K., and Morby, A.P. (2003) Zn(II) metabolism in prokaryotes. FEMS Microbiology Reviews 27: 291-311.

Blindauer, C.A., Harrison, M.D., Robinson, A.K., Parkinson, J.A., Bowness, P.W., Sadler, P.J., *et al.* (2002) Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like zinc fingers. Molecular Microbiology 45: 1421-1432.

Bolhuis, H., van Veen, H.W., Poolman, B., Driessen, A.J.M., and Koning, W.N. (1997) Mechanisms of multidrug transporters. FEMS Microbiology Reviews 21: 55-84.

Broadley, M.R., White, P.J., Hammond, J.P., Zelko, I., and Lux, A. (2007) Zinc in plants. New Phytologist 173: 677-702.

Brocklehurst, K.R., Hobman, J.L., Lawley, B., Blank, L., Marshall, S.J., Brown, N.L., *et al.* (1999) ZntR is a Zn(II)-responsive MerR-like transcriptional regulator of *znt*A in *Escherichia coli*. Molecular Microbiology 31: 893-902.

Brocklehurst, K.R., Megit, S.J., and Morby, A.P. (2003) Characterisation of CadR from *Pseudomonas aeruginosa*: a Cd(II)-responsive MerR homologue. Biochemical and Biophysical Research Communications 308: 234-239.

Brooks, R.R. (1998) Geobotany and hyperaccumulators. Plants That Hyperaccumulate Heavy Metals, CAB International, Wallingford, UK.

Broos, K., Beyens, H., and Smolders, E. (2005) Survival of rhizobia in soil is sensitive to elevated zinc in the absence of the host plant. Soil Biology and Biochemistry 37: 573-579.

Brown, N.L., Stoyanov, J.V., Kidd, S.P., and Hobman, J.L. (2003) The MerR family of transcriptional regulators. FEMS Microbiology Reviews 27: 145-163.

Bruins, M.R., Kapil, S., and Oehme, F.W. (2000) Microbial resistance to metals in the environment. Ecotoxicology and Environmental Safety 45: 198-207.

Busenlehner, L.S., Pennella, M.A., and Giedroc, D.P. (2003) The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: structural insights into prokaryotic metal resistance. FEMS Microbiology Reviews 27: 131-143.

Carrasco, J.A., Armario, P., Pajuelo, E., Burgos, A., Caviedes, M.A., Lopez, R. *et al.* (2005) Isolation and characterization of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcollar pyrite mine. Soil Biology and Biochemistry 37: 1131-1140.

Castro, I.V., Ferreira, E.M., and McGrath, S.P. (1997) Effectiveness and genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* isolates in Portuguese soils polluted by industrial effluents. Soil Biology and Biochemistry 29: 1209-1213.

Castro, H.F., Classen, A.T., Austin, E.E., Norby, R.J., and Schadt, C.W. (2010) Soil Microbial Community Responses to Multiple Experimental Climate Change Drivers. Applied and Environmental Microbiology 76: 999-1007.

Chaintreuil, C., Rigault, F., Moulin, L., Jaffre, T., Fardoux, J., Giraud, E. *et al.* (2007) Nickel resistance determinants in *Bradyrhizobium* from the endemic new-caledonian legume *Serianthes calycina*. Applied and Environmental Microbiology 73: 8018–8022.

Chaney, R.L., Angle, J.S., Broadhurst, C.L., Peters, C.A., Tappero, R.V., and Sparks, D.L. (2007) Improved understanding of hyperaccumulation yields commercial phytoextraction and phytomining technologies. Journal of Environmental Quality 36: 1429-1443.

Chaudhary, P., Dudeja, S.S., and Kapoor, K.K. (2004) Effectivity of host-*Rhizobium leguminosarum* symbiosis in soils receiving sewage water containing heavy metals. Microbiological Research 159: 121-127.

Chaudri, A., McGrath, S., Gibbs, P., Chambers, B., Carlton-Smith, C., Bacon, J. *et al.* (2008) Population size of indigenous *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in long-term field experiments with sewage sludge cake, metal-amended liquid sludge or metal salts: Effects of zinc, copper and cadmium. Soil Biology and Biochemistry 40: 1670-1680.

Chen, W.X., Li, G.S., Qi, Y.L., Wang, E.T., Yuan, H.L., and Li, J.L. (1991) *Rhizobium huakuii* sp. nov. Isolated from the Root Nodules of *Astragalus sinicus*. International Journal of Systematic Bacteriology 41: 275-280.

Chen, W., and Kuo, T. (1993) A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. Nucleic acids research 21: 2260.

Chen, W.-M., Wu, C.-H., James, E.K., and Chang, J.-S. (2008) Metal biosorption capability of *Cupriavidus taiwanensis* and its effects on heavy metal removal by nodulated *Mimosa pudica*. Journal of Hazardous Materials 151: 364-371.

Choudhary, S., and Sar, P. (2009) Characterization of a metal resistant *Pseudomonas* sp. isolated from uranium mine for its potential in heavy metal (Ni^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, and Cd^{2+}) sequestration. Bioresource Technology 100: 2482-2492.

Clark, R.B. (2001) Metals. *In* Marine Pollution 5th Ed. Oxford University press, Oxford, pp. 98-125.

Clemens, S. (2006) Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. Biochimie 88: 1707-1719.

Coleman, J.E. (1992) Zinc Proteins: Enzymes, Storage Proteins, Transcription Factors, and Replication Proteins. Annual Review of Biochemistry 61: 897-946.

Crossman, L., Gould, V., Dow, J.M., Vernikos, G., Okazaki, A., Sebaihia, M. *et al.* (2008) The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. Genome Biology 9: R74.

D'Costa, V.M., Griffiths, E., and Wright, G.D. (2007) Expanding the soil antibiotic resistome: exploring environmental diversity. Current Opinion in Microbiology 10: 481-489.

Dakora, F., and Phillips, D. (2002) Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. Plant and Soil 245: 35-47.

Dalmastri, C., Chiarini, L., Cantale, C., Bevivino, A., and Tabacchioni, S. (1999) Soil type and maize cultivar affect the genetic diversity of maize root–associated *Burkholderia cepacia;* populations. Microbial Ecology 38: 273-284.

Dary, M., Chamber-Pérez, M.A., Palomares, A.J., and Pajuelo, E. (2010) "In situ" phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. Journal of Hazardous Materials 177: 323-330.

Degefu, T., Wolde-Meskel, E., and Frostegard, A. (2011) Multilocus sequence analyses reveal several unnamed *Mesorhizobium* genospecies nodulating *Acacia* species and *Sesbania*

sesban trees in Southern regions of Ethiopia. Systematic and Applied Microbiology 34: 216-226.

de Lajudie, P., Willems, A., Nick, G., Moreira, F., Molouba, F., Hoste, B. *et al.* (1998) Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarium* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 48: 369-382.

Delorme, T.A., Gagliardi, J.V., Angle, J.S., and Chaney, R.L. (2001) Influence of the zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl. and the nonmetal accumulator *Trifolium pratense* L. on soil microbial populations. Canadian Journal of Microbiology 47: 773-776.

Delorme, T.A., Gagliardi, J.V., Angle, J.S., van Berkum, P., and Chaney, R.L. (2003) Phenotypic and genetic diversity of rhizobia isolated from nodules of clover grown in a zinc and cadmium contaminated soil. Soil Science Society of America Journal 67: 1746-1754.

Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., *et al*. (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. Nucleic acids research 36: W465-W469.

de Souza, M.P., Huang, C.P.A., Chee, N., and Terry, N. (1999) Rhizosphere bacteria enhance the accumulation of selenium and mercury in wetland plants. Planta 209: 259-263.

Dessureault-Rompre, J., Nowack, B., Schulin, R., Tercier-Waeber, M.-L., and Luster, J. (2008) Metal solubility and speciation in the rhizosphere of *Lupinus albus* cluster roots. Environmental Science & Technology 42: 7146-7151.

Diaz-Ravina, M., and Baath, E. (2001) Response of soil bacterial communities pre-exposed to different metals and reinoculated in an unpolluted soil. Soil biology and biochemistry 33: 241 – 248.

Dickstein, R., Bisseling, T., Reinhold, V.N., and Ausubel, F.M. (1988) Expression of nodule-specific genes in alfalfa root nodules blocked at an early stage of development. Genes & Development 2: 677-687.

Diels, L., and Mergeay, M. (1990) DNA probe-mediated detection of resistant bacteria from soils highly polluted by heavy metals. Applied and Environmental Microbiology 56: 1485-1491.

Diels, L., Dong, Q., van der Lelie, D., Baeyens, W., and Mergeay, M. (1995) The *czc* operon of *Alcaligenes eutrophus* CH34: from resistance mechanism to the removal of heavy metals. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 14: 142-153.

Doronina, N.V., Kaparullina, E.N., Trotsenko, Y.A., Nortemann, B., Bucheli-Witschel, M., Weilenmann, H.-U., *et al.* (2009) *Chelativorans multitrophicus* gen. nov., sp. nov. and

Chelativorans oligotrophicus sp. nov., aerobic, EDTA-degrading bacteria. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 60: 1044-1051.

Doyle, J.J., and Luckow, M.A. (2003) The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. Plant Physiology 131: 900-910.

Durfee, T., Nelson, R., Baldwin, S., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., *et al.* (2008) The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. Journal of Bacteriology 190: 2597-2606.

Duruibe, J.O., Ogwuegbu, M. O. C., and Egwurugwu, J. N. (2007) Heavy metal pollution and human biotoxic effects. International Journal of Physical Sciences 2: 112-118.

Dushenkov, V., Kumar, P.B.A.N., Motto, H., and Raskin, I. (1995) Rhizofiltration: The use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. Environmental Science & Technology 29: 1239-1245.

Dutta, S.J., Liu, J., Hou, Z., and Mitra, B. (2006) Conserved aspartic Aaid 714 in transmembrane segment 8 of the ZntA subgroup of P1B-Type ATPases is a metal-binding residue. Biochemistry 45: 5923-5931.

Endo, G., and Silver, S. (1995) CadC, the transcriptional regulatory protein of the cadmium resistance system of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. Journal of Bacteriology 177: 4437-4441.

Epelde, L., Becerril, J.M., Kowalchuk, G.A., Deng, Y., Zhou, J., and Garbisu, C. (2010) Impact of metal pollution and *Thlaspi caerulescens* growth on soil microbial communities. Applied and Environmental Microbiology 76: 7843-7853.

Escarré, J., Lefebvre, C., Gruber, W., Leblanc, M., Lepart, J., Riviere, Y.*, et al.* (2000) Zinc and cadmium hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens* from metalliferous and nonmetalliferous sites in the Mediterranean area: implications for phytoremediation. New Phytologist 145: 429-437.

Escarré, J., Lefebvre, C., Raboyeau, S., Dossantos, A., Gruber, W., Cleyet-Marel, J.-C., *et al.* (2011) Heavy metal concentration survey in soils and plants of the Les Malines mining district (southern France): implications for soil restoration. Water, Air, and Soil Pollution 216: 485-504.

Estrella, M.J., Munoz, S., Soto, M.J., Ruiz, O., and Sanjuan, J. (2009) Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado river basin (Argentina). Applied and Environmental Microbiology 75: 1088-1098.

Fabianek, R.A., Hennecke, H., Thony-Meyer, L. (2000) Periplasmic protein thiol: disulfide oxidoreductases of *Escherichia coli*. FEMS Microbiology Review 24: 303-316.

Fan, B., and Rosen, B.P. (2002) Biochemical characterization of CopA, the *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. Journal of Biological Biochemistry 49: 46987-46992.

Ferguson, B.J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M.-H., Lin, Y.-H., Reid, D.E., *et al.* (2010) Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. Journal of Integrative Plant Biology 52: 61-76.

Fierer, N., and Jackson, R.B. (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 103: 626-631.

Figueira, E.M.d.A.P., Gusmão Lima, A.I., and Pereira, S.I.A. (2005) Cadmium tolerance plasticity in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*: glutathione as a detoxifying agent. Canadian Journal of Microbiology 51: 7-14.

Fong, S.T., Camakaris, J., and Lee, B.T.O. (1995) Molecular-genetics of a chromosomal locus involved in copper tolerance in *Escherichia coli* K-12. Molecular Microbiology 15: 1127-1137.

Franche, C., Lindström, K., and Elmerich, C. (2009) Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. Plant and Soil 321: 35-59.

Frérot, H., Lefèbvre, C., Gruber, W., Colin, C., Santos, A.D., and Escarré, J. (2006) Specific interaction between local metallicolous plants improve the phytostabilization of mine soils. Plant and Soil 282: 53-65.

Frye, J.G., Lindsey, R.L., Rondeau, G., Porwollik, S., Long, F., McClelland, M. *et al.* (2010) Development of a DNA microarray to detect antimicrobial resistance genes identified in the National Center for Biotechnology Information database. Microbial Drug Resistance 16: 9-19.

Futamata, H., Nagano, Y., Watanabe, K., and Hiraishi, A. (2005) Unique kinetic properties of phenol-degrading variovorax strains responsible for efficient trichloroethylene degradation in a chemostat enrichment culture. Applied and Environmental Microbiology 71: 904-911.

Gabbianelli, R., Scotti, R., Ammendola, S., Petrarca, P., Nicolini, L., and Battistoni, A. (2011) Role of ZnuABC and ZinT in *Escherichia coli* O157:H7 zinc acquisition and interaction with epithelial cells. BMC Microbiology 11: 36.

Gad, N. (2006) Increasing the efficiency of nitrogen fertilization through cobalt application to pea plant. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 2: 433-442.

Gadd, G.M. (2010) Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. Microbiology 156: 609-643.

Galibert, F., Finan, T.M., Long, S.R., Pühler, A., Abola, P., Ampe, F. *et al.* (2001) The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. Science 293: 668-672.

Gans, J., Wolinsky, M., and Dunbar, J. (2005) Computational improvements reveal great gacterial diversity and high metal toxicity in soil. Science 309: 1387-1390.

Gaunt, M., Turner, S., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, S., and Young, J. (2001) Phylogenies of *atp*D and *rec*A support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51: 2037-2048.

Ghosh, M., and Singh, S.P. (2005) A Review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts. Applied Ecology and Environmental Research 3: 1-18.

Giller, K.E., Witter, E., and McGrath, S.P. (1998) Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. Soil Biology and Biochemistry 30: 1389-1414.

Giller, K.E., Witter, E., and McGrath, S.P. (2009) Heavy metals and soil microbes. Soil Biology and Biochemistry 41: 2031-2037.

Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, D., Barbe, V., Cytryn, E., Avarre, J.-C. *et al.* (2007) Legumes symbioses: absence of *nod* genes in photosynthetic bradyrhizobia. Science 316: 1307-1312.

Gisbert, C., Ros, R., De Haro, A., Walker, D.J., Pilar Bernal, M., Serrano, R., *et al.* (2003) A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation. Biochemical and Biophysical Research Communications 303: 440-445.

Gonzalez, V., Bustos, P., Ramirez-Romero, M., Medrano-Soto, A., Salgado, H., Hernandez-Gonzalez, I. *et al.* (2003) The mosaic structure of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 and its relation to other symbiotic genome compartments. Genome Biology 4: R36.

Gonzalez-Guerrero, M., and Arguello, J.M. (2008) Mechanism of Cu^{+}-transporting ATPases: Soluble Cu^{+} chaperones directly transfer Cu+ to transmembrane transport sites. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 105: 5992-5997.

Goris, J., De Vos, P., Caballero-Mellado, J., Park, J., Falsen, E., Quensen, J.F. *et al.* (2004) Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain $LB400^{T}$ and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54: 1677-1681.

Gowri, P.M., and Srivastava, S. (1996) Encapsulation as a response of *Azospirillum brasilense* sp7 to zinc stress. World Journal of Microbiology and Biotechnology 4: 319-322.

Graham, R.D., Ascher, J.S., and Hynes, S.C. (1992) Selecting zinc-efficient cereal genotypes for soils of low zinc status. Plant and Soil 146: 241-250.

Grass, G., Fan, B., Rosen, B.P., Lemke, K., Schlegel, H.-G., and Rensing, C. (2001a) NreB from *Achromobacter xylosoxidans* 31A is a nickel-induced transporter conferring nickel resistance. Journal of Bacteriology 183: 2803-2807.

Grass, G., Fan, B., Rosen, B.P., Franke, S., Nies, D.H., and Rensing, C. (2001b) ZitB (YbgR), a member of the Cation Diffusion Facilitator family, is an additional zinc transporter in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 183: 4664-4667.

Gruber, N., and Galloway, J.N. (2008) An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. Nature 451: 293-296.

Hakkila, K.M., Nikander, P.A., Junttila, S.M., Lamminmäki, U.J., and Virta, M.P. (2011) Cd-specific mutants of mercury-sensing regulatory protein MerR, generated by directed evolution. Applied and Environmental Microbiology 77: 6215-6224.

Hanson, B., Garifullina, G.F., Lindblom, S.D., Wangeline, A., Ackley, A., Kramer, K. *et al.* (2003) Selenium accumulation protects *Brassica juncea* from invertebrate herbivory and fungal infection. New phytologist 159: 461-469.

Hantke, K. (2001) Bacterial zinc transporters and regulators. BioMetals 14: 239-249.

Hao, X., Lin, Y., Johnstone, L., Baltrus, D.A., Miller, S.J., Wei, G., *et al.* (2012) Draft genome sequence of plant growth-promoting rhizobium *Mesorhizobium amorphae*, isolated from zinc-lead mine tailings. Journal of Bacteriology 194: 736-737.

Hasman, H., and Aarestrup, F.M. (2002) *tcr*B, a gene conferring transferable copper resistance in *Enterococcus faecium*: occurrence, transferability, and linkage to macrolide and glycopeptide resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46: 1410-1416.

Hayashi, M., Maeda, Y., Hashimoto, Y., and Murooka, Y. (2000) Efficient transformation of *Mesorhizobium huakuii* subsp. *rengei* and *Rhizobium* species. Journal of Bioscience and Bioengineering 89: 550-553.

Hayward, A.C. (1991) Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas Solanacearum*. Annual Review of Phytopathology 29: 65-87.

Henry, J.R. (2000) An overview of the phytoremediation of lead and mercury. National Network of Environmental Management Studies (NNEMS) Fellow.

Hirsch, P.R., Jones, M.J., McGrath, S.P. and Giller, K.E. (1993) Heavy metals from past applications of sewage sludge decrease the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* populations. Soil Biology and Biochemistry 25: 1485-1490.

Hong, S., Candelone, J.-P., Patterson, C.C., and Boutron, C.F. (1996) History of ancient copper smelting pollution during roman and medieval times recorded in Greenland Ice. Science 272: 246-249.

Hussain, D., Haydon, M.J., Wang, Y., Wong, E., Sherson, S.M., Young, J. *et al.* (2004) P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*. The Plant Cell Online 16: 1327-1339.

Ibekwe, A.M., Angle, J.S., Chaney, R.L. and van Berkum, P. (1995) Sewage sludge and heavy metal effects on nodulation and nitrogen fixation of legumes. Journal of Environmental Quality 24: 1199-1204.

Iqbal, A., Hayat, S., Aqil, A., and Samiullah, A.I. (2001) Metal and antibiotic resistance traits in *Bradyrhizobium* sp. (cajanus) isolated from soil receiving oil refinery wastewater. World Journal of Microbiology and Biotechnology 17: 379-384.

Janssen, P.J., Van Houdt, R., Moors, H., Monsieurs, P., Morin, N., Michaux, A. *et al.* (2010) The complete genome sequence of *Cupriavidus metallidurans* strain CH34, a master survivalist in harsh and anthropogenic environments. PLoS ONE 5: e10433.

Jarvis, B.D.W., Pankhurst, C.E., and Patel, J.J. (1982) *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. International Journal of Systematic Bacteriology 32: 378-380.

Jarvis, B.D.W., Van Berkum, P., Chen, W.X., Nour, S.M., Fernandez, M.P., Cleyet-Marel, J.C., *et al.* (1997) Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 47: 895-898.

Jebara, M., Mhamdi, R., Aouani, M.E., Ghrir, R., and Mars, M. (2001) Genetic diversity of *Sinorhizobium* populations recovered from different *Medicago* varieties cultivated in Tunisian soils. Canadian Journal of Microbiology 47: 139-147.

Kabata-Pendias, A. (2001) Race elements in soils and plants, 3rd Ed: CRC Press, Boca Raton, Florida.

Kampa, M., and Castanas, E. (2008) Human health effects of air pollution. Environmental Pollution, Proceedings of the 4th International Workshop on Biomonitoring of Atmospheric Pollution (With Emphasis on Trace Elements) 151: 362-367.

Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S. *et al.* (2000) Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. DNA Research 7: 331-338.

Kaplan, J.H. (2002) Biochemistry of Na,K-ATPase. Annual Review of Biochemistry 71: 511-535.

Kawaharada, Y., Kiyota, H., Eda, S., Minamisawa, K., and Mitsui, H. (2010) Identification of the *Mesorhizobium loti* gene responsible for glycerophosphorylation of periplasmic cyclic β-1,2-glucans. FEMS Microbiology Letters 302: 131-137.

Kazakov, A.E., Kalinina, O.V., Permina, E.A., and Gelfand, M.S. (2004) Bacterial metal resistance systems regulated by transcription regulators of the *mer*R family. Proceeding of the 4th International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure (BRG'2004), Novosibirsk, Russia, p. 91-94.

Khan, K., and Joergensen, R. (2010) Effects of Zn and P addition on the microbial biomass in a Zn deficient calcareous soil amended with glucose. Plant and Soil 335: 493-499.

Khan, S., El-Latif Hesham, A., Qiao, M., Rehman, S., and He, J.-Z. (2010) Effects of Cd and Pb on soil microbial community structure and activities. Environmental Science and Pollution Research 17: 288-296.

