

Thèse présentée pour obtenir le grade de Docteur de l'Université  
Louis Pasteur, Strasbourg I

**Discipline :** Sciences du vivant  
Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Présentée par :**

Daniel MULLER

ANALYSE GÉNÉTIQUE ET MOLÉCULAIRE DU STRESS  
ARSENIC DE SOUCHES BACTÉRIENNES ISOLÉES  
D'ENVIRONNEMENTS CONTAMINÉS PAR L'ARSENIC

Soutenue publiquement le 20 décembre 2004

**Membres du jury :**

Directrice de thèse	Mme Marie-Claire LETT	Professeur à l'Université Louis Pasteur, Strasbourg I
Rapporteur interne	M. Yves PIÉMONT	Professeur à l'Université Louis Pasteur, Strasbourg I
Rapporteur externe	Mme Violaine BONNEFOY	Chargé de recherche CNRS, Marseille
Rapporteur externe	M. Max MERGEAY	Directeur de Recherche, CEN/SCK, Mol, Belgique



*Il entre dans toutes les actions humaines plus de hasard que de décision.*

André Gide

*À ma Céline*



Ce travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire Dynamique, Évolution, Expression des Génomes de Micro-organismes de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg (FRE2316) dirigé par Monsieur le Professeur Jean-Claude Hubert lorsque j'ai débuté ce travail, puis par Monsieur le Professeur Serge Potier qui a pris sa succession. Je les remercie vivement de m'avoir accueilli au sein de leur unité.

Je tiens à remercier Madame le professeur Marie-Claire LETT qui m'a accueilli au sein de son équipe et qui a su me guider et me former tout au long de ses quatre années.

Il m'est extrêmement agréable d'exprimer ma reconnaissance à Monsieur Didier Lièvrement pour les remarques constructives et son aide précieuse.

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur Philippe Bertin, pour cet œil nouveau qu'il a apporté et qui a donné un nouvel élan à cette étude.

Un grand merci à Madame Marie-France Demouveau et Madame Sandrine Koechler, pour leur convivialité et leur travail qui m'a beaucoup aidé.

Je n'oublie pas toutes les personnes du laboratoire qui d'une manière ou d'une autre ont su m'aider dans l'accomplissement de ce travail. Je tiens également à remercier toutes celles et ceux qui ont rendu aussi agréables et conviviales ces quatre années au sein du laboratoire. Je remercie également Yann Brelivet, Nicolas Diebolt, Aurélie Auguste et Frank Den Hartog qui nous ont apporté leur aide durant leurs stages respectifs.

Je remercie Évelyne Krin (Institut Pasteur), pour m'avoir accueilli et appris la technique de construction de banque d'ADN génomique.

Madame le docteur Violaine Bonnefoy (CNRS Marseille) et Messieurs les professeurs Max Mergeay (CEN/SCK, Mol, Belgique) et Yves Piémont (Université Louis Pasteur de Strasbourg) qui me font l'honneur de juger ce travail. Je tiens à leur exprimer toute ma reconnaissance.

## **Table des matières**

<b>Chapitre I. Définition, propriétés physico-chimiques et biologiques de l'arsenic</b>	<b>1</b>
I. Introduction	1
II. Cycle biogéochimique de l'arsenic	1
II.1. La géosphère-pédosphère	2
II.2. L'atmosphère	3
II.3. L'hydrosphère	4
II.3.1. Les eaux de surface	6
II.3.2. Les eaux souterraines	6
II.4. La biosphère	6
III. Historique	7
III.1. L'arsenic : médicament ou poison ?	9
III.2. Les activités industrielles et la contamination anthropique	10
III.3. La contamination chronique	12
III.3.1. Les populations à risque	12
III.3.2. Les normes	12
IV. Métabolisme cellulaire de l'arsenic	13
IV.1. L'entrée dans la cellule	14
IV.2. La méthylation de l'arsenic	16
IV.3. L'opéron <i>ars</i> : un système de résistance	19
IV.3.1. ArsR : une famille de régulateurs	21
IV.3.2. ArsB : un système d'extrusion	22
IV.3.2.1. ArsA : une ATPase couplée à ArsB	23
IV.3.2.2. Systèmes d'extrusion eucaryotiques	25
IV.3.3. ArsC : réduction de As[V] en As[III]	25
IV.3.3.1. Réductases à glutarédoxine	27
IV.3.3.2. Réductases à thiorédoxine	27
IV.3.3.3. Réductases eucaryotes	27
IV.4. L'évolution des systèmes de type <i>ars</i>	28
IV.5. La respiration de As[V] ou réduction dissimilatrice	29
IV.6. L'oxydation de As[III] en As[V]	32
IV.6.1. L'historique	32
IV.6.2. L'arsénite oxydase	33
IV.6.3. L'oxydation par des chimiolithotrophes	35
IV.6.4. L'oxydation par des Archaea et des bactéries thermophiles	35
IV.6.5. Les cellules humaines : une oxydation non enzymatique ?	36
V. Toxicité de l'arsenic : le paradoxe	36
V.1. La spéciation	37

V.1.1. Les formes organiques	37
V.1.2. Les formes inorganiques	38
V.1.2.1. As[V]	38
V.1.2.2. As[III]	38
V.2. <i>Les effets sur l'ADN</i>	39
V.3. <i>Le stress oxydatif</i>	40
V.4. <i>Le paradoxe : carcinogène ou anti-cancéreux ?</i>	42
V.5. <i>L'induction de protéines de stress</i>	43
<b>Chapitre II. Objectifs</b>	<b>45</b>
<b>SECONDE PARTIE TRAVAUX PERSONNELS</b>	<b>49</b>
<b>Chapitre I. Arsenite Oxidase <i>aox</i> Genes from a Metal-Resistant <math>\beta</math>-Proteobacterium</b>	<b>50</b>
I. Introduction	51
II. Manuscrit	51
III. Résultats complémentaires	59
III.1. <i>Le métabolisme énergétique</i>	59
III.2. <i>La protéine AoxC, une nitroréductase</i>	60
III.3. <i>La protéine AoxD, un cytochrome c</i>	60
III.4. <i>Régulation de l'opéron <i>aoxAB</i></i>	61
III.4.1. Initiation de la transcription	61
III.4.1.1. Le principe de la technique de l'extension d'amorce	62
III.4.1.2. Les résultats préliminaires	62
IV. Conclusion	62
<b>Chapitre II. Arsenite oxidase, an ancient bioenergetic enzyme</b>	<b>64</b>
I. Introduction	65
II. Manuscrit	66
III. Résultats complémentaires : L'opéron <i>aoxAB</i>	75
IV. Conclusion	78
<b>Chapitre III. Pleiotropic response of <i>Cenibacterium arsenoxidans</i>, ULPAs1 sp. nov., metalloresistant</b>	<b>79</b>
I. Introduction	81
II. Manuscrit	81
III. Résultats complémentaires	112
III.1. <i>Les protéines de réparation de l'ADN et de stress</i>	112
III.1.1. La caractérisation des mutants	112
III.1.2. L'expression des gènes	113
III.1.3. Les tests de croissance	113

III.1.4. La sensibilité des mutants aux rayons UV	114
III.2. Discussion	116
IV. Conclusion	117
<b>Chapitre IV. Acquisition multiple de gènes de résistance à l'arsenic chez <i>Cenibacterium arsenoxidans</i></b>	<b>118</b>
I. Introduction	119
II. Matériels et méthodes	119
II.1. Souches, milieux et conditions de culture	119
II.1.1. Souches bactériennes	119
II.1.2. Milieux de cultures	120
II.1.3. Concentration minimale inhibitrice (CMI)	120
II.2. Techniques d'analyse des protéines et des ARN messagers	120
II.3. Construction de la banque d'ADN génomique	120
II.3.1 Plasmide pcDNA2.1	120
II.3.2 Établissement d'une banque de plasmides contenant de petits fragments d'ADN génomique	120
II.4. Technique de complémentation	121
II.3.1 Culture de cellules compétentes	121
II.3.2 Transformation	122
II.3.3 Complémentation	122
II.5. Techniques ADN	122
II.4.1. Extraction des plasmides	122
II.4.2. Séquençage	122
II.4.3. Analyse des séquences	122
III. Résultats	123
III.1. Complémentation par une banque d'ADN génomique	123
III.1.1. Analyse protéomique	125
III.1.2. Expression différentielle des transcrits	126
IV. Discussion	127
IV.1. Acquisition multiple de la résistance à l'arsenic	129
IV.2. Le système ars, commun à tous les microorganismes?	131
V. Conclusion	133
<b>Chapitre V. Conclusions générales et perspectives</b>	<b>134</b>
<b>Références</b>	<b>139</b>
<b>Liste des tableaux et figures</b>	<b>159</b>
<b>Annexes</b>	<b>165</b>

**PREMIÈRE PARTIE**  
**INTRODUCTION ET OBJECTIFS**

**Chapitre I.**  
**Définition, propriétés physico-chimiques et**  
**biologiques de l'arsenic**



**Arsenic** : Lat. *arsenicum*, Gr *arsenikon*, orpiment jaune — d'*arsenikos*, mâle, de la croyance que les métaux étaient de différents sexes — Arabe *az-zernikh*, l'orpiment du Perse *zerni-zar*, or (Hodgman *et al.*, 1961).

## I. Introduction

L'arsenic, de symbole As, est un élément de transition qui appartient au groupe 15 (ou Va) de la classification périodique des éléments de Mendeleïev. L'arsenic est donc un métalloïde, dont les propriétés chimiques (tableau I.1) sont intermédiaires entre celles des métaux et celles des non-métaux : sa conductivité électronique et thermique le rapproche des métaux tandis que son comportement en solution le rapproche des non métaux (formation d'anions).

L'arsenic natif possède deux principales variétés allotropiques, résultant d'un mode de cristallisation différent : l'une est d'aspect métallique, gris, et de densité 5,7; l'autre, d'aspect non métallique, jaune et de densité égale à 2. L'arsenic existe à l'état naturel, et en fonction des environnements dans lesquels il se trouve, sous quatre états d'oxydation différents ; -III (arsine), 0 (arsenic natif), +III (arsénites) et +V (arséniates). Ainsi, dans les environnements fortement réducteurs, l'arsenic natif (0) et l'arsine (-III) peuvent exister ; dans les milieux modérément réducteurs, la forme prédominante est l'arsénite, As[III], tandis que dans les milieux oxygénés la forme majeure est l'arséniat, As[V] (Schiferl et Barrett, 1969).

L'arsenic peut se combiner à d'autres métaux ou non métaux pour former des composés organiques et inorganiques (Gorby, 1994). Les formes inorganiques sont essentiellement des composés de l'arsénite, As[III] et de l'arséniat, As[V].

**Tableau I.1.** Propriétés physico-chimiques de l'élément arsenic (Schiferl et Barrett, 1969).

<b>Numéro atomique</b> : 33	<b>Rayon atomique</b> : 125 pm
<b>Symbole atomique</b> : As	<b>Point de fusion</b> : ~817 °C
<b>Masse atomique</b> : 74.9216	<b>Point d'ébullition</b> : 603°C (sublimation)
<b>Configuration électronique</b> : [Ar]4s <sup>2</sup> 3d <sup>10</sup> 4p <sup>3</sup>	<b>États d'oxydation</b> : 5, 3, -3

## II. Cycle biogéochimique de l'arsenic

L'arsenic est un élément naturel ubiquitaire, qui est présent à la fois dans l'atmosphère, la pédosphère, l'hydrosphère et la biosphère. Les concentrations de cet élément dans les différents compartiments cités sont comprises entre 1,5 et 3 mg Kg<sup>-1</sup> (Mandal *et al.*, 2004). Le cycle biogéochimique global de l'arsenic met en jeu des processus physico-chimiques, mais également biologiques. Ces mécanismes agissent sur la mobilité des espèces de l'arsenic et exercent ainsi leurs effets sur la distribution de l'arsenic dans les différents compartiments de la biosphère.

## II.1. La géosphère-pédosphère

L'arsenic est le 20<sup>ème</sup> élément le plus abondant de la croûte terrestre avec une teneur moyenne de 1 à 2 mg Kg<sup>-1</sup> (Matschullat, 2000). C'est un constituant majeur de plus de deux cents minéraux, parmi lesquels on peut citer les plus courants tels que l'arsénopyrite (FeAsS), le réalgar (AsS), ou l'orpiment (As<sub>2</sub>S<sub>3</sub>) (Cullen et Reimer, 1989)(tableau I.2.). Nombre de ces minéraux sont soufrés. En effet, la chimie de l'arsenic suit celle du soufre et par conséquent, l'arsenic peut très facilement remplacer un ou plusieurs atomes de soufre dans leur structure cristalline.

Ces minéraux sont assez rares dans la nature. Cependant, aux plus fortes concentrations, ils se retrouvent associés à des zones de minéralisation (en particulier aurifères et sulfurées) plus ou moins importantes, comprenant un cortège d'autres métaux tels que Au, Ag, Cu, Sb, P, W et Mo. Ainsi, l'or est souvent associé aux minéraux soufrés tels que la pyrite (FeS<sub>2</sub>) ou l'arsénopyrite (en particules inférieures à 0,1 µm) (Boyle, 1987; Maddox *et al.*, 1998). De plus, la quantité d'or est proportionnelle à la quantité d'arsenic : l'or est plus abondant dans l'arsénopyrite que dans la pyrite (Fleet *et al.*, 1993).

Parallèlement aux processus abiotiques donnant naissance à ces minéraux, Newman (1998) a mis en évidence, pour la première fois, la formation biologique d'orpiment (par précipitation) chez la bactérie sulfato-réductrice *Desulfotomaculum auripigmentum* (Newman *et al.*, 1998).

**Tableau I.2.** Principales formes minéralisées retrouvées dans l'environnement (d'après Smedley *et al.*, 2002).

minéraux	composition	origine
Arsenic natif	As	veines hydrothermales
Arsénopyrite ou mispickel	FeAsS	forme la plus abondante des minéraux arséniés, veines minérales
Niccolite	NiAs	dépôts en veines et norites
Réalgar	AsS	dépôts veines, souvent en association avec l'orpiment, argiles et sources chaudes
Orpiment	As <sub>2</sub> S <sub>3</sub>	veines hydrothermales, sources chaudes, produit de sublimation volcanique
Cobalite	CoAsS	roches métamorphiques, dépôts à haute température
Tennantite	(Cu,Fe)12As <sub>4</sub> S <sub>13</sub>	veines hydrothermales
enargite	Cu <sub>3</sub> As <sub>4</sub>	veines hydrothermales
Arsénolite	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	forme secondaire issu de l'oxydation de l'arsénopyrite, ou de minéraux arséniés
Claudetite	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	forme secondaire
Scorodite	FeAsO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	forme secondaire
Annabergite	(Ni,CO)3(AsO <sub>4</sub> )2·8H <sub>2</sub> O	forme secondaire

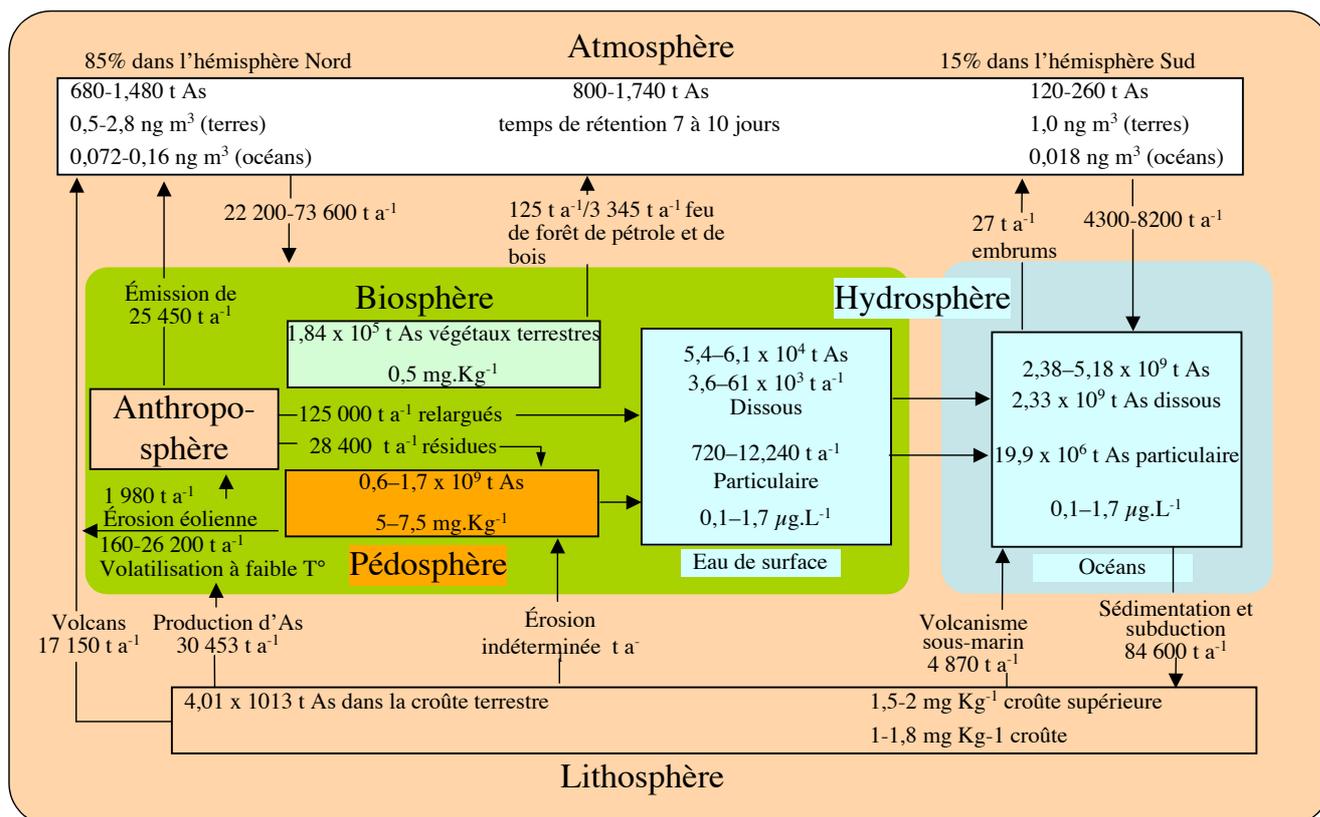
La pyrite joue un rôle important dans le cycle de l'arsenic car celle-ci n'est pas stable dans des environnements aérobies : elle s'oxyde en oxydes de fer tout en libérant du SO<sub>4</sub> et les éléments trace tel l'As. C'est pourquoi la présence de pyrite comme constituant mineur des charbons riches

en soufre est à l'origine des pluies acides, de l'acidité de l'eau de drainage des mines et est, par sa combustion, l'une des principales formes d'émission d'As dans l'atmosphère.

La concentration moyenne dans les roches ignées est de  $1,5 \text{ mg Kg}^{-1}$  (Ure et Berrow, 1982). Parmi celles-ci, les roches et cendres volcaniques, un peu plus concentrées en As (de l'ordre de  $5,9 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), sont souvent à l'origine d'eaux riches en As (Nicolli *et al.*, 1989). La concentration en As dans les roches sédimentaires est légèrement au-dessus de la moyenne de la croûte terrestre, et parmi celles-ci les boues et les argiles sont plus concentrées en As que les roches carbonatées et les sables. L'As dans les sols est majoritairement d'origine géologique, on peut y ajouter les contaminations anthropiques liées à l'agriculture (pesticides), aux terrils miniers et aux retombées atmosphériques (Smedley et Kinniburgh, 2002). La biodisponibilité de cet arsenic sera fonction de la biomasse microbienne, qui intervient dans la spéciation de l'élément, mais également de la texture du sol : l'arsenic est sorbé de façon préférentielle dans la fraction fine des sols ( $< 2\mu\text{m}$ ).

## II.2. L'atmosphère

Les apports d'arsenic dans l'atmosphère (figure I.1) se font par l'érosion éolienne, les émissions volcaniques, les embruns marins, les feux de forêts, la pollution et la volatilisation à froid. Cette volatilisation est essentiellement due aux transformations biologiques (biométhylation)(Cullen et Reimer, 1989). Les plus importantes sources anthropiques sont dues à la fonte des minerais et la combustion des énergies fossiles riches en As qui produisent de l'oxyde d'arsenic ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) très toxique (cuivre et charbon représentent 60% des émissions (Han *et al.*, 2003)). Matschullat (Matschullat, 2000) estime le temps de résidence de l'arsenic dans l'atmosphère à moins de 10 jours avant sa retombée sous forme de poussière, ou avec les pluies. Une concentration atmosphérique plus importante en As est observée près de sites de production : ainsi les concentrations atmosphériques dans l'hémisphère nord, où se concentrent les industries, sont supérieures à celles de l'hémisphère sud (figure I.1.) (Matschullat, 2000).



**Figure I.1.** Cycle global de l'arsenic. Flux et réservoirs dans les différents compartiments de la biosphère (d'après Matschullat, 2000).

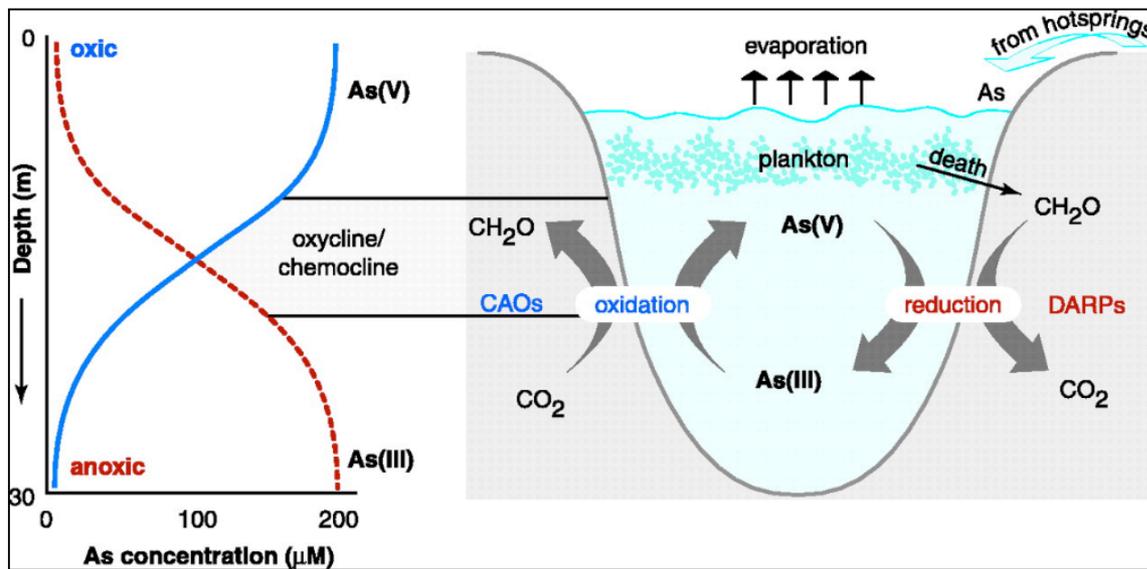
Ces dernières années cependant, en Europe de l'Ouest, des efforts considérables ont été réalisés afin de réduire l'apport atmosphérique en arsenic (Schulte et Gehrman, 1996).

### II.3. L'hydrosphère

Les concentrations en arsenic sont variables, dues principalement au contexte géologique et aux caractéristiques chimiques du milieu considéré. Les plus fortes concentrations se retrouvent néanmoins dans les eaux souterraines, environnement où les conditions physico-chimiques favorisent la mobilisation de l'As (Smedley et Kinniburgh, 2002). Ainsi, les conditions redox jouent un rôle majeur dans la mobilité de l'arsenic, et donc de sa biodisponibilité.

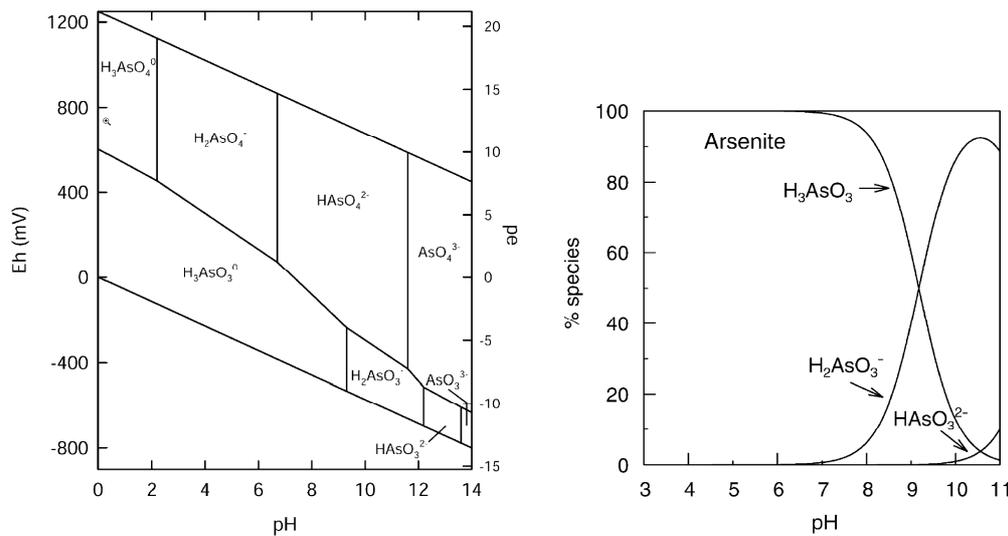
L'arsenic est l'un des rares éléments parmi les métalloïdes et métaux lourds (As, Se, Sb, Mo, V, Cr, U, Re) qui peut être mobilisé aux valeurs de pH caractéristiques des eaux souterraines (pH 6,5 à 8,5). Les espèces inorganiques, essentiellement la forme trivalente arsénite (As[III]) et la forme pentavalente arséniate (As[V]), sont prédominantes (Cullen et Reimer, 1989). Les formes organiques résultant de l'activité biologique peuvent se rencontrer occasionnellement, mais principalement dans les eaux de surface, et ne sont pas quantitativement importantes. Contrairement aux métaux qui, en solution, existent sous forme de cations, l'arsenic est en solution sous forme

d'anions. En conséquence, lorsque le pH augmente pour atteindre des valeurs de pH proches de la neutralité, les cations tendent à précipiter tandis que les anions persistent en solution. En conservant sa mobilité dans une large gamme de conditions redox, l'arsenic est un contaminant commun et majeur des aquifères. En effet, le potentiel redox (Eh) et le pH sont les facteurs les plus importants dans le contrôle de la spéciation de l'arsenic (Figures I.2., I.3.). Ces conditions nous montrent que dans des milieux oxydants et à des pH inférieurs à 6,9, l'espèce  $\text{H}_2\text{AsO}_4^-$  est dominante. Lorsque les valeurs de pH augmentent, l'espèce  $\text{HAsO}_4^{2-}$  devient majoritaire. Enfin, les formes  $\text{H}_3\text{AsO}_4^0$  et  $\text{AsO}_4^{3-}$  sont présentes dans les milieux extrêmement acides et alcalins. En milieu réducteur et pour des valeurs de pH supérieures à 9,2, l'espèce neutre  $\text{H}_2\text{AsO}_3^0$  prédomine (Pourbaix, 1963; Smedley et Kinniburgh, 2002).



**Figure I.2.** Spéciation de l'arsenic dans une colonne d'eau du lac Mono (Californie) en fonction des populations microbiennes présentes (à gauche). Cycle de l'arsenic dans la chémocline. La réduction de l'arséniate est réalisée par l'intermédiaire des DARPs (dissimilatory arsenate-reducing prokaryotes) qui utilisent la matière organique du plancton. L'oxydation de l'arsénite (aérobie et anaérobie) est réalisée par l'intermédiaire des CAOs (chemolithoautotrophic arsenite oxidizers) qui contribuent également à la production secondaire en fixant le  $\text{CO}_2$  dans la matière organique. L'arsenic entre dans le lac salin (90 g/L) et basique (pH=9,8) sous forme dissoute par les eaux hydrothermales (d'après Oremland, 2003).

Les réactions redox, lentes, contrôlent le comportement de nombreux éléments dont l'arsenic. Dans toutes les conditions redox, exceptées celles où prévalent de fortes conditions réductrices, les équilibres thermodynamiques montrent que le rapport de concentration  $\text{As[V]}/\text{As[III]}$  devrait être de l'ordre de  $10^{15}$ - $10^{26}$ . Cependant, les mesures réalisées font état de valeurs beaucoup plus faibles comprises entre 0,1 et 250, valeurs qui prennent en compte les transformations biologiques (Johnson, 1972).



**Figure I.3.** À gauche, diagramme Eh-pH-pe des espèces aqueuses de l'arsenic à 25°C et 1 bar de pression. À droite spéciation de l'arsenic en fonction du pH (Pourbaix, 1963). (pe potentiel d'oxydation)

### II.3.1. Les eaux de surface

Les concentrations moyennes en arsenic des eaux de surface restent modérées dans les eaux de rivière et de lacs (de 0,1 à 2  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). La lithologie traversée influence directement ces concentrations et des valeurs ponctuelles beaucoup plus élevées peuvent être mises en évidence. Les entrées géothermales dans les systèmes de surface sont également responsables de concentrations pouvant atteindre 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  et les activités minières sont à l'origine de valeurs encore plus élevées. Le lecteur intéressé par une revue de la littérature se reportera à Smedley (2002).

### II.3.2. Les eaux souterraines

Les concentrations s'établissent pour la plupart des pays à des valeurs inférieures à 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Comme évoqué précédemment, ces valeurs peuvent subir, à la hausse (jusqu'à 5000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), de grandes variations en fonction des conditions locales. La contamination par de l'arsenic de nombreux aquifères à travers le monde, desservant des bassins de population importants, entraîne cependant des problèmes épidémiologiques majeurs (figure I.6).

## II.4. La biosphère

L'arsenic est un élément très largement distribué et il n'est donc pas étonnant qu'il se retrouve concentré dans les organismes vivants. Environ 25 composés arséniés ont été identifiés dans des

échantillons biologiques, principalement dans les écosystèmes marins. Une fois ingéré, le métalloïde est métabolisé et excrété lentement.

Chez les végétaux, la quantité d'arsenic contenue dépend principalement de la concentration en arsenic du sol, déjà de l'ordre de quelques mg par kilogramme dans un sol non contaminé. Les concentrations en arsenic dans les végétaux fluctuent entre 0,001 et 5  $\mu\text{g}$  d'arsenic par gramme de matière sèche, en fonction de l'espèce considérée et du type de sol. En effet, les plantes à fortes teneurs en arsenic ( $>1 \mu\text{g g}^{-1}$ ) sont échantillonnées sur des sols riches en arsenic ( $>200\text{--}300 \text{ mg Kg}^{-1}$ ). Certains végétaux pourtant, qualifiés d'hyperaccumulateurs (Fitz et Wenzel, 2002) tels *Pteris vittata* ou *Pityrogramma calomelanos*, peuvent accumuler jusqu'à quelques milliers de mg d'arsenic par kilogramme de matière sèche et ce, dans des sols ne contenant qu'une centaine de mg d'arsenic par kilogramme (Bhumbla et Keefer, 1994; Fitz et Wenzel, 2002). De par leurs caractéristiques, ces végétaux sont utilisés dans les techniques de phytoremédiation.

### III. Historique

La première utilisation de métaux dans l'histoire de l'humanité n'est pas datée, mais remonte certainement à plusieurs milliers d'années : une figurine en plomb du British Museum est datée de 3800 ans avant JC (Clarkson *et al.*, 1995).

Les métaux ont depuis toujours été le moteur de l'évolution des civilisations et il n'est donc pas étonnant que celles-ci aient été nommées d'après le métal le plus représentatif de la période considérée : Âge du Bronze (4000 ans avant JC), du Fer (1500 ans avant JC), et maintenant du Silicium (1947-).

L'arsenic est certainement un des éléments chimiques qui a profondément modelé l'histoire et la destinée humaine ; du point de vue socio-politique (poison ou médicament), mais également économique (matière première industrielle).

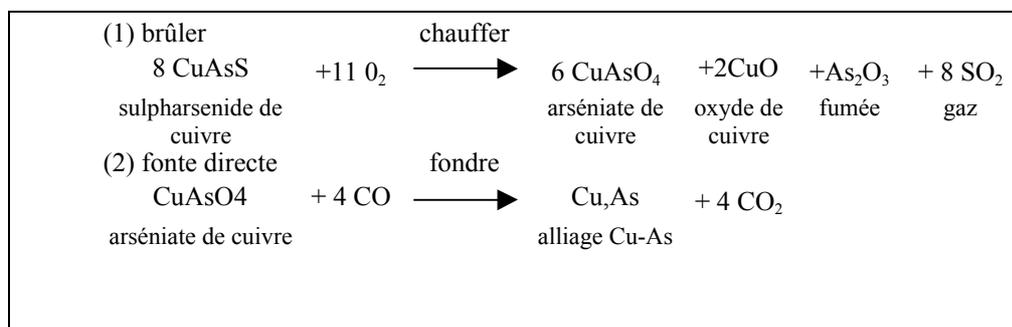
Bien que l'on s'accorde à dire qu'Albertus Magnus (Magnus, 1995) isola l'élément arsenic en 1250, les minéraux arséniés sont utilisés depuis l'Âge du Bronze et étudiés depuis l'Antiquité (Nriagu, 2002).

Le Bronze est un alliage de cuivre et d'étain. Cependant, dès le quatrième millénaire avant JC, à l'époque de l'Âge de Bronze-Ancien, les historiens constatent que le Bronze est souvent composé d'un alliage à base de cuivre et d'arsenic et nomment cette période l'Âge du Bronze-Arsenic. Celle-ci précède de 1500 ans l'Âge du Bronze-Étain (alliage cuivre-étain) (Lechtman et Klein, 1999; Muhly, 1988).

Les archéologues ont longtemps supposé que la présence d'arsenic dans le mélange était involontaire, mais liée à une contamination du minerai de cuivre par l'arsenic. Récemment, l'équipe de l'archéologue Doonan (Doonan *et al.*, 2004) a mis en évidence, sur des sites crétois datant du Bronze Ancien, que les métallurgistes mélangeaient intentionnellement du cuivre à des minerais riches en arsenic afin d'augmenter la dureté et la brillance du métal (la majorité des minerais d'or, d'argent, de cuivre, et de plomb contiennent une quantité variable d'arsenic. En 1985, Edelstein rapporte une quantité moyenne de 6,5 Kg d'arsenic par tonne de cuivre (Han *et al.*, 2003).

À l'époque romaine, Pline l'ancien<sup>1</sup> rapporte également dans son encyclopédie (Histoire Naturelle, livre XXXIII) l'extraction de l'or à partir d'orpiment (Zehnacker, 1983).

Lors de la fonte des minerais métallifères pour extraire les métaux, l'arsenic est oxydé en oxyde d'arsenic (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) (figure I.4.).



**Figure I.4.** Exemple de production d'un alliage de cuivre-arsenic. En chauffant un sulpharsénide de Cu, on observe l'émission de fumée d'oxyde (Lechtman et Klein, 1999).

Une exposition chronique à l'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> entraîne des névrites périphériques qui peuvent mener à de lourds handicaps fonctionnels, telle que la paralysie de certains membres (Harper, 1987). Il est donc probable que les métallurgistes antiques présentaient ce genre de handicap. C'est pourquoi ceux-ci auraient attribué à leur dieu du feu et de la métallurgie (Héphaïstos pour les grecs, Vulcain pour les romains) les mêmes infirmités (Aterman, 1999; Harper, 1987)(figure I.5.).

<sup>1</sup> Pline l'Ancien, naturaliste romain, est l'auteur d'une encyclopédie intitulée « *Histoire naturelle* », organisée en trente-sept livres, traitant chacun d'un thème différent. Le livre XXXIII, un des tomes dédiés aux matières « inanimées et précieuses », traite plus précisément de l'or et de l'argent. *Aurum faciendi est etiamnum una ratio ex auripigmento, quod in Syria foditur pictoribus in summa tellure, auri colore, sed fragile lapidum specularium modo. invitaveratque spes Gaium principem avidissimum auri; quam ob rem iussit excoqui magnum pondus et plane fecit aurum excellens, sed ita parvi ponderis, ut detrimentum sentiret propter avaritiam expertus, quamquam auripigmenti librae III permutarentur, nec postea temptatum ab ullo est.* Il existe une méthode de produire de l'or à partir de l'orpiment, un minéral qui est extrait à la surface de la terre en Syrie et très usité par les peintres. Doré, mais friable telle la pierre miroir cette substance excita beaucoup l'espoir de l'empereur Caligula, un prince avide d'or. Il fondit de grandes quantités d'or et obtint un or excellent, mais les quantités furent si faibles qu'il se retrouvait perdant. Tel fut le résultat d'une expérience menée uniquement par l'avarice, même si l'orpiment ne valait que 4 deniers. Depuis cette époque l'expérience n'a plus été tentée **Zehnacker, H.** 1983. *Pline l'Ancien, Histoire naturelle.* éd. Les Belles Lettres, Paris..



**Figure I.5.** Représentation du dieu Héphaïstos sur un cheval. On remarquera la difformité de ses membres inférieurs (Aterman, 1999).

L'utilisation de ces minerais d'arsenic n'était pas uniquement liée à la métallurgie ; ils étaient également employés dans les arts et la médecine. En effet, les archéologues ont mis en évidence que l'orpiment (de couleur jaune) et le réalgar (de couleur rouge) étaient déjà utilisés par les civilisations akkadiennes, égyptiennes, et grecques dans des préparations colorantes trouvant leurs usages dans la peinture, la cosmétique (fards funéraires par exemple) et l'écriture principalement (Forbes, 1964). Ces minerais furent encore employés par les peintres de la Renaissance (Nriagu, 2002).

### III.1. L'arsenic : médicament ou poison ?

La toxicité de l'arsenic fut associée très tôt à l'idée d'agent thérapeutique. Les traités médicaux des Assyriens (2000 avant JC) mentionnent l'orpiment et le réalgar. Hippocrate (400 avant JC) prescrivait ces mêmes minéraux pour traiter les ulcères (Miller *et al.*, 2002). Des traités médicaux de l'Antiquité préconisent l'emploi de l'orpiment et du réalgar comme remèdes contre toutes sortes de maux, tels le flegme, l'empoisonnement, la peur des fantômes et la lèpre (Inde texte du Charaka-Samhita)(Nriagu, 2002). Par la suite, les alchimistes arabes (~700 après JC) développèrent l'utilisation de l'arsenic pour les traitements de l'asthme, des maladies des poumons, de la peau, et de la dysenterie et furent certainement les premiers à employer l'arsenic pour lutter contre la peste (Konkola, 1992).

En Europe occidentale, dès le Moyen Âge, les produits à base d'arsenic sont disponibles chez tous les apothicaires. Au 16<sup>ème</sup> siècle, le médecin Paracelsus (1493-1541), contemporain de Léonard de Vinci, prescrivait le réalgar pour le traitement de structures tumorales. Paracelse énonce que « toute substance est un poison, il n'y en a aucune qui ne soit un poison. Le dosage correct différencie le poison du remède ». Il fut l'un des premiers à la Renaissance à redécouvrir qu'un composé toxique peut avoir un aspect thérapeutique à faible dose (Hombourg et Le Brun, 1992).