Kimbrel, J.A., Di, Y., Cumbie, J.S., and Chang, J.H. (2011) RNA-Seq for plant pathogenic bacteria. Genes 2: 689-705.

Klaassen, C.D., Liu, J., and Choudhuri, S. (1999) Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 39: 267-294.

Knox, A.S., Gamerdinger, A.P., Adriano, D.C., Kolka, R.K., and Kaplan, D.I. (1999) Sources and practices contributing to soil contamination. Bioremediation of the Contaminated Soils Agronomy Series No. 37.

Koch, H.-G., Winterstein, C., Saribas, A.S., Alben, J.O., and Daldal, F. (2000) Roles of the *cco*GHIS gene products in the biogenesis of the *cbb*3-type cytochrome c oxidase. Journal of Molecular Biology 297: 49-65.

Kovach, M.E., Elzer, P.H., Steven, H.D., *et al.* (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. Gene 166: 175-176.

Kumar, B., Kumar, S., Mishra, M., Singh, S.K., Prakash, D., Sharma, C.S., *et al.* (2011) Geochemical fractionation of some heavy metals in soils in the vicinity of sukinda mining Area, Orissa. Advances in Applied Science Research 2: 263-272.

Laguerre, G., Nour, S.M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P., and Amarger, N. (2001) Classification of rhizobia based on *nod*C and *nif*H gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. Microbiology 147: 981-993.

Lakzian, A., Murphy, P., Turner, A., Beynon, J.L., and Giller, K.E. (2002) *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* populations in soils with increasing heavy metal contamination: abundance, plasmid profiles, diversity and metal tolerance. Soil Biology and Biochemistry 34: 519-529.

Laranjo, M., and Oliveira, S. (2010) Tolerance of *Mesorhizobium* type strains to different environmental stresses. Antonie van Leeuwenhoek: 1-12.

Latour, X., Corberand, T., Laguerre, G., Allard, F., and Lemanceau, P. (1996) The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. Applied and Environmental Microbiology 62: 2449-2456.

Lee, L.J., Barrett, J.A., and Poole, R.K. (2005) Genome-wide transcriptional response of chemostat-cultured *Escherichia coli* to zinc. Journal of Bacteriology 187: 1124-1134.

Levin, J.Z., Yassour, M., Adiconis, X., Nusbaum, C., Thompson, D.A., Friedman, N. *et al.* (2010) Comprehensive comparative analysis of strand-specific RNA sequencing methods. Nature Methods 7: 709-715.

Li, X.K., Krumholz, L.R. (2009) Thioredoxin is involved in U(VI) and Cr(VI) reduction in *Desulfovibrio desulfuricans* G20. Journal of Bacteriology 191: 4924-4933.

Li, Z., Ma, Z., Hao, X., and Wei, G. (2012) Draft genome sequence of *Sinorhizobium meliloti* CCNWSX0020, a nitrogen-fixing symbiont with copper tolerance capability isolated from lead-zinc mine tailings. Journal of Bacteriology 194: 1267-1268.

Lin, Z.-Q., Hansen, D., Zayed, A., and Terry, N. (1999) Biological selenium volatilization: method of measurement under field conditions. Journal of environmental quality 28: 309-315.

Lindqvist, O., Johansson, K., Bringmark, L., Timm, B., Aastrup, M., Andersson, A. *et al.* (1991) Mercury in the Swedish environment — Recent research on causes, consequences and corrective methods. Water, Air, and Soil Pollution 55: xi-261.

Liu, X., Wu, Q., and Banks, M.K. (2005) Effect of simultaneous establishment of *Sedum alfredii* and *Zea mays* on heavy metal accumulation in plants. International Journal of Phytoremediation 7: 43-53.

Lone, M., He, Z.-l., Stoffella, P., and Yang, X.-e. (2008) Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: Progresses and perspectives. Journal of Zhejiang University SCIENCE B 9, p. 210-220.

Ma, Z., Jacobsen, F.E., Giedroc, D.P. (2009) Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing. Chemical reviews 109: 4644-4681.

Macaskie, L.E., Bonthrone, K.M., Yong, P., and Goddard, D.T. (2000) Enzymically mediated bioprecipitation of uranium by a *Citrobacter* sp.: a concerted role for exocellular lipopolysaccharide and associated phosphatase in biomineral formation. Microbiology 146: 1855-1867

MacDonald, I.R., Kampfer, P., Topp, E., Warner, K.L., Cox, M.J., Hancock, T.L.C., *et al.* (2005) *Aminobacter ciceronei* sp. nov. and *Aminobacter lissarensis* sp. nov., isolated from

various terrestrial environments. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55: 1827-1832.

Mahieu, S., Frérot, H., Vidal, C., Galiana, A., Heulin, K., Maure, L. *et al.* (2011) *Anthyllis vulneraria, Mesorhizobium metallidurans*; an efficient symbiotic nitrogen fixing association able to grow in mine tailings highly contaminated by Zn, Pb and Cd. Plant and Soil 342: 405-417.

Mahieu, S., Soussou, S., Cleyet-Marel, J.C., Brunel, B., Mauré, L., Lefèbvre, C., *et al.* (2012) Local adaptation of metallicolous and non-metallicolous *Anthyllis vulneraria* populations: their utilization in soil restoration. Restoration Ecology, DOI:10.1111/j.1526-100X.2012.00927.x, in press.

Mana-Capelli, S., Mandal, A.K., and Arguello, J. (2003) *Archaeoglobus fulgidus* CopB is a thermophilic Cu^{2+}-ATPase. Journal of Biological Chemistry 278: 40534-40541

Mandal, A.K., and Arguello, J.M. (2003) Functional roles of Metal Binding Domains of the *Archaeoglobus fulgidus* Cu^{+}-ATPase CopA. Biochemistry 42: 11040-11047.

Mandal, S.M., Pati, B.R., Das, A.K., and Ghosh, A.K. (2008) Characterization of a symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic: Isolated from the root nodules of *Vigna mungo* (L.) Hepper grown in an arsenic-contaminated field. Journal of General and Applied Microbiology 54: 93-99.

Marger, M.D., and Saier Jr, M.H. (1993) A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. Trends in Biochemical Sciences 18: 13-20.

Markmann, K., Giczey, G., and Parniske, M. (2008) Functional adaptation of a plant receptor- kinase paved the way for the evolution of intracellular root symbioses with bacteria. PLoS Biology 6: e68.

Marschner, H. (1993) Mineral nutrition of higher plants: London, Academic Press Ltd, Harcourt Brace & Co. Publishers.

Mata, M.T., Baquero, F., and Pérez-Díaz, J.C. (2000) A multidrug efflux transporter in *Listeria monocytogenes*. FEMS Microbiology Letters 187: 185-188.

Maynaud, G., Willems, A., Soussou, S., Vidal, C., Mauré, L., Moulin, L. *et al.* (2012) Molecular and phenotypic characterization of strains nodulating *Anthyllis vulneraria* in mine tailings, and proposal of *Aminobacter anthyllidis* sp. nov., the first definition of *Aminobacter* as legume-nodulating bacteria. Systematic and Applied Microbiology 35: 65-72.

McEntee, J.D., Woodrow, J.R., and Quirk, A.V. (1986) Investigation of cadmium resistance in an *Alcaligenes* sp. Applied and Environmental Microbiology 51: 515-520.

McGrath, S.P., Chaudri, A.M., and Giller, K.E. (1995) Long-term effects of metals in sewage sludge on soils, microorganisms and plants. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 14: 94-104.

Mench, M., and Martin, E. (1991) Mobilization of cadmium and other metals from two soils by root exudates of *Zea mays* L., *Nicotiana tabacum* L. and *Nicotiana rustica* L. Plant and Soil 132: 187-196.

Mergaert, P., Uchiumi, T., Alunni, B., Evanno, G., Cheron, A., Catrice, O. *et al.* (2006) Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 103: 5230-5235.

Mesbah, M., Premachandran, U., and Whitman, W. B. (1989). Precise measurement of the G-C content of deoxyribonucleic acid by high performance liquid chromatography. International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology 39: 159-167.

Miller, W.G., Leveau, J.H.J., and Lindow, S.E. (2000) Improved *gfp* and inaZ Broad-Host-Range Promoter-Probe Vectors. Molecular Plant-Microbe Interactions 13: 1243-1250.

Mills, R.F., Francini, A., Ferreira da Rocha, P.S.C., Baccarini, P.J., Aylett, M., Krijger, G.C., *et al.* (2005) The plant P1B-type ATPase AtHMA4 transports Zn and Cd and plays a role in detoxification of transition metals supplied at elevated levels. FEBS Letters 579: 783-791.

Misra, T.K. (1992) Bacterial resistances to inorganic mercury salts and organomercurials. Plasmid 27: 4-16.

Mishra, R.P.N., Tisseyre, P., Melkonian, R., Chaintreuil, C., Miché, L., Klonowska, A., *et al.* (2012) Genetic diversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts in soils of French Guiana: investigating the origin and diversity of *Burkholderia phymatum* and other beta-rhizobia. FEMS Microbiology Ecology 79: 487-503.

Mitra, B., and Sharma, R. (2001) The cysteine-rich amino-terminal domain of ZntA, a Pb(II)/Zn(II)/Cd(II)-translocating ATPase from *Escherichia coli*, is not essential for its function. Biochemistry 40: 7694-7699.

Mohamad, R. (2012) Analyse de la diversité des bactéries symbiotiques d'*Anthyllis vulneraria*. Mémoire de MASTER 2, Université Montpellier II, 34 pages.

Monchy, S., Benotmane, M.A., Janssen, P., Vallaeys, T., Taghavi, S., van der Lelie, D., *et al.* (2007) Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* are specialized in the maximal viable response to heavy metals. Journal of Bacteriology 189: 7417-7425.

Monsieurs, P., Moors, H., Van Houdt, R., Janssen, P.J., Janssen, A., Coninx, I., *et al.* (2011) Heavy metal resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34 is governed by an intricate transcriptional network. Biometals 24: 1133-1151.

Mornico, D., Miché, L., Béna, G., Nouwen, N., Verméglio, A., Vallenet, D. *et al.* (2011) Comparative genomics of *Aeschynomene* Symbionts: insights into the ecological lifestyle of *nod*-Independent photosynthetic bradyrhizobia. Genes 3: 35-61.

Morozkina, E., Slutskaya, E., Fedorova, T., *et al.* (2010) Extremophilic microorganisms: Biochemical adaptation and biotechnological application (review). Applied Biochemistry and Microbiology 46: 1-14.

Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., and Boivin-Masson, C. (2001) Nodulation of legumes by members of the [beta]-subclass of proteobacteria. Nature 411: 948-950.

Mukhopadhyay, D., Yu, H.R., Nucifora, G., and Misra, T.K. (1991) Purification and functional characterization of MerD. A coregulator of the mercury resistance operon in gram-negative bacteria. Journal of Biological Chemistry 266: 18538-18542.

Mulligan, C.N., Yong, R.N., and Gibbs, B.F. (2001) Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. Engineering Geology 60: 193-207.

Munson, G.P., Lam, D.L., Outten, F.W., and O'Halloran, T.V. (2000) Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K-12. Journal of Bacteriology 182: 5864-5871.

Murata, K., Tani, K., Kato, J., and Chibata, I. (1981) Glutathione production by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*; cells containing an ATP regeneration system. Applied Microbiology and Biotechnology 11: 72-77.

Nandasena, K.G., O'Hara, G.W., Tiwari, R.P., and Howieson, J.G. (2006) Rapid in situ evolution of nodulating strains for *Biserrula pelecinus* L. through lateral transfer of a symbiosis island from the original mesorhizobial inoculant. Applied and Environmental Microbiology 72: 7365-7367.

Nandasena, K.G., O'Hara, G.W., Tiwari, R.P., Sezmiş, E., and Howieson, J.G. (2007) In situ lateral transfer of symbiosis islands results in rapid evolution of diverse competitive strains of mesorhizobia suboptimal in symbiotic nitrogen fixation on the pasture legume *Biserrula pelecinus* L. Environmental Microbiology 9: 2496-2511.

Nandasena, K.G., O'Hara, G.W., Tiwari, R.P., Willems, A., and Howieson, J.G. (2009) *Mesorhizobium australicum* sp. nov. and *Mesorhizobium opportunistum* sp. nov., isolated from *Biserrula pelecinus* L. in Australia. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59: 2140-2147.

Needleman, H. (2004) Lead poisoning. Annual Review of Medicine 55: 209-222.

Nies, D.H. (1999) Microbial heavy-metal resistance. Applied Microbiology and Biotechnology 51: 730-750.

Nies, D.H. (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. FEMS Microbiology Reviews 27: 313-339.

Ning, Z., Cox, A.J., and Mullikin, J.C. (2001) SSAHA: a fast search method for large DNA databases. Genome Research 11: 1725-1729.

Nishino, K., Nikaido, E., and Yamaguchi, A. (2007) Regulation of multidrug efflux systems involved in multidrug and metal resistance of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. Journal of Bacteriology 189: 9066-9075.

Nour, S.M., Cleyet-Marel, J.-C., Beck, D., Effosse, A., and Fernandez, M.P. (1994) Genotypic and phenotypic diversity of *Rhizobium* isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.). Canadian Journal of Microbiology 40: 345-354.

Novikova, N., Pavlova, E.A., and Limeshchenko, E.V. (1993) Phage sensitivity and host range of *Rhizobium* strains isolated from root nodules of temperate legumes. Plant and Soil 1:45–53.

Nriagu, J.O., and Pacyna, J.M. (1988) Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. Nature 333: 134-139.

Nriagu, J.O. (1994) Arsenic in the environment. 1. Cycling and characterization: John Wiley and Sons, New York.

Nriagu, J.O. (1996) A Hhstory of global metal pollution. Science 272: 223.

Nucifora, G., Chu, L., Misra, T.K., and Silver, S. (1989) Cadmium resistance from Staphylococcus aureus plasmid pI258 *cad*A gene results from a cadmium-efflux ATPase Proceedings of the National Academy of Sciences USA 86: 3544-3548

Nwuche, C.O., and Ugoji, E.O. (2008) Effects of heavy metal pollution on the soil microbial activity. International Journal of Environment Science and Technology 5: 409-414.

Okuku, E.O., and Peter, H.K. (2012) Choose of heavy metals pollution biomonitors: a critic of the method that uses sediments total metals concentration as the benchmark. International Journal of Environmental Research 6: 313-322.