L'utilisation de l'arsenic, en tant que médicament, connu un grand essor avec le développement des organoarséniés. En 1786, un pharmacien anglais, Thomas Fowler, utilisa une solution alcaline d'arsénite de sodium, pour le traitement de fièvres intermittentes. La solution dite « de Fowler » fut alors utilisée pour traiter l'anémie, l'asthme, le psoriasis, le pemphigus, et l'eczéma (Miller *et al.*, 2002). Au début du 20<sup>ème</sup> siècle, Paul Ehrlich (prix Nobel de médecine 1908) travaillant sur la synthèse de composés organo-arséniés, découvrit le 4,4-arsenobis (2-aminophenol) dihydrochloride (CAS N°139-93-5) encore dénommé arsphenamine mais plus connu sous le nom de salvarsan. Ce composé resta pendant quarante ans le médicament de référence pour traiter la syphilis avant d'être remplacé par la pénicilline.

Les composés à base d'arsenic furent ensuite remplacés progressivement par des produits moins dangereux. Aujourd'hui cependant, ces composés arséniés se retrouvent à l'avant scène, de par leur utilisation comme anti-cancéreux (cf. chapitre V).

Les propriétés toxiques de l'arsenic ont également été mises à profit mais avec d'autres intentions, peu louables cette fois : crimes et luttes de pouvoir. L'arsenic était un poison facile à se procurer, sans odeur ni goût, et les symptômes sont proches de ceux de maladies connues (Nriagu, 2002). Certains historiens pensent que ce poison a été utilisé dès l'Antiquité, car les écrits de l'époque, par la description des empoisonnements et de leurs symptômes, laissent supposer que l'arsenic était impliqué. L'arsenic fut également un moyen de promotion sociale et hiérarchique au sein de l'aristocratie européenne (poison préféré des Borgia), à tel point que le nom de « poudre d'héritage » lui fut donné (Nriagu, 2002). L'âge d'or des empoisonnements à l'arsenic se situe entre la fin du Moyen Âge et la première moitié du 19<sup>ème</sup> siècle. A cette époque en effet, l'anglais James Marsh développe une technique pour détecter la présence d'arsenic, décourageant certains utilisateurs potentiels (Goessler et Kuehnelt, 2002).

L'histoire retient aussi que l'arsenic a été employé comme arme de guerre. Les anciens Chinois préconisaient de brûler les sulfures d'arsenic pour produire les fumées toxiques afin d'empoisonner l'armée ennemie (Nriagu et Azcue, 1994). Ce type d'arme préfigurait les gaz de combat à base d'arsenic (adamsite et léwisite) utilisés au cours de la première guerre mondiale, et dont le stockage est encore à l'heure actuelle la source de contaminations du sol ( $>900\text{mg Kg}^{-1}$ ) (Kohler *et al.*, 2001).

### **III.2. Les activités industrielles et la contamination anthropique**

L'utilisation de l'arsenic est devenue importante avec l'ère industrielle (tableau I.3.). L'une de ses principales utilisations, au cours du 20<sup>ème</sup> siècle, est liée à sa toxicité. En effet, les organoarséniés sont utilisés en tant qu'insecticides, fongicides et herbicides. Néanmoins, la mise en

évidence de leur pouvoir carcinogène sonna leur glas dans de nombreux pays industrialisés. Par exemple, l'arsénite de sodium, un puissant anti-fongique utilisé par les vignerons pendant plusieurs décennies pour lutter contre l'esca de la vigne, fut interdit en France en novembre 2001.

L'arsenic est cependant encore utilisé comme additif alimentaire pour les volailles, comme produits phytosanitaires, pour la préservation du bois (Chromated Copper Arsenate CCA ou arséniate de cuivre chromé), comme inhibiteur de corrosion, comme semi-conducteur dans l'industrie électronique, dans différents alliages et dans l'industrie verrière (rapports du Sénat sur métaux lourds (MIQUEL, 2001)). En 2000, la production industrielle d'arsenic cumulée depuis le début de l'ère industrielle atteignait 4,53 millions de tonnes. Dans les années 40, l'agriculture représentait le domaine d'application majeur de l'arsenic (90%) tandis qu'actuellement, celui-ci a été remplacé par la protection du bois (CCA). Depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2004, l'utilisation du CCA dans le traitement du bois destiné aux habitations particulières est interdit aux États-Unis (Han *et al.*, 2003).

Comparés aux autres produits contenant des métaux lourds, les produits contenant de l'arsenic possèdent des durées de vie beaucoup plus courtes (de 30 ans pour les bois traités à moins d'un an pour les biocides). L'arsenic contenu sera principalement relargué dans la pédosphère comme polluants. Ce compartiment de la biosphère représente donc un piège majeur pour l'arsenic (Han *et al.*, 2003). Le rapport du Sénat sur les métaux lourds indique que les poteaux traités aux CCA empoisonnent de nombreux animaux, et contaminent le sol sur un diamètre de 1 m (MIQUEL, 2001). Une autre source de contamination majeure de l'environnement par l'arsenic est la combustion des énergies fossiles, charbons et pétroles qui émettent de l'As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Nriagu et Pacyna, 1988). Certains charbons européens et américains ont des concentrations en As de l'ordre de 200 mg Kg<sup>-1</sup>, mais les charbons les plus riches en As sont ceux exploités en Chine qui contiennent souvent plusieurs milliers de mg Kg<sup>-1</sup> (Han *et al.*, 2003). Une meilleure gestion et l'utilisation de produits de substitution permettront à terme de réduire les pollutions.

**Tableau I.3.** Principales utilisations de l'arsenic (d'après Han, 2003).

secteurs	utilisations
Agriculture	Pesticides, herbicides, fongicides, insecticides, raticides, défoliants, conservation du bois
Élevage	Alimentations additives, prévention de maladies (Dysenterie porcine)
Médecine	traitement antisyphilitiques, trypanosomiase, amibiase, anti-cancéreux
Électronique	Cellules solaires, semi-conducteur
Métallurgie	durcissement des métaux
autres	électrophotographies, catalyses, pyrotechnies, céramiques, verreries

### III.3. La contamination chronique

Dès le 19<sup>ème</sup> siècle des études ont démontré que l'ingestion et l'inhalation chroniques d'arsenic étaient les causes respectives de cancers de la peau et des poumons (Smith *et al.*, 1992). Au cours des années 1960, il a été mis en évidence que la consommation d'eau riche en arsenic était responsable de cancers de la peau, des poumons, et du système digestif.

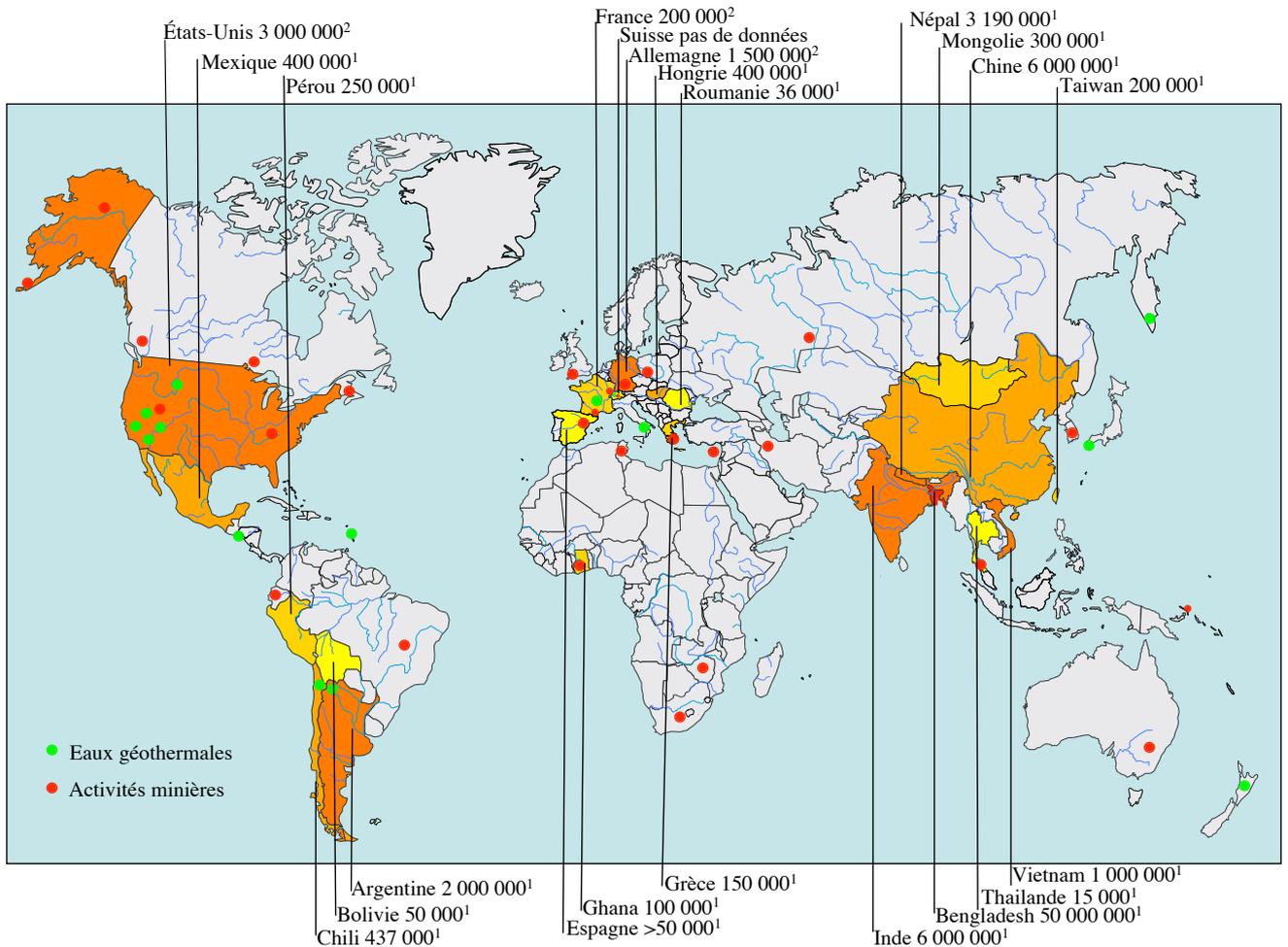
#### III.3.1 Les populations à risque

La toxicité de l'arsenic a donné lieu à de très nombreuses publications (1968; Frost, 1969; Jungmann, 1966; Pearce et Brown, 1915; Poulsen, 1973; Schulz, 1967; Smith *et al.*, 1995; Thiers *et al.*, 1967; Yeh, 1973; Zachariae, 1972). La toxicité de cet élément ne dépend pas uniquement de l'état d'oxydation mais aussi de l'espèce considérée. Les formes inorganiques As[III] et As[V] sont les formes les plus toxiques, mais aussi les plus abondantes dans le milieu aquatique. L'As est facilement solubilisé dans les nappes phréatiques. La consommation d'eau contaminée est ainsi devenue un problème majeur pour de nombreux pays (Figure I.6.). Une revue de la bibliographie disponible met en évidence que plus de 100 000 000 de personnes à travers le monde sont exposées de manière quotidienne à de fortes concentrations en arsenic, essentiellement à travers l'eau de boisson qui est pompée de nappes phréatiques contaminées.

#### III.3.2. Les normes

L'arsenic est classé par l'organisation mondiale de la santé (OMS ou WHO) comme un carcinogène puissant. L'OMS recommande que l'eau de consommation n'en contienne pas plus de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  (soit 10 ppb). Néanmoins, de nombreux pays ont gardé pour norme  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ , qui est l'ancienne valeur. Le « National Research Council Subcommittee on Arsenic in Drinking Water » (agence gouvernementale américaine) estime qu'une eau à  $50 \mu\text{g/L}$  place le risque de cancer entre 1 pour 100 et 1 pour 1000, ce qui est largement supérieur au risque acceptable pour les eaux de boisson habituellement de 1 pour 10 000 à 1 pour 1 000 000 (1999; Gurian *et al.*, 2001).

En France, depuis décembre 2003, et dans la majorité des pays européens la norme est de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  (directive européenne 98/83/CE du 3 novembre 1998 fixe à  $10 \mu\text{g/L}$  transposition en droit français, à travers le décret 2001-1220 du 20 décembre 2001). Aux Etats-Unis, la diminution de la norme de  $50$  à  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  est applicable à partir de janvier 2006 (EPA). Le changement de norme a d'ailleurs donné lieu à un débat politique et économique outre-Atlantique. Le coût économique des diverses options retenues (de  $20$  à  $2 \mu\text{g L}^{-1}$ ) a été simulé par l'EPA (Environmental Protection Agency). La perspective d'abaisser la norme à  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  a été jugée réalisable, mais trop coûteuse (Gurian *et al.*, 2001).



**Figure I.6.** Carte mondiale des populations à risque d'après les données bibliographiques actuelles. Estimations des personnes contaminées. <sup>1</sup> Nombres de personnes consommant quotidiennement une eau dont la concentration en arsenic est supérieure à  $50\mu\text{g L}^{-1}$ , <sup>2</sup> eau supérieure à  $10\mu\text{g L}^{-1}$ . Gradation des couleurs en fonctions du nombre de personnes contaminées, du jaunes (moins intense) vers le rouge (le plus intense).

#### IV. Métabolisme cellulaire de l'arsenic

Biosphère et géosphère ont évolué conjointement depuis l'apparition des premiers organismes vivants (~3,8 milliards d'années). La vie a ainsi colonisé tous les milieux et il est aujourd'hui impossible de trouver une partie de notre planète qui n'a pas été affectée par la vie, sauf peut-être au plus profond de la croûte terrestre (Newman et Banfield, 2002). La vie s'est adaptée progressivement aux éléments chimiques présents, qu'ils soient essentiels ou toxiques comme l'arsenic.

Rares sont les microorganismes dépourvus de mécanismes de résistance aux ions métalliques. Des gènes de résistance plasmidiques et chromosomiques sont connus pour de nombreux métaux  $\text{Ag}^{2+}$ ,  $\text{AsO}^{2-}$ ,  $\text{AsO}_4^{3-}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{CrO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Sb}^{3+}$ ,  $\text{TeO}_3^{2-}$ ,  $\text{Ti}^+$  et  $\text{Zn}^{2+}$  (pour revue (Silver, 1996; Silver, 1998))

Les premiers gènes de résistance bactériens étudiés étaient souvent situés sur des plasmides ou des transposons, car il était plus facile d'étudier des gènes plasmidiques. Néanmoins, il y a eu des exceptions tels les gènes chromosomiques de résistances au mercure et à l'arsenic chez les bactéries du genre *Bacillus* (Silver, 1996). Actuellement, le séquençage systématique de nombreux génomes, permet de mettre en évidence de plus en plus de gènes chromosomiques de résistance aux ions métalliques.

Différents mécanismes cellulaires existent et sont mis en œuvre dans la résistance aux éléments toxiques. Comme ces derniers ne peuvent pas être dégradés, les moyens de résistance développés par les cellules consistent (i) à interdire l'entrée du composé toxique dans la cellule, (ii) à les séquestrer, (iii) à les transformer en des espèces moins toxiques ou moins bio-disponibles (par des réactions d'oxydo-réduction par exemple), (iv) à les sublimer (volatilisation suite à des réactions de méthylation par exemple).

Les organismes vivants et en particulier les micro-organismes, jouent un rôle significatif dans le cycle de l'arsenic par différents mécanismes agissant sur la mobilité, et donc, sur la biodisponibilité de l'élément : des processus indirects telles la dissolution de sulfures par oxydation, la réduction d'oxydes de fer et de sulfates, ou des processus directs, telles la réduction, la respiration (autre forme de réduction), la méthylation et l'oxydation. Certains micro-organismes utilisent l'arsenic dans leur métabolisme soit comme accepteur terminal d'électrons dans la réduction dissimilatrice de l'arséniate (respiration) (Ahmann *et al.*, 1994; Newman *et al.*, 1998; Stolz et Oremland, 1999), soit comme donneur d'électrons dans l'oxydation chimioautotrophique de l'arsénite (« manger l'arsenic ») (Ilialetdinov et Abdrashitova, 1981; Santini *et al.*, 2000).

#### **IV.1. L'entrée dans la cellule**

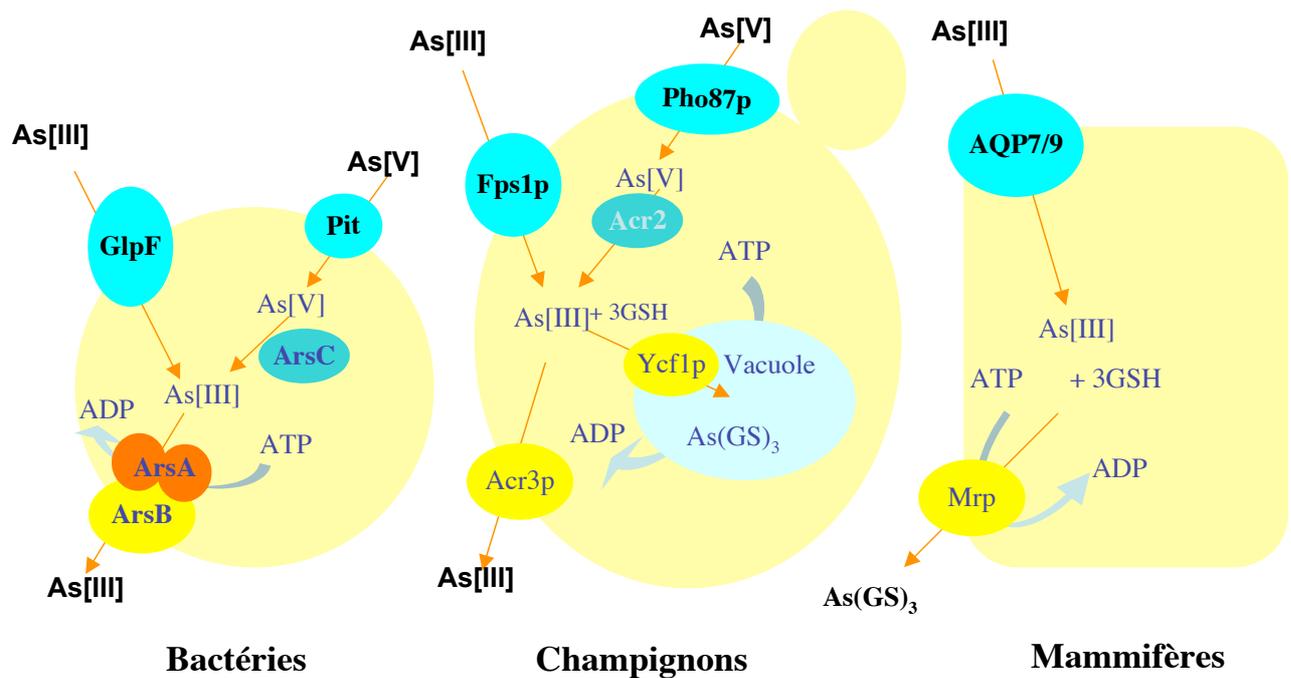
L'entrée de l'arsenic dans la cellule engendre une cascade de réactions menant à la mort cellulaire. Ainsi, empêcher l'entrée du composé toxique dans la cellule par imperméabilisation (utilisation de système de transport spécifique) est l'un des mécanismes de résistance mis en œuvre.

L'oxyanion  $\text{As[V]}$  est présent en solution sous trois formes, correspondant aux trois différents pKa (2,2 ; 7,0 et 11,5). Ceux-ci sont comparables à ceux du phosphate (pKa de 2,1 ; 7,2 et 12,7). Ainsi, l'entrée de l'arséniate dans la cellule bactérienne peut être réalisée par les systèmes de transport transmembranaire du phosphate (anion analogue). Il existe deux systèmes de transport du

phosphate dans la souche *Escherichia coli* (Rosenberg *et al.*, 1977). Le premier est le transport du phosphate inorganique (ou Pit, Phosphate inorganic transport), peu spécifique, et qui laisse entrer aussi bien l'As[V] que le Pi. Le second système, nommé Pst (Phosphate specific transport), est, quant à lui, 100 fois plus spécifique pour le phosphate que pour l'As[V] (Willsky et Malamy, 1974; Willsky et Malamy, 1980). Ce système, dont la spécificité vis à vis du phosphate n'est pas absolue, ne confère donc pas une résistance totale à l'As[V]. Ainsi, les cellules ont développé en parallèle des mécanismes d'extrusion des composés toxiques.

Dans le cas de l'As[III], il a longtemps été supposé qu'il entrait par diffusion passive dans la cellule (Cervantes *et al.*, 1994), et ce n'est qu'au cours de ces dix dernières années que des mécanismes de transports plus spécifiques ont été découverts (figure I.7.). L'As[III] se trouve sous la forme (As(OH)<sub>3</sub>) non chargée à des pH inférieurs à 9,3. A ces pH, il entre dans la cellule *via* les aquaglycéroporines (protéines de transport du glycérol et autres petites molécules non chargées) qui sont présentes chez les bactéries, les levures et les mammifères (Liu *et al.*, 2002). La protéine GlpF de la souche *E. coli* est un transporteur de polyol similaire aux aquaglycéroporines (Park et Saier, 1996). La mutation du gène *glpF* confère uniquement une faible résistance à l'antimonite Sb[III] (Sanders *et al.*, 1997). Malgré le fait que les mutants *glpF* soient sensibles à l'As[III], il est supposé que la protéine GlpF transporte quand même de l'As[III]. L'absence de phénotype lié à l'arsenic suggère qu'il existe un ou plusieurs autres systèmes d'entrée de l'As[III] dans la cellule.

Le même phénomène est observé chez les cellules eucaryotes. En effet, chez la levure, la délétion du gène codant l'aquaglycéroporine Fps1p confère une résistance à l'As[III] et à Sb[III]. Cette résistance à l'arsenic est faible, sous-entendant l'existence d'un autre moyen d'entrée dans la cellule pour l'As[III]. Les mutants présentant un canal de transport du glycérol toujours ouvert sont hypersensibles à As[III] et à Sb[III] (Wysocki *et al.*, 1997; Wysocki *et al.*, 2001). En 2002, l'équipe du professeur Rosen a démontré que les analogues humains AQP7 et AQP9 de Fps1p complètent la délétion du gène *fps1p* dans la souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* (Rosen, 2002b). Ce dernier résultat suggère que l'As[III] entre aussi par les aquaglycéroporines dans les cellules des mammifères.



**Figure I.7.** Représentation schématique des différents mécanismes d'entrée de l'arsenic dans la cellule (d'après Rosen 1999).

Néanmoins il s'avère que ces systèmes de transport, lorsqu'ils sont mutés, ne confèrent pas toujours une résistance complète à l' $As[III]$ , suggérant qu'il existe certainement d'autres mécanismes d'entrée de l' $As[III]$  dans la cellule.

## IV.2. La méthylation de l'arsenic

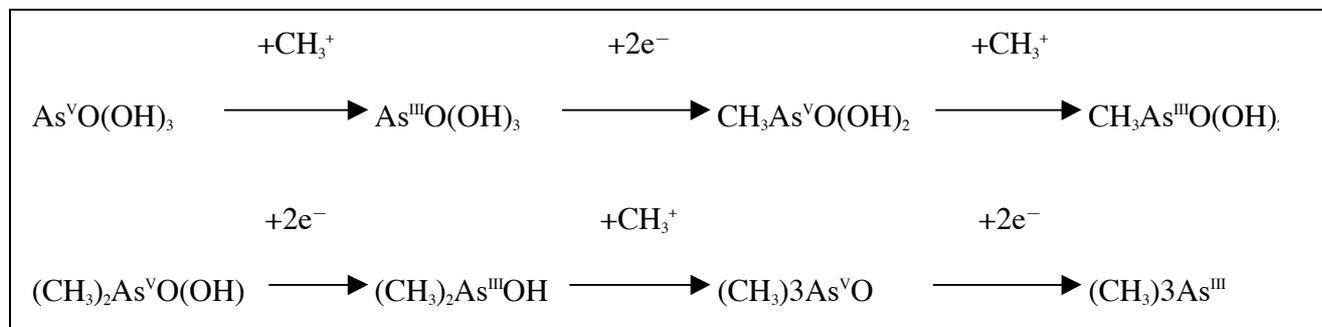
La biométhylation de l'arsenic forme à la fois des espèces volatiles et non volatiles. Les espèces prédominantes d'arsenic volatiles sont les mono-, di- et triméthylarsine (MMA, DMA et TMA) dont les structures respectives sont  $(CH_3)_nAsH_{3-n}$  ; pour  $n=1,2,3$ . Les composés non-volatils sont majoritairement les méthylarsoniates et les méthylarsiniates (Bentley et Chasteen, 2002). La méthylation des formes inorganiques est souvent considérée comme une forme de détoxication. Les espèces organiques méthylées tels le MMA et le DMA sont moins réactives, moins toxiques et plus aisément excrétables par l'urine que ne l'est la forme inorganique  $As[III]$ . Cependant, de nouvelles études semblent montrer que les formes méthylées peuvent être tout aussi toxiques que l' $As[III]$  (cf chapitre Toxicité de l'arsenic : le paradoxe).

La biométhylation de l'arsenic est un mécanisme biologique largement répandu dans le monde vivant, présent chez les microorganismes, mais également chez les algues, les plantes, et les animaux. Pourtant, quelques exceptions existent dans le règne animal: aucune méthylation de l'arsenic n'est mise en évidence chez les chimpanzés et les cochons d'Inde (Aposhian, 1997).

La mise en évidence de la biométhylation de l'arsenic n'est pas récente. Dès 1815, il fut constaté des cas d'empoisonnement liés à des problèmes de moisissures de papiers peints. À cette époque, de nombreux pigments employés dans cette industrie étaient préparés à base d'arsenic (le « vert de Paris » par exemple). On supposa alors que les moisissures qui se développaient sur ces papiers utilisaient l'arsenic. Des cultures de ces moisissures en présence d'arsenic confirmèrent que les microorganismes méthyloient cet élément et dégagèrent un gaz à l'odeur d'ail (Bentley et Chasteen, 2002). Inhalé, ce gaz provoquait ces intoxications.

Ces études portant sur la biométhylation de l'arsenic par les microorganismes furent reprises dans les années 1890 par l'Italien Gosio. Il isola des moisissures (*Scopulariopsis brevicalis*) qui méthyloient l'arsenic et mit au point une méthode microbiologique simple pour identifier de manière qualitative l'arsenic par l'odeur d'ail dégagée (sensibilité jusqu'à  $2 \text{ ng Kg}^{-1}$ ) (Bentley et Chasteen, 2002). Le principe est d'ajouter la matière « suspecte » à une culture de *S. brevicaucis*. Si de l'arsenic y est contenu, une odeur d'ail se développe en 10 minutes. Ce n'est que beaucoup plus tard, dans les années 1940, que le gaz de Gosio fut identifié comme étant du triméthylarsine (Challenger, 1945).

Après guerre, Challenger émit l'hypothèse que dans la méthylation de l'arsenic, le groupement méthyle était transféré d'un composé tel la bétaine, la méthionine ou un dérivé de choline (Challenger, 1945). Il proposa alors une suite de réactions d'oxydation et de réduction selon le schéma de la figure I.8. :



**Figure I.8.** Méthylation de l'arsenic (D'après Challenger, 1951).

L'étude de la formation de  $(\text{CH}_3)_3\text{As}$  (triméthylarsine) en présence des trois précurseurs marqués radioactivement, permis de mettre en évidence que seul le  $^{14}\text{CH}_3$  marqué de la méthionine était transféré à l'arsénite dans une culture de *S. brevicaucis*. Des études ultérieures ont démontré que le donneur de groupement méthyle dans la cellule était la S—adénosyl méthionine (Cullen et Reimer, 1989). Des expériences similaires effectuées avec le méthylarséniate et le diméthylarséniate marqués au  $^{14}\text{C}$  révèlent la formation de triméthylarsine, ainsi que du méthylarséniate formé par déméthylation du diméthylarséniate. Ces observations suggèrent que

bien que les différents intermédiaires de la réaction de méthylation de l'arsenic soient présents dans la cellule, les mécanismes impliqués dans la méthylation semblent complexes (Cullen et Reimer, 1989).

Challenger n'ayant pu, ni observer, ni isoler de procaryotes capables de méthyler l'arsenic, il en conclut que les bactéries ne possédaient pas cette capacité (Challenger, 1951).

La première bactérie méthyant l'arsenic fut isolée en 1971 (McBride et Wolfe, 1971). La souche *Methanobacterium* MoH pousse en anaérobiose en présence de H<sub>2</sub> ou de CO<sub>2</sub> et produit un gaz à l'odeur d'ail à partir de l'arséniate. Ce gaz est du diméthylarsine, et la présence de CO<sub>2</sub> est une condition nécessaire à sa production. La même étude montre qu'en présence d'arséniate, des extraits cellulaires de *Desulfovibrio vulgaris* produisent également une arsine (McBride et Wolfe, 1971). Par la suite, d'autres bactéries furent identifiées. Ces bactéries ont été isolées de l'environnement, et les produits formés à partir des pesticides à base d'arséniate ou d'arsénite de sodium sont résumés dans le tableau I.4. Ces souches sont capables de méthyler l'arsenic en méthyl-, diméthyl- et triméthyl arsine (Shariatpanahi et Anderson, 1981; Shariatpanahi *et al.*, 1981, Shariatpanahi et Anderson, 1984).

Chez la plupart des mammifères, l'arsenic inorganique est méthylié en acide monométhylarsonique (MMA), puis en acide diméthylarsinique (DMA), selon le schéma réactionnel précédent.

La méthylation et la dégradation des composés méthyliés de l'arsenic ont été observées, mais il existe à l'heure actuelle encore peu de littérature qui traite des mécanismes enzymatiques et/ou génétique. Les formes trivalentes de l'arsenic seront non seulement méthyliées (Aposhian, 1997; Hughes, 2002; Thomas *et al.*, 2001), mais peuvent aussi être réoxydées en forme pentavalente par le peroxyde d'hydrogène formé par les xanthines oxydases (Aposhian *et al.*, 2003).

**Tableau I.4.** Bactéries capables de méthyler l'arsenic (D'après Cullen *et al.*, 1989).

bactéries	substrat	produits
<i>Methanobacterium</i> MoH	NaH <sub>2</sub> AsO <sub>4</sub>	Me <sub>2</sub> AsH
<i>Corynebacterium sp</i>	NaH <sub>2</sub> AsO <sub>4</sub>	As[III], Me <sub>2</sub> AsH, Me <sub>3</sub> As
<i>Flavobacterium sp</i>	NaH <sub>2</sub> AsO <sub>4</sub>	As[III], Me <sub>2</sub> AsH
	MeAsO(ONa) <sub>2</sub>	AsV, MeAsH <sub>2</sub> , Me <sub>2</sub> AsH
<i>Proteus sp</i>	NaH <sub>2</sub> AsO <sub>4</sub>	As[III], MeAsH <sub>2</sub> , Me <sub>2</sub> AsH
<i>E. coli sp</i>	NaH <sub>2</sub> AsO <sub>4</sub>	As[III], MeAsH <sub>2</sub> , Me <sub>2</sub> AsH
<i>Pseudomonas sp</i>	NaH <sub>2</sub> AsO <sub>4</sub>	As[III], MeAsH <sub>2</sub> , Me <sub>2</sub> AsH, Me <sub>3</sub> As
	MeAsO(ONa) <sub>2</sub>	AsV, MeAsH <sub>2</sub> , Me <sub>2</sub> AsH
<i>Achromobacter sp</i>	} MeAsO(ONa) <sub>2</sub>	AsV, MeAsH <sub>2</sub> , Me <sub>2</sub> AsH
<i>Aeromonas sp</i>		MeAsH <sub>2</sub> , Me <sub>2</sub> AsH, Me <sub>3</sub> As
<i>Enterobacter sp</i>		MeAsH <sub>2</sub> , Me <sub>2</sub> AsH
<i>Nocardia</i>		AsV, MeAsH <sub>2</sub> , Me <sub>2</sub> AsH, Me <sub>3</sub> As
<i>Veillonella alcalescens</i>	} Me <sub>3</sub> AsO	
<i>Streptococcus sanguis</i>		
<i>Fusobacterium nucleatum</i>		Me <sub>3</sub> As
<i>Bacillus subtilis</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>E. coli</i> K12		

### IV.3. L'opéron *ars* : un système de résistance

La réduction microbienne de l'arséniate en arsénite apparaît dans au minimum deux cas. D'une part, la réduction dissimilatrice lorsque l'As[V] est utilisé comme accepteur terminal d'électrons pour une respiration anaérobie (Ahmann *et al.*, 1994), et d'autre part, dans l'activité de détoxification qui fait intervenir un arséniate réductase et une pompe à efflux de l'arsénite (Rosen, 2002a).

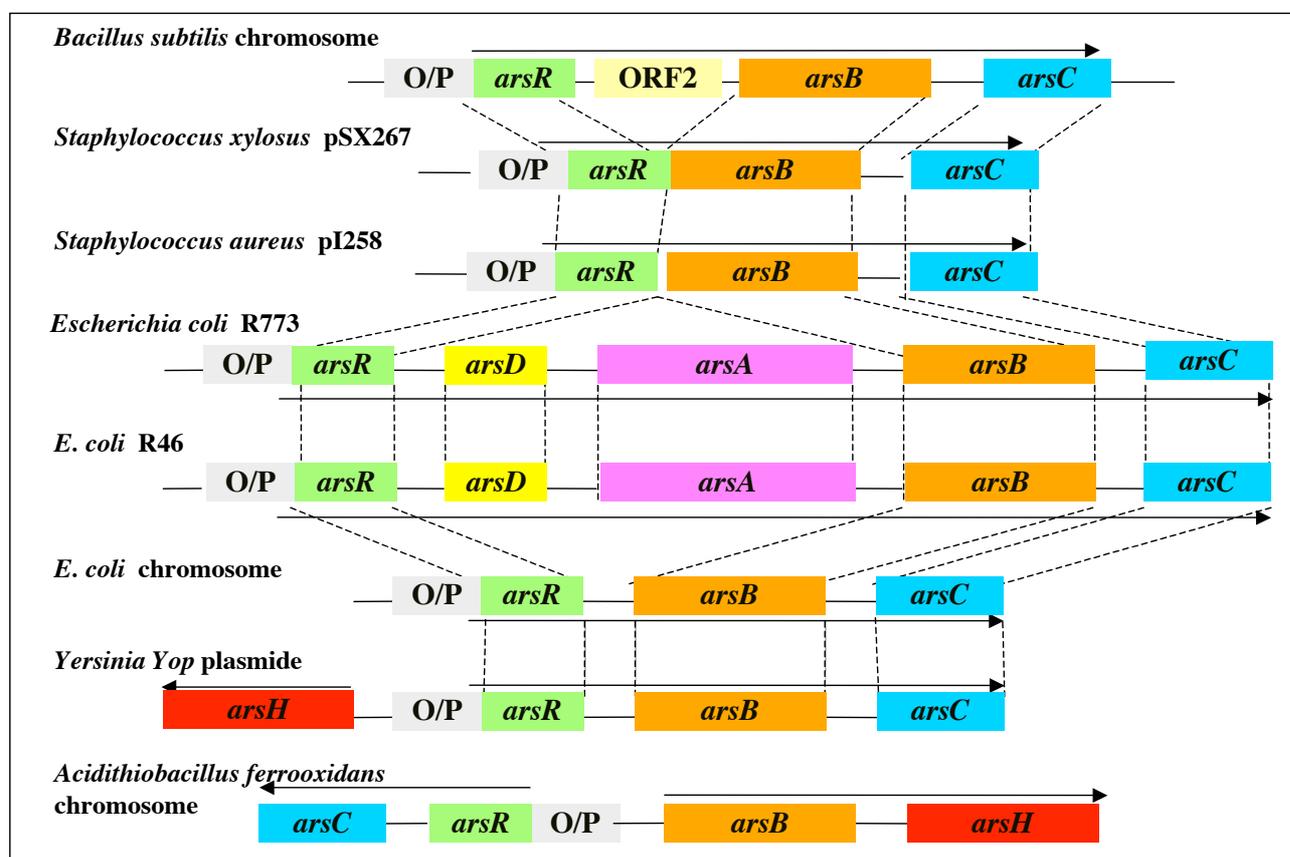
L'utilisation de l'arsenic dans les pesticides, les additifs alimentaires ou les composés antimicrobiens, a indubitablement contribué à la dispersion des plasmides qui encodent la résistance à l'arsenic. En 1968, en analysant les plasmides (pI258) qui confèrent la résistance à la pénicilline aux souches de *Staphylococcus aureus*, Novick *et al.* (1968) mirent en évidence que ces plasmides hébergeaient également des gènes de la résistance à l'arsenic, à l'antimoine et à d'autres métaux (Novick et Roth, 1968). Les auteurs isolèrent différents mutants, sensibles soit à l'As[III], soit à l'As[V], et suggèrent alors que le plasmide code des gènes de résistance spécifiques aux deux espèces d'arsenic. Des délétions progressives du plasmide ont montré que les gènes étaient tous regroupés dans une même zone du plasmide, peut-être même organisés en structure opéronique

(Novick et Roth, 1968). Hedge et Baumberg (1973) démontraient que le plasmide R773 de *E. coli* lui conférait une résistance accrue à l'arsenic (Hedges et Baumberg, 1973).

Ces premières études ont montré qu'une même région de ces plasmides conférait la résistance à l'As[III] et l'As[V], mais aussi à Sb[III], analogue de l'As[III]. La résistance aux trois formes ioniques est induite indifféremment par l'un des trois ions, suggérant un mécanisme de résistance commun à ces espèces (Silver *et al.*, 1981).

Lors de ces premières études, il fut supposé que l'arséniate était la forme toxique qui était exportée par la cellule (Mobley *et al.*, 1982; Silver *et al.*, 1981; Silver et Keach, 1982). Cependant, les études suivantes démontrèrent que l'As[V] devait être réduit en As[III] avant de pouvoir être exporté par la cellule (Ji et Silver, 1992a; Oden *et al.*, 1994).

Les premières analyses génétiques et le séquençage des plasmides conférant la résistance à l'arsenic (Chen *et al.*, 1986) confirmèrent que l'ensemble des gènes étaient regroupés dans une structure opéronique, l'opéron *ars*. Différents exemplaires de cet opéron ont été séquencés et décrits. Ils possèdent au moins trois gènes (Cervantes *et al.*, 1994) : *arsR* code un répresseur opéronique, *arsB* code une protéine transmembranaire qui exporte l'As[III] et le Sb[III] et *arsC* code une arséniate réductase (figure I.9.). L'opéron *ars* codé par le plasmide pI258 ne comporte que trois gènes *arsR*, *arsB* et *arsC* ( Ji et Silver, 1992b, Rosenstein *et al.*, 1992) tout comme l'opéron



20 **Figure I.9.** Structures de différents opérons *ars*.

chromosomique d'*E. coli* (Silver et Phung, 1996; Sofia *et al.*, 1994).

Le système de résistance du plasmide R773 fut le premier à être séquencé. Il code pour 5 gènes co-transcrits sur un même ARN messager (Chen *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 1985). Certains opérons *ars*, tel celui du plasmide R773, possèdent en outre les gènes *arsD* et *arsA* (Chen *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 1985). Le gène *arsD* est toujours retrouvé sur des opérons encodant le gène *arsA*, suggérant une acquisition commune des deux gènes. La protéine ArsD, qui est un dimère composé de deux monomères de 13 kDa, est un second répresseur de la régulation de l'opéron. Tandis qu'ArsR régule la transcription de l'opéron *ars*, ArsD fonctionne en tant que répresseur secondaire. Il permet d'éviter une expression trop importante, ou encore d'éviter une surexpression de la protéine ArsB, toxique en forte concentration. Il peut aussi s'agir d'une économie d'énergie. Les gènes *arsA* et *arsD* n'ont été trouvés que sur les opérons *ars* plasmidiques de bactéries Gram-.

Un autre gène *arsH* a été trouvé dans les opérons de résistance de *Yersinia enterocolitica* (Neyt *et al.*, 1997) et de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Butcher *et al.*, 2000). La fonction de ArsH n'a pas encore été mise en évidence. Néanmoins, la présence du gène *arsH* s'avère nécessaire pour que le système soit fonctionnel chez *Y. enterocolitica* (Neyt *et al.*, 1997).

#### IV.3.1. ArsR : une famille de régulateurs

Les opérons *ars* contiennent toujours un gène *arsR* qui code pour une protéine de régulation ArsR (d'une taille comprise entre 100 et 120 aa). Xu *et al.* (1996) ont mis en évidence qu'ArsR est un répresseur de l'opéron *ars*, contrôlé par la présence de As[III] ou de Sb[III] dans le milieu (Xu *et al.*, 1996). L'année suivante, la même équipe remarque que la dimérisation de ArsR est nécessaire pour la fixation à l'ADN et donc pour la régulation de l'opéron (Xu et Rosen, 1997). L'opéron est réprimé lorsque ArsR fixe la région opératrice et promotrice (O/P). La fixation du métalloïde à ArsR entraîne un changement conformationnel du répresseur altérant sa fixation à l'ADN, laissant alors la place au système de transcription et à l'expression de l'opéron (Wu et Rosen, 1993b).

Actuellement, toutes les protéines ArsR connues sont très semblables entre elles et aux autres membres de la famille de protéine de régulation dimérique (SmtB/ArsR), incluant des protéines de régulation d'autres systèmes de résistance, tels ceux pour le Cd[II], le Pb[II], le Zn[II] et le Hg[II] chez *Streptomyces* (Busenlehner *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 1994).

Le site de fixation au niveau de la région opératrice est un motif peu conservé de 12nt-2nt-12nt, généralement localisé sur le site d'initiation de la transcription de l'opéron *ars* ou à proximité (Busenlehner *et al.*, 2003). Cette protéine ArsR est composée de trois domaines : un domaine de fixation du métalloïde, un domaine d'interaction avec l'ADN et un domaine de dimérisation

(Busenlehner *et al.*, 2003). Le site de liaison probable de l'As[III] de la protéine ArsR du plasmide R773 est composé de Cys32, Cys34, Cys37 (Shi *et al.*, 1994). La mutation d'une de ces cystéines inhibe la régulation de l'opéron, mais pas la fixation de répresseur à l'ADN (Wu et Rosen, 1993b). Les cystéines 32 et 34 font parties d'un motif conservé ELCV(C/G)D, aussi appelé cassette de fixation métal (Busenlehner *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 1994). Ce motif serait le domaine d'interaction avec le métalloïde As[III] ou Sb[III]. Néanmoins, il s'avère que ce motif n'est pas commun à toutes les ArsR. Butcher *et al.* (2002) ont démontré que l'ArsR de *Acidithiobacillus ferrooxidans* ne possède pas de domaine ELCV(C/G)D, suggérant que le modèle décrit jusqu'alors n'est pas applicable à toutes les protéines ArsR (Butcher *et al.*, 2000).

ArsD est un régulateur secondaire de l'expression de l'opéron *ars*, qui présente une affinité moindre à l'As[III] et à l'ADN que le répresseur ArsR. C'est pourquoi la régulation se fait à une concentration plus forte en arsenic (Chen *et al.*, 1997). La présence ou non du gène *arsD* ne semble avoir aucune incidence sur la résistance bactérienne à l'arsenic dans les conditions de laboratoire (Wu et Rosen, 1993a). Néanmoins, le fait que ce gène soit présent dans différents opérons *ars* plasmidiques, laisse supposer que cette protéine joue un rôle plus subtil pour la cellule dans l'environnement. Les protéines ArsR et ArsD forment ensemble un système de régulation qui contrôle le niveau basal et le niveau maximal d'expression de l'opéron. Cet exemple de double régulation pour un opéron simple est rare. Le seul autre exemple décrit est le système MerR/MerD (Yu, H *et al.* 1994, JCB). ArsD fixe la même région O/P que ArsR. De faibles concentrations en As[III] ou Sb[III] induisent l'expression de l'opéron en se fixant sur ArsR qui se dissocie alors de l'ADN, permettant l'expression de l'opéron et de *arsD*. Une fois que la quantité de ArsD est suffisante, ce second répresseur se fixe sur l'ADN, inhibant à son tour l'expression de l'opéron. En revanche, si la concentration intracellulaire du métalloïde augmente, il y aura dissociation de ArsD, qui permettra à nouveau l'expression de l'opéron (Chen et Rosen, 1997).

Les protéines ArsD et ArsR codées par le plasmide R773 sont très peu similaires au niveau de la composition en aminoacides. De plus ArsD présente une moins grande affinité pour l'ADN que ArsR. La protéine ArsD du plasmide R773 possède huit résidus cystéine, soit beaucoup plus que toutes les autres protéines de l'opéron. Six de ces cystéines forment des paires, hors les paires de cystéines sont connues pour fixer l'As[III] (Hoffman et Lane, 1992). Il a été démontré que ces paires sont essentielles au fonctionnement de ArsD (Li *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002).

#### **IV.3.2. ArsB : un système d'extrusion**

Le gène *arsB* code la protéine transmembranaire ArsB qui confère, à elle seule, la résistance à As[III] et à Sb[III] en exportant les métalloïdes hors de la cellule, en utilisant pour énergie, soit le

potentiel de membrane, soit le produit de l'ATPase (ArsA) (Broer *et al.*, 1993; Ji et Silver, 1992b). Deux familles protéiques de pompes d'extrusion d'As[III] ont été identifiées. Un transporteur transmembranaire de l'As[III], de la famille des transporteur de type Acr3 a été isolé à partir de l'élément SKIN de *B. subtilis* (Sato et Kobayashi, 1998), retrouvé également dans quelques autres bactéries, archées et levures. Néanmoins, la majorité des systèmes analysés correspond aux protéines ArsB semblables à celles codées par les gènes *ars* des plasmides R773 et pI258 (Rosen, 2002a).

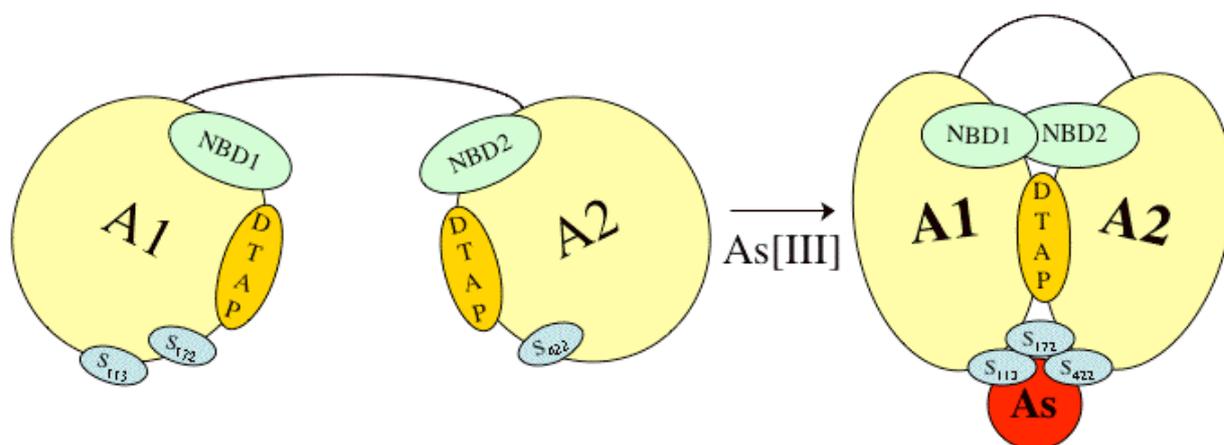
La seule protéine ArsB étudiée à ce jour l'a été par Wu *et al.* (1992). Il s'agit de la protéine ArsB codée par le plasmide R773. C'est une protéine de 429 aminoacides à 12 domaines transmembranaires, dont les extrémités C-terminale et N-terminale se trouvent du côté cytoplasmique (Wu *et al.*, 1992). La protéine ArsB fonctionnerait comme transporteur secondaire, utilisant le potentiel de membrane pour transporter la forme anionique de l'intérieur vers l'extérieur de la membrane, excréant ainsi As[III] (Kuroda *et al.*, 1997).

Il est intéressant de noter que toutes les études actuelles sont basées sur les seuls résultats obtenus de l'analyse de l'ArsB codée par l'opéron *ars* du plasmide R773. Ainsi, aucune étude n'a pour le moment, pu expliquer le fonctionnement du transporteur ArsB dans les cellules acidophiles, où le potentiel de membrane est inversé. Aussi, certains auteurs estiment que l'hypothèse du potentiel de membrane n'est pas une explication suffisante pour élucider le fonctionnement de la pompe ArsB (Butcher *et al.*, 2000; Gihring *et al.*, 2003). Il est étonnant de ne trouver que quelques études partielles s'intéressant à la protéine ArsB (Broer *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1992), pourtant la composante majeur du système de résistance, alors que des protéines (ArsA, ArsD) qui semblent n'appartenir qu'à quelques opérons ont été l'objet d'études très détaillées (Rensing *et al.*, 1999).

#### IV.3.2.1. ArsA : une ATPase couplée à ArsB

ArsA, la protéine qui permet grâce à l'hydrolyse de l'ATP d'effectuer un efflux énergétique, est une enzyme particulière qui n'a été retrouvée à l'heure actuelle, que sur quelques opérons *ars* de plasmides de bactéries à Gram négatif. Néanmoins, cette enzyme qui n'est que rarement présente dans les opérons de résistance à l'arsenic, a fait l'objet de nombreuses études et revues (Rensing *et al.*, 1999). *E. coli* possède un opéron *arsRBC* chromosomique qui ne confère qu'une résistance modérée à l'arsenic, mais il a été observé que lorsque la protéine ArsA, produit de l'opéron *arsRDABC* du plasmide R773, est exprimée dans la souche d'*E. coli*, la cellule devient résistante à des concentrations plus élevées en arsenic : le complexe ArsAB alors produit, est plus efficace que la protéine ArsB seule, pour exporter As[III] (Dey et Rosen, 1995).

La protéine ArsA codée par R773, composée de 583 aminoacides, est une ATPase associée à la protéine ArsB. En l'absence de ArsB, la protéine ArsA est soluble et peut être aisément purifiée et analysée. L'enzyme ArsA est un dimère constitué de deux moitiés A1 et A2 identiques qui sont reliées entre elles par 25 aminoacides (figure I.9)(Li et Rosen, 2000). Chaque sous-unité est identique et possède un site de fixation de l'ATP (Walker *et al.*, 1982). La structure cristallographique a permis de déterminer trois types de domaines : deux domaines de fixation de nucléotides (ou NBD, nucleotide binding domain) (Zhou *et al.*, 2000) composés de repliements entre les régions A1 et A2 ; un domaine unique de fixation du métallope localisé à l'extrémité opposée des sites NBD ; et entre ces deux domaines, un domaine de transduction du signal défini par 12 acides aminés (**D**<sub>142</sub>**TAPTGH**TIRLL et **D**<sub>447</sub>**TAPTGH**TIRLL), présent sur chacune des moitiés, a été identifié (Zhou et Rosen, 1997). L'activité ATPase de la protéine ArsA est activée par la fixation de trois molécules d'As[III] ou de Sb[III] au site allostérique de fixation, qui est composé des aminoacides Cys113, Cys172 et Cys422 (Bhattacharjee *et al.*, 1995; Bhattacharjee et Rosen, 1996) et His148 et His453 (Bhattacharjee et Rosen, 2000). L'hypothèse du mécanisme de fonctionnement de la protéine est le suivant : en absence du métallope, les parties A1 et A2 entrent faiblement en contact, ce qui crée un site de fixation du nucléotide non fonctionnel. En revanche, la fixation du métallope agirait comme un ligand des sous-unités A1 et A2, rendant les domaines fonctionnels (figure I.10.).



**Figure I.10.** Schéma de fonctionnement de l'ATPase ArsA (d'après Rensing, 1999).

A ce stade, nous pouvons nous interroger sur la nécessité de l'existence de ArsA. En effet, ArsB seule est fonctionnelle et suffisante pour exporter As[III]. Messens *et al.* (1999) indiquent que chez *S. aureus*, As[III] est exporté de manière rapide hors de la cellule sans l'aide d'une ATPase. Cependant, chez *E. coli*, il a été démontré, qu'en présence d'une ATPase, l'efflux est meilleur et la

souche résiste à des concentrations plus fortes en As[III] (Silver *et al.*, 2002). D'autre part, l'activité ArsA ne perturbe pas le potentiel de membrane, contrairement à ArsB seule. On peut néanmoins se demander : ArsA n'existerait-il pas ailleurs que dans les structures opéroniques ?

Ainsi, le système d'extrusion de l'As[III] est, soit un transporteur membranaire qui utilise le potentiel de membrane pour exporter la forme anionique toxique, soit un transporteur couplé à l'ATPase ArsA qui fournit l'énergie d'extrusion.

#### IV.3.2.2. Systèmes d'extrusion eucaryotiques

Le mécanisme de résistance des cellules eucaryotes est homologue à celui des systèmes bactériens. En effet, des enzymes de la famille des protéines de résistance aux drogues (MRP ; multidrug resistance-associated), elles-mêmes appartenant à la superfamille de transporteurs à ATPase (Cole *et al.*, 1994), exportent l'arsenic en association avec le glutathion.

L'exportation du glutathion, catalysée par la protéine MRP1, est augmentée en présence d'As[III], suggérant que cette protéine pourrait fonctionner comme un transporteur de l'arsenic-triglutathion (As(GS)<sub>3</sub>) (Zaman *et al.*, 1995). En 2000, l'équipe de Kala *et al.* démontre que la protéine MRP2, localisée dans les cellules du foie, exporte hors de la cellule le complexe arsenic-glutathion. Il semble donc que ce soit une des voies de détoxification de l'arsenic et de ses composés méthylés, chez les organismes supérieurs (Kala *et al.*, 2000). Chez *S. cerevisiae*, une protéine homologue des MRP, Ycf1p, confère la résistance à As[III] en exportant dans la vacuole le complexe As(GS)<sub>3</sub> (Ghosh *et al.*, 1999). *S. cerevisiae* possède également, outre le gène *ycf1*, un groupement de trois gènes *acr*, équivalent de l'opéron *ars*, qui confère également à la cellule la résistance à l'arsenic. *Acr1* est un facteur de transcription, *Acr2* est l'arséniate réductase de la levure (voir point suivant), et *acr3* code une protéine membranaire homologue au transporteur de l'As[III] codé par le gène *arsB* de *B. subtilis* (Ghosh *et al.*, 1999; Wysocki *et al.*, 1997).

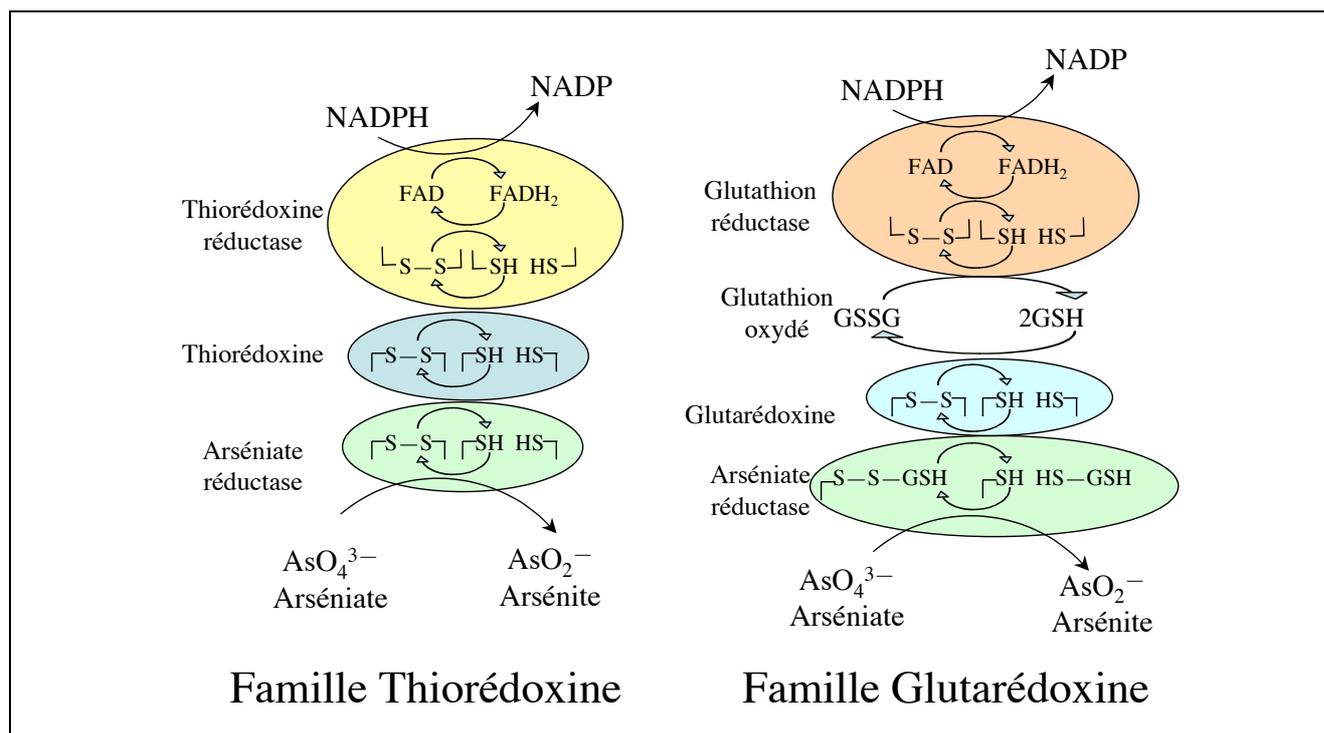
Deux mécanismes indépendants de détoxification de l'arsenic peuvent cohabiter dans la levure : Ycf1p, localisé dans la membrane de la vacuole, catalyse la séquestration vacuolaire de As(GS)<sub>3</sub>, et la protéine membranaire Acr3 catalyse l'extrusion de l'arsenic hors de la cellule.

#### **IV.3.3. ArsC : réduction de As[V] en As[III]**

As[V] entre dans la cellule par l'intermédiaire des transporteurs de phosphate (voir § IV.1). La cellule réduit cet As[V] en As[III] afin de pouvoir l'exporter hors de la cellule ou dans la vacuole (chez les levures). Lors des premières études du système de résistance à l'arsenic, l'hypothèse admise proposait que ce soit la forme As[V] qui fût exportée par la cellule (Silver *et al.*, 1981; Silver et Keach, 1982). C'est pourquoi lorsque le gène *arsC* fut séquencé pour la première

fois en 1986, les auteurs émirent l'hypothèse qu'il pouvait s'agir d'une protéine soluble aidant ArsB à excréter As[V] (Chen *et al.*, 1986).

As[V] peut être réduit en As[III] de manière abiotique, non-enzymatique, mais les vitesses de ces réactions sont beaucoup trop lentes pour être biologiquement significatives. L'enzyme arséniate réductase, ou ArsC, catalyse cette réaction. Ainsi, le produit de cette réaction, As[III], plus toxique qu'As[V], doit être exporté de manière active par le transporteur ArsB. Il peut paraître étrange que la cellule transforme un anion toxique en une forme encore plus toxique. Néanmoins, on peut supposer qu'il est difficile à la « vie » de développer des protéines qui arrivent à différencier As[V] du phosphate, ce qui est le cas des systèmes de transport d'entrée du phosphate (Pit ou Pst) (Silver *et al.*, 1981) évoqués précédemment. Or, l'évolution a certainement avantage les organismes n'exportant pas le phosphate intracellulaire (Messens *et al.*, 1999; Silver *et al.*, 2002). Ainsi, le système d'extrusion spécifique à As[III] est certainement un moyen d'éviter la carence en phosphate, car si le système *ars* est capable de transporter As[V], il risque aussi d'exporter le phosphate.



**Figure I.11.** Les deux familles de ArsC (d'après Silver *et al.*, 2002).

L'enzyme arséniate réductase (ou ArsC) est une petite protéine monomérique qui fonctionne avec la chimie des groupements thiols. Les premières études concernant la famille ArsC ont permis d'en définir deux types: d'une part, les ArsC du plasmide R773 de bactéries à Gram négatives et, d'autre part, celles du plasmide PI258 de bactéries à Gram positives (Gladysheva *et al.*, 1994; Ji *et*

*al.*, 1994; Ji et Silver, 1992a). Le mode de couplage énergétique ainsi que leurs propriétés respectives montrent de grandes différences. La plus importante concerne la source de potentiel de réduction employée par la protéine. Aussi bien l'ArsC du plasmide R773 que celle codée par le gène *arsC* du plasmide PI258 nécessitent pour leur fonctionnement de petites protéines intracellulaires, qui sont des réducteurs d'agent disulfide (figure I.11.).

L'ArsC de PI258 utilise le pouvoir réducteur d'une thiorédoxine, petite protéine impliquée dans une multitude de mécanismes cellulaires (Ji *et al.*, 1994; Ji et Silver, 1992a), alors que l'ArsC de R773 utilise la glutarédoxine et le glutathion réduit (Gladysheva *et al.*, 1994) (figure I.11.).

#### IV.3.3.1. Réductases à glutarédoxine

La structure cristalline de l'arséniate réductase codée par le plasmide R773, d'une taille de 16 kDa, a été réalisée lorsque l'enzyme est liée à son substrat, As[V], ou avec le produit de la réaction, As[III] (Martin *et al.*, 2001). Cette étude a permis de mettre en évidence les différentes étapes de la réaction. Lors d'une première étape, As[V] se lie au site anionique défini par trois résidus basiques, Arg60, Arg 94 et Arg107. Le phosphate et le sulfate peuvent également se fixer à ce site. Lors de la seconde étape, l'arséniate (mais ni le phosphate, ni le sulfate) forme un thioester d'arséniate en liaison avec la cystéine 12 du site actif de l'enzyme. L'arséniate est alors réduit en deux phases successives par la glutarédoxine et le glutathion, produisant un intermédiaire de réaction le Cys12—S—As[III], qui est ensuite hydrolysé pour libérer As[III]. *E. coli* possède trois glutarédoxines, Grx1, Grx2, Grx3 qui peuvent toutes les trois servir de réducteurs pour l'ArsC, même si l'enzyme utilise préférentiellement Grx2 (Shi *et al.*, 1999).

#### IV.3.3.2. Réductases à thiorédoxine

Cette seconde « famille » d'ArsC largement répandue dans le monde bactérien, a été caractérisée pour la première fois chez *Staphylococcus aureus* codé par le plasmide pI258.

L'arséniate réductase de *S. aureus*, codée par le plasmide pI258, est une protéine monomérique de 14,8 kDa qui ne présente que 12% d'identité avec la protéine ArsC du plasmide R773 d'*E. coli*. Afin d'être fonctionnelle, ArsC nécessite *in vitro* la présence de thiorédoxine (Trx), de la thiorédoxine réductase (TR) et du NADPH. Les études menées par Messens (1999) chez *S. aureus* ont permis de préciser qu'ArsC utilise la paire de cystéines, Cys82, Cys89, pour la réduction d'As[V] (Messens *et al.*, 1999).

La détermination de la structure cristalline de l'arséniate réductase du plasmide pI258, et de celle de son homologue chromosomique chez *Bacillus subtilis* (Bennett *et al.*, 2001; Zegers *et al.*,

2001), a permis de montrer, que ces deux enzymes étaient proches des tyrosines phosphatases, corroborant, l'observation d'une faible activité phosphatase de ces enzymes (Zegers *et al.*, 2001).

#### IV.3.3.3. Réductases eucaryotes

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la protéine Acr2p, parfaitement caractérisée, est une nouvelle protéine que l'on rattache à la superfamille des phosphatases. Cette dernière inclut la protéine CDC25a, une phosphatase du cycle cellulaire. Acr2p utiliserait le motif HisCys(X)<sub>5</sub>Arg de son site actif. Ainsi, il semblerait exister une troisième famille d'arséniate réductases proche des tyrosine phosphatases.

Tout comme l'ArsC codée par le plasmide R773, Acr2p possède une seule cystéine en son site actif et utilise la glutarédoxine et le glutathion comme réducteur (Mukhopadhyay *et al.*, 2000). Lorsque le gène *acr2* est exprimé de manière hétérologue, il complémente une délétion *arsC* dans la souche d'*E. coli*.

Jusqu'à présent, aucune publication ne fait mention chez les mammifères d'une arséniate réductase homologue de l'une des trois familles déjà décrites. Dans l'organisme humain, il est supposé depuis longtemps que la réduction de As[V] ait lieu dans le sang. Récemment pourtant, une arséniate réductase humaine a été isolée du foie (Radabaugh et Aposhian, 2000), qui est cependant bien différente de celles connues. On peut dès lors s'interroger sur la fonction première de cette enzyme.

### **IV.4. L'évolution des systèmes de type *ars***

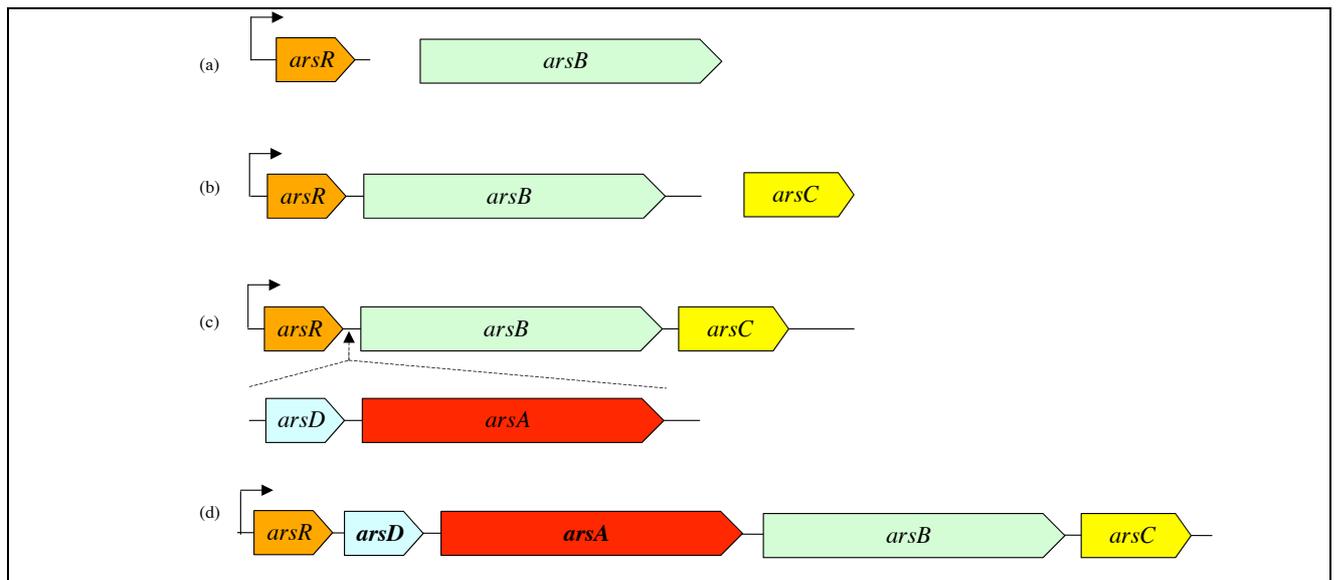
Dans les environnements primitifs ayant abrité les premières formes de vie, l'atmosphère, sans oxygène, et donc non oxydante, ne devait pas permettre la production de As[V] à cette époque, d'où une faible pression de sélection pour le développement de pompes d'extrusion de As[V] ou d'une arséniate réductase. Étant donné que la pompe ArsB est suffisante pour donner le phénotype de résistance à l'arsenic, l'hypothèse actuelle stipule que le système de résistance à l'arsenic ne soit composé que de la pompe à efflux de As[III].

L'apparition de l'oxygène vers ~3,8 milliards d'années, grâce aux premières Cyanobactéries, permis l'oxydation de As[III] en As[V] et ce processus serait responsable de l'apparition de l'arséniate réductase. Par la suite, le système opéronique s'est développé, par acquisition de nouveaux gènes, tels *arsA* et *arsD* qui perfectionnent le système (Mukhopadhyay *et al.*, 2002; Rosen, 1999a) (figure I.12.).

Les premières études phylogénétiques semblaient prouver que les protéines ArsC étaient spécifiques à un des embranchements Gram+ ou Gram- ou eucaryotes (Mukhopadhyay et Rosen,

2002; Mukhopadhyay *et al.*, 2002). Certains auteurs émirent alors l'hypothèse que ces deux familles d'arséniate réductases seraient issues d'une évolution convergente, c'est à dire qu'elles n'ont pas pour ancêtre commun une même protéine (Cervantes *et al.*, 1994; Rosen, 1999a). Néanmoins, il s'avère actuellement que l'on retrouve des ArsC du type glutarédoxine et thiorédoxine, aussi bien chez les bactéries à Gram+ que chez les bactéries à Gram-.

L'étude phylogénétique menée par Jackson et Dugas (2003) (Jackson et Dugas, 2003) inclut un grand nombre de gènes *arsC* putatifs issus de génomes séquencés. Les arbres phylogénétiques, basés sur les ADNr 16S et les *arsC*, mettent en évidence un parallèle entre la séparation des grands embranchements : archées, bactéries et eucaryotes. Les hypothèses suggérant que les trois classes d'arséniate réductases sont issues d'une évolution convergente semblent être remises en cause. En effet, il existe un parallèle entre la phylogénie des ARNr 16S et des gènes *arsC*. De plus, les différents embranchements bactériens semblent posséder une arséniate réductase bien spécifique, ce qui est attendu d'une évolution divergente à partir d'une protéine ancêtre . Ainsi, les *arsC* et donc les mécanismes de résistance à l'arsenic, ont du être présents dans les premières cellules, et dans le groupement de cellules ancêtres (LUCA, last universal common ancestor).



**Figure I.12.** Evolution de l'opéron *ars*. (a) La résistance originelle ne demande que l'expression constitutive du gène *arsB*. (b) L'acquisition de *arsR* résulte en un opéron régulé de deux gènes. (c) Un opéron à trois gènes apparaît par fusion avec l'un ou l'autre des deux types de gènes *arsC*. (d) La fusion avec un opéron *arsDA* résulte en un opéron à cinq gènes (d'après Rosen, 1999).

Le mécanisme de résistance est donc apparu bien longtemps avant les pollutions d'origine anthropique.

## IV.5. La respiration de As[V] ou réduction dissimilatrice

L'arsenic étant essentiellement considéré comme une substance très toxique, il peut donc paraître étonnant de mettre en évidence la nécessité ou l'utilisation de cet élément en tant qu'accepteur terminal d'électrons dans la chaîne respiratoire. De nombreux microorganismes sont capables d'utiliser des composés inorganiques tels le Fe[III] (Lovley et Phillips, 1988), le Mn[IV] (Myers et Nealson, 1988) l'U[VI] (Lovley *et al.*, 1991) ou le Se[VI] en tant qu'accepteur terminal de la respiration anaérobie.

Le calcul thermodynamique montre que la réaction de réduction d'As[V] couplée à l'oxydation d'un composé organique produit assez d'énergie pour soutenir la croissance bactérienne (Ahmann *et al.*, 1994; Oremland et Stolz, 2003).



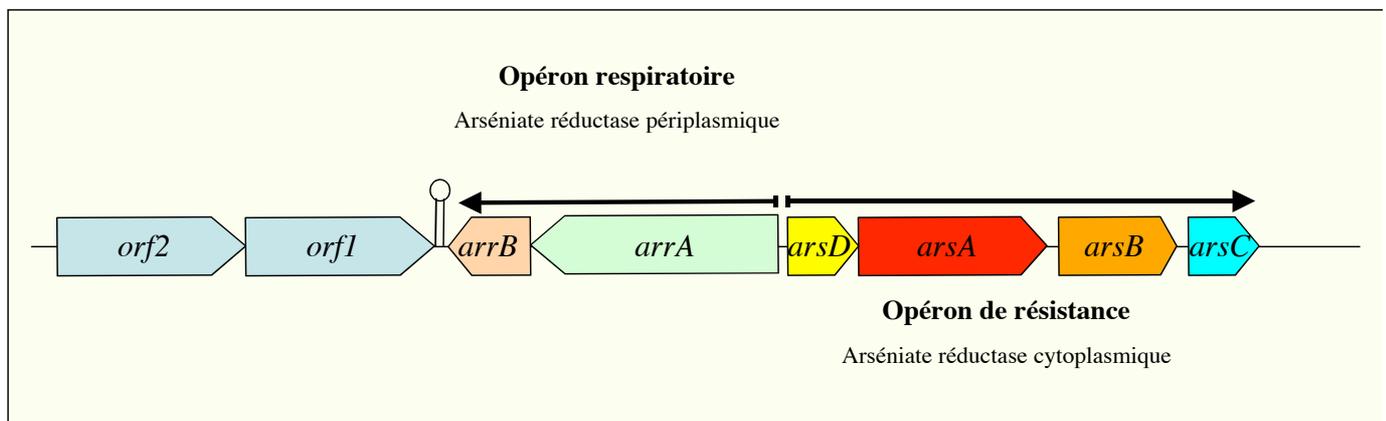
Deux membres de la famille des Protéobactéries, *Sulfurospirillum arsenophilum*, et *Sulfurospirillum barnesii* furent les premières cellules isolées pour ce phénotype (Ahmann *et al.*, 1994; Laverman *et al.*, 1995).

Actuellement, près d'une vingtaine de bactérie capables de respirer As[V], appartenant aux différents groupes tels les  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -Protéobactéries, les bactéries à Gram+, les eubactéries thermophiles et les Crenarchaea ont été isolées d'environnement divers tels les estuaires, les sédiments alluviaux, les mines d'or, les tractus intestinaux, les lacs salés... Ces souches peuvent utiliser différents donneurs d'électrons pour la réduction de As[V] comme l'hydrogène, le lactate, le butyrate, le fumarate, le malate, le glucose, le citrate (Niggemyer *et al.*, 2001), voire des composés plus complexes comme le benzoate et le toluène (Oremland et Stolz, 2003). Néanmoins, aucune souche ne dépend de la réduction dissimilatrice de As[V] comme source énergétique unique. En effet, les bactéries *Desulfotomaculum auripigmentum* et *Desulfomicrobium* Ben-RB sont capables de respirer le sulfate. De même, la souche *S. barnesii* est capable d'utiliser une grande variété de composés comme accepteur terminal de la chaîne électronique, entre autres le séléniate, le nitrate, le nitrite, le Fe[III], le thiosulfate, le soufre.

La majorité des souches étudiées sont hétérotrophes, car elles ont besoin d'une source simple de carbone (lactate ou acétate) pour leur développement. Des auteurs émirent l'hypothèse que deux *Crenarcheota* hyperthermophiles sont capables de chimiolithotrophie (Huber, Sacher et al. 2000). Hoefft *et al.* (2004) décrivent la première souche chimioautotrophe, qui utilise le sulfate comme donneur d'électrons et As[V] comme accepteur terminal, et qui soit capable de se développer sans source de carbone organique (Hoefft *et al.*, 2004).

Macy *et al.* (1996) ont caractérisé biochimiquement la première arséniate réductase respiratoire de la bactérie *Chrysochromes arsenatis* (Macy *et al.*, 1996). L'enzyme purifiée montre de grandes différences comparée aux réductases ArsC habituellement retrouvées dans les opérons de résistance *ars*. L'arséniate réductase respiratoire est un hétérodimère composé d'une sous-unité ArrA et d'une sous-unité ArrB (respectivement de 87kDa et 29kDa). Les données de séquençage N-terminale et l'analyse des métaux permettent de dire que la sous-unité ArrA contient un centre catalytique à molybdène et un centre 4Fe-4S, tandis que la petite sous-unité ArrB contient un autre centre 4Fe-4S. L'enzyme de *C. arsenatis* et de la souche bactérienne MLMS-1 est localisée dans le périplasma et serait, peut-être, rattachée à la membrane par des interactions protéiques avec un cytochrome par exemple (Hoeft *et al.*, 2004; Macy *et al.*, 1996). Cette hypothèse est vérifiée car l'enzyme de la bactérie à Gram+ *Bacillus selenitireducens*, qui ne possède pas de périplasma, est ancrée à la surface de la membrane plasmique (Afkar *et al.*, 2003).

À la fin de l'année 2003, les premières séquences des gènes *arrA* et *arrB* obtenues à partir de la gamma-Protéobactérie *Schewanella ANA-3* (Saltikov *et al.*, 2003; Saltikov et Newman, 2003), et de la souche *B. selenitireducens* (Afkar *et al.*, 2003) ont été publiées. Depuis, neuf séquences complètes ou partielles de l'arséniate réductase respiratoire des eubactéries sont disponibles dans les banques de données.



**Figure I.13.** Représentation schématique de l'opéron *arrAB* et *ars* de la souche *Schewanella ANA-3* (d'après Saltikov et Newman, 2003).

Toutes les séquences correspondent à une structure opéronique qui code les gènes *arrA* et *arrB*. Dans le cas de la bactérie *Schewanella ANA-3*, un fragment d'ADN d'environ 11kb a été séquencé, incluant deux structures opéroniques divergentes (figure I.13). La première code les gènes *arrA* et *arrB* et la seconde, un opéron de résistance à l'arsénite de type *ars* (*arsDABC*). Cela sous-entend que les deux systèmes de réduction coexistent dans une même cellule. La séquence de *arrA* codant la grande sous-unité catalytique débute avec un peptide signal de type TAT

caractéristique de différentes classes de protéines rédox. L'analyse de la protéine putative ArrA confirme la présence d'un motif (C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>3</sub>-C) qui fixe les centres Fe-S, et d'un motif de fixation d'un centre molybdoptérine. La séquence *arrB* code la petite sous-unité qui possède également un motif (C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>3</sub>-C) de fixation au centre de type 4Fe-4S (Afkar *et al.*, 2003; Saltikov et Newman, 2003). La délétion d'un des gènes *arr*, quel qu'il soit, entraîne la perte du phénotype respiratoire de As[III] et de la réduction de l'As[V] en anaérobiose.

## IV.6. L'oxydation de As[III] en As[V]

### IV.6.1. L'historique

Les chercheurs s'accordent à reconnaître que l'oxydation de l'arsenic est un mécanisme de résistance des cellules (Cervantes *et al.*, 1994). En effet, As[III], qui est la forme la plus toxique, la plus mobile, est transformé en As[V], une forme moins toxique et qui précipite plus facilement (Cullen et Reimer, 1989).

Au début de notre travail, peu de données existaient sur les mécanismes biologiques d'oxydation de As[III] en As[V]. Néanmoins, les premières observations d'oxydation de As[III] en As[V] ont été faites en Australie dès 1909. Les chercheurs étudiaient les bains de traitement anti-parasitaire du bétail à base d'arsénite et observèrent une oxydation « spontanée » qui semblait être liée à la croissance bactérienne (ref citée chez (Cullen et Reimer, 1989)). En 1918, en Afrique du Sud, Green, travaillant sur le même sujet isola la première bactérie As[III]-oxydante. Cette bactérie fut provisoirement nommée *Bacillus arsenoxydans* (Green, 1918), mais fut malheureusement perdue depuis. Les études suivantes furent réalisées dans les années 1940 quand l'équipe de Turner isola une quinzaine de bactéries oxydantes, appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Xanthomonas* et *Achromobacter* (Turner, 1949; Turner, 1954; Turner et Legge, 1954). L'unique bactérie d'*Achromobacter* était très semblable à la souche isolée par Green.