Osborn, R.K., Haydock, P.P.J., Edwards, S.G. (2010). Isolation and identification of oxamyl-degrading bacteria from UK agricultural soils. Soil Biology and Biochemistry 42: 998-1000.

Outten, F.W., Huffman, D.L., Hale, J.A., and O'Halloran, T.V. (2001) The independent *cue* and *cus* systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. Journal of Biological Chemistry 276: 30670-30677.

Panina, E.M., Mironov, A.A., and Gelfand, M.S. (2003) Comparative genomics of bacterial zinc regulons: Enhanced ion transport, pathogenesis, and rearrangement of ribosomal proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 100: 9912-9917.

Pardo, F., Jordán, M., Sanfeliu, T., and Pina, S. (2011) Distribution of Cd, Ni, Cr, and Pb in amended soils from Alicante province (SE, Spain). Water, Air, and Soil Pollution 217: 535-543.

Patzer, S.I., and Hantke, K. (1998) The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. Molecular Microbiology 28: 1199-1210.

Patzer, S.I., and Hantke, K. (2000) The zinc-responsive regulator Zur and its control of the *znu* gene cluster encoding the ZnuABC zinc uptake system in *Escherichia coli*. Journal of Biological Chemistry 275: 24321-24332.

Paulsen, I.T., and Saier, J., M.H. (1997) A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. Journal of Membrane Biology 156: 99-103.

Peoples, M.B., Herridge, D.F., and Ladha, J.K. (1995) Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production ? In Management of Biological Nitrogen Fixation for the Development of More Productive and Sustainable Agricultural Systems, Springer Netherlands, p. 3-28.

Peplow, D. (2000) Environmental impacts of hardrock mining in eastern Washington. Streamside Runoff 12: 2-3.

Pereira, S.I.A., Lima, A.I.G., and Figueira, E.M.d.A.P. (2006) Heavy metal toxicity in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* isolated from soils subjected to different sources of heavy-metal contamination: Effects on protein expression. Applied Soil Ecology 33: 286-293.

Permina, E., Kazakov, A., Kalinina, O., and Gelfand, M. (2006) Comparative genomics of regulation of heavy metal resistance in Eubacteria. BMC Microbiology 6, 49.

Perreten, V., Schwarz, F.V., Teuber, M., and Levy, S.B. (2001) Mdt(A), a new efflux protein conferring multiple antibiotic resistance in *Lactococcus lactis* and *Escherichia coli*. Antimicrobial Agents Chemotherapy 45: 1109-1114.

Perron, K., Caille, O., Rossier, C., van Delden, C., Dumas, J.-L., and Köhler, T. (2004) CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Biological Chemistry 279: 8761-8768.

Petrarca, P., Ammendola, S., Pasquali, P., and Battistoni, A. (2010) The Zur-regulated ZinT protein is an auxiliary component of the high-affinity ZnuABC zinc transporter that facilitates metal recruitment during severe zinc shortage. Journal of Bacteriology 192: 1553-1564.

Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic acids research 29.

Poston, S.M., and Hee, F.-L.L.S. (1991) Genetic characterisation of resistance to metal ions in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: elimination of resistance to cadmium, mercury

and tetracycline with loss of methicillin resistance. Journal of Medical Microbiology 34: 193-201.

Prasad, M.N.V., Freitas, H., Fraenzle, S., Wuenschmann, S., and Markert, B. (2010) Knowledge explosion in phytotechnologies for environmental solutions. Environmental Pollution 158: 18-23.

Prentki, P., Krisch, H.M. (1984) In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. Gene 29: 303-313.

Quandt, J., and Hynes, M.F. (1993) Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. Gene 127: 15-21.

Quemeneur, M., Heinrich-Salmeron A., Muller, D., Lievremont, D., Jauzein, M., Bertin, P.N., *et al.* (2008) Diversity surveys and evolutionary relationships of *aox*B genes in aerobic arsenite-oxidizing bacteria. Applied and Environmental Microbiology 74: 4567–4573

Quinlan, A.R., and Hall, I.M. (2010) BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. Bioinformatics 26: 841-842.

Ralston, D.M., and O'Halloran, T.V. (1990) Ultrasensitivity and heavy-metal selectivity of the allosterically modulated MerR transcription complex. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 87: 3846-3850.

Rapisarda, V.A., Chehín, R.N., Rivas, J.D.L., *et al.* (2002) Evidence for Cu(I)-thiolate ligation and prediction of a putative copper-binding site in the *Escherichia coli* NADH dehydrogenase-2. Archives of Biochemistry and Biophysics 405: 87-94.

Reeve, W.G., Tiwari, R.P., Kale, N.B., Dilworth, M.J., and Glenn, A.R. (2002) ActP controls copper homeostasis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and *Sinorhizobium meliloti* preventing low pH-induced copper toxicity. Molecular Microbiology 43: 981-991.

Rensing, C., Mitra, B., and Rosen, B.P. (1997) The zntA gene of *Escherichia coli* encodes a Zn(II)-translocating P-type ATPase Proceedings of the National Academy of Sciences USA 94: 14326-14331.

Rensing, C., Fan, B., Sharma, R., Mitra, B., and Rosen, B.P. (2000) CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 97: 652-656.

Requena, N., Perez-Solis, E., Azcón-Aguilar, C., Jeffries, P., and Barea, J.M. (2001) Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified. Applied and Environmental Microbiology 67: 495–498.

Rice, W.J., and MacLennan, D.H. (1996) Scanning mutagenesis reveals a similar pattern of mutation sensitivity in transmembrane sequences M4, M5, and M6, but Not in M8, of the

Ca^{2+}-ATPase of sarcoplasmic reticulum (SERCA1a). Journal of Biological Chemistry 271: 31412-31419.

Rossbach, S., Mai, D.J., Carter, E.L., *et al.* (2008) Response of *Sinorhizobium meliloti* to Elevated Concentrations of Cadmium and Zinc. Applied and Environmental Microbiologly 74: 4218-4221.

Rugh, C.L., Wilde, H.D., Stack, N.M., Thompson, D.M., Summers, A.O., and Meagher, R.B. (1996) Mercuric ion reduction and resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a modified bacterial *mer*A gene. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 93: 3182-3187.

Rutherford, J.C., Cavet, J.S., and Robinson, N.J. (1999) Cobalt-dependent transcriptional switching by a dual-effector MerR-like protein regulates a cobalt-exporting variant CPx-type ATPase. Journal of Biological Chemistry 274: 25827-25832

Saeki, K., and Kouchi, H. (2000) The *Lotus* symbiont, *Mesorhizobium loti*: molecular genetic techniques and application. Journal of Plant Research 113: 457-465.

Sakakibara, M., Watanabe, A., Inoue, M., Sano, S., and Kaise, T. (2010) Phytoextraction and phytovolatilization of arsenic from As-contaminated soils by *Pteris vittata*. Proceedings of the Annual International Conference on Soils, Sediments, Water and Energy, 12.

Sala, O.E., Stuart Chapin, F., Armesto, J.J., Berlow, E., Bloomfield, J. *et al.* (2000) Global biodiversity scenarios for the year 2100. Science 287: 1770-1774.

Sambrook, J., Fritschi, E.F., and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual 2nd edition. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Saraswat, S., and Rai, J. (2011) Complexation and detoxification of Zn and Cd in metal accumulating plants. Reviews in Environmental Science and Biotechnology 10: 327-339.