*Pseudomonas arsenoxydans-quinque* a été utilisée pour étudier plus en détail la physiologie de l'oxydation de As[III]. Chez cet micro-organisme, Turner et Legge démontrèrent que l'oxydation était maximale pour des cultures âgées de 3 à 4 jours et que As[III] était oxydé uniquement par des cellules ayant été pré-cultivées en présence d'As[III], suggérant une induction de l'activité enzymatique. La lyse des cellules par microbilles a permis d'isoler l'arsénite oxydase (ou « arsénite déshydrogénase »). Le pH optimal d'oxydation est de 6,4 et la température optimale de 40°C. L'utilisation du 2,6-dichloroindophénol (DCIP), accepteur final d'électron, montre que l'oxydation engendre une cascade électronique suggérant que l'arsénite oxydase pourrait avoir un rôle bioénergétique (Legge, 1954; Legge et Turner, 1954).

Dans les années 1970, il est démontré que l'oxydation de l'arsénite par la souche du sol *Alcaligenes faecalis* est induite par la présence d'arsénite (Osborne et Enrich, 1976; Philips et Taylor, 1976). Plus récemment, différentes bactéries As[III] oxydants ont été isolées d'environnement aquatique contaminé par l'arsenic, la  $\beta$ -Protéobactérie ULPAs1 (Weeger *et al.*, 1999), et des organismes du genre *Thiomonas* (Battaglia-Brunet *et al.*, 2002; Duquesne, 2004).

#### IV.6.2. L'arsénite oxydase

L'équipe d'Anderson (1992) (Anderson *et al.*, 1992) a étudié une arsénite oxydase chez une souche d'*Alcaligenes faecalis*. Ce travail a démontré que l'enzyme était localisée à la surface externe de la membrane plasmique. Sa synthèse est induite en présence d'As[III] et l'enzyme catalyse la réaction suivante :



Des protéines rédox ont également été isolées de la souche *A. faecalis*. Une azurine (centre de cuivre) et un cytochrome *c* semblent servir d'accepteurs d'électrons de l'arsénite oxydase, et formeraient une chaîne électronique au niveau du périplasma. L'étude de la l'As[III] oxydase par spectrométrie à résonance paramagnétique électronique (EPR, electron paramagnetic resonance) démontre que l'enzyme comporte deux types de centre fer soufre ; un centre de type HiPIP [4Fe-4S] ou [3Fe-3S] et un centre de type Rieske [2Fe-2S].

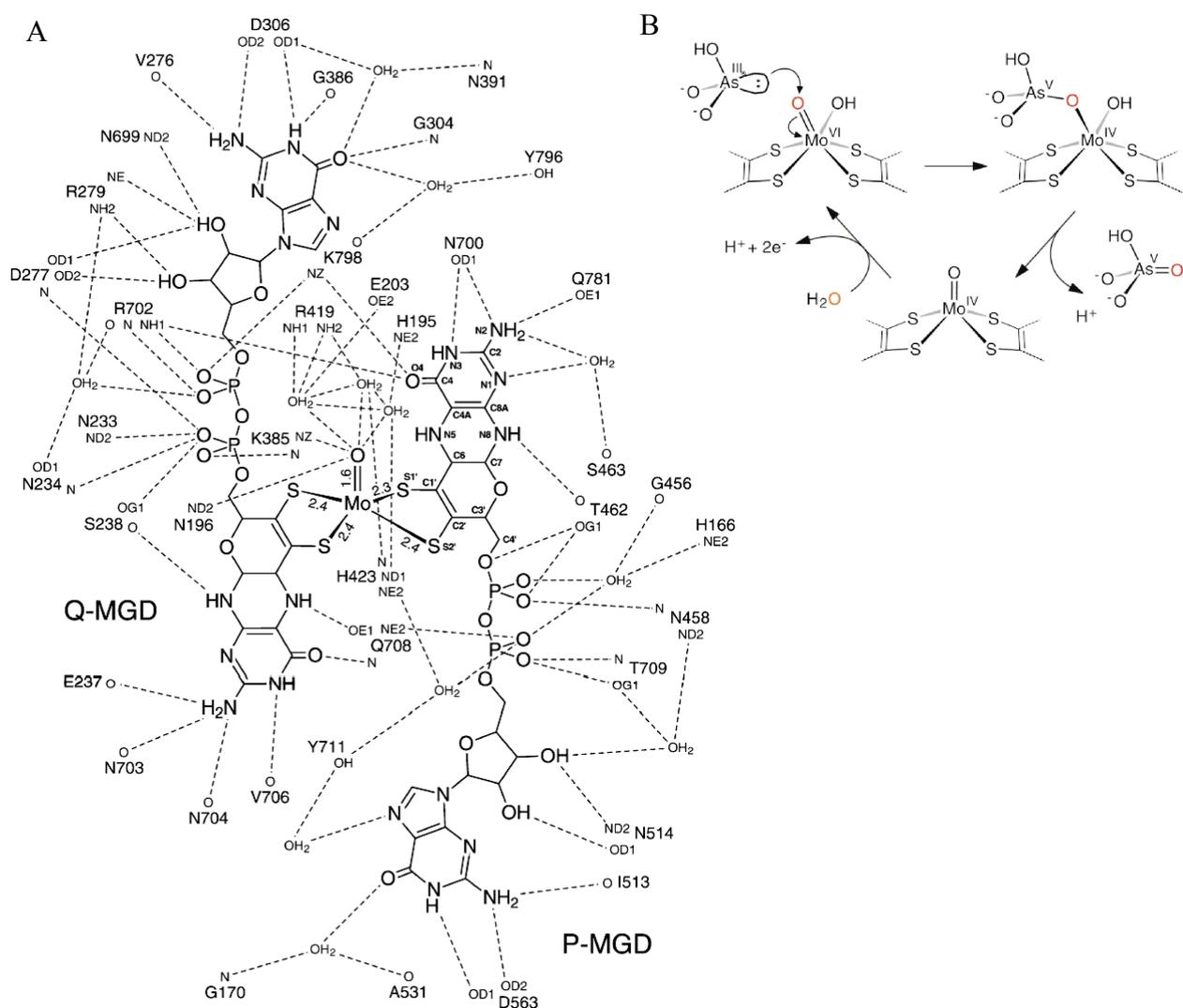
Lors de cette première étude, les auteurs isolèrent sur gel une bande de 85 kDa et supposèrent que l'arsénite oxydase était une protéine monomérique contenant le centre molybdoptérine et les centres fer-soufre (Anderson *et al.*, 1992).

Par la suite, l'analyse par diffraction aux rayons X de la structure cristalline de l'arsénite oxydase, réalisée par Ellis *et al.* (2001), a montré que l'enzyme est un hétérodimère composé d'une grande sous-unité de 825 aminoacides qui incorpore le centre molybdoptérine et un centre fer soufre du type [3F-4S], et d'une petite sous-unité de type Rieske, d'environ 134 aminoacides comportant un centre de type Rieske [2Fe-2S].

Le co-facteur molybdoptérine contient deux ptérines anti-parallèles, qui fixent l'atome de Mo (figure I.13.), caractéristiques des autres protéines à molybdoptérine de la famille protéique des diméthyle sulfoxyde (DMSO) réductases (Anderson *et al.*, 1992; Ellis *et al.*, 2001; McEwan *et al.*, 2002).

Bien qu'il y ait de faibles homologies de séquences avec les autres membres de la famille dont la structure a été déterminée (23% d'identité en aminoacides avec la nitrate réductase de

*Desulfovibrio desulfuricans*), la topologie globale reste semblable au niveau de la subdivision en quatre domaines ainsi qu'à celui de la structure de ces domaines. La différence la plus importante entre l'arsénite oxydase et les autres protéines à Mo est l'absence de liaisons covalentes entre la protéine et l'atome de molybdène. De même, et contrairement aux autres membres de la famille des protéines DMSO, la grande sous-unité de l'Aox possède un centre [3Fe-4S] à la place du centre [4Fe-4S] (Anderson *et al.*, 2002; Ellis *et al.*, 2001). La présence d'une sous-unité de type Rieske est pour le moment le seul exemple qui existe pour les protéines à Mo, mais cette structure est similaire au domaine Rieske du cytochrome *bc1*, du cytochrome *b6f* et de la naphtalène 1,2 dioxygénase (Ellis *et al.*, 2001).



**Figure I.14.** A. Représentation schématique des liaisons Hydrogène intervenant dans la liaison au centre molybdoptérine. B. Représentation schématique du mécanisme d'oxydation (Ellis *et al.*, 2001).

En se basant sur la structure cristalline, Ellis *et al.* (2001) ont proposé un mécanisme de réaction d'oxydation. Une structure en entonnoir présente sur la grande sous-unité permet d'abord à As[III] d'atteindre le centre catalytique de l'enzyme, puis le relargage de As[V]. L'hypothèse est que As[III] se lie au cofacteur à molybdène Mo[VI], permettant une attaque nucléophile et le transfert de deux électrons. Il en résulte une réduction du Mo[VI] en Mo[IV] et la production d'arséniate. Le Mo[IV] est ensuite réoxydé par transfert des électrons au centre [3Fe-4S] qui, à son tour, réduit le centre de type Rieske, qui sera réoxydé en transférant les électrons à des protéines de la chaîne respiratoire tels l'azurine ou le cytochrome *c* (Ellis *et al.*, 1995) (figure I.14).

#### IV.6.3. L'oxydation par des chimiolithotrophes

L'oxydation de As[III] en aérobiose est exergonique, et certaines bactéries sont capables d'en tirer de l'énergie pour leur croissance, en parallèle de la détoxification de As[III] (Anderson *et al.*, 2002). Les souches chimiolithoautotrophes couplent l'oxydation de l'arsénite, donneuse d'électrons à la réduction de l'oxygène ou de nitrate et utilisent l'énergie ainsi produite pour fixer le CO<sub>2</sub>.

La majorité des bactéries oxydant As[III] sont des hétérotrophes, ce qui signifie que l'oxydation ne semble être qu'un moyen de résistance au composé toxique.

La première souche chimiolithotrophe, *Pseudomonas arsenitoxidans*, dont le temps de génération est de 48h, a été caractérisée dès 1981 par les russes Ilialetdinov et Abdrashitova (Ilialetdinov et Abdrashitova, 1981). Plus récemment, Santini *et al.* (2000) caractérisèrent, à partir de déchets de mines d'or, une autre souche chimiolithotrophe, une  $\alpha$ -Protéobactérie du genre *Agrobacterium* nommée NT-26. Cet organisme est l'espèce de type chimiolithoautotrophe qui se multiplie le plus rapidement lors de l'oxydation de As[III] (Santini *et al.*, 2000).

Oremland *et al.* (2002) isolèrent la bactérie MLHE-1, membre de la branche *Ectothiorhodospira* des  $\gamma$ -Protéobactéries (Oremland *et al.*, 2002). Elle croit en anaérobiose utilisant As[III] en tant que donneur d'électrons et le nitrate comme accepteur final. Cette bactérie non-photosynthétique, se multiplie également de manière autotrophe en remplaçant As[III] par des sulfides ou de l'hydrogène. Cette souche cultive encore de manière hétérotrophe en présence d'acétate.

#### IV.6.4. L'oxydation par des Archaea et des bactéries thermophiles

Actuellement, différentes Archaea sont connues pour leurs aptitudes à oxyder As[III]. La première souche décrite était *Sulfolobus acidocaldarius* (souche BC) (Lindstrom et Gunneriusson, 1990; Sehlin et Lindstrom, 1992). Par la suite, Gihring *et al.* ont isolé des bactéries thermophiles du

genre *Thermus* (souche HR 13, *T. aquaticus* et *T. thermophilus*), obtenues d'une source d'eaux chaudes géothermales riches en arsenic (Gihring et Banfield, 2001; Gihring *et al.*, 2001).

Sehlin *et al.* (1992) démontrent que l'activité As[III] oxydase de *S. acidocaldarius* est induite par l'arsenic. L'activité oxydase de celle-ci est 8 fois plus importante lorsqu'elle est induite par As[III], comparée à l'archée pré-cultivée sans arsenic. Le fractionnement cellulaire a permis de localiser l'activité oxydante au niveau de la fraction membranaire. Un traitement des fractions membranaires à la protéinase K supprime l'oxydation de l'arsénite, indiquant que l'activité oxydative est enzymatique (Sehlin et Lindstrom, 1992). L'oxydation de As[III] n'apparaît pas être la source d'énergie, celle-ci étant assurée par le tétrathionate. L'oxydation n'est pas détectable lorsque la source de tétrathionate est présente. Ce phénomène est lié au fait qu'en présence du tétrathionate une réduction non enzymatique de l'arséniate est observée. C'est un sous-produit du métabolisme du tétrathionate qui est responsable de la réduction. La vitesse de réduction est 20 fois plus rapide qu'une réduction enzymatique. L'activité oxydase était maximum à pH 2-4, soit de 40 à 50 fois supérieure à celle observée à pH neutre.

Gihring *et al.* (2001) démontrèrent que les espèces *T. aquaticus* et *T. thermophilus* oxydent rapidement As[III] (100 fois plus rapide que l'oxydation abiotique) (Gihring *et al.*, 2001). Le fait que ces 2 souches ne soient pas capables d'utiliser As[III] comme source d'énergie suggère que ce mécanisme est essentiellement dévoué à la résistance. Du point de vue métabolique, la souche *Thermus* HR13 est bien plus intéressante. En effet, la souche peut alterner l'oxydation totale de As[III] en As[V], puis la réduction du produit en As[III] et l'oxyder à nouveau. Tout comme les deux autres espèces de *Thermus*, la souche HR13 ne peut pas pousser avec As[III] comme seule source d'énergie. En revanche, l'étude a mis en évidence que la souche HR13 est capable d'utiliser As[V] comme accepteur d'électrons. HR13 est une souche qui respire l'arsenic (Gihring et Banfield, 2001).

Les auteurs ont déposé un brevet sur leur souche et sur la technique de bioremédiation.

#### **IV.6.5. Les cellules humaines : une oxydation non enzymatique ?**

L'oxydation de As[III] a été observée dans des cellules de mammifères (ref 15, 16 Anderson 1992). Des études effectuées par Aphosian *et al.* (2003) suggèrent que l'oxydation de As[III] dans les cellules humaines ne serait pas enzymatique. En effet, le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit par une xanthine oxydase (protéine Fe-S et Mo) oxyderait As[III] en As[V], de même que les formes méthylées MMA<sup>III</sup> et DMA<sup>III</sup> (Aphosian *et al.*, 2003).

## V. Toxicité de l'arsenic : le paradoxe

L'arsenic est un des polluants majeurs des eaux de boisson dans de nombreuses parties du globe (cf Cycle biogéochimique et figure I.5) et est à l'origine d'un des plus grands empoisonnements collectifs de notre histoire. L'entrée de l'arsenic dans la cellule a été décrit dans un point précédent. Les modes d'ingestion de l'arsenic chez les organismes supérieurs peuvent être la respiration de fumées toxiques (essentiellement lors d'accidents dans les industries sidérurgiques), la prise orale d'aliments (rare) et de boissons contaminés (cas de contamination chronique le plus courant), ou le contact dermique direct avec l'élément (diffusion à travers la peau) (Mandal et Suzuki, 2002).

Les études épidémiologiques sur l'ingestion chronique de fortes concentrations d'arsenic mettent en évidence une augmentation du nombre de cancers, affectant tous les organes, aussi bien la peau, le foie, les poumons que les organes internes. Ainsi, les manifestations cliniques sont nombreuses, mais les symptômes les plus courants sont des lésions de la peau, des mélanomes, des conjonctivites, des kératoses et des hyperkératoses (Basu *et al.*, 2001), ou bien encore la maladie du « pied noir » (black foot disease) à Taïwan (Chen *et al.*, 2003).

La toxicité de l'arsenic est connue depuis l'Antiquité, mais son mode d'action au niveau de la cellule commence seulement à être perçu. La majorité des études se font actuellement sur des lignées cellulaires de mammifères. Il en ressort que l'arsenic engendre une cascade de réactions directes ou indirectes, qu'il est encore difficile d'expliquer de manière précise.

### V.1. La spéciation

Le degré de toxicité de l'arsenic est lié à la forme chimique et surtout à l'état d'oxydation sous lequel il se trouve : les formes trivalentes [III] sont plus toxiques que les formes pentavalentes [V]. Néanmoins, la toxicité dépendra de la biodisponibilité de l'élément et des facteurs physiques tels que son état (gazeux, en solution...).

La toxicité de l'arsenic décroît dans l'ordre suivant arsine > As[III] > arsénoxydes (composé organique) > As[V] > composé arsénié > arsenic élémentaire (Mandal et Suzuki, 2002).

#### V.1.1. Les formes organiques

Jusqu'à très récemment, il semblait acquis que les formes inorganiques de l'arsenic étaient les plus toxiques. En effet, depuis de nombreuses années, la communauté scientifique s'accorde à dire que la méthylation est une forme de détoxification (Healy *et al.*, 1997), mais de récentes études démontrent le contraire. L'As[III] ingéré par les organismes supérieurs est très vite métabolisé en

monométhyl arsenic (MMA[III]). Ainsi, une exposition chronique à As[III] résulte en réalité à une exposition au MMA[III]. Petrick *et al.* (Petrick *et al.*, 2000) mettent en évidence que le MMA[III] est jusqu'à 26 fois plus toxique qu'As[III] dans les cellules d'hépatocyte humain de Chang. D'autres études montrent que le MMA[III] et le diméthyl arsenic DMA[III], tout comme As[III], forment des complexes avec le glutathion(GSH), et que ces deux formes méthylées sont au moins aussi toxiques qu'As[III] (Styblo *et al.*, 1999; Styblo *et al.*, 1997). La production de MMA[III] apparaît être un mécanisme qui augmente la toxicité des formes inorganiques, et non une forme de protection contre l'As[III] inorganique. L'induction de dommages à l'ADN par les formes méthylées de As[III] a été mise évidence lors d'une étude *in vitro* sur une lignée de cellules de lymphocytes humains. Les auteurs de cette étude en concluent que les formes méthylées sont des espèces d'arsenic qui ont un effet génotoxique direct, n'excluant pas que les autres espèces d'arsenic puissent aussi être génotoxiques (Mass *et al.*, 2001).

## **V.1.2. Les formes inorganiques**

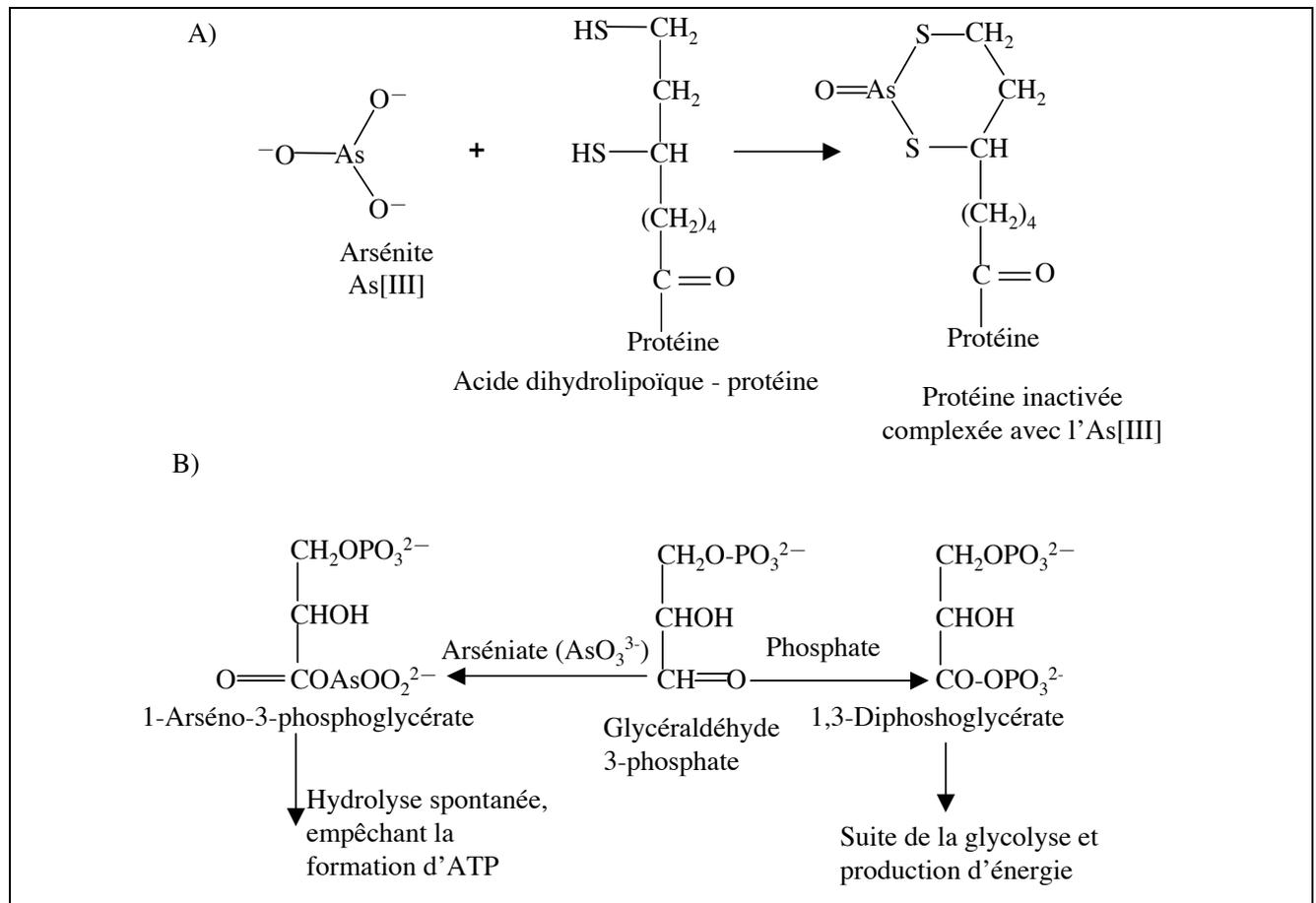
### V.1.2.1. As[V]

As[V] est un analogue structural du phosphate qui inhibe la phosphorylation, ce qui a pour conséquences la production de dérivés arséniés instables (Moore *et al.*, 1983) et le court-circuit du métabolisme énergétique (Moore *et al.*, 1983) (figure I.15.). L'arséniate, entrant en compétition avec le phosphate, découple la phosphorylation oxydative productrice d'ATP, en formant un arséniate d'ester d'ADP instable, qui s'hydrolyse rapidement. De la même manière, As[V] inhibe le métabolisme énergétique par la production de glucose-6-arséniate au lieu de glucose-6-phosphate. L'arséniate pourrait aussi remplacer le phosphate dans la double hélice d'ADN. Un tel phénomène expliquerait la clastogénicité de l'arsenic, car une liaison arsénodiester est instable contrairement aux liaisons phosphodiester. Néanmoins, bien que de nombreux travaux mettent en évidence les cassures d'ADN en présence d'arsenic, aucune étude n'a pu confirmer l'hypothèse de l'As[V] clastogène (Mandal et Suzuki, 2002).

### V.1.2.2. As[III]

As[III] est la forme la plus toxique car elle se fixe aux groupements sulfhydryl des protéines, dénaturant ou perturbant ainsi le fonctionnement de nombreuses protéines (Crane et Lipmann, 1953; Gresser, 1981) (figure I.15.). L'arsenic inhibe des enzymes telles la pyruvate oxydase, la S-aminoacide oxydase, la choline oxydase et les transaminases ; en fait, plus de 200 enzymes humaines seraient inhibées par l'arsenic (Abernathy *et al.*, 1999).

Aphosian émet l'hypothèse que la fixation de As[III] à des groupements sulfhydryls non-essentiels serait l'une des principales voies de détoxification de la cellule (Mandal et Suzuki, 2002).



**Figure I.15.** Fixation de As[III] aux groupements SH des protéines et intervention de As[V] dans la glycolyse. A) exemple du mode toxique de As[III] ; B) exemple du mode toxique de As[V] (d'après Mandal *et al.*, 2002).

## V.2. Les effets sur l'ADN

Les études de mutagénèse n'ont pas toujours pu mettre en évidence le rôle mutagène de l'arsenic. Lors de tests sur les modèles bactériens, l'arsenic ne semble pas causer de mutations ponctuelles. Ainsi, l'arsenic ne montre pas d'effet mutagène sur les cultures de *Salmonella* (test d'Ames). Des observations contradictoires sont relevées chez certaines bactéries, tel *E. coli*, où l'arsenic est mutagène dans un cas et non dans d'autres (Rossman *et al.*, 1980). Des résultats semblables ont été obtenus avec la levure *S. cerevisiae* (pour revue (Basu *et al.*, 2001)). À la fin des années 70, Rosman *et al.* démontrèrent qu'As[III] est un co-mutagène des rayons UV. L'élément inhiberait le système de réparation de l'ADN d'*E. coli* (Rossman, 1981a; Rossman *et al.*, 1977). De même, les études sur les cellules de mammifères ne mettent pas en évidence l'apparition de

mutations ponctuelles liées à la présence d'arsenic. Ces observations suggèrent des actions non génotoxiques au niveau de l'induction de la méthylation de l'ADN (Zhao *et al.*, 1997) et de l'inhibition des systèmes de réparation (Lynn *et al.*, 1997).

À cette époque, il était supposé que As[III] inhibe directement les enzymes du système de réparation de l'ADN en se fixant aux groupements sulfhydryls. Cependant, une étude récente montre que As[III] n'altère pas directement l'activité de ces enzymes (Hu *et al.*, 1998). Ces nouvelles observations soutiennent l'hypothèse que l'As[III] agit indirectement en induisant un changement de potentiel rédox de la cellule et en altérant la transduction des signaux intracellulaires.

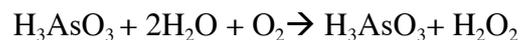
Il a été observé que l'arsenic induit des transformations chromosomiques (dans le nombre et la structure), des amplifications de gènes dans les cultures de cellules de mammifères (Nakamuro et Sayato, 1981) (Kochhar *et al.*, 1996). Des études *in vitro* sur des lignées cellulaires humaines ont mis en évidence les effets clastogènes des composés arsénicaux, qui se traduisent par des aberrations chromosomiques, des échanges entre chromatides sœurs et l'apparition de micronucléi dans le centre (Liu et Jan, 2000; Yamanaka *et al.*, 1991; Yamanaka *et al.*, 1990; Yamanaka *et al.*, 1993). Ces aberrations sont retrouvées dans les centres de cellules des personnes contaminées (Basu *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1997). L'utilisation de cellules hybrides Homme-Hamster ( $A_L$ ) dans les tests de mutagenèse, permettant la détection de mutations intragéniques et multiloci, démontre que As[III] est un mutagène qui induit en réalité des délétions comprenant plusieurs millions de paires de bases (Hei *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2001). Dans les cellules hybrides  $A_L$ , est présent, outre les chromosomes de hamster, le chromosome 11 de l'homme non essentiel à la cellule, et pouvant être une cible potentielle de mutations non létales. Il a pu être montré lors de cette expérience que l'élément arsenic est clastogène et mutagène.

### **V.3. Le stress oxydatif**

Différentes hypothèses concernant les modes d'action toxique de l'arsenic, comme l'inhibition des systèmes de réparation de l'ADN, la méthylation, le pouvoir co-carcinogène avec d'autres toxiques environnementaux ont été proposées (pour revue (Basu *et al.*, 2001; Bode et Dong, 2002)). Le thème commun qui ressort de ces hypothèses est celui du rôle des radicaux libres (ROS, reactive oxygen species). Ces ROS, produits suite à une exposition à l'arsenic, sont liés aux voies de signalisation cellulaire, à l'apoptose, et à la mutagénicité de l'ADN (Hei et Filipic, 2004). En effet, de nombreuses études mettent en évidence que la présence d'arsenic dans la cellule génère la production de ROS : peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (Barchowsky *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1996), radicaux hydroxylés ( $HO^\bullet$ ) (Wang *et al.*, 1996), oxyde nitrique (NO), anions

superoxydes ( $O_2^-$ ), peroxy diméthylarsinique ( $[(CH_3)_2AsOO\cdot]$ ) et radicaux de diméthylarsinique ( $[(CH_3)_2As\cdot]$ ) (Yamanaka *et al.*, 1991; Yamanaka *et al.*, 1997). D'autres expériences montrent que l'arsenic induit la peroxydation des lipides membranaires, conduisant à la formation de peroxydes lipidiques, ce qui contribue à augmenter le stress oxydatif intracellulaire et amplifie les dommages oxydatifs.

Ces ROS seraient responsables du stress et de la toxicité liés à l'arsenic. Les mécanismes de production de ces composés sont encore mal compris. Une des hypothèses propose que les ROS soient produits lors de l'oxydation de As[III], qui, en condition physiologique, produirait du  $H_2O_2$  :



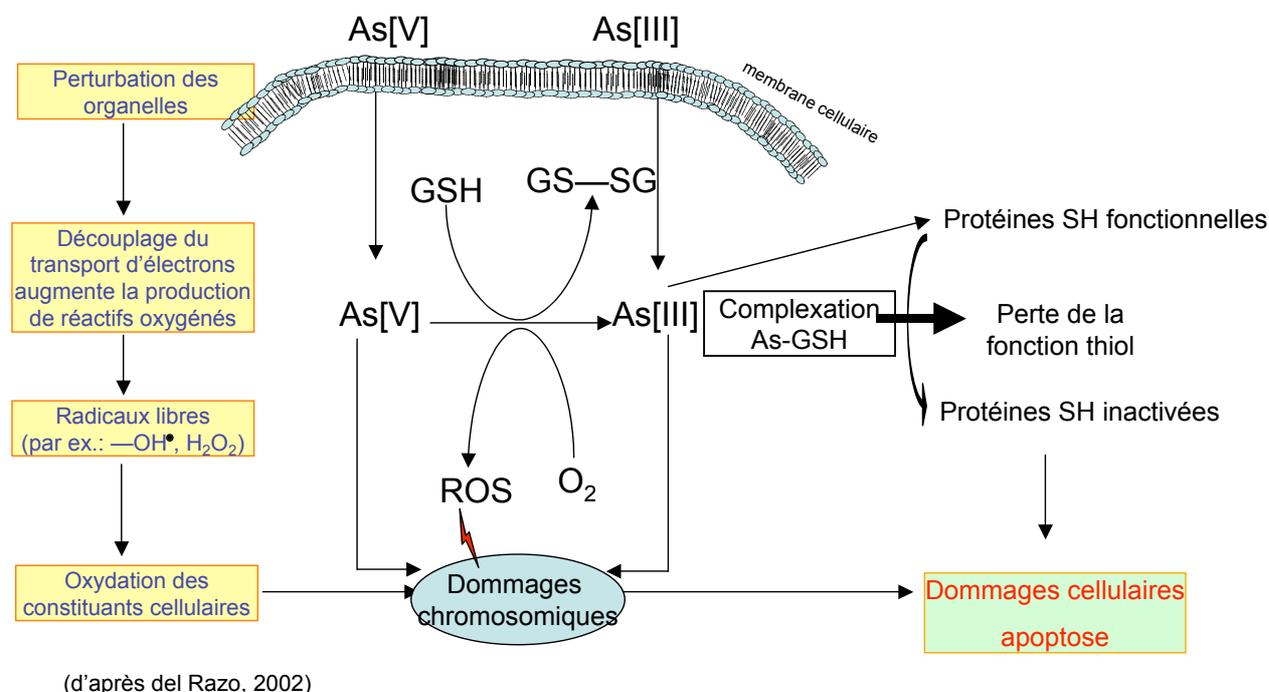
Il est important de noter que la méthylation de l'arsenic comporte une succession d'oxydations de l'As[III] en MMAs[V] puis du MMAs[III] en DMAs[V] (Aposhian, 1997). Nesnow *et al.* (2002) (Nesnow *et al.*, 2002) suggèrent que les ROS soient produits lors de l'oxydation du DMA [III] en DMA[V].

Les ROS sont des composés critiques dans les voies de signalisation, dans l'activation et l'inactivation de facteurs de transcription qui provoquent la carcinogénèse. Les ROS peuvent moduler l'expression des gènes en agissant comme messagers secondaires ; néanmoins, la surproduction de ROS engendre des dommages oxydatifs qui peuvent mener à la mort cellulaire (Perkins *et al.*, 2000) (figure I.16.).

Si les ROS sont effectivement responsables de la génotoxicité de As[III], pourquoi ce dernier n'est-il pas identifié comme inducteur de mutations ponctuelles, souvent observées dans les tests bactériens et les mutants *hprt*<sup>-</sup> (gène codant l'hypoxanthine guanine phosphoribosyltransférase hébergé sur le chromosome X de cellules eucaryotes) de cellules de mammifères exposées aux ROS (Oller et Thilly, 1992)? En fait, le type de mutations sélectionnées dépend de différents facteurs incluant le type de mutagène, les conditions de sélection du mutant, le taux et la fidélité de réparation de l'ADN, et, de manière plus importante, l'outil cellulaire utilisé pour mettre en évidence différentes mutations (ponctuelles ou grandes délétions). La plupart des tests mutagènes utilisant un outil bactérien mettent en évidence que les radicaux oxygénés induisent des substitutions de bases ou des décalages de cadre de lecture (Moody et Hassan, 1982). Dans les études réalisées sur des cellules de mammifères *hprt*<sup>-</sup> en présence de ROS, 64% des cellules ne présentent aucune modification majeure dans le gène (mutation synonyme ou pas de mutation) et 36% présentent des délétions partielles ou totales du gène. Hsie *et al.* démontrent, lors de l'utilisation de constructions cellulaires qui permettent des délétions multiples, que ce type d'événement est important en présence de ROS (Hsie *et al.*, 1990).

Wang *et al.* observent que l'arsenic induit des lésions de l'ADN aussi bien à dose très faibles (de l'ordre de  $0,25 \mu\text{M}$ ) que très élevées ( $10-100 \mu\text{M}$ ) (Wang *et al.*, 2001). Effectivement, l'utilisation de la formamidopyrimidine-ADN glycosylase (Fpg), lors de l'extraction d'ADN, augmente de manière significative les cassures de brins d'ADN (CBA) dans les cellules cultivées avec  $0,25 \mu\text{M}$  d'arsenic (Wang *et al.*, 2001). Ces résultats suggèrent que As[III] cause la formation d'adduits d'ADN plutôt que les CBA, car la Fpg coupe les adduits d'ADN entre des bases oxydées tels la 8-oxoguanine, 5-hydroxycytosine, 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine (Nickoloff *et al.*, 1998). Les adduits d'ADN oxydés sont prédominants, suggérant que l'ADN subit des lésions oxydatives lorsque la cellule est soumise au stress arsenic.

Les effets toxiques de l'arsenic sont réduits lorsque sont ajoutés des systèmes antioxydants naturels de régulation et de protection de nature enzymatique (superoxyde dismutases (SOD), catalases et peroxydases) et non enzymatique (glutathion réduit) (Del Razo *et al.*, 2001).



**Figure I.16.** Mécanisme d'altération de la cellule provoqué par l'arsenic. La réduction intracellulaire de la forme pentavalente As[V] en une forme trivalente As[III] conduit à la formation de radicaux libres (ROS) toxiques pour la cellule. L'As[III] peut se complexer aux groupements SH des protéines et contribuer à la diminution de la concentration du glutathion (GSH) et perturber la fonction des groupements thiols (d'après Del Razo *et al.*, 2002).

#### V.4. Le paradoxe : carcinogène ou anti-cancéreux ?

Les mécanismes précis de l'action carcinogène de l'arsenic ne sont pas encore bien compris, pourtant différentes études mettent en évidence les effets mutagènes induits par l'arsenic (Basu *et*

*al.*, 2001; Bau *et al.*, 2002). Le paradoxe de ce puissant carcinogène est que l'arsenic se révèle un agent chimiothérapeutique dans le traitement de certains types de cancer. En particulier, l'arsenic se révèle être très efficace dans le traitement de la leucémie aiguë promyélocytaire (un type rare de cancer du sang) (Bode et Dong, 2002; Zhu *et al.*, 1997). En effet, des études récentes démontrent que l'arsenic induit l'apoptose (Pulido et Parrish, 2003) et ciblerait même certains types de cellules tumorales (Bode et Dong, 2002).

Outre les dommages à l'ADN occasionnés par le stress oxydatif, les ROS attaquent aussi d'autres macromolécules comme les lipides et les protéines. Il est certain que ces molécules interfèrent dans la transduction des signaux cellulaires et modulent l'expression des gènes pouvant mener à la mort cellulaire.

Les mitochondries sont sensibles aux lésions du stress oxydatif. Des tests d'induction de l'apoptose dans différentes cultures cellulaires cancéreuses et leucémiques ont montré que les mitochondries sont des cibles de la toxicité de l'arsenic (Miller *et al.*, 2002 ; Shen *et al.*, 1997). En effet, il peut paraître paradoxal que l'As[III], puissant carcinogène, soit utilisé dans le traitement de certains cancers. Une des voies d'action pouvant expliquer l'induction de l'apoptose serait un effet direct de l'arsenic sur le potentiel de membrane de la mitochondrie. Cela engendrerait la perte des cytochromes *c*, ce qui induirait alors les caspases 3 provoquant l'apoptose (Chen *et al.*, 1998).

## V.5. L'induction de protéines de stress

L'arsenic est connu pour induire (directement ou indirectement) un grand nombre de protéines de stress (PS) tels les « heat shock protein » (Hsp, protéine de réponse au stress thermique). La grande majorité des études les concernant a été réalisée sur des lignées cellulaires eucaryotes. Il existe deux grandes catégories de protéines qui répondent à un stress métallique : certaines de ces protéines sont membres des Hsp tandis que d'autres ne sont pas inductibles par la chaleur tels les métallothionines (MT). Les MT sont des protéines riches en groupements sulfhydryls qui fixent de nombreux métaux, diminuant ainsi la toxicité (Kreppel *et al.*, 1994).

Les PS sont classifiées en familles suivant leurs degrés d'homologies et leur masse relative : MT, ubiquitine (Ub), protéines de 15 à 40 kDa (incluant les hèmes oxygénases) et des protéines de 60, 70, 90 et 110 kDa (Del Razo *et al.*, 2001). En absence de stress, certaines PS sont exprimées de manière constitutive à un niveau basal, et servent de protéines chaperonnes pour maintenir l'homéostasie cellulaire en facilitant le repliement des protéines et leur assemblage (Hendrick et Hartl, 1993). Ces fonctions sont liées au fait que les Hsp sont des protéines qui se fixent à d'autres protéines et polypeptides. Les Hsp aident certaines protéines à traverser les membranes cellulaires

(Pelham, 1986), assistent l'assemblage des polypeptides, et facilitent la maturation des protéines (Rothman, 1989). Les Hsp interviennent dans les mécanismes de protection et de réparation de protéines vulnérables lors des stress. L'étude des protéines Hsp révèle que toutes ces protéines ont un rôle similaire et contiennent toutes des motifs très conservés au sein du monde vivant (de la bactérie à l'humain).

## **Chapitre II.**

### **Objectifs**



Les microorganismes interviennent de façon significative dans le cycle biogéochimique de l'arsenic. Différents mécanismes directs et indirects, agissant sur la mobilité et donc sur la biodisponibilité de l'élément, sont mis en œuvre et ont fait l'objet d'une revue de la littérature dans le chapitre I de la première partie.

L'oxydation biologique de As[III] en As[V] est considérée chez les cellules bactériennes essentiellement comme un mécanisme de résistance à l'arsenic. Tandis que les premières observations d'oxydation de As[III] en As[V] ont été faites en Australie dès 1909, les publications traitant des mécanismes biologiques d'oxydation de As[III] en As[V] sont rares. Quelques souches bactériennes As[III] oxydantes furent isolées durant la seconde partie du siècle dernier mais ce n'est que récemment qu'une espèce extrêmement performante dans la réalisation de cette oxydation fut isolée au laboratoire. Cette bactérie, ULPAs1, par la suite nommée *C. arsenoxidans* est la pierre angulaire de ce travail.

L'enzyme arsénite oxydase, responsable de l'oxydation de As[III] en As[V], a été étudié chez *Alcaligenes faecalis*. Elle est située sur la surface externe de la membrane plasmique. Sa structure cristallographique a été déterminée, et l'analyse par diffraction X de cette structure montre que l'enzyme est un hétérodimère composé d'une grande sous-unité qui incorpore le cofacteur molybdoptérine et un centre fer soufre du type [3F-4S], et d'une petite sous-unité à centre [2Fe-2S] de type Rieske.

Les objectifs fixés au commencement de ce travail peuvent se résumer succinctement de la manière suivante : la caractérisation génétique et moléculaire de l'arsénite oxydase chez *C. arsenoxidans*.

Le chapitre I de la seconde partie décrit la caractérisation des gènes codant l'arsénite oxydase. La stratégie employée est celle du criblage d'une banque de mutants obtenu par insertion aléatoire d'un transposon. Cette technique nous a permis d'isoler les gènes *aoxA* et *aoxB*, organisés en une structure opéronique. Deux autres gènes, *aoxC* et *aoxD*, codant des protéines du métabolisme énergétique ont été identifiés au sein de la structure opéronique. Nous nous sommes interrogés alors sur la fonction première de l'enzyme. Est-elle seulement liée à la résistance à l'arsenic ? Ces résultats ont donné lieu à l'article « Arsenite oxidase *aox* genes from a metal-resistant  $\beta$ -Proteobacterium » publié dans *Journal of Bacteriology* (2003).

Au cours du second chapitre de la seconde partie, nous détaillons l'analyse phylogénétique des deux sous-unités de l'arsénite oxydase. De manière intéressante, nous montrons que des homologues de ces deux sous-unités se retrouvent chez d'autres familles de protéines enzymatiques assurant des fonctions diverses. Ainsi, nous avons été amenés à nous questionner sur l'évolution de cette famille de protéines. Assemblage « récent » de sous-unités existantes chez d'autres familles ou origine « ancienne » ? Nous proposons l'hypothèse, au regard de nos résultats, de l'apparition précoce de ce type d'enzymes. Le manuscrit « Arsenite oxidase, an ancient bioenergetic enzyme » publié dans *Molecular Biology and Evolution* (2003) regroupe ces résultats.

Dans un troisième chapitre, nous nous consacrons aux mutants d'insertion obtenus au chapitre I. Les résultats obtenus révèlent que les gènes régulés par le stress arsenic sont divers : gènes de l'information (régulation, réplication, transcription), gènes du métabolisme intermédiaire, gènes de synthèse des membranes bactériennes... Certaines protéines synthétisées en présence d'arsenic interviennent dans les mécanismes de réparation et de protection de l'ADN. La publication « Pleiotropic response of *Cenibacterium arsenoxidans*, ULPAs1 sp. nov., a metalloresistant  $\beta$ -Proteobacterium, to arsenic stress » soumis à *Proteomics* en résume l'essentiel.

Le dernier chapitre reprend des résultats non encore publiés. Ceux-ci n'en demeurent pas moins intéressants car nous avons montré que la bactérie *C. arsenoxidans* héberge trois types d'opérons *ars* différents. La structure de ces opérons, en nombre de gènes et en famille de gènes, varie. En outre, nous identifions des arsénates réductases chez *C. arsenoxidans*. Nous proposons alors que plusieurs mécanismes de résistance coexistent chez cette souche.

**SECONDE PARTIE**  
**TRAVAUX PERSONNELS**

## **Chapitre I.**

# **Arsenite Oxidase *aox* Genes from a Metal-Resistant $\beta$ -Proteobacterium**

**Daniel Muller, Didier Lièvreumont, Diliانا Dancheva  
Simeonova, Jean-Claude Hubert and Marie-Claire Lett**  
*Journal of Bacteriology* 185, 135-141 (2003)

## I. Introduction

Les bactéries jouent un rôle important dans le cycle biogéochimique de l'arsenic en modifiant les espèces et la biodisponibilité de l'élément. Celles-ci résistent à la toxicité de ce métalloïde, soit en réduisant l'As[V] intracellulaire en As[III], qui est alors excrété par une pompe (système codé par l'opéron *ars*), soit en oxydant l'As[III] extracellulaire en As[V] moins toxique et moins mobile (rôle de détoxification de l'arsénite oxydase).

Ces vingt dernières années, les mécanismes de réduction ont été abondamment étudiés tant du point de vue enzymatique que génétique. En revanche, il existe très peu de littérature traitant des mécanismes d'oxydation biologique, ainsi que des mécanismes de stress liés à l'arsenic. Seule, l'arsénite oxydase d'*Alcaligenes faecalis* a été isolée (Anderson *et al.*, 1992; Ellis *et al.*, 2001). Son analyse cristallographique a permis de montrer qu'il s'agit d'un hétérodimère composé d'une petite sous-unité à centre [2Fe-2S] et d'une grande sous-unité catalytique à cofacteur molybdoptérine (Ellis *et al.*, 2001).

L'objectif de nos travaux est l'analyse génétique et moléculaire du système d'oxydation de l'As[III] en As[V], et des mécanismes de la réponse cellulaire au stress arsenic. La souche retenue pour cette étude est la  $\beta$ -Protéobactérie provisoirement nommée ULPAs1, issue de la collection du laboratoire. Ce microorganisme se caractérise principalement par son aptitude à oxyder de façon rapide ( $4 \text{ mM h}^{-1}$  avec  $5 \times 10^8$  cellules) et totale de très fortes concentrations d'As[III] en As[V] ( $100 \text{ mg/L}$ ) (Weeger *et al.*, 1999).

L'approche méthodologique retenue est celle de la construction de mutants par transposition aléatoire (mini-Tn5 *lacZ2*) (de Lorenzo *et al.*, 1990). Ces mutants sont criblés, afin d'isoler ceux dont le gène rapporteur (*lacZ2*) s'est inséré en aval d'un promoteur inductible par l'As[III]. L'étude de ces mutants d'insertion nous a conduit à l'identification de différents gènes impliqués dans le mécanisme de réponse à l'arsenic. Cette technique nous a permis pour la première fois d'isoler et de caractériser les gènes codant l'arsénite oxydase.

## II. Manuscrit

Disponible via internet à l'adresse suivante

<http://dx.doi.org/10.1128/JB.185.1.135-141.2003>



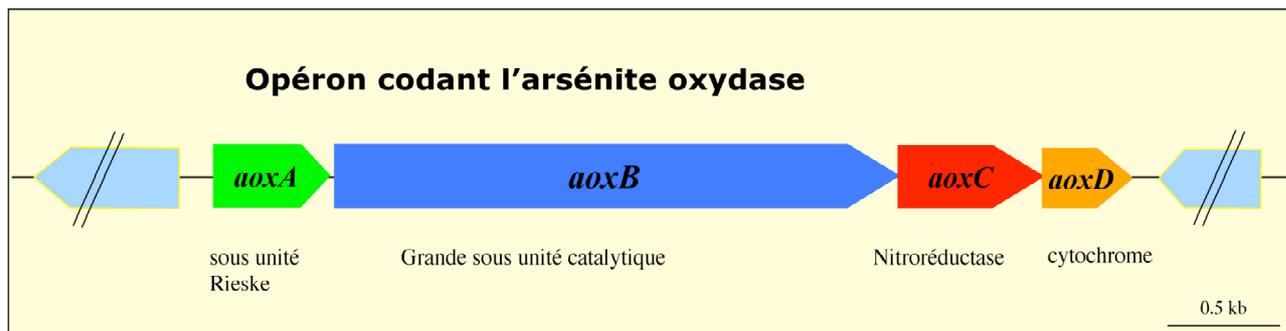
### III. Résultats complémentaires

Jusqu'à présent, l'hypothèse admise était que l'oxydation de l'arsénite représente une voie de résistance à l'arsenic (Anderson *et al.*, 2002; Mobley et Rosen, 1982; Rosen, 1999b). Pourtant, lors de ces travaux, nous avons observé que les deux mutants qui ont perdu le phénotype d'oxydation de l'arsenic restent As[III] résistants. Ainsi, ces résultats suggèrent l'existence d'autres mécanismes de résistance. Indubitablement, le rôle physiologique de cette protéine n'est donc pas totalement dévoué à la résistance à l'arsenic. Il est également probable que certaines souches soient mixotrophes (Ehrlich, 2001), c'est-à-dire que l'oxydation de l'As[III] fournit à la cellule une partie de l'énergie nécessaire à son développement tandis que le complément est apporté par l'oxydation de composés organiques.

#### III.1. Le métabolisme énergétique

Weeger *et al.* (1999) ont démontré que la bactérie ULPAs1, *C. arsenoxidans*, n'est pas autotrophe (utilisation du carbone minéral CO<sub>2</sub> ou de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). En effet, l'espèce *C. arsenoxidans* se cultive dans un milieu synthétique comportant une source de carbone et d'énergie organique (acétate, peptone ou lactate). Néanmoins, le développement de la bactérie n'est pas affecté lorsque 1,33 mM d'As[III] sont additionnés au milieu de culture (Weeger *et al.*, 1999). Ce dernier résultat suggère que le gain d'énergie apporté par l'oxydation serait directement utilisé pour lutter contre le stress du à l'arsenic. Cette hypothèse est en accord avec les observations de la littérature. Le micro-organisme hétérotrophe *Agrobacterium albertimagni* AOL15 présente les mêmes caractéristiques de croissance que la bactérie *C. arsenoxidans* (Salmassi *et al.*, 2002). De même, Anderson *et al.* (2002) ont observé que les cultures de l'espèce *A. faecalis* survivent mieux en présence d'arsénite (Anderson *et al.*, 2002).

Outre les gènes *aoxAB* codant l'arsénite oxydase, l'analyse des clones a permis de séquencer des gènes voisins. Les résultats de RT-PCR (non décrits) indiquent que les deux ORF, *aoxC* et *aoxD* adjacentes à *aoxAB* font partie de l'opéron *aox* et coderaient des protéines impliquées dans le transport des électrons (figure II.1.). En effet, l'analyse des domaines conservés indique que la protéine putative AoxC est composée d'un domaine nitroréductase. La famille des nitroréductases est impliquée dans la réduction du groupe nitro (NO<sub>2</sub>), intéressant en particulier les composés nitroaromatiques. La protéine putative AoxD possède un domaine de type cytochrome *c551/c552*.



**Figure II.1.** Représentation schématique de l'opéron *aox* chez *C. arsenoxidans*.

### III.2. La protéine AoxC, une nitroréductase

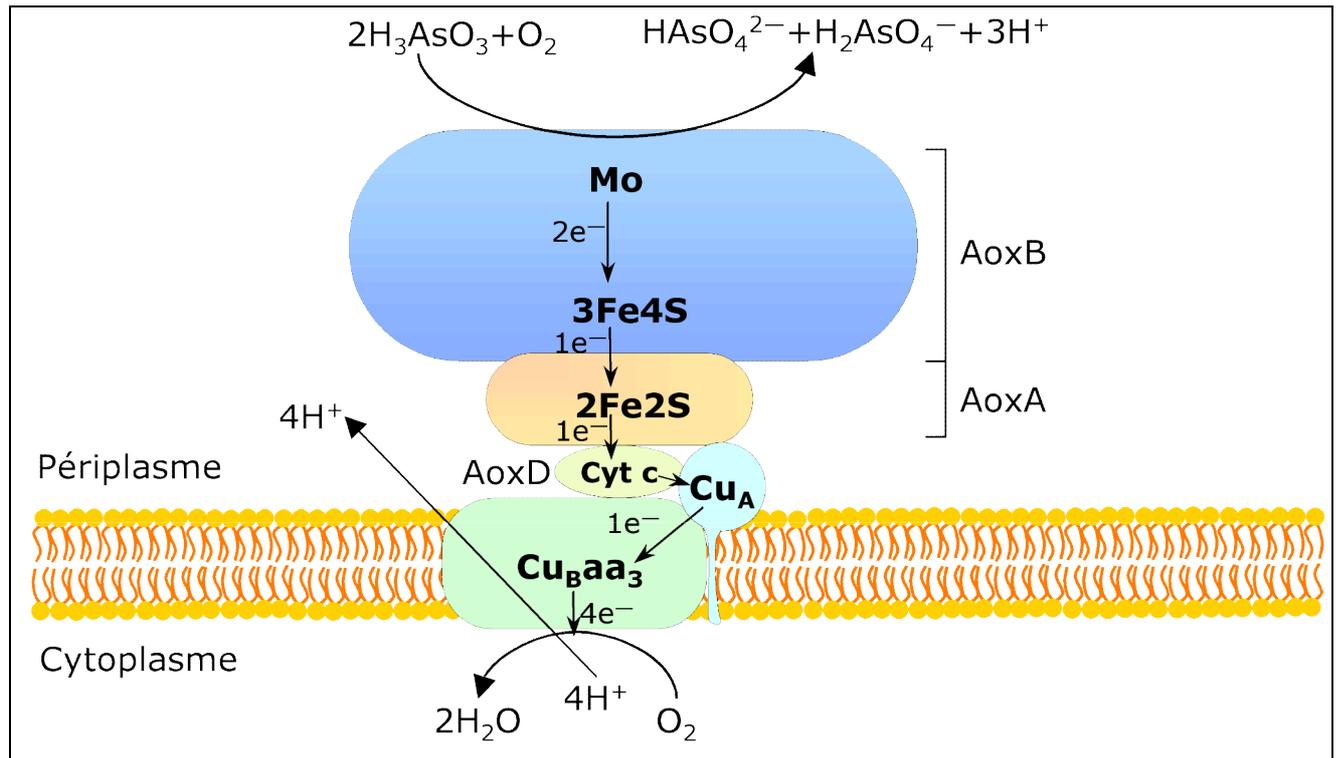
AoxC est une nitroréductase putative dont la fonction est de réduire des composés nitro-organiques. Les nitroréductases sont en général des homodimères qui utilisent la flavine mononucléotide (FMN) comme cofacteur. La famille des nitroréductases regroupe différents types d'enzymes dont celles qui sont FMN dépendantes telles que les nicotineamide adénine dinucléotide (NADH) nitroréductases, les nicotineamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) nitroréductases, les dihydroptéridines réductases (Lind, 1972) et les NADH déshydrogénases (Hochstein et Dalton, 1973; Kaniuga, 1963). Plusieurs de ces protéines sont décrites comme étant des oxydoréductases, mais il reste difficile de leur déterminer un rôle potentiel. Des expériences de mutagenèse permettront peut-être à l'avenir d'attribuer une fonction à cette protéine.

### III.3. La protéine AoxD, un cytochrome *c*

La présence du gène *aoxD* est intéressante, car un cytochrome *c* (551/552) et une azurine ont été détectés lors de la purification de l'arsénite oxydase d'*A. faecalis* (Anderson *et al.*, 1992). De même, l'équipe de Vanden Hoven (2004) a récemment détecté et purifié un cytochrome *c*551 lors de l'extraction de l'arsénite oxydase de la souche *Hydrogenophaga sp.*, souche NT-14 (Vanden Hoven et Santini, 2004). Le cytochrome *c* (551/552) apparaît être l'accepteur d'électrons des arsénite oxydases respectives (Anderson *et al.*, 1992; Ellis *et al.*, 2001).

La structure cristalline de la sous-unité de type Rieske de l'arsénite oxydase d'*A. faecalis* présente une petite partie hydrophobe, en forme de sillon, où une petite protéine globulaire tel un cytochrome *c* ou une azurine pourrait se fixer (Ellis *et al.*, 2001). Le schéma fonctionnel de l'oxydation de l'As[III] actuellement proposé par différents auteurs (Anderson *et al.*, 2002; Ellis *et al.*, 1995; Vanden Hoven et Santini, 2004) est le suivant : lors de l'oxydation, l'arsénite oxydase prend un électron à l'As[III] et celui-ci est ensuite transmis, soit à l'azurine, soit au cytochrome *c* (551/552). En outre, la plupart des cytochromes *c* (551/552) peut donner des électrons directement à une oxydase terminale (exemple la cytochrome *c* oxydase *aa3*) (Otten *et al.*, 2001) ou une réductase

terminale (exemple la nitrate réductase) (Berks *et al.*, 1995). La cytochrome *c* oxydase *aa3* peut fonctionner comme une pompe à protons, générant un gradient de protons à travers la membrane qui peut être utilisé pour la production d'ATP (Forst et Schulten, 2001; Mills et Ferguson-Miller, 2003). Cette hypothèse sous-entend que l'oxydation de l'arsenic serait liée à une chaîne de transport électronique, qui est génératrice d'énergie, même chez les bactéries décrites comme étant hétérotrophes.



**Figure II.2.** Représentation schématique du mécanisme de fonctionnement probable de l'arsénite oxydase (d'après Vanden Hoven, 2004). L'arsénite est oxydé en arséniate au niveau du centre catalytique à molybdène de la grande sous-unité (AoxB). Les deux électrons sont ensuite transférés au centre [3Fe-4S] de AoxB d'où ils passent au centre [2Fe-2S] de la petite sous-unité de type Rieske (AoxA). Les électrons passeraient ensuite au cytochrome *c*551/552 (AoxD) qui est associé à AoxA, puis au CuA et à l'hème du complexe cytochrome *c* oxydase *aa3*. Quatre électrons seront nécessaires au total pour réduire l'O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O dans le cytoplasme, et quatre protons seront pompés hors de la cellule créant une force proton motrice qui peut être utilisée dans la production d'ATP.

### III.4. Régulation de l'opéron *aoxAB*

#### III.4.1. Initiation de la transcription

L'analyse des gènes *aoxA* et *aoxB* a permis de montrer que ceux-ci appartiennent à une structure opéronique. La technique de l'extension d'amorce a été employée pour déterminer le point

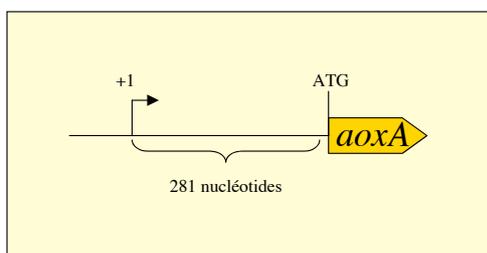
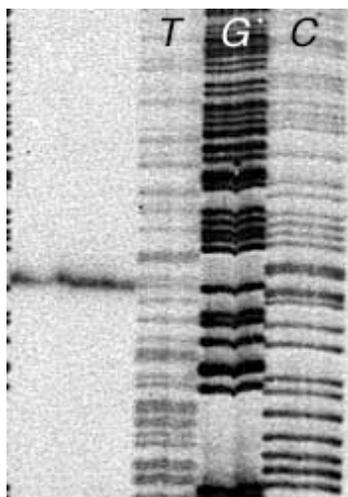
d'initiation de la transcription de l'opéron *aoxAB* (Nicoloff, 2001).

#### III.4.1.1. Le principe de la technique de l'extension d'amorce

Le site d'initiation de la transcription correspond au premier nucléotide de l'extrémité 5' de l'ARN messager. Ce site peut être déterminé par une réaction de rétro-transcription en présence d'un oligonucléotide (amorce) spécifique radiomarqué en son extrémité 5', des ARN cellulaires totaux, et d'une ARN polymérase ADN dépendante. La taille de l'ADN complémentaire est déterminée après séparation sur gel de polyacrylamide dénaturant par comparaison des séquences obtenues à l'aide de la même amorce et ayant migré en parallèle. La taille du fragment ADN simple brin polymérisé étant déterminée au nucléotide près, les amorces utilisées doivent toutes être de la même taille. De telles amorces purifiées sont commercialisées par les fabricants d'oligonucléotides.

#### III.4.1.2. Les résultats préliminaires

Lors des analyses préliminaires, les bactéries étaient cultivées en présence d'As[III] pour induire l'expressions des gènes *aoxAB*. L'analyse des gels de séquence permet de localiser le point d'initiation de la transcription, située à 284 nucléotides en amont de l'ATG du gène *aoxA* (FigII.3). Ce résultat ne corrobore pas le point d'initiation déduit par une analyse bioinformatique et proposé dans l'article. La mise en évidence de cette grande région laisse envisager la présence de motifs de régulation au niveau de cette séquence. Des expériences complémentaires seront nécessaires pour confirmer et déterminer le mode de régulation ainsi qu'un régulateur



**Figure II.2.2** Point initiation de la transcription  
a) photographie de l'expérience. b) représentation schématique.

## IV. Conclusion

Nous avons caractérisé pour la première fois les gènes *aoxAB* codant les deux sous unités de l'arsénite oxydase. Ils s'organisent en une structure opéronique dont font également partie les gènes

*aoxC* et *aoxD* dont les protéines putatives interviennent dans la chaîne électronique. Le rôle de la protéine AoxAB est-il bien uniquement dévoué à la résistance de la cellule à l'arsenic ?

## **Chapitre II.**

### **Arsenite oxidase, an ancient bioenergetic enzyme**

Evelyne Lebrun, Myriam Brugna, Frauke Baymann, Daniel Muller, Didier Lièvreumont, Marie-Claire Lett and Wolfgang Nietschke

***Molecular Biology and Evolution* 20, 686-693 (2003)**

## I. Introduction

La terre serait âgée d'environ 4,5 milliards d'années (Wilde *et al.*, 2001) et les premières formes de vie seraient apparues il y a ~4,2 milliards d'années (Russell et Hall, 1997). L'équipe de Russell (1997) suggère qu'à cette période, des billes de monosulfure de fer se formaient chimiquement au fond de l'océan primordial. Ces structures que l'on retrouve fossilisées, semblent avoir été des précurseurs inorganiques des membranes cellulaires. La biochimie des acides ribonucléiques aurait pu alors se réaliser dans ces structures, afin de donner naissance au premier système de réplication : le sulfure de fer agissant comme catalyseur dans les réactions de synthèse géochimique et biochimique conduisant à la production des précurseurs organiques pour la réplication. Cet ancêtre universel à toutes les formes de vie n'était pas une cellule libre, mais aurait contribué à l'apparition des premiers procaryotes chimiolithotrophes, il y a quelques 3,8 milliards d'années (pour revue cf (Martin et Russell, 2003)).

Baymann *et al.* (2003) notent que la majorité des enzymes énergétiques actuelles montre un lien étroit de parenté, et suggèrent alors que les protéines impliquées dans les mécanismes bioénergétiques seraient le résultat de l'évolution et de l'assemblage d'un groupe limité d'enzymes présentes dans les cellules pré-LUCA (LUCA, last universal common ancestor) (Baymann *et al.*, 2003).

La seule enzyme arsénite oxydase qui ait été purifiée, et pour laquelle la structure a été déterminée, est celle d'*Alcaligenes faecalis* (Anderson *et al.*, 1992 ; Ellis *et al.*, 2001). L'unique description d'une autre arsénite oxydase, celle de *C. arsenoxidans*, est présentée par Muller *et al.* (2003). Il s'agit d'un hétérodimère présentant une petite sous-unité appartenant à la famille des protéines de type Rieske, dont font partie les complexes cytochrome *b/c*, et une grande sous-unité catalytique à cofacteur molybdoptérine (DMSO-réductase, formate déhydrogénase). Des homologues de ces deux sous-unités existent chez d'autres familles enzymatiques assurant des fonctions diverses.

On peut dès lors s'interroger sur l'origine de l'enzyme, ou de la famille d'enzymes de type arsénite oxydase : Est-elle apparue récemment dans l'évolution, par association de sous-unités existantes, ou cette famille est-elle d'une origine extrêmement ancienne ?

L'analyse de génomes entièrement séquencés de bactéries et la recherche des gènes codant l'enzyme arsénite oxydase, a permis de mettre en évidence chez *Chloroflexus aurantiacus*, ainsi que chez *Sulfolobus tokodaii* et *Aeropyrum pernix* d'autres enzymes appartenant à cette nouvelle famille. La comparaison des séquences protéiques, déduites des séquences nucléotidiques, démontre

que tous les acides aminés impliqués dans les interactions avec le cofacteur à molybdène et les centres Fe-S, sont conservés. La séquence signal de type TAT l'est également. La diversité phylogénétique représentée par ces trois micro-organismes suggère une enzyme largement conservée dans le monde microbien.

*C. aurantiacus* est une bactérie thermophile tandis que *S. tokadaii* et *A. pernix* appartiennent aux Archaea. Les environnements dans lesquels se trouvent ces microorganismes sont intrinsèquement riches en arsenic et peuvent être considérés comme des environnements à partir desquels la vie a pu débiter. L'avantage énergétique représenté par la récupération des électrons lors de l'oxydation de l'arsénite, aurait conduit à l'apparition précoce d'enzymes de type arsénite oxydase.

## **II. Manuscrit**

Disponible à l'adresse suivante

<http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msg071>

### III. Résultats complémentaires : L'opéron *aoxAB*

Depuis cette étude, d'autres arsénite oxydases de bactéries ont été décrites dans la littérature, et une nouvelle branche des protéines à molybdoptérine a été caractérisée.

Dans la littérature ou les banques de données, l'arsénite oxydase apparaît sous divers acronymes données par les différentes équipes qui en étudient les gènes. Les études américaines se réfèrent aux gènes *aso* (pour **As** oxydase) (Mukhopadhyay *et al.*, 2002), les australiens aux gènes *aro* (pour **arsénite** oxydase) (Santini et vanden Hoven, 2004) et les équipes européennes aux gènes *aox* (pour **arsénite** oxydase). Cette dernière dénomination a été attribuée par Muller *et al.* qui ont, pour la première fois, isolé et caractérisé les gènes codant l'arsénite oxydase (Muller *et al.*, 2003). Ainsi, les synonymes des gènes *aoxA* et *aoxB* sont respectivement *aroB* et *aroA*, ou encore *asoB* et *asoA*. Nous n'utiliserons quant à nous, que la dénomination *aox* pour évoquer ces gènes.

Les bactéries oxydant As[III] peuvent être divisées en deux groupes : d'une part, (i) les chimiolithotrophes qui utilisent l'arsenic comme source d'électrons et le carbone inorganique comme source de carbone et d'autre part, (ii) les hétérotrophes qui nécessitent une source de carbone organique pour leur développement. Actuellement, quatre bactéries chimiolithotrophes ont été étudiées dans le détail : *Pseudomonas arsenitoxidans* (Ilialetdinov et Abdrashitova, 1981), la bactérie NT-26 appartenant aux  $\alpha$ -Protéobactéries (Santini *et al.*, 2000), la bactérie MLHE-1 appartenant aux  $\gamma$ -Protéobactéries (Oremland *et al.*, 2002), et des bactéries appartenant au genre *Thiomonas* appartenant aux  $\beta$ -protéobactéries (Duquesne, 2004). De même, des bactéries hétérotrophes As[III]-oxydantes ont été isolées et étudiées. Dans l'ordre chronologique, *Ochrobactrum anthropi* CCM999, seule souche référencée dans les catalogues, sur les 15 bactéries isolées par Turner (Turner, 1954), *Pseudomonas* (Legge, 1954), *Alcaligenes faecalis* (Philips et Taylor, 1976), *Cenibacterium arsenoxidans* (Weeger *et al.*, 1999), *Agrobacterium albertimagni* (Salmassi *et al.*, 2002), trois archées du genre *Thermus* (Gihring et Banfield, 2001; Gihring *et al.*, 2001), des bactéries du genre *Thiomonas* (Battaglia-Brunet *et al.*, 2002; Bruneel *et al.*, 2003), et la bactérie NT-14 appartenant au genre *Hydrogenophoga* (Vanden Hoven et Santini, 2004).

À ces micro-organismes de la littérature, nous pouvons ajouter une soixantaine de bactéries As[III]-oxydantes conservées au sein de la collection de notre laboratoire. Ces bactéries ont été isolées à partir de sols contaminés par l'arsenic et proviennent d'origines géographiques variées : mines de Salsigne (Aude), de Sainte-Marie-Aux-Mines (Haut-Rhin), et d'Astano (Tessin ; Suisse). L'analyse phylogénétique de ces nouvelles bactéries par l'étude des ADN<sub>r</sub> 16S montre que toutes

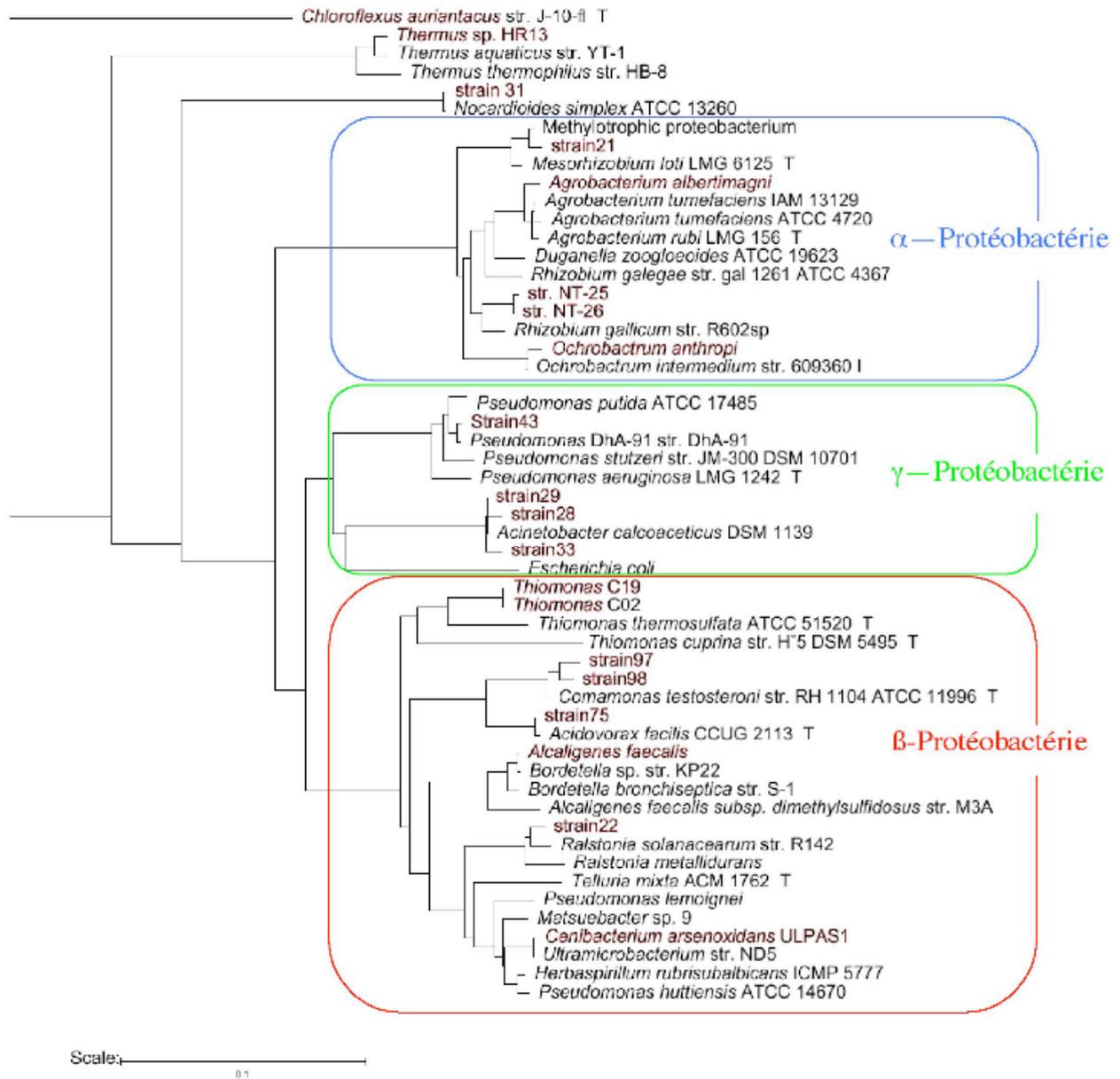
ces bactéries appartiennent aux Protéobactéries, et parmi celles-ci, de nombreuses bactéries sont proches de *Pseudomonas putida*. La surreprésentation de quelques genres bactériens ne reflète certainement pas la réelle diversité des bactéries As[III]–oxydantes issues de ces milieux, mais est vraisemblablement une conséquence du choix du milieu de sélection employé. La diversité des bactéries de la collection est représentée dans l’arbre phylogénétique (figure II.3.).

Depuis la publication des papiers de Muller *et al.* (2003) et de Lebrun *et al.* (2003), de nouvelles séquences de gènes *aoxAB* sont disponibles dans les banques de données ; celle de la bactérie chimiolithoautotrophe australienne NT-26 (numéro d’accèsion AY345225)(Santini et vanden Hoven, 2004), celle de l’AoxAB d’*A. faecalis* (numéro d’accèsion AY297781), et une séquence partielle d’une bactérie appartenant au genre *Thiomonas* (numéro d’accèsion AJ 510263 ; Duquesne, 2004).

En parallèle, et afin d’estimer la diversité des gènes *aox*, nous avons réalisé sur quelques bactéries de notre collection, le séquençage total des gènes *aoxAB* de la souche 43 ( $\gamma$ -Protéobactérie), et partiel des gènes *aoxB* de la souche 21 ( $\alpha$ -Protéobactérie), 22 ( $\beta$ -Protéobactérie), et 75 ( $\gamma$ -Protéobactérie). Une analyse des séquences contenues dans les banques de données nous a permis d’identifier deux nouveaux gènes codant des Aox putatives, issues du séquençage métagénomique de la mer des Sargasses (Venter *et al.*, 2004). La souche codant ces enzymes est évidemment inconnue car issue d’un métagénome et nous proposons de nommer ces deux nouveaux opérons Aox, Sarg1 (numéro d’accèsion AACY01058630) et Sarg2 (numéro d’accèsion AACY01082423). Ces données sont très intéressantes car la mer des Sargasses n’est pas réputée pour être un milieu riche en arsenic : ce sont donc les premières Aox isolées d’un milieu non contaminé par l’arsenic.

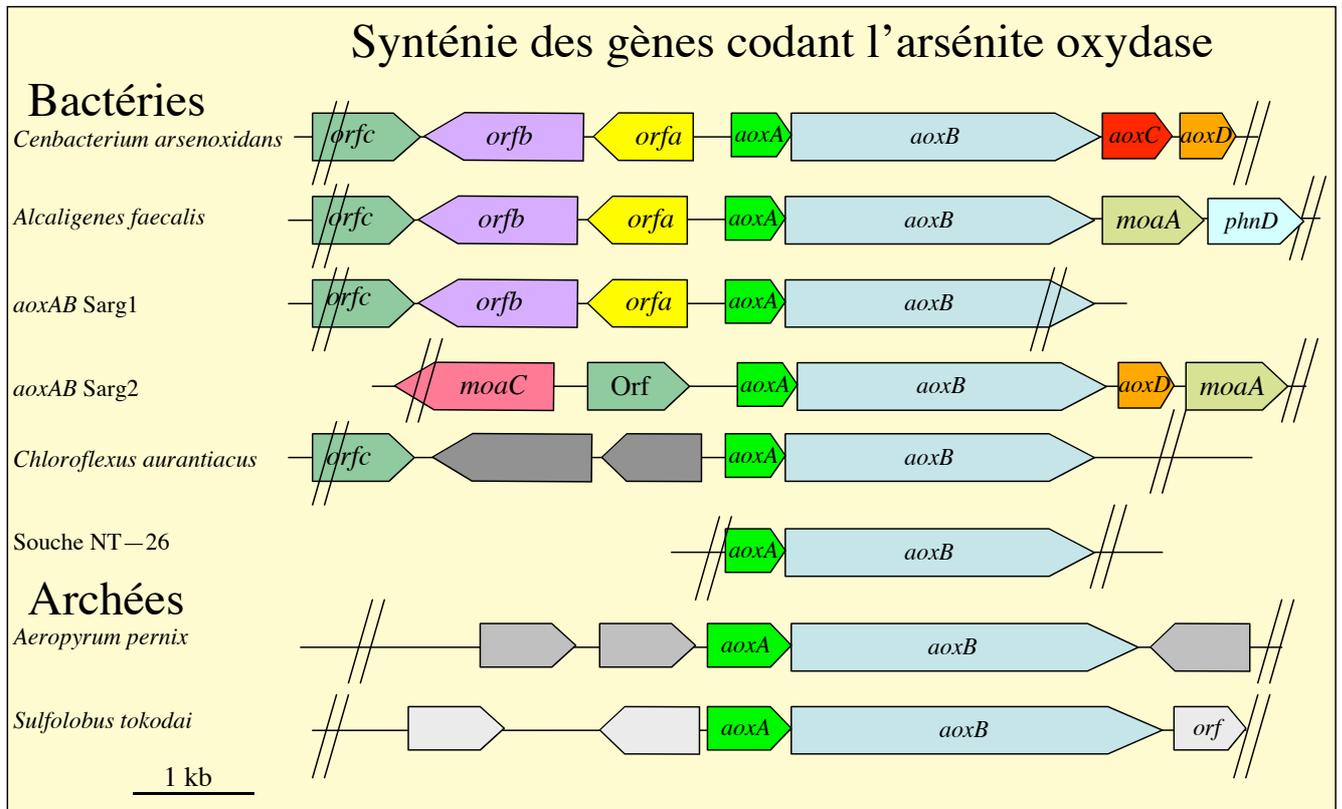
L’étude de ces nouveaux gènes *aox* montre que l’organisation génétique *aoxAB* est toujours conservée, tout comme les séquences caractéristiques de fixation des centres métalliques et le peptide signal de type TAT.

Certaines nouvelles séquences disponibles ne se limitent pas uniquement aux gènes de l’arsénite oxydase. Des études préliminaires sur les séquences situées en amont du gène *aoxA* provenant des séquences de la mer des Sargasses, de celles d’*A. faecalis*, de *C. arsenoxidans* et *C. aurantiacus*, indiquent une conservation de certains gènes (figure II.4.). Par contre, dans ces bactéries les gènes *aoxC* et *aoxD* ne sont pas retrouvés à l’aval des gènes *aoxAB*.



**Figure II.3.** Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des ADN 16S des bactéries As[III]-oxydantes issues de la littérature et de la collection interne au laboratoire. En rouge, les noms des bactéries de identifiées comme organisme pouvant oxyder l'As[III]. Les numéros d'accèsion sont les suivants : souche NT-26 (AF159453) ; souche NT-25 (AF159452) ; *Ochrobactrum anthropi* (AJ249720) ; *Ultrabacterium* souche ND5 (AB008506) ; *Pseudomonas huttienensis* (AB021366) ; *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (AF137508) ; *Matsuebacter* sp9 (AB008503) ; *Methylophilic proteobacterium* (AF107722) ; *Alcaligenes faecalis* (AF155147) ; *Nocardiooides simplex* (U81990) ; souche 21 (AF107722) ; *Thiomonas* C19 (AF176594) ; *Thiomonas* C02 (AF176594) ; *Cenibacterium arsenoxidans* ULPAS1 (AB008506) ; souche 43 (AF177916) ; *Ralstonia metallidurans* (AF067657) ; *Pseudomonas putida* (D85994) ; *Ochrobactrum intermedium* (AJ249720) ; *Pseudomonas* DhA-91 souche DhA-91 (AF177916) ; *Bordetella* sp souche KP22 (AB015607) ; *Thiomonas thermosulphata* ATCC51 520 (U27839) ; *Thiomonas cuprina* DSM5495 (U67162) ; *Agrobacterium albertimagni* (AF316615) ; *Agrobacterium tumefaciens* IAM 13129 (D12784) ; *Agrobacterium rubi* (D12787) ; *Rhizobium gallicum* souche R602sp. (U86343) ; *Alcaligenes faecalis* subsp. *dimethylsulfidosus* souche M3A (AB015607) ; *Ralstonia solanacearum*

(RS06158). Les séquences des ADNr 16S des bactéries de la collection ne sont pas encore dans les banques de données. Les bactéries *Aeropyrum pernix* et *Sulfolobus tokodai* ne sont pas représentées.