Sarret, G., Willems, G., Isaure, M.-P., Marcus, M.A., Fakra, S.C., Frérot, H. *et al.* (2009) Zinc distribution and speciation in *Arabidopsis halleri* x *Arabidopsis lyrata* progenies presenting various zinc accumulation capacities. New Phytologist 184: 581–595.

Sharma, R., and Schimke, R. (1996) Preparation of electrocompetent *E. coli* using salt-free growth medium. BioTechniques 20: 42-44.

Sheirdil, R.A., Bashir, K., Hayat, R., and Akhtar, M.S. (2012) Effect of cadmium on soybean (*Glycine max* L) growth and nitrogen fixation. African Journal of Biotechnology 11: 1886-1891.

Sheoran, V., Sheoran, A.S., and Poonia, P. (2010) Soil Reclamation of abandoned mine land by revegetation: a review. International Journal of Soil, Sediment and Water 3: 1-20.

Silver, S., and Phung, L. (2005) A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 32: 587-605.

Sjoholm, O.R., Aamand, J., Sorensen, J., and Nybroe O. (2010). Degrader density determines spatial variability of 2,6-dichlorobenzamide mineralisation in soil. Environmental Pollution 158: 292–298.

Slaveykova, V.I., Parthasarathy, N., Dedieu, K., and Toescher, D. (2010) Role of extracellular compounds in Cd-sequestration relative to Cd uptake by bacterium *Sinorhizobium meliloti*. Environmental Pollution 158: 2561-2565.

Smejkalova, M., Mikanova, O., and Boruvka, L. (2003) Effects of heavy metal concentrations on biological activity of soil micro-organisms. Plant Soil and Environment 49: 321–326.

Sorek, R., and Cossart, P. (2010) Prokaryotic transcriptomics: a new view on regulation, physiology and pathogenicity. Nature Reviews Genetics 11: 9-16.

Soussou, S., Mahieu, S., Brunel, B., Escarré, J., Lebrun, M., Banni, M. *et al.* Zn accumulation pattern of four *Anthyllis vulneraria* subspecies supplemented with mineral nitrogen or grown in presence of their symbiotic bacteria. Submitted.

Spain, A. (2003) Implications of microbial heavy metal tolerance in the environment. Reviews in Undergraduate Research 2: 1-6.

Sprent, J.I. (2007) Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. New Phytologist 174: 11-25.

Stan, V., Gament, E., Cornea, C.P., Voaides, C., Dusa, M., *et al.* (2011) Effects of heavy metal from polluted soils on the *Rhizobium* diversity. Notulae Botanicae Horti AgrobotaniciCluj-Napoca 39: 88-95.

Stepkowski, T., Hughes, C.E., Law, I.J., Markiewicz, L., Gurda, D., Chlebicka, A., *et al.* (2007) Diversification of lupin *Bradyrhizobium* strains: evidence from nodulation gene trees. Applied and Environmental Microbiology 73: 3254–3264.

Stępkowski, T., Żak, M., Moulin, L., Króliczak, J., Golińska, B., Narożna, D. *et al.* (2011) *Bradyrhizobium canariense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the two dominant rhizobium species in root nodules of lupin and serradella plants growing in Europe. Systematic and Applied Microbiology 34: 368-375.

Stougaard, J. (2000) Regulators and regulation of legume root nodule development. Plant Physiology 124: 531-540.

Sullivan, J.T., Patrick, H.N., Lowther, W.L., Scott, D.B., and Ronson, C.W. (1995) Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 92: 8985-8989.

Sullivan, J.T., and Ronson, C.W (1998) Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 95: 5145–5149.

Sullivan, J.T., Trzebiatowski, J.R., Cruickshank, R.W., Gouzy, J., Brown, S.D., Elliot, R.M. *et al.* (2002) Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. Journal of Bacteriology 184: 3086-3095.

Sultan, S., and Hasnain, S. (2007) Reduction of toxic hexavalent chromium by *Ochrobactrum intermedium* strain SDCr-5 stimulated by heavy metals. Bioresource Technology 98: 340-344.

Szczyglowski, K., Shaw, R.S., Wopereis, J., Copeland, S., Hamburger, D., Kasiborski, B. *et al.* (1998) Nodule organogenesis and symbiotic mutants of the model legume *Lotus japonicus*. Molecular Plant-Microbe Interactions 11: 684-697.

Taghavi, S., Lesaulnier, C., Monchy, S., Wattiez, R., Mergeay, M., and van der Lelie, D. (2009) Lead(II) resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34: interplay between plasmid and chromosomally-located functions. Antonie van Leeuwenhoek 96: 171-182.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24: 1596-1599.

Tatusov, R.L., Natale, D.A., Garkavtsev, I.V., Tatusova, T.A., Shankavaram, U.T., Rao, B.S., *et al.* (2001) The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. Nucleic Acids Research 29: 22-28.

Turnau, K., Ostachowicz, B., Wojtczak, G., Anielska, T., and Sobczyk, L. (2010) Metal uptake by xerothermic plants introduced into Zn-Pb industrial wastes. Plant and Soil 33: 299-311.

Urakami, T., Araki, H., Oyanagi, H., Suzuki, K.-I., and Komagata, K. (1992) Transfer of *Pseudomonas aminovorans* (den Dooren de Jong 1926) to *Aminobacter* gen. nov. as *Aminobacter aminovorans* comb. nov. and description of *Aminobacter aganoensis* sp. nov. and *Aminobacter niigataensis* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 42: 84-92.

Vallenet, D., Labarre, L., Rouy, Z., Barbe, V., Bocs, S., Cruveiller, S. *et al.* (2006) MaGe: a microbial genome annotation system supported by synteny results. Nucleic acids research 34: 53-65.

Vallenet, D., Engelen, S., Mornico, D., Cruveiller, S., Fleury, L., Lajus, A., *et al.* (2009) MicroScope: a platform for microbial genome annotation and comparative genomics. Database 2009, doi:10.1093/database/bap021.

van der Lelie, D., Schwuchow, T., Schwidetzky, U., Wuertz, S., Baeyens, W., Mergeay, M., *et al.* (1997) Two-component regulatory system involved in transcriptional control of heavy-metal homoeostasis in *Alcaligenes eutrophus*. Molecular Microbiology 23: 493-503.

Vidal, C. (2008) Etude taxonomique et génétique des bactéries symbiotes des légumineuses métallicoles adaptées aux sites contaminés par le zinc et le cadmium. Thèse de Doctorat, Université Montpellier II, 123 pages.

Vidal, C., Chantreuil, C., Berge, O., Maure, L., Escarre, J., Bena, G. *et al.* (2009) *Mesorhizobium metallidurans* sp. nov., a metal-resistant symbiont of *Anthyllis vulneraria* growing on metallicolous soil in Languedoc, France. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59: 850-855.

Vitousek, P.M., Mooney, H.A., Lubchenco, J., and Melillo, J.M. (1997) Human domination of earth's ecosystems. Science 277: 494-499.

von Rozycki, T., and Nies, D. (2009) *Cupriavidus metallidurans*: evolution of a metal-resistant bacterium. Antonie van Leeuwenhoek 96: 115-139.

Wall, L.G. (2000) The actinorhizal symbiosis. Journal of Plant Growth Regulation 19: 167-182.