**Figure II.4.** Structure opéronique de l'arsénite oxydase. Les barres parallèles correspondent aux limites des séquences réalisées ou bien fixé arbitrairement lors de cette étude. Les gènes coloré de la même couleur code de protéine similaire. En gris sont représenté des gènes différents.

## IV. Conclusion

Le chapitre II de la seconde partie détaille l'analyse phylogénétique des deux sous-unités de l'arsénite oxydase.

Des homologues des sous-unités AoxA (Rieske) et AoxB (protéine à molybdène) se retrouvent chez d'autres familles enzymatiques assurant des fonctions diverses, par exemple et respectivement dans les complexes protéiques cytochrome *b/c*, et dans la famille des DMSO-réductases (formiate déshydrogénase, nitrate réductase, arséniate réductase respiratoire...). On peut dès lors s'interroger sur l'origine et l'évolution de la famille des arsénite oxydases. En considérant que dans les environnements primitifs, l'As[III] constitue un substrat énergétique minéral majeur pour les organismes autotrophes, une origine précoce de cette famille d'enzyme aurait permis à des bactéries primitives, de coloniser ces milieux hostiles.

## **Chapitre III.**

# **Pleiotropic response of *Cenibacterium arsenoxidans*, ULPAs1 sp. nov., metalloresistant $\beta$ -Proteobacterium, to arsenic stress**

Christine Carapito, Daniel Muller, Evelyne Turlin, Philippe Riegel, Emmanuelle  
Leize, Antoine Danchin, Alain Vandorsealar, Philippe Bertin, Marie-Claire Lett

**Soumis à *Proteomics***



## I. Introduction

Le degré de toxicité de l'arsenic dépend de son état d'oxydation. Ainsi, les formes trivalentes sont plus toxiques que les formes pentavalentes (Mandal et Suzuki, 2002). Les effets biologiques de l'arsenic, au niveau cellulaire, sont principalement étudiés sur des lignées de cellules de mammifères (pour revue (Basu *et al.*, 2001)). De nombreux microorganismes de l'environnement vivent directement en contact avec le métalloïde et ont, de ce fait, développé une multitude de mécanismes d'adaptation au stress engendré par cet élément. Néanmoins, les seules études réalisées sur des bactéries sont celles concernant les mécanismes de résistance qui interviennent dans la modification de l'état d'oxydation de l'arsenic.

Ainsi, tandis que les mécanismes de réponse au stress arsenic commencent à être décryptés au niveau de la cellule eucaryote, aucune information n'est disponible sur la réponse générale de la cellule bactérienne exposée à un environnement fortement contaminé par l'arsenic.

Par conséquent, cette partie de notre travail se fixe pour objectif, l'étude de la réponse adaptative de la souche bactérienne ULPAs1 ou *Cenibacterium arsenoxidans* au stress arsenic. Lors de la caractérisation de l'arsénite oxydase par mutagenèse aléatoire (Chapitre II), nous avons isolé une trentaine de mutants dont le gène rapporteur se trouve sous le contrôle de promoteurs induits par l'As[III]. Deux de ceux-ci, M1 et M2, sont des mutants d'insertion de l'arsénite oxydase et ont fait l'objet du second chapitre. L'étude des autres gènes induits par l'arsenic, combinée à une approche protéomique, doit nous permettre d'élargir notre vision des mécanismes adaptatifs de la cellule bactérienne au stress arsenic.

## II. Manuscrit

1  
2 **Pleiotropic response of *Cenibacterium arsenoxidans*, ULPAs1, a**  
3 **metalloresistant beta-Proteobacterium, to arsenic stress.**

4

5

6

7 Christine Carapito<sup>1†</sup>, Daniel Muller<sup>2†</sup>, Evelyne Turlin<sup>3</sup>, Philippe Riegel<sup>4</sup>, Emmanuelle Leize-  
8 Wagner<sup>1</sup>, Antoine Danchin<sup>3</sup>, Alain Van Dorsselaer<sup>1</sup>, Philippe Bertin<sup>2</sup>, Marie-Claire Lett<sup>2\*</sup>

9

10 1. LSMBO, Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique ECPM, Bât. R5 67087  
11 Strasbourg France CNRS-UMR 7509/Université Louis-Pasteur, Strasbourg, France

12

13 2. Laboratoire de dynamique, évolution et expression des génomes de microorganismes, FRE  
14 2326, Université Louis-Pasteur, Strasbourg, France

15

16 3. Génétique des Génomes Bactériens URA 2171 CNRS Département de Biochimie et  
17 Génétique Moléculaire, 28 rue du Docteur Roux, Institut Pasteur, Paris, France

18

19 4. Laboratoire de physiopathologie des infections bactériennes émergentes et nosocomiales,  
20 Faculté de Médecine, Université Louis-Pasteur, 3, rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France

21

22 **\*corresponding author. Mailing address:** Laboratoire de dynamique, évolution et  
23 expression des génomes de microorganismes, FRE 2326, Université Louis-Pasteur,  
24 Strasbourg, France. Phone: (33) 3 90 24 19 97. Fax: (33) 3 90 24 20 28. E-mail:  
25 [lett@gem.u-strasbg.fr](mailto:lett@gem.u-strasbg.fr).

26

27 † These authors contributed equally to this work

## 28 **Summary**

29 The effect of high concentrations of arsenic on *Cenibacterium arsenoxidans*, strain ULPA1,  
30 a  $\beta$ -Proteobacterium, isolated from an arsenic contaminated environment, which is able to  
31 oxidize arsenite to arsenate, has been investigated. The study of this bacteria, for which the  
32 genome is unknown, has been done by combining a proteomic approach with a mutational  
33 analysis. Twenty-two proteins and sixteen genes were identified as differentially expressed in  
34 cells grown in the presence of arsenite. Beside the genes involved in arsenite oxydation (n=2)  
35 or in arsenite efflux (n=1) and proteins responsible for arsenate reduction (n=2), we identified  
36 genes and proteins belonging to various functional classes including information and  
37 regulation pathways, intermediary metabolism, cell envelope and cellular processes. Our  
38 results suggest that the adaptation of *Cenibacterium arsenoxidans* to an arsenic-contaminated  
39 environment is not limited to transformation of arsenic species, but is rather pleiotropic, since  
40 it results in a great variety of biological effects.

41

42 **Keywords:** *Cenibacterium arsenoxidans*,  $\beta$ -Proteobacterium, arsenite-oxidation, arsenic  
43 induced-proteins, arsenic-induced genes, two-dimensional gel electrophoresis, unknown  
44 genome.

## 45 **1 Introduction**

46 Arsenic is widely distributed in many environments, released from both natural and  
47 anthropogenic sources. Arsenic can be trapped in combination with sulfur (e.g. realgar  $\text{As}_4\text{S}_4$ ,  
48 orpiment  $\text{As}_2\text{S}_3$  and arsenopyrite  $\text{FeAsS}$ ). These insoluble forms can be mobilized from the  
49 solid to the aqueous phase by both chemical or biological transformations, including  
50 microbial transformations, favorising the contamination of the aquifers by the two inorganic  
51 forms (As[III] and As[V]), both of which are toxic for living organisms. The presence of  
52 arsenic in drinking water aquifers is critical to the health of millions of people worldwide [1].  
53 Different studies have demonstrated that, due to their impact on speciation and mobilization  
54 of arsenic in the environment, bacteria play a major role in the biogeochemical cycle of this  
55 element [2, 3]. Despite that fact, investigations of the interactions of arsenic with bacterial  
56 cells, have been focused exclusively on the transformation by methylation, reduction or  
57 oxidation (for review see [3, 4]), while the other cellular functions involved in the adaptation  
58 of these microorganisms to toxic concentrations of arsenic remain completely unknown.  
59 Knowledge of regulatory cellular networks controled by arsenic, will provide an extensive  
60 understanding of the mechanisms implicated in the colonization of toxic environments  
61 supported by arsenic cycling.

62 Genome-wide technologies, such as proteome analysis constitute attractive tools to  
63 understand biological processes in a comprehensive manner. However, such approaches have  
64 mainly been used for organisms for which the genome is entirely known, in particular for  
65 model microorganisms and pathogenic bacteria. In contrast this technology has not been  
66 widely used to investigate the physiology of natural isolates. In the present work, we  
67 examined the usefulness of proteome analysis to determine the regulatory cellular network  
68 involved in the adaptation of a bacterium with an unknown genome, to a high concentration  
69 of As. The study was done with the strain ULPASs1, a  $\beta$ -Proteobacterium, isolated from a

70 highly As-contaminated environment [5]. It tolerates 5 mM of As[III] and is able to oxidize it  
71 to As[V], it is multiresistant to heavy metals such as Se[IV], Mn [II], Pb[II], Cr[III], Cd[II],  
72 Sb[III] Ni[II]. To gain insight on the effect of arsenic on bacterial physiology we compared  
73 the proteins profiles of ULPA1 cells grown in presence and in absence of this metalloid.  
74 Identification of arsenic-regulated proteins was done by *de novo* sequencing of tryptic  
75 peptides followed by sequence comparison to data banks. Moreover, this approach was  
76 combined with a mutational analysis in which a collection of mutants obtained by reporter  
77 gene transposition was screened to identify differential gene expression in the presence of  
78 arsenic. A previous study has already led to the identification and sequencing of *aoxA* and  
79 *aoxB*, the genes encoding the two subunits of the arsenite oxidase responsible for the  
80 transformation of As[III] to As[V] [6]. These genes are organised in an operonic structure,  
81 comprising two additional ORFs, *aoxC* and *aoxD*, encoding a putative nitroreductase and a  
82 putative cytochrome c (551/552) respectively.

83 In addition, we completed the phenotypical and genotypical characterization of the bacterium  
84 ULPA1. On the basis of the results gained in the previous work [5] as well as in the present  
85 one, it is proposed that this bacteria represents a new species within a new genus, for which  
86 we propose the name *Cenibacterium arsenoxidans*.

## 87 **2 Materials and Methods**

### 88 **2.1 Bacterial strains and culture conditions**

89 The strain ULPAs1 was previously isolated from industrial activated sludge contaminated  
90 with arsenic and described in [5]. It was cultivated in a chemically defined medium (CDM)  
91 which has been described previously [5]. This strain transforms efficiently arsenite to  
92 arsenate. Cultures were grown in liquid medium in flasks placed on a rotary shaker at 25°C.  
93 Induced cells were obtained by adding a solution of sodium arsenite (NaAsO<sub>2</sub>) to obtain a  
94 final concentration of 2.66 mM As[III]. Mutants induced by arsenic were obtained by random  
95 insertion of a mini-*Tn5* as described previously by Muller *et al.*, 2003 [6].

### 96 **2.2 DNA work**

97 DNA manipulations were carried out according to standard protocols as described by  
98 Sambrook *et al.* [7]. Total DNA of strain ULPAs1 was isolated using the Wizard<sup>®</sup> Genomic  
99 DNA purification kit (Promega). Templates for I-PCR (Inverse-PCR) were prepared as  
100 previously described [6]. DNA flanking the mini-*Tn5* insertion was amplified by PCR with  
101 Taq DNA polymerase (Gibco BRL) with the minitransposon-specific primer 5'-  
102 AGATCTGATCAAGAGACAG-3' (I-end) and 5'-ACTTGTGTATAAGAGTCAG-3' (O-  
103 end) [8].

104 The PCR products were purified and sequenced. The sequencing chemistry used AmpliTaq  
105 FS DNA polymerase and BIGDYE TM terminators (version 1). Sequence reactions were  
106 analyzed with an Applied Biosystems 373XL sequencer. Database searches and sequence  
107 analyses were performed using the BLAST program [9].

### 108 **2.3 DNA-DNA hybridization**

109 DNA extraction and purification were performed as described earlier [10]. DNA  
110 hybridizations between the labelled and the unlabelled DNA were done in 0.42 M NaCl  
111 according to the nuclease trichloroacetic acid method as described previously [10].

112 **2.4 PCR amplification and 16S rRNA sequencing.**

113 16SrDNA fragments were amplified by PCR on DNA extract [10] by using the eubacterial  
114 universal primers specific for 16SrDNA (P8: 5'-AGAGATTTGATCCTGGCTCAG-3' and  
115 Pc1544: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'). The amplified fragments were purified via  
116 phenol extraction and 2-propanol precipitation. Sequencing was performed on 16S rDNA  
117 fragments with the Thermosequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit  
118 (Amersham Life Science) on an A.L.F. DNA Sequencer (Pharmacia Biotech). The sequences  
119 obtained were compared with 16S rDNA sequences itemized in the EMBL-GenBank  
120 database; they were aligned by using the clustal method [11] on a DNASTar software.

121 **2.5 Determination of cellular fatty acids.**

122 The fatty acids analysis has been performed by the Belgian Co-ordinated Collections of  
123 Micro-organisms (BCCM<sup>TM</sup>/LGM, University of Gent, Belgium). Bacteria were grown on  
124 LMG medium 198 (Concentration per Liter: yeast extract, 2.5g; peptone, 2.5g; agar, 15g;  
125 distilled water; pH 7.0-7.4).

126 **2.6 Analytical two-dimensional gel electrophoresis.**

127 Stationary phase cells (100 ml) were harvested by centrifugation. The cell pellets were  
128 washed with MS minimal medium and resuspended in 1 ml of distilled water. After DNase  
129 and RNase treatment, cells were disrupted with a "FP120 FastPrep Cell disruptor" (Bio101)  
130 (two times 30 sec at maximum speed with 1-min intervals on ice). Cell debris was removed  
131 by ultracentrifugation for 60 min at 90 000 g.

132 Isoelectric focusing (IEF) was conducted using the horizontal Multiphor II system  
133 (Pharmacia) at a temperature of 20 °C. For analytical gels, 60 µg of protein were solubilized  
134 in 400 µl of rehydration solution (0.5 % (v/v) Pharmalyte 3-10, 8 M urea, 65 mM DTT, 2 %  
135 (v/v) Nonidet P40), and loaded onto a 18 cm pH 4-7 immobilized pH gradient strip (IPG)  
136 using the in-rehydration technique [12]. For preparative gels, 120 µg of protein were

137 solubilized as mentioned above. For both analytical and preparative gels, focusing was  
138 performed for 3 h at 300 V, 1 h at 750 V, 30 min at 1500 V, 16 h at 2500 V and 2 h at 3500 V  
139 (total = 50 kVh). The IPGs were equilibrated as previously described [13, 14]. The second  
140 dimension was performed with 11.5 % (w/v) SDS-polyacrylamide gels using the Protean II xi  
141 2D Multicell system (Biorad). Proteins were stained with silver nitrate and gels were  
142 digitalized using a JX-330 scanner (Sharp). Digitalized 2-D gel patterns were edited and  
143 matched using the PDQUEST software package (PDI, Humington Station).

144 To account for unspecific variations, a minimum of six gels have been performed for both  
145 conditions (in presence or in absence of arsenite) using two independent protein preparations  
146 extracted from two independent cultures. Protein levels were expressed as percentage volume,  
147 which corresponds to the percentage ratio between the volume of a single spot and the total  
148 volume of all spots present in a gel. The mean values of each spot intensity were calculated on  
149 at least three gels. Spots showing important variations were not considered.

## 150 **2.7 Sample preparation for mass spectrometry analysis**

151 *In-situ* digestion of the gel spots was performed with an automated protein digestion system,  
152 MassPREP Station (Micromass, Manchester, UK). The gel plugs were washed three times  
153 with a mixture of 50%/50%  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ (25 mM)/ACN. The cysteine residues were reduced  
154 with dithiothreitol at 57°C for 30 minutes and alkylated with iodoacetamide at room  
155 temperature for 20 minutes. After dehydration with acetonitrile, the proteins were digested in  
156 gel with 20  $\mu\text{L}$  of 12.5 ng/ $\mu\text{L}$  of modified porcine trypsin (Promega, Madison, WI, USA) in  
157 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  overnight and at room temperature. Then a double extraction was  
158 performed, first with 60% acetonitrile in 5% formic acid and a second extraction with 100%  
159 acetonitrile. The resulting tryptic peptides were analysed by nanoLC-MS/MS.

## 160 **2.8 Mass spectrometry analysis**

161 NanoLC-MS/MS analysis of the tryptic peptides was performed using a CapLC capillary LC

162 system (Micromass, Manchester, UK) coupled to a hybrid quadrupole orthogonal acceleration  
163 time-of-flight tandem mass spectrometer Q-TOF II from Micromass (Manchester, UK).  
164 Chromatographic separations were conducted on a reverse-phase (RP) capillary column  
165 (Pepmap C18, 75 $\mu$ m i.d., 15 cm length, LC Packings) with a flow rate of 200 nL/min  
166 accomplished by a pre-column split. An external calibration was performed using a 2 pmol/ $\mu$ l  
167 GFP solution.

168 Mass data acquisitions were piloted by MassLynx software (Micromass, Manchester, UK)  
169 using automatic switching between MS and MS/MS modes.

## 170 **2.9 Data interpretation and protein identification**

171 In a first step, the complete .pkl files were submitted to protein database searches via a local  
172 Mascot<sup>TM</sup> (MatrixScience, London, UK) server. Searches were done with a mass tolerance of  
173 50 ppm in MS mode and 0.25 Da in MS/MS mode. One missed cleavage per peptide was  
174 allowed and variable modifications were taken into account such as carbamidomethylation of  
175 cysteine, oxidation of methionine, and N-acetylation of the protein. Searches were performed  
176 without constraining protein molecular weight or isoelectric point and without any taxonomic  
177 restriction.

178 In the case of unsuccessful protein identification in the protein databases with Mascot<sup>TM</sup>, the  
179 generated MS/MS spectra were individually *de novo* sequenced in order to deduce a partial or  
180 complete sequence. These interpretations were performed using the PepSeq program  
181 (Micromass) and the PEAKS Studio program (Bioinformatics Solutions, Waterloo, Canada)  
182 able to process a complete .pkl file with automatic *de novo* sequencing on each individual  
183 MS/MS spectrum.

184 The deduced amino acid sequence lists were submitted to the MS-BLAST program  
185 (<http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2/>) provided at the EMBL to perform cross-species  
186 protein identification by sequence homology.

187 **2.10  $\beta$ -galactosidase assays**

188  $\beta$ -galactosidase activity was determined using ortho-nitrophenol  $\beta$ -D-galactopyranoside  
189 (ONPG) essentially as described by Miller [15]. After 48h of ULPAs1 mutants culture in  
190 CDM, the medium was supplemented with 0.66 mM As[III] and cultures were grown for an  
191 additionnal 4h. Whereas the cultures containing the metal solution ceased growth, the OD of  
192 the control cultures without metals increased, but remained in the recommended range of 0.3-  
193 0.9 [15].

194 **2.11 Quantitative analysis of mRNA**

195 RNA was prepared from ULPAs1 cultures grown in 20 ml CDM medium to exponential  
196 phase. Cultures were induced by addition of 0.66 mM (50 ppm) As[III] 15 and 30 min before  
197 extraction. Bacteria were pelleted by centrifugation and total RNA extracted with TRIzol  
198 Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. RNA samples were then  
199 treated with DNase I (Gibco-BRL) and quantified spectrophotometrically at 260 nm.

200 DNA probes, corresponding to part of the coding region in which the Tn5 has inserted, were  
201 generated by PCR amplification with oligonucleotides given in Table 3 and by using the PCR  
202 DIG Probe synthesis kit (ROCHE) according to the manufacturer's instructions.

203 RNA (500 ng or 2 $\mu$ g) was denatured in 300  $\mu$ l of RNA dilution buffer (water, 20 X SSC {1X  
204 SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate}, and formaldehyde in the ratio 5:3:2) at  
205 65°C for 15 min. The 20X SSC solution (3 M NaCl–0.3 M trisodium citrate adjusted to pH 7)  
206 was treated with diethylpyrocarbonate. It was then applied to Hybond N1 nylon filters  
207 (Amersham) with a Biodot SF slot blot applicator (BioRad). The RNAs were fixed on the  
208 membrane by UV irradiation DIG-labeled probe (20  $\mu$ l) was hybridized to the immobilized  
209 RNA at 50°C for 24 h with DIG Easy Hyb buffer (Roche). The membrane was washed two  
210 times with 2X SSC–0.1% sodium dodecyl sulfate at room temperature and then two times  
211 with 0.13 SSC–0.1% sodium dodecyl sulfate at 68°C. The labeled probe was visualized with

212 the CSPD chemiluminescence detection system (Roche) and Hyperfilm-MP X-ray film  
213 (Amersham). The image acquisition was performed with the Geldoc 2000 apparatus  
214 (BIORAD)

215 **2.14 Nucleotide sequence accession number.**

216 Accession number are given in Table 2.

## 217 **3 Results and discussion**

### 218 **3.1 Identification of As-induced proteins and genes**

219 Many investigations have been conducted on the interactions of bacteria with their  
220 environment, but most of them were focused on well-known pathogenic microorganisms, for  
221 which the genome has been already sequenced. Except for strains belonging to the  
222 *Pseudomonas* genus, only a very few studies have been devoted to natural isolates. In the  
223 present work we have investigated the response to arsenic stress of the strain ULPAs1, an  
224 arsenite oxidizing metalloresistant  $\beta$ -Proteobacterium, with an unknown genome, by  
225 combining a proteomic approach and a mutational analysis .

#### 226 **3.1.1 Comparative analysis of 2D protein pattern associated with the presence of** 227 **arsenite.**

228 To evaluate the effect of arsenic stress on the physiology of the strain ULPAs1, we attempted  
229 to identify proteins whose accumulation was altered in the presence of As[III]. For this  
230 purpose, proteome modifications generated by a high concentration of this metalloid were  
231 explored using 2D-electrophoresis. Bacteria were grown in CDM medium to stationary phase  
232 and after cell disruption, proteins were separated on 2D SDS-PAGE gels, silver stained, and  
233 analyzed by mass spectrometry (see Material and Methods). Representative patterns of silver-  
234 stained proteins are shown in Figure 1. The overall profile of total soluble proteins in the  
235 strain ULPAs1 was found to be identical in both growth conditions (Fig. 1a and 1b). Most  
236 proteins were found in the pI and mass region ranging from 5 to 7 and 25 to 175 kDa,  
237 respectively. The accumulation level of several polypeptides was affected (by at least a factor  
238 of two) when As[III] was present in the growth medium. Twenty-two proteins that were up-  
239 regulated or down-regulated were identified on the basis of the sequences specified in Table 1  
240 and about two third of them are similar to proteins of *Ralstonia solanacearum*, a  
241 phylogenetically related bacterium. A relatively good correlation was observed between both

242 theoretical and experimental isoelectric points and molecular weights of the identified  
243 proteins (Table I).

244 Most proteins whose accumulation level was shown to be decreased in the presence of  
245 arsenic, i.e. 7 out of 22, are known to play a role in intermediary metabolism. In particular,  
246 several proteins involved in the metabolism of methionine were shown to be accumulated at a  
247 lower level in the presence of As[III], e.g. proteins similar to an adenosylmonocysteinase  
248 (spots 9 and 11) and a methionine aminopeptidase (spot 3) in *R. solanacearum*, and a 5,10-  
249 methylenetetrahydrofolate reductase (spot 14) in *Chromobacterium violaceum* (Table 1).  
250 Proteins that showed a significantly increased accumulation in bacterial cells subjected to  
251 arsenic stress belong to different functional classes. Some of them showed homology with  
252 proteins involved in translational process, e.g. the elongation factor Tu (spot 5) and the tRNA  
253 synthetases of various aminoacids (spots 4 and 7). Two proteins were similar to proteins  
254 involved in the metabolism of purines and of pyrimidines in *R. solanacearum*, i.e. a  
255 phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase (spot 10) and a dihydroorotase (spot 16),  
256 respectively, and a protein showed homology with a peptidase (spot 2) of the same organism  
257 that may play a role of modulator of gyrase activity. Two proteins involved in the synthesis of  
258 membrane components were also induced in the strain ULPA1 in the presence of arsenic: an  
259 hypothetical protein in *Leptospira interrogans* belonging to the nucleoside-diphosphate-sugar  
260 epimerase family (spot 19) and a D-alanine-D-alanine ligase (spot 20) in *Bordetella pertussis*.  
261 These growth conditions also resulted in the increased accumulation of two proteins showing  
262 homology with arsenate reductases (spots 21 and 22) in *Shigella flexneri* (Table 1).

263

### 264 **3.1.2 Analysis of arsenic-responsive gene fusions.**

265 The collection of about 4000 mutants generated by *lacZ*-containing reporter gene transposon  
266 was screened for differential gene expression in the presence of As[III]. Among the 16

267 different clones showing arsenic-induced expression, two, called M1 and M2, expressed an  
268 arsenite-oxidase minus phenotype (Table 2, group D). Their analysis permitted the  
269 identification of the genes *aoxA* and *aoxB*, coding respectively the small Rieske type subunit  
270 and the large catalytic subunit of the arsenite oxidase [6]. For the other mutants, the  
271 sequencing of the regions flanking the Tn5-derivative led to the identification of 14 putative  
272 proteins, which have been classified in functional groups as defined by Moszer [16]. Results  
273 are presented in Table 2. In mutants M11, M13 and M16 (Group A), the predicted proteins  
274 showed similarities to either *Burkholderia cepacia* (exonuclease R) or *Ralstonia*  
275 *solanacearum* (two transcription regulators) involved in information and regulation pathways.  
276 The ORFs flanking the transposon in M3, M9, M17, M33, M39, (group B) displayed high  
277 similarities with enzymes or coenzymes involved in intermediary metabolism found in  
278 *Bordetella pertussis* (carboxynospemidine decarboxylase), in *Ralstonia solanacearum*  
279 (fumarase and probable FDHD protein), in *Rubrivivax gelatinosus* (NAD(P)H-nitrite  
280 reductase) and in *Ralstonia metallidurans* (UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl] glucosamine N-  
281 acyltransferase) while in M20, M28, M30, M36, (Group C), the putative proteins displayed  
282 similarities with proteins found in the cell membrane and involved in transport in *Erwinia*  
283 *carotovora* (efflux pump Acr3), in bacterial motility in *Ralstonia solanacearum* (flagellar  
284 FLIL transmembrane protein), in membrane structure in *Ralstonia metallidurans*  
285 (hypothetical lipoprotein) or in energetic metabolism or cell division in *Methylobacillus*  
286 *flagellatus* (predicted GTPases and ATPase involved in chromosome partitioning). Group E  
287 (M18) contains one probable protein showing no significant similarities with any protein in  
288 data bases.

289 As shown by the quantitative  $\beta$ -galactosidase assay, all the genes coding for these putative  
290 proteins were significantly induced in presence of 0.66 mM of As[III]. These results were  
291 confirmed by the quantitative analysis of mRNA synthesized in induced and non-induced

292 bacteria. In each functional group one mutant was chosen and total RNA was extracted from  
293 cells grown in the absence (abs) of arsenic or exposed to As[III] for 15 or 30 min.  
294 Hybridization was performed with a probe corresponding to part of the coding region in  
295 which the transposon is inserted. A control was done for each strain with a 16S-rDNA probe.  
296 The synthesis of reporter gene mRNA was significantly up-regulated in each mutant when  
297 exposed to arsenic, while the control remained stable (only one control shown) (Fig.2).

298

### 299 **3.1.3 Biological functions of proteins and genes induced by arsenic**

300 The combination of a mutational analysis and a proteomic approach led to the identification  
301 of 16 genes and 22 proteins which are regulated by arsenic. They were shown to belong to  
302 different functional categories, including information and regulation pathways, intermediary  
303 metabolism, cell envelope and cellular processes, demonstrating that the response of this  
304 bacteria to the toxic metalloid is not limited to changes in arsenic speciation, but that it is  
305 rather pleiotropic, since it results in a great variety of biological effects.

306 Genes and proteins, classified in the intermediary metabolism category (B) are involved in  
307 various metabolic pathways, such as amino acids and protein synthesis, TCA cycle,  
308 carbohydrates and metabolism, suggesting that arsenic affects the general physiology of the  
309 cell, including energetic metabolism. The most dramatic change was found with the  
310 disappearance of the adenylate kinase involved in ATP synthesis (Table 2). This is in  
311 agreement with the observation that arsenic has a negative effect on ATP production in *E. coli*  
312 [17, 18]. However, since the growth of the strain ULPAs1 was not inhibited in the presence of  
313 the arsenic concentration used in the 2D-protein electrophoresis experiment, one can  
314 hypothesize that such depletion of ATP, may be compensate by another mechanism. The  
315 strong stimulation of the succinyl-CoA synthetase may be involved in such a mechanism  
316 since this enzyme catalyses in bacteria the production of ATP.

317 Several proteins and genes involved in the synthesis of the cell envelope components  
318 (category C) were up-regulated, suggesting that both the organisation (lipoproteins,  
319 peptidoglycan and LPS) as well as the functioning (transport and mobility) of the bacteria  
320 may be changed in cells grown in the presence of arsenite. In particular, we observed the up-  
321 regulation of a putative gene coding an arsenite efflux pump (*acr3*). This is consistent with  
322 the modifications involved in the adaptation of cells to an arsenic-rich toxic environment. In  
323 addition, different proteins and genes involved in arsenic transformations were also detected  
324 (category D). Mutagenesis approach led to the identification of *aoxA* and *aoxB* genes,  
325 involved in synthesis of the small Rieske subunit and of the large catalytic subunit,  
326 respectively, of the arsenite oxidase [6]. The identification of arsenic-regulated proteins  
327 indicated that the strain ULPAs1 is harboring two *arsC* genes, encoding arsenate reductase,  
328 the expression of which was strongly induced by the presence of arsenite in the medium.  
329 These two functional *arsC* genes are probably the indicators of the presence at least one *ars*  
330 operon in the genome of this strain. On the other hand, the fact that *aox* knock-out mutants  
331 still display resistance to arsenic, can also be connected to the occurrence inside ULPAs1 of  
332 one or two *ars* operon(s) that also include an efficient arsenite efflux pump. The *acr3* gene,  
333 mentioned previously, may belong to such an operon.

334 Arsenic has been shown to induce DNA damage in eucaryotic cells. Studies based on the  
335 analyses of cultured cell lines, animal models or on clinical studies have shown that this toxic  
336 metalloid interferes with DNA synthesis and repair, and as a consequence is an efficient agent  
337 for carcinogenesis, teratogenesis as well as mutagenesis [19-22]. A recent study, based on the  
338 incubation of *E. coli* cells with subinhibitory concentration of sodium arsenite [23], described  
339 the effect of arsenic on several apparently unrelated cellular functions, including general  
340 recombination, conjugation, transposition, plasmid stability [23]. A study, using a proteomic  
341 approach, and investigating the interaction of *E. coli* K12 with the cadmium (Cd) showed that

342 the exposure of cells to this toxic metal stimulated the synthesis of proteins some of them  
343 were identified as taking part in the stress regulons (heat-shock, oxygen stress, general stress,  
344 SOS response), in the formation of S-adenosylmethionine, in the synthesis of aminoacids [24,  
345 25] by using a mutagenesis approach, identified, in *P. fluorescens*, a sensor/regulator protein,  
346 the expression of which is regulated by Cd. In the case of the strain ULPAs1, while the results  
347 obtained by the mutagenesis approach suggest an impact of arsenic on RNA degradation and  
348 on the regulation of gene expression, the data generated by the proteomic approach show  
349 clearly that arsenic interferes with amino-acids and proteins synthesis (category A).  
350 Moreover, the up-regulation of PmbA (a putative peptide maturation protein) and the fact that  
351 a new isoform of the elongation factor Tu did arise, in response to the presence of arsenic,  
352 indicate that this metalloid may also trigger post-translational modifications (Table 1). This  
353 last results can be connected with the observation made by Wilkins *et al.* [26], showing that  
354 different isoforms of the elongation factor Tu can be differentially expressed in response to a  
355 pH stress.

356

## 357 **3.2 Identification of the strain ULPAs1: characterization of *Cenibacterium arsenoxidans***

### 358 **3.2.1 Cellular fatty acids components.**

359 The cells of ULPAs1 contained the following fatty acids : summed feature 4 (16:1 $\omega$ 7c and/or  
360 15:0 iso 2-OH) (52.7%), 16:0 (20.4%), 10:0 3-OH (8.8%), summed feature 7 (18:1  
361  $\omega$ 7c/ $\omega$ 9t/ $\omega$ 12t and/or 18:1 $\omega$ 9c/ $\omega$ 12t/ $\omega$ 7t and/or 7 18:1 $\omega$ 12c/ $\omega$ 9t/ $\omega$ 7t) (6.6%), 14:0 (5%), 17:0  
362 cyclo (3.3%), summed feature 6 (18:2 $\omega$ 6, 9c and/or 18:0 ante) (1.5%). This pattern showed  
363 similarities with the one found in *Zoogloae ramigera* LGM17136<sup>T</sup>: summed feature 4  
364 (16:1 $\omega$ 7c and/or 15:0 iso 2-OH) (61%), 16:0 (17.6%), 10:0 3-OH (6.7%), summed feature 7  
365 (18:1  $\omega$ 7c/ $\omega$ 9t/ $\omega$ 12t and/or 18:1 $\omega$ 9c/ $\omega$ 12t/ $\omega$ 7t and/or 7 18:1 $\omega$ 12c/ $\omega$ 9t/ $\omega$ 7t) (8.2%), 14:0  
366 (6.6%), 12:0 (3.7%), 12:0 3OH (3.3%), 10:0 (1.1%).

367

### 368 **3.2.2 16S rDNA sequence analysis**

369 The strain ULPAs1 was subjected to a phylogenetic analysis based on its 16S rDNA  
370 sequence. The analysis of 1,455 unambiguous nucleotides positions showed that the strain  
371 belongs to the  $\beta$ -Proteobacteria group and branches deeply with the misidentified strain ND5,  
372 isolated from a soil in Tokyo ([27] (1454 nucleotides/1455). The other nearest phylogenetic  
373 relatives are *Herbaspirillum huttiensis* (96% sequence similarities), *Herbaspirillum*  
374 *rubrisubalbicans* (96%), *Duganella* CTHB-18 (96%), *Paucimonas lemoignii* (95%),  
375 *Zoogloae ramigera* (94%), *Telluria mixta* (93%). On the basis of this phylogenetic position it  
376 is likely that the strain ULPAs1 belongs to a new genus and a new species.

377

### 378 **3.2.3 DNA-DNA hybridization**

379 Because of the very high homology found with the 16S rDNA of the 2 strains ULPAs1 and  
380 ND5, we performed DNA-DNA hybridization involving these two strains. DNA of the strain  
381 ULPAs1 was labelled and hybridized with unlabelled DNA of strain ND5. Hybridization was  
382 less than 11%, showing that these two strains correspond to different species, despite the high  
383 homology found in the 16S rDNA.

### 384 **3.2.4 Identification of the strain ULPAs1**

385 Strain ULPAs1 exhibited phenotypic characteristics similar to that of  $\beta$ -Proteobacteria.  
386 Briefly, cells are motile incurved short rods, Gram-negative. The strain is oxidase (weak) and  
387 catalase positive. It reduces nitrate to nitrite. It is devoided of arginine dihydrolase,  $\beta$ -  
388 galactosidase, and urease. It does not produce indole from tryptophan and does hydrolyse nor  
389 gelatin nor esculin. It does not assimilate glucose, sucrose, arabinose, mannose, mannitol, N-  
390 acetyl-glucosamine, maltose, gluconate, caprate, adipate, citrate, malate, phenyl-acetate,  
391 ethanol and methanol. The only carbone source which supported cultures was Na lactate,  
392 acetate and peptone [5]. It is oxidase-positive and reduces nitrate to nitrite. It does not

393 produce indole from tryptophan, neither does it hydrolyse esculin nor gelatin. It does not  
394 harbor arginine dihydrolase, urease and  $\beta$ -galactosidase. The absence of assimilation of either  
395 sugars (glucose, arabinose, mannose, mannitol, N-acetyl-glucosamine, maltose, gluconate,  
396 caprate and adipate) or of substrates like citrate, malate and phenyl-acetate excludes the  
397 identification as *Pseudomonas* or as *Alcaligenes*. The cellular fatty acids of the strain ULPAs1  
398 showed similarities with *Zoogloae ramigera*, suggesting a high relatedness between these two  
399 bacteria. However these results were invalidated by genetic analysis.

400 Phylogenetic investigations based on 16S rDNA 1,455 nucleotides sequence showed that the  
401 strain belongs to the  $\beta$ -Proteobacteria group and exhibits a 99,9% similarity (1,454  
402 nucleotides/1,455) with the misidentified strain ND5, isolated from a soil in Tokyo [27]. All  
403 the other phylogenetic relatives, *Herbaspirillum huttiensis*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*,  
404 *Duganella*, *Paucimonas lemoignii*, *Zoogloae ramigera*, *Telluria mixta*, *Ralstonia*  
405 *solanacearum*, showed similarities between 96 and 93%, suggesting that strain ULPAs1  
406 belongs to a different genus. Data obtained by whole-DNA hybridization of the two strains  
407 ND5 and ULPAs1 showed less than 11% relatedness to each other, excluding the fact that  
408 they belong to the same species. Moreover, the strain ND5 has been described as an  
409 ultramicrobacterium, the size of the cells being around 0.5  $\mu\text{m}$  in length, and 0.1-0.2  $\mu\text{m}$  wide.  
410 This is quite different from the size of *Cenibacterium arsenoxidans* (1-2  $\mu\text{m}$  length and 0.5-  
411 0.7  $\mu\text{m}$  wide). All these results suggest that ULPAs1 belongs to a new species and a new  
412 genus. We propose the name of *Cenibacterium arsenoxidans*.

413

## 414 **5 References**

415

- 416 1. Smith, A.H., et al., *Public health. Arsenic epidemiology and drinking water standards*.  
417 *Science*, 2002. **296**(5576): p. 2145-2146.

- 418 2. Newman, D.K. and J.F. Banfield, *Geomicrobiology: how molecular-scale interactions*  
419 *underpin biogeochemical systems*. Science, 2002. **296**(5570): p. 1071-1077.
- 420 3. Oremland, R.S. and J.F. Stolz, *The ecology of arsenic*. Science, 2003. **300**(5621): p.  
421 939-944.
- 422 4. Mukhopadhyay, R., et al., *Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes*.  
423 FEMS Microbiol Rev, 2002. **26**(3): p. 311-325.
- 424 5. Weeger, W., et al., *Oxidation of arsenite to arsenate by a bacterium isolated from an*  
425 *aquatic environment*. Biometals, 1999. **12**(2): p. 141-149.
- 426 6. Muller, D., et al., *Arsenite oxidase aox genes from a metal-resistant  $\beta$ -*  
427 *proteobacterium*. J Bacteriol, 2003. **185**(1): p. 135-141.
- 428 7. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, eds. *Molecular cloning : a laboratory*  
429 *manual*. 2nd ed., ed. C.S.H.L. Press. 1989: Cold Spring Harbor, N.Y.
- 430 8. de Lorenzo, V., et al., *Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis,*  
431 *promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative*  
432 *eubacteria*. J Bacteriol, 1990. **172**(11): p. 6568-6572.
- 433 9. Altschul, S.F., et al., *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein*  
434 *database search programs*. Nucleic Acids Research, 1997. **25**(17): p. 3389-3402.
- 435 10. Riegel, P. and D. de Briel, Prévost, G., Jehl, F., Monteil, H., *Genomic diversity among*  
436 *Corynebacterium jeikeium strains and comparison with biochemical characteristics*  
437 *and antimicrobial susceptibilities*. J Clin Microbiol, 1994. **32**: p. 1860-1865.
- 438 11. Higgins, D.G. and P.M. Sharp, *CLUSTAL: a package for performing multiple*  
439 *sequence alignment on a microcomputer*. Gene, 1988. **73**(1): p. 237-244.
- 440 12. Rabilloud, T., C. Valette, and J.J. Lawrence, *Sample application by in-gel rehydration*  
441 *improves the resolution of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH*  
442 *gradients in the first dimension*. Electrophoresis, 1994. **15**(12): p. 1552-1558.
- 443 13. Gorg, A., W. Postel, and S. Gunther, *The current state of two-dimensional*  
444 *electrophoresis with immobilized pH gradients*. Electrophoresis, 1988. **9**(9): p. 531-  
445 546.
- 446 14. Gorg, A., et al., *Approach to stationary two-dimensional pattern: influence of focusing*  
447 *time and immobiline/carrier ampholytes concentrations*. Electrophoresis, 1988. **9**(1):  
448 p. 37-46.
- 449 15. Miller, J.H., *A Short Course in Bacterial Genetics*. 1992, New York: Cold Spring  
450 Laboratory Press.

- 451 16. Moszer, I., *The complete genome of Bacillus subtilis: from sequence annotation to*  
452 *data management and analysis*. FEBS Letters, 1998. **430**(1-2): p. 28-36.
- 453 17. Crane, R.K. and F. Lipmann, *The effect of arsenate on aerobic phosphorylation*. J Biol  
454 Chem, 1953. **201**(1): p. 235-243.
- 455 18. Fong, K., F. Lee, and R. Bockrath, *Effects of sodium arsenite on single-strand DNA*  
456 *break formation and post-replication repair in E. coli following UV irradiation*. Mutat  
457 Res, 1980. **70**(2): p. 151-156.
- 458 19. Wang, Z., G. Hou, and T.G. Rossman, *Induction of arsenite tolerance and*  
459 *thermotolerance by arsenite occur by different mechanisms*. Environ Health Perspect,  
460 1994. **102**(Suppl 3): p. 97-100.
- 461 20. Wang, T.S., et al., *Arsenite induces oxidative DNA adducts and DNA-protein cross-*  
462 *links in mammalian cells*. Free Rad Biol Med, 2001. **31**(3): p. 321-330.
- 463 21. Bates, M.N., A.H. Smith, and C. Hopenhayn-Rich, *Arsenic ingestion and internal*  
464 *cancers: a review*. Am J Epidemiol, 1992. **135**(5): p. 462-476.
- 465 22. Smith, A.H., et al., *Cancer risks from arsenic in drinking water*. Environmental Health  
466 Perspectives, 1992. **97**: p. 259-267.
- 467 23. Gualco, L., et al., *Pleiotropic effect of sodium arsenite on Escherichia coli*. Research  
468 in Microbiology, 2004. **155**(4): p. 275-282.
- 469 24. Ferianc, P., A. Farewell, and T. Nystrom, *The cadmium-stress stimulon of Escherichia*  
470 *coli K-12*. Microbiology, 1998. **144**(Pt 4): p. 1045-1050.
- 471 25. Rossbach, S., et al., *Cadmium-regulated gene fusions in Pseudomonas fluorescens*.  
472 Environ Microbiol, 2000. **2**(4): p. 373-382.
- 473 26. Wilkins, J. and K. Homer, Beighton, D, *Analysis of Streptococcus mutans proteins*  
474 *modulated by culture under acidic conditions*. Appl Env Microbiol, 2002. **68**(5): p.  
475 2382-2390.
- 476 27. Iizuka, T. and S. Yamanaka, Nishiyama, T, Hiraishi, A, *Isolation and phylogenetic*  
477 *analysis of aerobic copiotrophic ultramicrobacteria from urban soil*. J Gen Appl  
478 Microbiol, 1998. **44**(1): p. 75-84.
- 479  
480

**Table I.** Identification of *C. arsenoxidans* arsenic regulated proteins

<b>a.</b>					
N° spot on 2-DE	No arsenic (-)*	Arsenic (+)*	Ratio +/-	MW (kDa) / pI (theor.)	MW (kDa) / pI (exper.)
A. Information and regulation pathways					
1	2845	6352	2,27	23772 / 4,92	23550 / 5,39
2	577	1225	2,12	49360 / 5,69	47110 / 6,19
3	717	167	0,23	29815 / 5,91	31300 / 5,84
4	545	1177	2,17	47708 / 4,98	50130 / 5,33
5	abs	8946	>1000	43167 / 5,43	47260 / 5,35
6	608	1207	1,99	52342 / 5,35	52340 / 5,40
7	abs	1550	>1000	43496 / 5,97	43660 / 5,97
8	4108	2030	0,49	26995 / 5,38	25280 / 5,37
B. Intermediary metabolism					
9	8867	3664	0,41	51949 / 5,78	48710 / 5,52
10	2187	5699	2,63	37151 / 5,22	37960 / 5,26
11	10501	5107	0,48	51949 / 5,78	49200 / 5,59
12	9084	4355	0,48	38218 / 5,42	39140 / 5,55
13	1665	abs	<0,001	23787 / 5,83	26610 / 5,86
14	4819	2229	0,46	30913 / 6,25	28560 / 6,48
15	664	1329	2,04	27214 / 5,01	24100 / 5,00
16	539	1401	2,63	37816 / 6,43	38100 / 6,55
17	abs	1180	>1000	40939 / 5,23	42400 / 5,26
C. Cell envelope and cellular processes					
18	1036	2688	2,63	25894 / 5,91	23360 / 6,31
19	270	1344	4,98	37973 / 7,70	37980 / 6,50
20	617	1499	2,43	33558 / 5,16	38060 / 5,39
D. Other functions					
21	abs	18757	>1000	18826 / 5,95	17980 / 5,99
22	abs	8640	>1000	18826 / 5,95	17870 / 5,43

**b.**

N° spot on 2-DE Sequences\*

Organism

Accession  
Number

Function

## A. Information and regulation pathways

1	FLMIEQQIR HVTTLEIEPEL LQELALRK	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Q8Y1J3	Probable protein-L-isoaspartate O-methyltransferase
2	MGQGVNYVTGDYSR IQYPVEEITIAGN TVEAAYNIAR GASGFWVE NSEGASVYA KSTFLLDVTGK LAAPETIG	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Q8Y0U8	Putative PMBA protein
3	AGVTTGELDR LGSEVLDYITPFVK AELTYECM MFILGEEPALAK TAEDIEGMR	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Q8XZJ2	Probable methionine aminopeptidase protein
4	SGAAYAVIIGED LELNSLGNAEER GIGAVTDIVEK NPAMQEMVGGA TPIVEPTALFAR LWDDLGL	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Q8Y029	Histidyl-tRNA synthetase
5	LLDQGGQAGDNVGVLLR FLLPVEDVFSISGR TQVTTCTGVEMFR ALDSYIPTPER FPGDDLPIIK LTAAIATVLS TTLTAAIA IIVFLNK EHILLAR	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Q8XGZ0	Elongation factor Tu

6	<p>NYFYDLPK          TPILLELVTEPDNR          CDGNMQEGSFR          EIDAAPVSAAQLAVLLHR          NYFYDLPK          FMEDAINYEVR          SAAEAVAYAK          QIELIEDGGR          IIDDVLAANTK</p>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Q8Y3C6	Aspartyl/glutamyl-tRNA (Asn/Gln) amidotransferase subunit B
7	<p>LSGAPIGIGQLLK          VLLAQEIVAR          VEAGTVVVQVGK          IDGAVISDK          GGTDQK          NLLVGR</p>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Q8Y240	Probable tyrosyl-tRNA synthetase protein
8	<p>LLTFMMEDPR          MLHDALDAFAR          KYDMDLETIR</p>	<i>Nitrosomonas europaea</i>	Q82TX5	Hypothetical protein PhoU
B. Intermediary metabolism				
9	<p>GVTEETTTGVHR          SKFDNLYGCR          ESLVDGIKR          ATDVMIAGK</p>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Q8Y387	Adenosylhomocysteinase
10	<p>EVDAGDALVEAIRKPKFAK          NCGIGMTVIV          LNADFHG          PVLVSGTDRGTK</p>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Q8XW52	Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase
11	<p>ESLVDGIK          ATDVMIAGK          ESLVDGIKR          FDNLYGCGR          IAETEMPGLMAIR          VAVLAGYGDVGK          TEETTTGVHR</p>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Q8Y387	Adenosylhomocysteinase
12	<p>ELTGDLYFGQPR          TPAAITGGLELGVGR</p>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Q8XXX5	3-isopropylmalate dehydrogenase

13	GYWIDAASTLR DLPLAEIESIIR VGLVGWR MDEGGLVSDDLIIGLV LILLGAPGAGK AGTPLGLAAK VTGEELLQR	<i>Bordetella pertussis</i>	P39068	Adenylate kinase
14	FSDMCGAELPR FYNADAYFR AFGLDVVTD SAGHDAAPHLSC SLEFFPPK SYNDDTDSIR DDLASYVR	<i>Chromobacterium violaceum</i>	AE016913	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase
15	AVLAASLFHYGQHTVQEAK GAGEILLTSMR IIPCLDVTAGR FMSEQGIAMR IVVAIDAK GVNFLELR TGLDAI	<i>Burkholderia multivorans</i>	Q845U7	Imidazole glycerol phosphate synthase
16	FLGTDSAPHPK YYCLPVLK ALVAAATSG VVFHITTK	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Q8Y249	Dihydroorotase
17	LLIEEGADIK DPAEIEASK FNFDSNALYR	<i>Bordetella pertussis</i>	Q7WKM5	Succinyl-CoA synthetase, beta chain
C. Cell envelope and cellular processes				
18	GCGGGILSESMAR LEWINS LAPLAAK	<i>Ralstonia solanacearum</i>	AL646061	Probable 3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase protein
19	YGNVMASR LYESLVS VVLSTDK FYIGDLR	<i>Leptospira interrogans</i>	Q9S4H0	Hypothetical protein (nucleoside diphosphate sugar epimerase)

20	SLVPMAAK VGVLFGGR YEAVVLVEQFV HGVPTP SLAELAA ALPLVEI	<i>Bordetella pertussis</i>	Q7WFS4	D-alanine--D-alanine ligase
----	---	-----------------------------	--------	-----------------------------

D. Other functions

21	YNVFLCTGNSAR WGFEDPAAATGTDEE SIMAEAMINTMGK	<i>Shigella flexneri</i>	Q7UC02	Hypothetical arsenate reductase
22	SIMSEALIATMG NVFLCTGNSAR	<i>Shigella flexneri</i>	Q7UC02	Hypothetical arsenate reductase

---

482 Peptide sequences obtained by *de novo* sequencing and matching with protein sequences present in databases

484

**Table 2.** Identification of *Cenibacterium arsenoxidans* arsenic induced protein coding genes

name	gene name	putative identification	induction <sup>a</sup>	accession number	%identity (identical amino acids/total amino acids)
<b>A. Information and regulation pathways</b>					
M11	<i>rnr</i>	Exoribonuclease R [ <i>Burkholderia cepacia</i> R18194]	2	AY728030	63% (245/385)
M13		probable transcription regulator protein [ <i>Ralstonia solanacearum</i> ]	3	AY728029	40% (93/229)
M16		probable transcription regulator protein [ <i>Ralstonia solanacearum</i> ]	3	AY728031	51% (139/269)
<b>B. Intermediary metabolism</b>					
M3		carboxynorspermidine decarboxylase [ <i>Bordetella pertussis</i> ]	3	AY728032	68% (251/365)
M9	<i>fumC</i>	Probable fumarate hydratase class II (Fumarase) protein [ <i>Ralstonia solanacearum</i> ]	2	AY728025	58% (153/261)
M33	<i>fdhD</i>	Probable FDHD protein homolog [ <i>Ralstonia solanacearum</i> ]	2	AY728035	64% (175/271)
M39	<i>nirB</i>	NAD(P)H-nitrite reductase [ <i>Rubrivivax gelatinosus</i> PM1]	2,5	AY728037	76% (333/434)
M17		UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl] glucosamine N-acyltransferase [ <i>Ralstonia metallidurans</i> CH34]	3,5	AY728027	62% (52/83)
<b>C. Cell envelope and cellular processes</b>					
M30	<i>acr3</i>	putative membrane protein [ <i>Erwinia carotovora</i> ] Arsenite efflux pump ACR3 and related permeases (Inorganic ion transport and metabolism)	4	AY728034	58% (176/301)
M36	<i>fliL</i>	Probable flagellar FLIL transmembrane protein [ <i>Ralstonia solanacearum</i> ]	3,5	AY728028	50% (33/65)
M31		ATPases involved in chromosome partitioning [ <i>Methylobacillus flagellatus</i> KT]	2,5	AY728036	48% (109/225)
M20		hypotetical lipoprotein [ <i>Ralstonia metallidurans</i> ]	3,5		33% (50/151)
M28		Predicted GTPases [ <i>Methylobacillus flagellatus</i> KT]	2,5	AY728033	66% (184/275)
<b>D. Other functions</b>					
M1	<i>aoxA</i>	arsenite oxidase small subunit		AF509588	published
M2	<i>aoxB</i>	arsenite oxidase catalytic subunit		AF509588	published
<b>E. Similar to unknown proteins</b>					
M18		conserved hypothetical protein [ <i>Pseudomonas syringae</i> ]	3	AY728026	22% (163/711)

a. Functional classification of protein coding gene as referred by Moszer I. 1998 [16]

b. Quantitative enzyme assay-fold induction in the presence of 0.66 mM AsIII

**Table 3** : List of primers which were used in transcription analysis (Slot blot)

Genetic locus (inserted orf)	Primer set	Amplified size (nt)	Primer name and sequence (5'–3')	
M 9	<i>fumC</i>	M9a/M9b	107	M9a AACACCACAATCCCGAGT M9b CAGCATCACGCAGAAACT
M 16		M16a / M16b	345	M16a GGTGTGCATGGAGACAA M16b TACGGAAGCAGTGCTACG
M 18		M17a/M17b	128	M18a TCAGCATCAATGGCATCT M18b ATGGATTTGCTGGTTTC
M 20		M20a/M20b	266	M20a CAGGCGGAATACTGGTTT M20b CCATGTGCATGATGCTTG
M 1	<i>aox</i>	AOXA1/AOXA2	1400	AOXA1 AGCACTCGATCTTTTGCAG AOXA2 CGCTGCAAATGGGATACG
16S RNA	<i>rrn</i>	rD1/fD1	1451	rD1 AAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC fD1 AGAGTTTGATCCTGGCTCAG

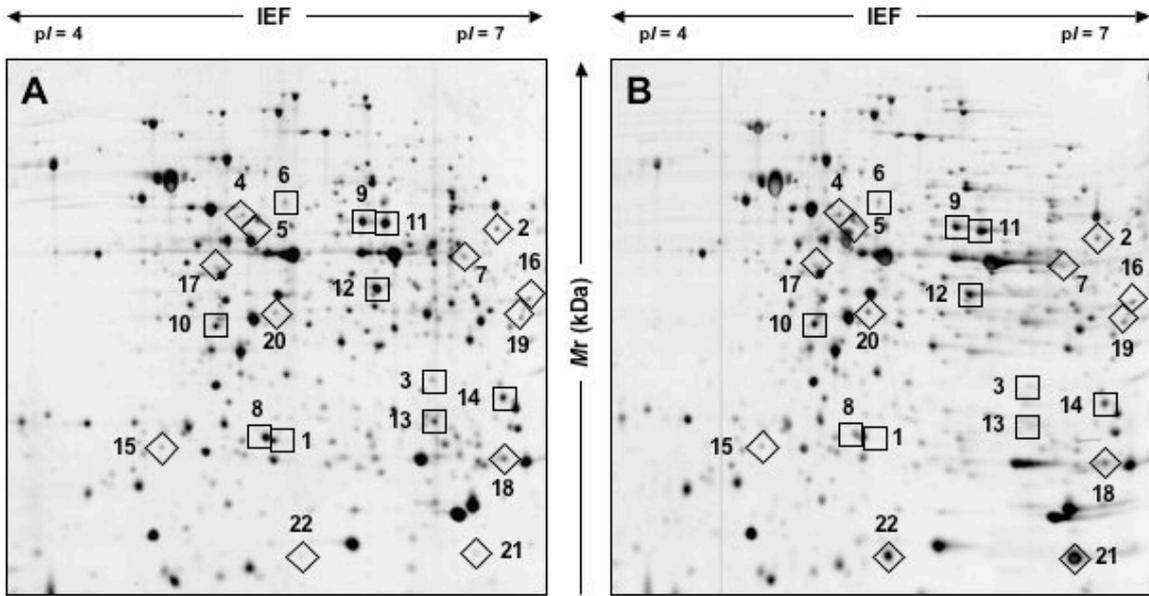


Figure 1

induction time	Slot blot	Intensity rate	Slot blot	Intensity rate	Slot blot	Intensity rate
abs. As		1		1		1
15 min		2		2		3,3
30 min		3		4,4		4,8

Class A M16

Class B M9

Class C M20

induction time	Slot blot	Intensity rate	Slot blot	Intensity rate	Slot blot	Intensity rate
abs. As		1		1		1
15 min		2,5		1,5		1
30 min		2,9		2,5		1

Class D M1

Class E M18

Control *rrn*

Figure 2

## Legends

Fig. 1. Comparison of the protein synthesis patterns of *C. arsenoxidans* in the absence (A) or in the presence (B) of arsenite. Cells were grown in MS medium with or without 2.66 mM of As[III] at 28 °C for 30 h. Proteins were separated in IPG pH 4.7 gels in the first dimension and in 11.5 % (w/v) polyacrylamide gels in the second dimension. After silver staining, proteins induced (□) or repressed (◇) by arsenic stress were submitted to mass spectrometry. Two-dimensional gels were repeated at least three times for each condition.

Fig. 2. Slot blot analysis of mRNAs synthesized in induced and non-induced ULPAs1 wild strain. Total RNA was extracted from cells grown in absence of arsenic (abs As) or exposed to arsenite for 15 or 30 min (0.66 mM). Hybridization was performed with the probe corresponding to part to the coding region in which the transposon is inserted. Probes correspond to genes detected in M16, M9, M20, M1 and M18 respectively. A control was done with a 16S-rDNA probe.

### III. Résultats complémentaires

#### III.1. Les protéines de réparation de l'ADN et de stress

L'arsenic est un mutagène reconnu, et son action directe ou indirecte au niveau de l'ADN fait l'objet de nombreuses études sur les modèles eucaryotes (cf chapitre I). Différents auteurs remarquent que l'arsenic semble inhiber les systèmes de réparation de l'ADN (Basu *et al.*, 2001; Rossman, 1981a; Rossman, 1981b).

Lors d'une nouvelle mutagénèse par transposition aléatoire de Tn5, nous avons isolé de nouveaux mutants dont le gène est induit en présence d'arsénite. Parmi ceux-ci, quatre mutants intervenant dans les mécanismes de réparation de l'ADN et le stress général ont été caractérisés, leur analyse est décrite ici.

##### III.1.1. La caractérisation des mutants

L'analyse des régions adjacentes des mutants 10, 19, 21 et 35 montre que celles-ci présentent de fortes similarités avec les gènes de l'information (réplication, transcription, traduction) (Moszer, 1998) (tableau II.1.).

Chez le mutant 10, la région où s'est inséré le transposon mini Tn5 modifié, présente une très forte similarité avec le gène *rpoE* codant le facteur sigma E (Raina *et al.*, 1995; Rouviere *et al.*, 1995), qui est induit lors de stress au niveau du périplasme (Ades *et al.*, 2003).

Chez le mutant 19, l'insertion du transposon est localisée dans un cadre de lecture (ORF open reading frame) dont la protéine putative est similaire à l'ADN polymérase I de *Ralstonia solanacearum* et *R. metallidurans* (73% d'identité en aminoacides). L'ADN polymérase I est une protéine multidomaine qui possède les activités 5'-3' exonucléase, « proofreading » 3'-5' exonucléase, et l'activité ADN polymérase qui intervient dans les mécanismes de réparation de l'ADN (Friedberg *et al.*, 1995; Joyce *et al.*, 1982). Ces trois domaines sont présents dans la protéine putative dont le gène a été inactivé dans le mutant M10.

Chez le mutant 21, le mini Tn5 est inséré dans un gène qui code pour la protéine RadA (ou Sms), une protéase intervenant dans la réparation de l'ADN dans un processus intermédiaire de la recombinaison (Beam *et al.*, 2002; Song et Sargentini, 1996). La protéine radA est un homologue des protéines de stress RecA et RAD51 des eucaryotes.

Chez le mutant M35, le transposon s'est inséré dans un gène dont le transcrit présente de

fortes homologies avec les protéines de type RecQ, membres de la superfamille II des ADN hélicases. Les protéines RecQ sont des hélicases qui sont impliquées dans les mécanismes de réparation, de réplication et de recombinaison de l'ADN.

### III.1.2. L'expression des gènes

L'augmentation de l'expression de ces gènes est mise en évidence de manière indirecte par le dosage de l'activité des  $\beta$ -galactosidases dont le gène *lacZ* dépourvu de son promoteur s'est inséré en aval du promoteur des gènes étudiés dans ces mutants (tableau II.1.). L'expression des gènes *polA*, *rpoE*, *radA* et *recQ* a été aussi analysée par la quantification des ARN messagers correspondants par la technique du slot blot comme décrit dans le papier soumis à *Proteomics* (voir partie II chapitre III.). Une augmentation de l'expression de chaque gène muté est observée, confirmant les résultats obtenus par mesure de l'activité de  $\beta$ -galactosidase.

**Tableau II.1.** Identification de gènes induits par l'arsenic chez *Cenibacterium arsenoxidans*.

(a) Dosage de l'activité  $\beta$ -galactosidase en présence d'As[III]

mutant	gène	protéine putative	%identité	induction <sup>(a)</sup>
M10	<i>rpoE</i>	RNA polymerase sigma-E factor (SIGMA-24) [ <i>Ralstonia solanacearum</i> ]	63% 146/198	4,9
M19	<i>polA</i>	probable DNA polymerase I [ <i>R. solanacearum</i> ou <i>metallidurans</i> ]	65% 100/152	2,1
M21	<i>radA</i>	Probable ATP-dependent protease, DNA repair protein [ <i>R. solanacearum</i> ]	66% 32/48	8,2
M35	<i>recQ</i>	RecQ Superfamily II DNA helicase [ <i>Burkholderia cepacia</i> R1808]	55% 232/421	2

### III.1.3. Les tests de croissance

Les résultats des courbes de croissance de chaque mutant, cultivé en présence ou en absence de 4 mM As[III] dans le milieu synthétique (ou CDM décrit dans les articles), sont présentés dans le tableau II.2.

Plusieurs observations méritent d'être notées. Dans un premier temps, et en absence d'arsenic, la comparaison des temps de génération de la souche sauvage et de ceux des mutants, montre un net avantage à la souche sauvage. Seuls, M1 et M35 montrent des temps de génération proches de celui de la souche sauvage. Dans un second temps, et en présence d'arsenic, nous observons que le temps de génération de la souche sauvage est identique à celui de cette même

souche, cultivée en absence d'arsenic. Ainsi, la souche se montre insensible à la présence ou à l'absence du métalloïde. Chez les mutants 10, 19, 21, et 35, tous liés à la réparation de l'ADN et au stress en général, la présence d'arsenic dans le milieu s'accompagne d'une croissance très fortement ralentie, à la fois par rapport à leur croissance sur milieu sans arsenic, mais également par rapport à celle de la souche sauvage. Seul M1 adopte un comportement légèrement différent : les temps de génération augmentent mais plus faiblement.

Ces observations permettent de formuler diverses hypothèses. En particulier, la souche sauvage serait susceptible d'utiliser l'énergie « supplémentaire » fournie par l'oxydation de As[III] pour lutter contre le stress arsenic qui la prive d'une part de son énergie. Ainsi, le temps de génération reste identique quelle que soit la condition de culture de la souche sauvage, avec ou sans As[III]. Également intéressante est l'observation des temps de génération du mutant M1. Ce mutant a perdu l'aptitude d'oxyder l' As[III] (vérifié par HPLC-ICP-AES) et les temps de génération entre les deux conditions de milieu sont différents : la présence de As[III] induit l'augmentation légère du temps de génération. L'énergie allouée à la réponse au stress arsenic diminue celle consacrée au développement de la cellule. Cependant, la résistance à As[III] n'est sans doute pas conférée par la seule présence de l'arsénite oxydase car l'écart entre les temps de génération reste faible. À l'appui de cette hypothèse également, les mutants M10, M19, M21 et M35 possèdent une arsénite oxydase toujours fonctionnelle (vérifié par le test au nitrate d'argent) mais des temps de génération très élevés.

**Tableau II.2.** Temps de génération des cultures de *C. arsenoxidans* et des mutants *aoxA*, *rpoE*, *polA*, *radA* et *recQ*. Concentration en As[III] : 4 mM.

Souche	temps de génération (h)	
	MS	MS + AsIII
sauvage	10	9,7
M1 <i>aoxA</i>	10,7	12,4
M10 <i>rpoE</i>	12,2	29,8
M19 <i>polA</i>	12,6	33,4
M21 <i>radA</i>	12,4	24
M35 <i>recQ</i>	10,4	33,8

#### III.1.4. La sensibilité des mutants aux rayons UV

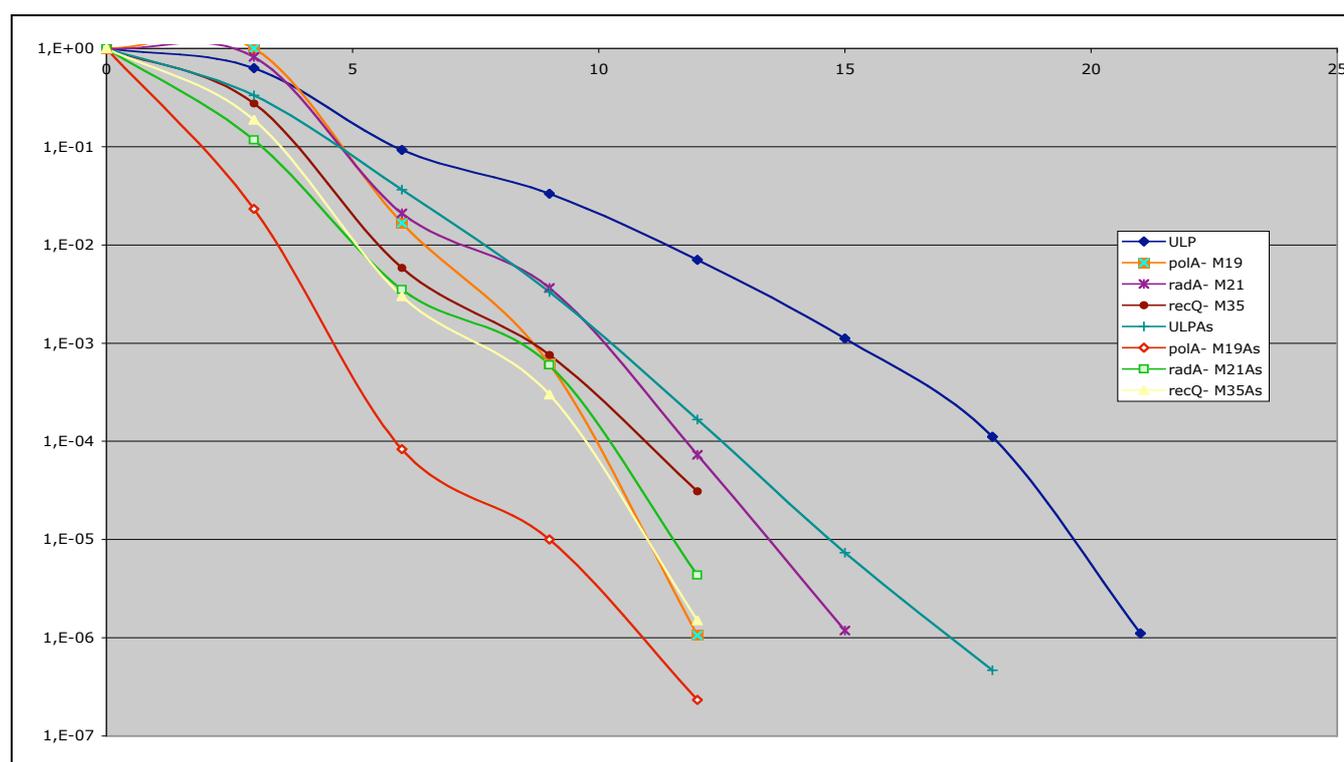
Afin de mettre en évidence l'effet co-mutagène possible de l'arsenic, nous avons soumis les mutants, cultivés en présence ou en absence d'As[III] (0,75 mM) à des expositions aux UV (qui induisent la formation de dimères de pyrimidine). Les résultats sont présentés sur la figure

## II.5.

Cultivés en absence d'arsenic, et comparés à la souche sauvage, les mutants montrent très nettement une plus grande sensibilité aux rayons UV (254 nm). En effet, pour les mutants M19, M21, M35 aucune survie n'est observable après 12 secondes d'exposition aux rayons UV, tandis que la souche sauvage résiste pendant plus de 20 secondes. La présence d'arsenic (0,75 mM As[III]) accroît la sensibilité aux UV des mutants. Il en est de même pour la souche sauvage mais de façon moindre.

Des expériences réalisées avec la mitomycine C, autre agent mutagène (par alkylation), montre les mêmes tendances : la présence de l'arsenic contribue à l'augmentation de la sensibilité des mutants à l'agent mutagène.

Ces observations correspondent à celles de la littérature chez des mutants *polA* (pour exemple voir (Gutman *et al.*, 1994; Kayser *et al.*, 2000; Sweet et Moseley, 1976)) et confirmeraient l'effet co-mutagène de l'arsenic, montré par Rossman *et al.* (1981).



**Figure II.5.** Tests de survie aux UV des mutants et de la souche sauvage cultivés en présence et en absence d'As[III] (concentration 0,75 mM). Légende : ULP (souche sauvage), *polA* M19, *radA* M21 et *recQ* M35 cultivés sans As[III] et ULPAs (souche sauvage), *polA* M19As, *radA* M21As et *recQ* M35As cultivés avec As[III].

## III.2. Discussion

Bien que la majorité des études sur la réponse au stress arsenic ait été réalisée sur les cellules de mammifères (cf. introduction), quelques études réalisées au début des années 80 ont examiné l'effet toxique de l'arsenic sur la bactérie d'*E. coli* (Fong *et al.*, 1980; Rossman, 1981b). Ces études tendent à montrer que l'arsenic diminue la concentration intracellulaire en ATP et inhibe les mécanismes de synthèse et de réparation de l'ADN. Cependant, les expériences réalisées n'autorisent pas, à notre avis, une conclusion aussi catégorique. En effet, après traitement aux UV, les bactéries de *E. coli* sont étalées sur milieu supplémenté ou non avec de l'arsenic, et les auteurs constatent que la survie des bactéries est meilleure dans les conditions sans arsenic. Ils concluent alors que les mécanismes de synthèse et de réparation de l'ADN sont inhibés par l'arsénite de sodium.

Récemment, Gualco *et al.* (2004) ont démontré que l'As[III] induisait la perte de plasmides et augmentait le nombre de recombinaisons lors d'expériences de conjugaison et de transposition (Gualco *et al.*, 2004). Or, nos résultats préliminaires confirment une partie de ces observations en montrant très clairement une augmentation de la transcription de protéines intervenant dans la réplication et la réparation de l'ADN (RadA, PolA et RecQ). La mise en évidence de l'induction des gènes codant ces protéines signifie que l'arsenic pénètre dans la cellule et engendre un stress oxydatif au niveau de l'ADN, comme c'est le cas chez les cellules eucaryotes.

Les différents modes d'action de l'arsenic sont connus ; ce métalloïde présente de grandes affinités pour les groupements thiols, et perturbe la synthèse d'ATP ainsi que les réactions de phosphorylation (Mandal et Suzuki, 2002). Ceci peut expliquer l'induction du facteur  $\sigma^E$  qui est stimulé par un stress membranaire et périplasmique, engendré par l'action de l'arsenic. Le facteur  $\sigma^E$  induit à son tour la cascade du stress général, par l'induction du facteur  $\sigma^H$  qui coordonne le stress cytoplasmique (Raina *et al.*, 1995; Rouviere *et al.*, 1995), dont de nombreux exemples ont déjà été mis en évidence au niveau des cellules eucaryotes (pour revue (Del Razo *et al.*, 2001)). Récemment, il a été montré que l'arsenic induit le système SOS chez *E. coli* (Gualco *et al.*, 2004).

Ces protéines de stress n'ont pas été isolées lors de l'expérience de protéomique. La différence entre les profils d'expression différentielle des protéines et les protéines obtenues par mutagénèse est importante, mais les deux approches permettent de retrouver des membres des grandes catégories fonctionnelles. En outre, les différences peuvent s'expliquer par le traitement de l'échantillon. En effet, les profils protéomiques sont réalisés après 4h de culture en présence

d'As[III], tandis que les expériences d'expression différentielle de l'ARN en slot blot sont réalisées après 15 et 30 min d'induction par As[III]. Aussi, seuls des mutants dont le gène rapporteur est exprimé en présence d'arsenic ont été isolés, excluant tous les gènes qui sont réprimés en présence d'arsenic. La variation des résultats s'explique aussi par la limite de détection des deux méthodes. Par exemple, lors de la mutagenèse par transposition aléatoire, les insertions dans les gènes essentiels seront létales et donc non-sélectionnables, de même la technique d'extraction des protéines n'a permis d'isoler que des protéines périplasmiques. Ainsi, les gènes de l'arsénite oxydase, codant une protéine périplasmique ne sont identifiés que par la technique de mutagenèse.

#### **IV. Conclusion**

Le fait que tous les mutants obtenus par insertion aléatoire du Tn5 soient capables de croître en présence d'arsenic, signifie que les gènes touchés ne sont pas les seuls à intervenir dans le stress arsenic, et qu'il existe un système complexe capable de palier à l'absence de ces protéines. De nouvelles constructions de mutants par transposition aléatoire ont permis d'en sélectionner de nouveaux, dont le gène rapporteur est toujours induit par l'arsenic. L'analyse génétique de ceux-ci révèle d'autres gènes dont les protéines potentielles interviennent dans la réparation de l'ADN mais aussi dans la cascade de synthèse des flagelles. Nous montrons ainsi qu'une multitude de mécanismes de résistance et de stress, non décrits dans la littérature, sont induits par As[III].

## **Chapitre IV.**

**Acquisition multiple de gènes de résistance à l'arsenic  
chez *Cenibacterium arsenoxidans*  
(Résultats non publiés)**

## I. Introduction

Dans notre premier article (Muller *et al.*, 2003 *Journal of Bacteriology*), nous avons montré que l'arsénite oxydase n'est pas la seule enzyme impliquée dans le mécanisme de résistance à l'arsenic. Les mutants dépourvus d'arsénite oxydase fonctionnelle ne devenant pas extrêmement sensibles à As[III], nous supposons la présence d'autres mécanismes de résistance tels l'imperméabilisation (systèmes Pit et Pst) ou un système d'extrusion (système ArsB).

L'analyse de l'expression différentielle des profils protéiques de la souche en présence et en absence d'As[III] nous a permis de caractériser deux protéines ArsC putatives (arséniatase réductase), suggérant la présence d'un ou de plusieurs loci *ars* qui codent la résistance à As[III] (voir partie II Chapitre III). Le système de résistance à l'arsenic décrit chez les bactéries Gram- et Gram+ est codé par l'opéron *ars*, porté selon les bactéries, soit sur le chromosome, soit sur un plasmide. Il se compose de 3 à 5 gènes (suivant la souche étudiée), mais comporte toujours *arsR*, *arsB*, et *arsC* (Rosen, 1999b).

Lors de cette étude, trois nouveaux opérons *ars*, à la structure inédite, ont été séquencés. Ces trois structures sont phylogénétiquement éloignées, suggérant des acquisitions multiples de gènes de résistance. L'étude de leur expression met en évidence une régulation différente des trois opérons.

## II. Matériels et méthodes

### II.1. Souches, milieux et conditions de culture

#### II.1.1. Souches bactériennes

La souche *C. arsenoxidans* ULPAs1 est une  $\beta$ -protéobactérie qui ne se développe que sur milieux synthétiques pauvres (CDM, Muller *et al.*, 2003), à un optimum de température de 25°C. Elle développe de petites colonies jaune ocre. Son génome est en cours de séquençage au Génoscope (Évry, France).

La souche *E. coli* W3110 est gamma-Protéobactérie, couramment utilisée en laboratoire, et se développant préférentiellement sur milieux riches à un optimum de température de 37°C. Sa croissance est rapide, sa manipulation aisée. Cette souche résiste à l'arsenic (CMI 6,66mM).

La souche *E. coli* AW3110 ( $\Delta$ *ars::cam*) est dérivée de la souche sauvage W3110 par délétion de l'opéron *ars* (Carlin *et al.*, 1995). Cette souche arsenic sensible (CMI 0,16 mM) est

utilisée pour des expériences de complémentation fonctionnelle permettant la sélection de gènes de résistance à l'arsenic.

### **II.1.2. Milieux de cultures**

Les milieux de cultures employés sont le milieu défini pour la souche *C. arsenoxidans* et le milieu Luria-Bertani pour les cultures des souches *E. coli* AW3110 et W3110. La composition des milieux est décrite dans Muller *et al.* 2003.

### **II.1.3. Concentration minimale inhibitrice (CMI)**

Les tests de CMI sont réalisés en suivant la procédure décrite par Lim et Cocksey (Lim et Cooksey, 1993). En bref, une suspension bactérienne est transférée sur des boîtes de culture auxquelles sont additionnées des doses croissantes d'As[V] (0 à 200 mM) ou d'As[III] (0 à 75mM). La CMI correspond à la concentration d'arsenic la plus faible qui inhibe la croissance des souches après trois jours de culture à 25°C.

## **II.2. Techniques d'analyse des protéines et des ARN messagers**

Les techniques employées lors de l'analyse des données de protéomique, tout comme l'analyse de l'expression des ARN messagers ont été décrites dans le matériel et méthode du papier Carapito *et al.* (voir partie II, chapitre III.).