Wang, A., and Crowley, D.E. (2005) Global gene expression responses to cadmium toxicity in *Escherichia coli.* Journal of Bacteriology 187: 3259-3266

Wang, F.Q., Wang, E.T., Liu, J., Chen, Q., Sui, X.H., Chen, W.F., *et al.* (2007a) *Mesorhizobium albiziae* sp. nov., a novel bacterium that nodulates *Albizia kalkora* in a subtropical region of China. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57: 1192-1199.

Wang, Y., Shi, J., Wang, H., Lin, Q., Chen, X., and Chen, Y. (2007b) The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter. Ecotoxicology and Environmental Safety 67: 75-81.

Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P.A.D, Kandler, O., Krichevsky, M.I., *et al.* (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. International journal of systematic bacteriology 37: 463-464.

Willems, A., Doignon-Bourcier, F., Goris, J., Coopman, R., de Lajudie, P., De Vos, P., *et al.* (2001). DNA-DNA hybridization study of *Bradyrhizobium* strains. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51: 1315-1322.

Wojciechowski, M.F., Lavin, M., and Sanderson, M.J. (2004) A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *mat*K gene resolves many well-supported subclades within the family. American Journal of Botany 91: 1846-1862.

Wuana, R.A., and Okieimen, F.E. (2011) Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. ISRN Ecology 2011: 1-20.

Yamamoto, K., and Ishihama, A. (2005) Transcriptional response of *Escherichia coli* to external zinc. Journal of Bacteriology 187: 6333-6340.

Young, J.P., Crossman, L., Johnston, A., Thomson, N., Ghazoui, Z., Hull, K. *et al.* (2006) The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. Genome Biology 7: R34.

Younis, M. (2007) Responses of *Lablab purpureus-Rhizobium* symbiosis to heavy metals in pot and field experiments. World Journal of Agricultural Sciences 3: 111-122.

Zahran, H.H. (1999) *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. Microbiology and Molecular Biology Reviews 63: 968-989.

Zeller, T., and Klug, G. (2006) Thioredoxins in bacteria: functions in oxidative stress response and regulation of thioredoxin genes. Naturwissenschaften 93: 259-266.

Zhang, Z.Q., Wong, M.H., Nie, X.P., and Lan, C.Y. (1998) Effects of zinc (zinc sulfate) on Rhizobia-earleaf acacia (*Acacia auriculaeformis*) symbiotic association. Bioresource Technology 64: 97-104.

Zhang, J.-h., and Min, H. (2010) Characterization of a multimetal resistant *Burkholderia fungorum* isolated from an e-waste recycling area for its potential in Cd sequestration. World Journal of Microbiology and Biotechnology 26: 371-374.

Zhang, Y.M., Tian, C.F., Sui, X.H., Chen, W.F., and Chen, W.X. (2012) Robust markers reflecting phylogeny and taxonomy of rhizobia. PLoS ONE 7: 1-6.

Adaptation aux métaux lourds de populations de rhizobia impliquées dans la phytostabilisation de déblais miniers : Identification des mécanismes d'adaptation au Zn et au Cd, et structuration des populations de rhizobia adaptées aux sites miniers

Résumé : La symbiose entre *Anthyllis vulneraria* et *Mesorhizobium metallidurans*, mise en évidence dans l'ancienne mine Zn/Pb des Avinières à St-Laurent-le-Minier (Gard) permet une entrée d'azote dans les sols grâce à la fixation biologique qui favorise l'installation d'une végétation pérenne d'intérêt pour limiter la pollution métallique *via* l'érosion éolienne et hydrique. *M. metallidurans* ayant la particularité de résister à de fortes concentrations en Zn et Cd, la recherche des gènes d'adaptation aux métaux lourds a été mise en œuvre pour mieux connaitre cette bactérie impliquée dans des opérations de phytostabilisation, par des approches de génétique moléculaire et de transcriptomie (RNAseq). Les gènes codant pour des systèmes de séquestration, d'exclusion, de réduction et d'efflux des métaux lourds, dont *cad*A1 codant pour une P_{IB}-ATPase exportant Cd/Zn, ont été identifiés chez deux souches métallicoles associées à *Anthyllis* ; *M. metallidurans* STM 2683^T (mine des Avinières) et *Mesorhizobium* sp. STM 4661 (mine d'Eylie). Une étude fonctionnelle de *cad*A1 a permis de caractériser son rôle dans la résistance aux métaux lourds chez *M. metallidurans*. Ce gène a ensuite été testé comme marqueur de résistance pour étudier la diversité et la répartition des symbiotes d'*Anthyllis* sur des sites miniers et non pollués. Pour cela, ce travail a été complété par des analyses phénotypiques de tolérance au Zn et Cd et des analyses phylogénétiques basées sur des marqueurs taxonomiques et symbiotiques. La contrainte métallique exercée par les environnements miniers semble influencer la composition et la diversité bactérienne avec une plus forte proportion (i) de phénotype métallicole lié à la présence du gène *cad*A1 et (ii) de rhizobia appartenant à *M. metallidurans* ou à une espèce très proche. La plante hôte semble quant à elle influencer la diversité symbiotique des rhizobia, indépendamment de la contrainte métallique.
Mots clés : métaux lourds, *Mesorhizobium*, génomique fonctionnelle, P_{IB}-ATPase, transcriptomie RNAseq, diversité.

Heavy metal-adaptated rhizobial populations involved in phytostabilisation strategies: Identification of Zn/Cd-adaptation genes and structural populations of rhizobia adapted to mining soils

Abstract: Efficient nitrogen-fixing symbiosis between *Anthyllis vulneraria* and *Mesorhizobium metallidurans*, identified in the highly Zn/Pb polluted mining site of Avinières (St-Laurent-le-Minier, Gard county, France) has recently been described as a potential key bioremediation agent for stimulating the growth of a sustainable plant cover and thus limit heavy metal dispersion from contaminated sites. *M. metallidurans* strains were shown to be resistant to high Zn and Cd concentrations. The aim of our work was to identify and characterize genes involved in heavy metal adaptation in *M. metallidurans* by using genetic and transcriptomic approaches (RNAseq technology). Putative genes involved in heavy metal adaptation mechanisms such as exclusion, binding, reduction and efflux, like *cad*A1, encoding an efflux system P_{IB}-type ATPase involved in Zn and Cd export, were identified in two *Mesorhizobium* strains associated with *Anthyllis*: *M. metallidurans* STM 2683^T (Avinières mine) and *Mesorhizobium* sp. STM 4661 (Eylie mine). Functional studies allowed us to characterize the *cad*A1 efflux protein as involved in metal tolerance in *M. metallidurans*. Then, *cad*A1 was used as a metal-resistance marker to study the diversity and the distribution of *Anthyllis* symbionts from mine soils and unpolluted soils. This work was completed by Zn- and Cd-tolerance phenotype assays and phylogenetic analyses using taxonomical and symbiotic markers. Metals in mine environments seemed to influence the bacterial composition and the diversity with a high proportion of (i) metal-tolerant phenotypes consistent with the detection of the *cad*A1 gene and (ii) strains belonging to the *M. metallidurans* species or to a bacterial species close to it. The plant-hosts seemed to impact symbiotic diversity independently of the metal-tolerant property.
Keywords: heavy metals, *Mesorhizobium*, functional genomics, P_{IB}-type ATPase, RNAseq transcriptomic, diversity.

Laboratoire d'accueil : Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (UMR 113), IRD, CIRAD, INRA, Montpellier SupAgro, Université Montpellier II, Campus International de Baillarguet, TA-A82/J, 34398 Montpellier cedex 5, France.