## **II.3. Construction de la banque d'ADN génomique**

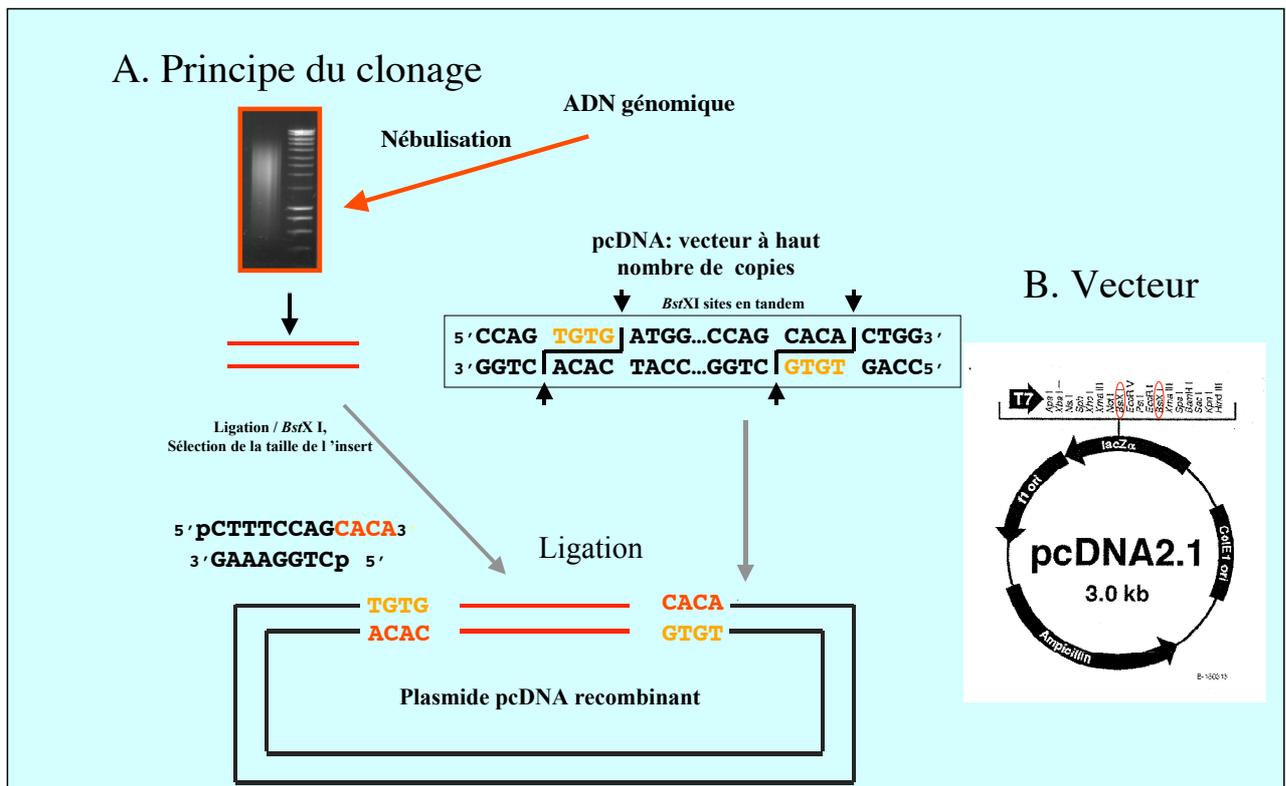
### **II.3.1 Plasmide pcDNA2.1**

Le plasmide pcDNA2.1 : d'une taille de 3 kb, il présente les origines f1 et ColE1, un gène de résistance à l'Ampicilline et un gène *lacZ* pourvu d'une cassette de clonage présentant deux sites de restriction *Bst*X I (figure II.6.B).

### **II.3.2 Établissement d'une banque de plasmides contenant de petits fragments d'ADN génomique (tailles comprises entre 1000 pb et 3000 pb)**

Les banques d'ADN génomique de *C. arsenoxidans* ont été réalisées en utilisant une technique de nébulisation (rupture mécanique) de l'ADN génomique. Pour cette construction, nous avons suivi le protocole décrit dans le papier de Hommais *et al.* 2001 (Hommais *et al.*, 2001). En bref, 20 µg d'ADN dilué dans 2ml de TE (Tris-EDTA) 1mM sont nébulisés pendant 42 secondes. Ensuite, la solution d'ADN est précipitée puis reprise dans 100µL d'H<sub>2</sub>O. Les fragments d'ADN

sont ensuite réparés par la T4 DNA polymérase (Roche) qui incorpore les dNTP. Suite à l'étape de réparation, des adaptateurs *Bstx* (ref N408-18 d'Invitrogen) sont liés par la T4 DNA ligase (Roche) aux extrémités des fragments d'ADN (figure II.6.A). En parallèle, le plasmide pcDNA2.1 a été digéré par l'enzyme de restriction *BstXI*. Les fragments d'ADN sont insérés dans les plasmides par ligation. Afin d'amplifier la banque, des cellules (XL1Blue) sont transformées par électroporation avec les ligations (plasmides contenant les inserts), puis l'on extrait les plasmides à partir de ces cultures sélectionner sur boîtes.



**Figure II.6.** Construction d'une banque d'ADN par la technique de nébulisation. A) Principe du clonage lors d'une construction d'une banque d'ADN génomique. B) plasmide pcDNA2.1.

## II.4. Technique de complémentation

### II.3.1 Culture de cellules compétentes

Un litre de milieu LB estensemencé avec 10 ml d'une préculture de la souche *E. coli* AW3110, puis mis à cultiver à 37°C avec une forte agitation afin d'obtenir une culture en phase exponentielle de croissance. Les cellules sont récoltées par centrifugation (5000rpm, 15 min, 4°C). Le culot cellulaire est repris dans un même volume d'eau ultra pure stérile froide. Ce lavage est renouvelé une fois, puis le culot est lavé par 20 ml d'une solution de glycérol 10% avant d'être repris dans 2 à 3 ml de la même solution.

### **II.3.2 Transformation**

Les cellules compétentes sont placées dans la glace, puis 40 µl de cellules sont mélangées à 2 µl des banques d'intérêt, dans une cuve d'électroporation de 2 mm d'épaisseur. Après une minute dans la glace, les cellules sont soumises à une décharge électrique de 2,5 kV. Immédiatement après le choc électrique, la suspension est diluée par 1 ml de milieu SOC, favorisant la régénération des cellules. Elles sont ensuite transférées dans un tube stérile et laissées à incuber une heure à 37°C. Composition du milieu SOC : 2% Bacto-tryptone ; 0,5% Bacto-extrait de levure ; 10mM NaCl ; 2,5mM KCl ; 10mM MgCl<sub>2</sub> ; 10mM Mg SO<sub>4</sub> ; 20mM glucose.

### **II.3.3 Complémentation**

Pour sélectionner les inserts capables de restaurer la résistance à l'arsenic (par complémentation hétérospécifique) de la souche AW3110, on étale 100 µl de cellules transformées avec les banques sur milieu de culture additionné de 0,75 mM d'As[III]. Après 24 heures à 30°C, seule une dizaine de clones ayant poussé sur milieux de sélection, sontensemencés et cultivés en milieu LB liquide afin de pouvoir extraire leurs plasmides.

## **II.5. Techniques ADN**

### **II.4.1. Extraction des plasmides**

Des cultures des différents clones sélectionnés sont réalisées en milieu LB liquide à 37°C sous agitation durant 48 heures. Les plasmides hébergeant les différents inserts d'intérêt sont extraits au moyen du kit « mimiprep plasmid extraction kit » Qiagen en suivant les instructions du fabricant. La qualité de l'extraction est vérifiée par migration sur gel d'agarose. La visualisation se fait après coloration au bromure d'éthidium BET sous UV.

### **II.4.2. Séquençage**

Le séquençage est réalisé par la plate-forme technique de l'IBMP (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Strasbourg), en utilisant la méthode « Amplitaq FS DNA polymerase using applied biosystems bigdye TM terminators (VERSION 1) », et par analyse sur une machine de type « BIOSYSTEMS 373 XL Sequencer » ABIPRISM.

### **II.4.3. Analyse des séquences**

Le programme DNA Strider est utilisé pour réaliser les assemblages des séquences et construire la carte des ORF dans les six cadres de lecture. Les séquences sont analysées sur le site

du NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>) en utilisant les outils d'alignement BLASTN et BLASTX.

### III. Résultats

#### III.1. Complémentation par une banque d'ADN génomique

Afin de nous permettre de mieux étudier le mécanisme de résistance à l'arsenic, mais aussi de caractériser les gènes *ars* de *Cenibacterium arsenoxidans*, nous avons construit une banque d'ADN génomique de cette bactérie clonée sur des plasmides type pcDNA2.1 (Invitrogen).

Lors de cette expérience, la souche *Escherichia coli* AW3110, dérivée de la souche sauvage W3110 par délétion de l'opéron *ars* (Carlin *et al.*, 1995) est utilisée. Cette souche sensible à l'arsenic (CMI 0,16 mM) est utilisée pour des expériences de complémentation fonctionnelle permettant la sélection de gènes de résistance à l'arsenic.

La transformation de la souche AW 3110 par la banque d'ADN génomique de *C. arsenoxidans* a permis d'obtenir des clones résistants à l'arsenic. Parmi ceux-ci, les clones A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, et C2 ont été repiqués et leurs plasmides extraits. Les inserts hébergés par les plasmides (de taille variant entre 2 et 3 kb) ont été séquencés, révélant trois types de loci *ars* différents. Ces trois loci *ars* ont été nommés arbitrairement *ars*(I), *ars*(II) et *ars*(III). L'organisation de ces loci ont été complétées grâce aux données préliminaires du génome de *C. arsenoxidans* qui est en cours de séquençage au Génoscope (Évry, France <http://www.genoscope.cns.fr/externe/Francais/Projets/>).

Des tests de CMI (concentration minimale inhibitrice) démontrent que les loci *ars*(I), *ars*(II) et *ars*(III) confèrent une résistance à la souche AW3110 supérieure à 6,65 mM As[III] (maximum testé). Cette valeur est supérieure à la CMI de la souche W3110 non délétée de ses gènes *ars* (tableau II.3.).

**Tableau II.3.** Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de différentes souches de la collection réalisées sur milieu solide. Concentration maximale en As[V] : 200 mM. À des concentrations supérieures, As[V] précipite dans le milieu. La CMI de la souche W3110 n'a pas été réalisée avec As[V] (ND).

	<i>Cenibacterium arsenoxidans</i>	<i>E. coli</i> AW3110	<i>E. coli</i> W3110	<i>E. coli</i> AW3110 + <i>ars</i> (I)	<i>E. coli</i> AW3110 + <i>ars</i> (II)	<i>E. coli</i> AW3110 + <i>ars</i> (III)
CMI As[III]	6 mM	0,16 mM	6 mM	>6 mM	>6 mM	>6 mM
CMI As[V]	200 mM	0,75 mM	ND	ND	12 mM	10mM

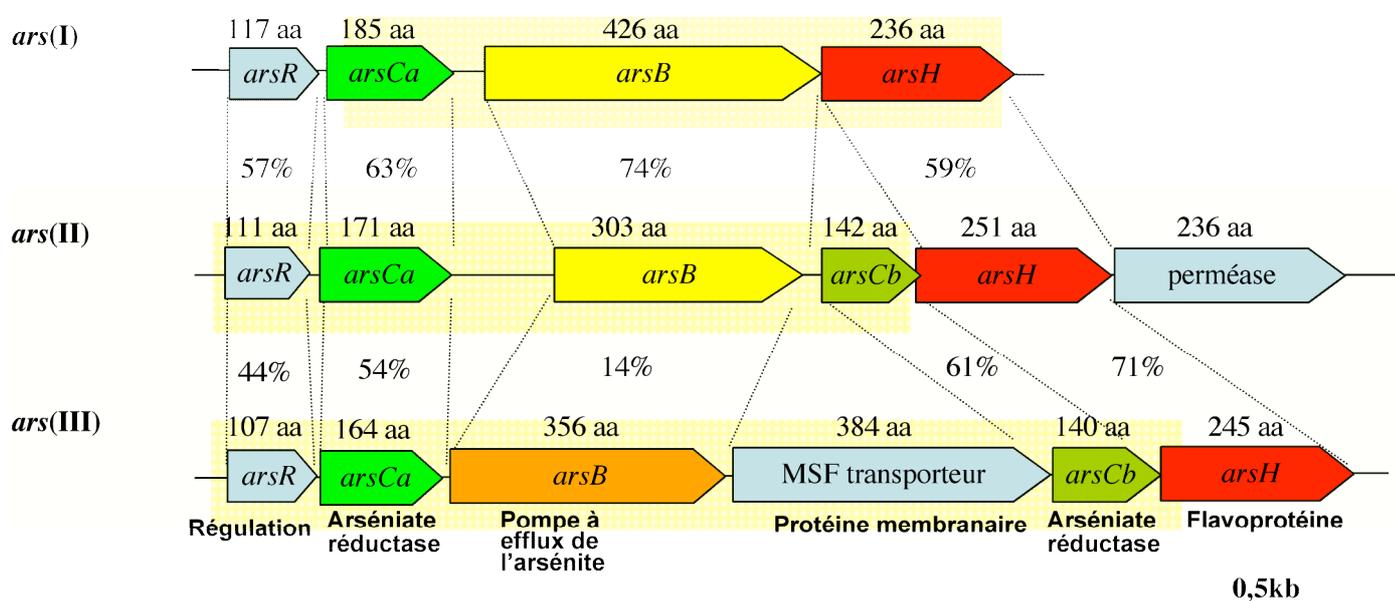
En outre, il semble que les loci *ars*(III) et *ars*(II) confèrent également la résistance à As[V]

chez AW3110, ce qui signifie que les protéines ArsC de ces deux opérons sont fonctionnelles. En revanche, l'opéron *ars(I)* n'a pas encore été testé pour ces phénotypes.

L'analyse bioinformatique de la séquence du locus *ars A1* a montré la présence de six cadres de lecture (ou ORF « open reading frame »). L'analyse par comparaison avec les banques de données en utilisant le logiciel Blast (Altschul *et al.*, 1997) a permis de caractériser un gène *arsR*, un gène *arsC* codant une arséniate réductase du type glutarédoxine, un gène *arsB* du type *acr3* semblable à l'*arsB* de l'élément *skin* de *B. subtilis*, un second gène *arsC* mais du type thiorédoxine, un gène *arsH* et un gène de transporteur de la famille MSF (Major Super Facilitator) (figure II.7.).

Le locus *ars(I)* s'est avéré être le plus petit, n'étant composé que de quatre gènes : un gène *arsR*, un gène *arsB*, un gène *arsH* et un gène *arsC* (figure II.7.).

Le locus *ars(II)* présente cinq gènes : un gène *arsR*, un gène *arsC* du type glutarédoxine, un gène *arsB*, un gène *arsC* du type thiorédoxine et un gène *arsH* (figure II.7.). L'analyse par BlastX et BlastN de ces mêmes séquences, et par BlastP des séquences peptidiques correspondant aux gènes identifiés, montre des similarités avec des gènes trouvés dans des organismes phylogénétiquement proches (d'après l'analyse des ARN 16S) de *C. arsenoxidans* (*Ralstonia metallidurans*).



**Figure II.7.** Représentation schématique des trois loci *ars* présents dans le génome de la souche *C. arsenoxidans*. Outre la structure classique *arsRBC*, les trois loci possèdent le gène *arsH*. Les trois loci codent la protéine ArsCa (type thiorédoxine). Les opérons *ars(II)* et *ars(III)* sont pourvus d'un second gène codant une ArsC de type glutathiorédoxine *arsCb*. Les pourcentages représentent l'identité en aminoacides entre les trois loci.

Les comparaisons des séquences en acides aminés des produits putatifs des gènes *ars* de la

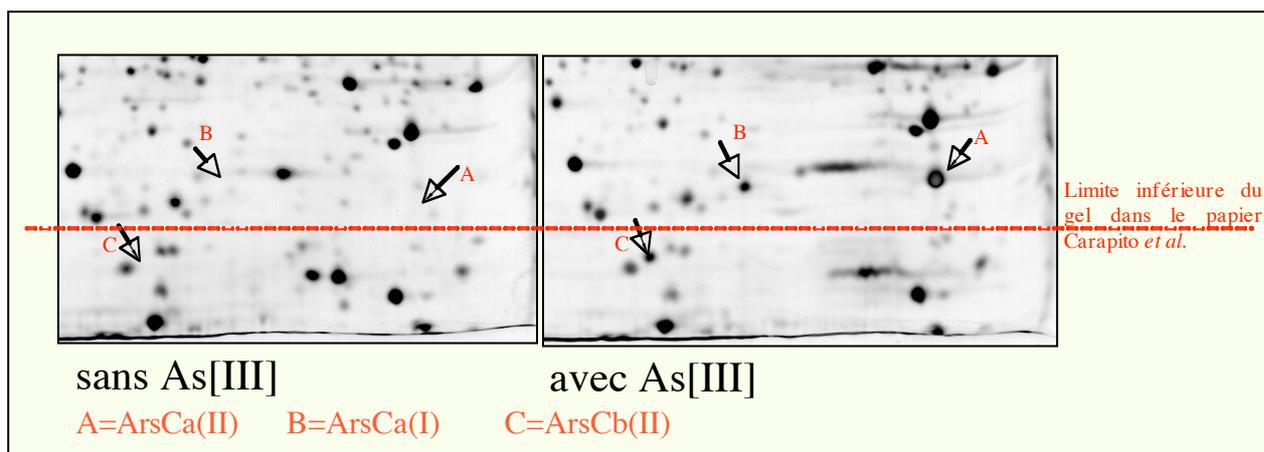
même famille à l'aide de ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) indiquent des pourcentages d'identités en aminoacides peu élevés entre les gènes de la même famille de protéines, suggérant que ces opérons ne sont pas issus de duplications récentes dans le génome de *C. arsenoxidans* (figure II.7.).

L'analyse des séquences protéiques des ArsR putatives des opérons *ars* de *C. arsenoxidans* indique l'absence du motif très conservé ELCV(C/G)D, identifié dans la famille de régulateur SmtB/ArsR comme étant le motif de fixation du métal (Busenlehner *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 1994). L'absence de ce motif a déjà été observé dans l'ArsR de l'opéron *ars* de la bactérie *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Butcher et Rawlings, 2002). Néanmoins, les auteurs ont mis en évidence que cette ArsR est fonctionnelle et régulée par l'arsenic. De plus, des analyses comparatives dans les banques de données démontrent que ce motif caractérisé au niveau de la protéine ArsR d'*E. coli* est absent de régulateurs ArsR potentiels présents dans les génomes séquencés (résultat non montré).

### III.1.1. Analyse protéomique

Lors de l'étude de l'expression différentielle des protéines en gel 2D, 22 protéines ont été caractérisées pour leur synthèse différentielle en présence d'As[III] (voir partie II chapitre III.). Parmi celles-ci, deux protéines synthétisées *de novo* se sont avérées être des arséniate réductases (ArsC). Or, lors du test de complémentation fonctionnelle, trois loci *ars* ont été isolés. Nous avons donc entrepris une étude plus détaillée des protéines de plus faible poids moléculaire, ce qui nous a permis de caractériser une troisième arséniate réductase également synthétisée en présence d'As[III].

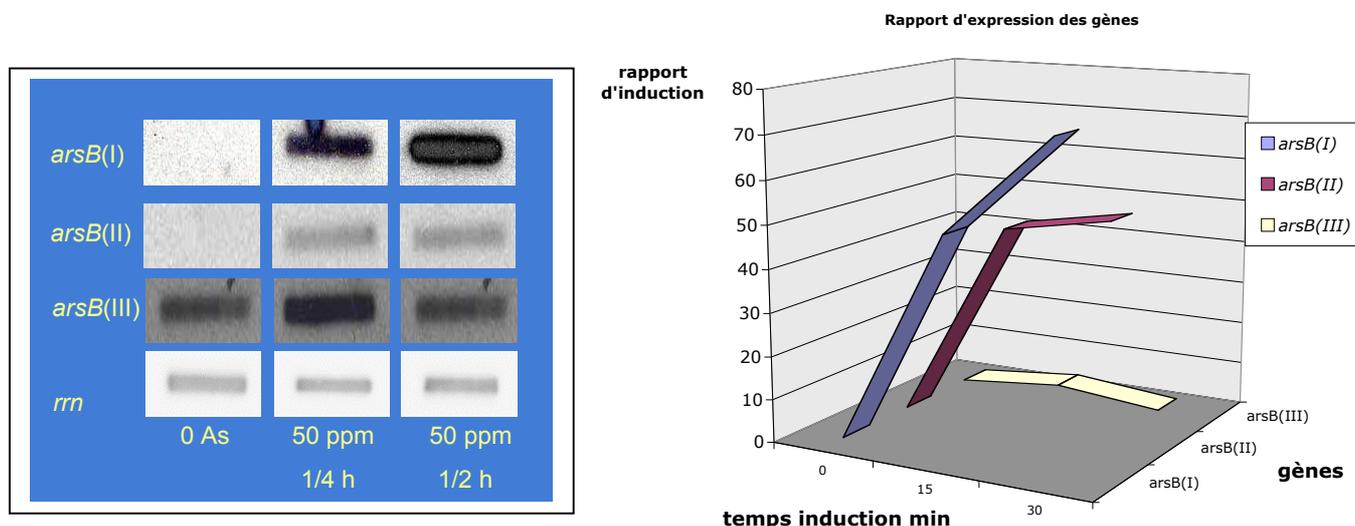
La comparaison des fragments de peptides séquencés par synthèse *de novo*, correspondant à chacune des arséniate réductases, avec les séquences putatives obtenues à partir des gènes obtenus lors des expériences de complémentation, met en évidence que seules les arséniate réductases des loci *ars(I)* et *ars(II)* sont synthétisés de manière différentielle sur les gels de protéines dans les conditions testés lors de notre étude (figure II.8.). En revanche, les deux protéines ArsC du loci *ars(III)* n'ont pas été détectées.



**Figure II.8.** Analyse protéomique de la synthèse différentielle de trois arséniate réductases. Le spot A correspond à la protéine ArsCa du loci *ars(II)*, le spot B à ArsCa de *ars(I)* et le spot C à ArsCb de *ars(III)*. Aucune des protéines ArsC de l'opéron A1 n'a été identifiée.

### III.1.2. Expression différentielle des transcrits

L'analyse de l'expression des transcrits des trois loci *ars* a été réalisée par des expériences d'hybridation à l'aide d'une sonde spécifique à chaque gène *arsB* sur l'ARN total de la souche *C. arsenoxidans*, induite ou non par 0,75 mM As[III] (Carapito *et al.*, voir partie II chapitre III.). Les résultats sont représentés sur la figure II.9.



**Figure II.9.** Expression différentielle des opérons *ars* de la souche *Cenibacterium arsenoxidans*. A) Représentation des résultats d'hybridation des sondes *arsB* sur l'ARN total. B) Représentation schématique de l'expression différentielle des 3 gènes *arsB* (*arsB(I)*, *arsB(II)* et *arsB(III)*). L'expression des *arsB(I)* et *arsB(II)* est fortement induite par 0,75 mM As[III], tandis que l'expression de *arsB(III)* ne semble pas affectée par 0,75 mM As[III].

Ces résultats montrent une expression différentielle importante pour les opérons *ars(I)* et *ars(II)*. En effet, en absence d'arsenic, les transcrits *aoxB* de ces deux opérons ne sont pas détectables, mais après 15 minutes de culture en présence d'As[III], la réponse est importante. Au

contraire, le gène *arsB* du locus *ars(III)* semble être transcrit de manière constitutive à un niveau basal, et ne serait quasiment pas induit par As[III] à la concentration testée (0,75 mM).

Les résultats des expériences d'hybridation ADN-ARN au niveau des transcrits des gènes *arsB*, confirment les observations précédentes de la synthèse différentielle des protéines ArsC. En effet, seuls les opérons *ars(I)* et *ars(II)* sont réellement régulés par l'As[III] dans les deux cas, pour les conditions de laboratoire que nous avons utilisé.

## IV. Discussion

La littérature concernant la résistance des bactéries au métalloïde arsenic, évoque quatre principaux mécanismes pour lutter contre la toxicité de cet élément : la séquestration, la volatilisation l'efflux et le changement d'état d'oxydation. Ainsi, les différents auteurs s'accordent à dire que la principale voie de détoxification bactérienne est liée au système Ars qui code la réduction de As[V] en As[III] et l'extrusion active de l'As[III] (voir point IV de l'introduction, et pour revue (Mukhopadhyay *et al.*, 2002)). Quelques microorganismes seulement possèderaient un système d'oxydation Aox qui confère la résistance à l'arsenic en transformant la forme la plus toxique As[III] en une forme moins toxique As[V]. En effet, les résultats regroupés dans le tableau II.4. permettent de montrer que les microorganismes As[III] oxydantes, isolées au laboratoire, sont résistantes à une concentration de plus de 200 mM en As[V] alors que la résistance à As[III] est beaucoup plus faible (de 6 à 47 mM selon la souche). Ainsi, l'oxydation de As[III] est bien un mécanisme de résistance à la forme la plus toxique. Des résultats analogues ont été obtenus chez une bactérie appartenant au genre *Agrobacterium*, isolée par l'équipe de Salmassi *et al.* (2002) (Salmassi *et al.*, 2002).

**Tableau II.4** Concentration minimale inhibitrice (CMI) de différentes souches de la collection réaliser sur milieu solide. 200mM As(V) est la concentration maximum testée, car au-delà l'As(V) précipite dans le milieu

	<i>Cenibacterium arsenoxidans</i>	bactérie 21 ( $\alpha$ -protéobactérie)	bactérie 22 (genre <i>Ralstonia</i> )	bactérie 43 (genre <i>Pseudomonas</i> )
CMI As(III)	6 mM	40 mM	30 mM	47mM
CMI As(V)	200 mM	200 mM	200 mM	200 mM

La littérature ne rapporte jusqu'à présent que le cas d'un microorganisme, appartenant au genre *Thermus*, capable à la fois d'oxyder et de réduire l'arsenic. Dans ces cas, la réduction est due à une arséniate réductase respiratoire (Gihring et Banfield, 2001).

Macur *et al.* (2004) ont étudié une population bactérienne isolée d'un environnement riche en

arsenic, et ont isolé par des techniques classiques, uniquement des bactéries As[III] oxydantes ou As[V] réductrices (Macur *et al.*, 2004). Néanmoins, dans notre premier article (Muller *et al.*, 2003), nous mettons en évidence que les mutants Aox<sup>-</sup> restent résistants, suggérant ainsi l'existence d'autres mécanismes de résistance tels que la présence d'un locus *ars* dans des souches As[III] oxydantes ou une imperméabilité de la souche à l'arsenic. Seule une étude récente (Santini et vanden Hoven, 2004) a mis en évidence, par Southern et en utilisant le gène *arsC* du plasmide R773 comme sonde, la présence probable d'un gène *arsC* dans l' $\alpha$ -protéobactérie As[III] oxydante NT-26. En revanche, ces mêmes auteurs n'ont pas pu caractériser de protéine similaire à ArsB, la pompe d'extrusion qui est la protéine majeure dans le mécanisme de résistance à l'arsenic.

Or, grâce à notre étude protéomique précédemment décrite, notre travail met en évidence pour la première fois l'induction de la synthèse de 3 protéines ArsC différentes. Par ailleurs, les analyses de nos expériences de complémentations fonctionnelles, nous ont permis de caractériser trois loci *ars* soit *arsI*), *ars(II)*, et *ars(III)*. Chacun de ceux-ci est composé d'un gène codant le répresseur ArsR, d'une pompe à efflux ArsB, du gène *arsH* codant une flavoprotéine et, au minimum, d'un gène codant une arséniate réductase (ArsC). Le dernier gène opéronique *arsH* a été pour la première fois identifié dans l'opéron *ars* de *Yersinia enterocolitica* (Neyt *et al.*, 1997), puis ensuite chez *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Butcher *et al.*, 2000) et chez *Ralstonia metallidurans* (Mergeay *et al.*, 2003). Ce gène est essentiel au fonctionnement de la résistance chez *Y. enterocolitica*, mais aucune autre donnée n'existe dans la littérature sur sa fonction dans l'opéron.

Ces résultats mettent pour la première fois en évidence qu'une souche As[III] oxydante possède, en plus du système d'oxydation un système de réduction ArsC fonctionnel.

Silver *et al.* (2004, GenBank) ont séquencé un fragment de 70 kb contenant les gènes de l'Aox d'*A. faecalis* (numéro d'accèsion AY297781). L'étude de la séquence génétique autour de l'opéron *aox* leur a permis d'identifier un opéron *ars*, en plus des gènes codant des protéines intervenant dans la synthèse de protéines à molybdène, et des gènes de stress. Existerait-il un îlot de résistance à l'arsenic chez *A. faecalis* comme le suggère Simon Silver (communication personnelle) ?

En conclusion, la présence de différents systèmes de résistance à As[III] au sein d'une même souche n'est pas spécifique à *C. arsenoxidans*, et semble même être la règle chez de nombreuses souches As[III] oxydantes. Cependant, aucun homologue de gènes *ars* n'a pu être identifié chez *C. aurantiacus* dont le génome est partiellement séquencé.

### IV1. Acquisition multiple de la résistance à l'arsenic

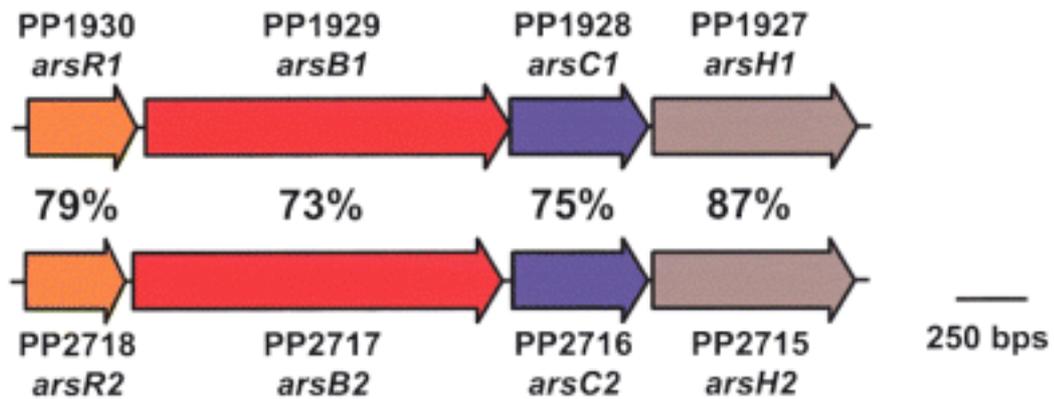
La souche *C. arsenoxidans* héberge au moins trois loci *ars* différents. Nos analyses du protéome et des ARN messagers montrent que ces trois opérons sont régulés de manière différente. Les opérons *ars*(I) et *ars*(II) sont induits en présence d'As[III], tandis que l'opéron *ars*(III), bien qu'exprimé à un niveau basal en absence d'arsenic, ne montre pas de différence d'expression après addition d'arsénite. Ce type d'observation n'a pas encore été mentionné dans la littérature.

Nos résultats préliminaires nous conduisent à émettre les hypothèses suivantes: (i) l'opéron *ars*(III) serait exprimé de manière constitutive pour donner une résistance intrinsèque au métalloïde, puisque la *C. arsenoxidans* est issue d'un environnement riche en arsenic, (ii) chaque opéron pourrait être régulé de manière différente en fonction des conditions physico-chimiques, ou de la présence d'une des formes oxydées. Ces hypothèses vont dans le sens d'une acquisition multiple de gènes *ars*. Toutefois, il reste à les vérifier.

Malgré différentes techniques mises en œuvre (extraction de plasmide, électrophorèse en champs pulsés), la présence d'aucun plasmide n'a été révélée chez *C. arsenoxidans*. En outre, les premières données de séquençage confirment l'absence de tout plasmide, signifiant que les opérons *ars* et l'opéron *aox* sont tous codés par le chromosome bactérien.

La présence de multiples systèmes de résistance *ars* n'est pas rare. En effet, *E. coli* code un opéron chromosomique mais héberge parfois un plasmide (ex. R773) qui code un second opéron (Silver et Phung, 1996). Canovas *et al.* (2003) notent d'une part, que l'opéron *ars* est dupliqué sur le chromosome de *Pseudomonas putida* et d'autre part, que les opérons de *P. putida* conservent la disposition des gènes et un degré d'identité élevé (entre 73% et 87% d'identité en aminoacides figure II.10.) contrairement aux opérons *ars* de *C. arsenoxidans* (Canovas *et al.*, 2003).

Il semble que la caractérisation de trois opérons *ars* hébergé par le chromosome de *C. arsenoxidans* soit unique parmi les données bibliographiques consultées. En revanche, il n'est pas rare de caractériser des structures opéroniques qui portent plusieurs gènes *arsC* dans un même opéron. Ainsi, l'analyse des séquences du génome d'*Azotobacter vinelandi*, de celles de *Burkholderia cepacia* R1808 indique que les deux types d'*arsC* (codant des arséniate réductase du type glutarédoxine et du type thiorédoxine) sont présents sur le même opéron. *R. metallidurans* possède un opéron *ars* putatif qui porterait les gènes *ars* suivant *arsR-ΔarsR-ORF-arsC-arsB/C-arsC-arsH*. Cet opéron coderait en effet trois types d'ArsC potentielles. Cependant, il n'existe aucune étude traitant de leur fonction respective, à savoir si ces trois gènes codent des arséniate réductase fonctionnelles (Mergeay *et al.*, 2003).



**Figure II.10.** Représentation schématique des opérons *ars* chez *Pseudomonas putida* (Canovas *et al.*, 2003). Organisation génétique des gènes *ars*, avec le degré d'identité entre les protéines.

La particularité des opérons *ars* de *C. arsenoxidans* est la suivante : leur organisation génétique, en nombre de gènes et de famille de gènes varient (figure II.7.). Les études phylogénétiques indiquent que les gènes *ars* d'une même famille ne sont pas issus de duplications récentes. Le fait de trouver deux systèmes d'extrusion différents (*ArsB* et *Acr3*) suggère une acquisition multiple des gènes de résistance. En effet, les données actuelles font état d'une évolution convergente pour les protéines *ArsB* et *Acr3*. Le pourcentage d'identité en acides aminés est faible (autour des 14 %) entre les protéines de type *Acr3* et *ArsB* (figures II.7. et II.11.). Des analyses bioinformatiques disponibles sur le site internet de l'Institut Sanger sur la banque de données des familles de protéines (Pfam) dénombrent 248 *ArsC* à glutarédoxine probables <http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/getacc?PF03960>; et 115 protéines du type *ArsB* <http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/getacc?PF02040>. Le site du « Cluster of Orthologous Genes » du centre national de bioinformatique américain dénombre 22 protéines *ArsB* du type *Acr3* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/new/release/cow.cgi?cog=COG0798>. Néanmoins, une analyse rapide des banques de données (Genbank) indique qu'il existe beaucoup plus de protéines *ArsB* type *Acr3*.

L'analyse phylogénétique (figure II.11.) des deux familles *ArsB*, incluant les protéines d'eucaryotes (Champignons) de bactéries et d'archées, met en évidence une certaine corrélation entre la phylogénie basée sur l'ADN 16S et les *ArsB*, en particulier entre procaryotes et eucaryotes. Ainsi, la divergence entre les *ArsB* et les *Acr3* semble remonter avant la dichotomie archées–bactéries. En effet, les deux familles de protéines *ArsB* sont représentées dans les deux domaines suggérant que les gènes de la pompe à As[III] (*ArsB*) ont été présents dans les cellules LUCA ou, au moins, dans les deux domaines procaryotes. Ces données vont dans le sens de l'étude de la phylogénie des gènes *arsC* (Jackson et Dugas, 2003). Ces auteurs suggèrent que des transferts horizontaux de gènes ont pu se produire entre les différents domaines. Brown *et al.* (1997) affirment

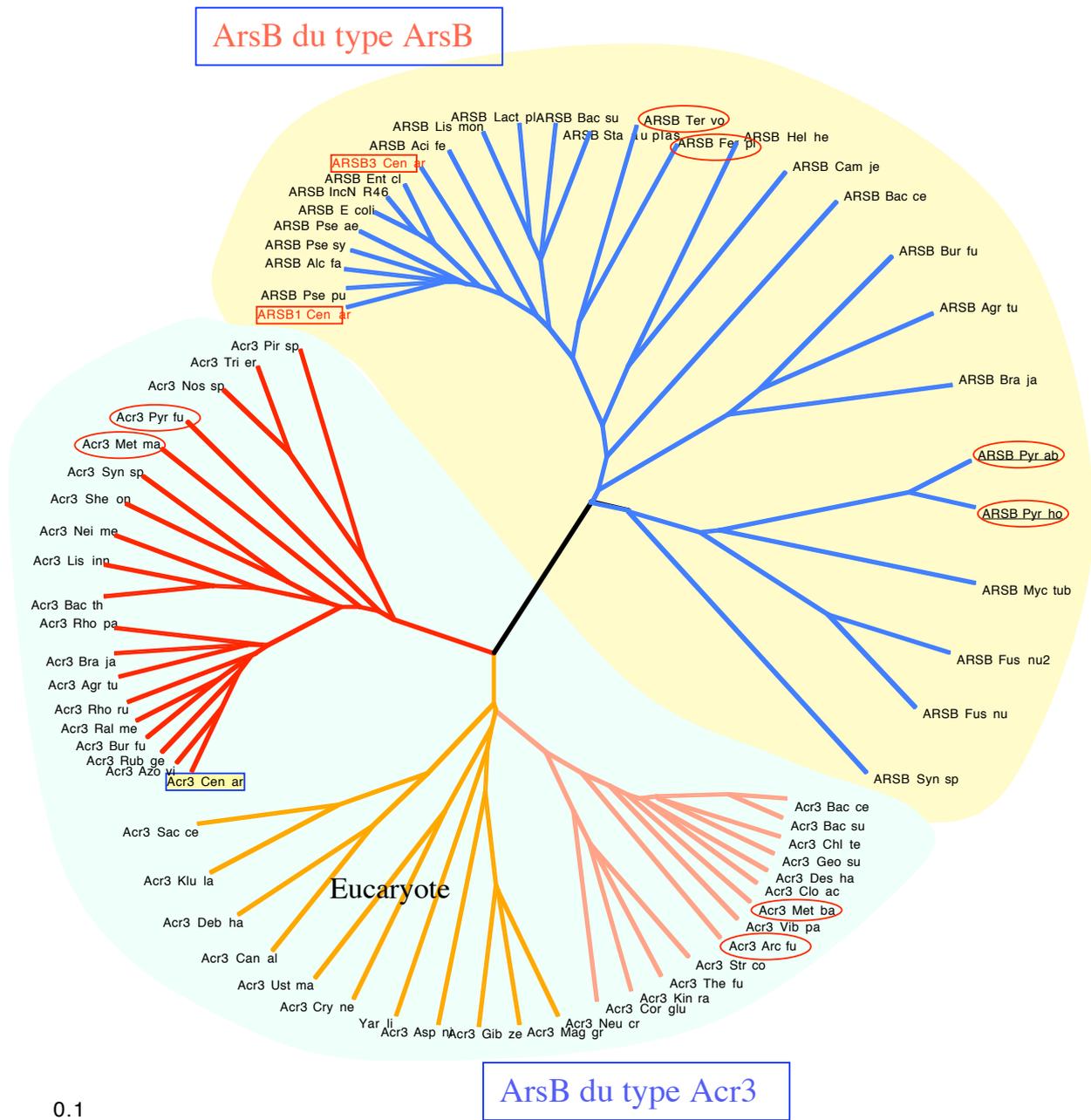
que ces transferts ont eut lieu (Brown et Doolittle, 1997; Brown *et al.*, 2001), rendant ainsi toute théorie sur l'origine d'un gène difficile.

#### IV.2. Le système *ars*, commun à tous les microorganismes?

Cette question est intéressante car actuellement, plus de 318 génomes bactériens et 22 génomes d'archées sont consultables dans les banques de données. Une grande majorité de ces génomes semblent héberger un ou plusieurs opérons *ars*. Des souches issues d'environnements non contaminés par l'arsenic possèdent également les gènes de résistance. Ainsi, au laboratoire, l'étude de souches du genre *Acinetobacter*, *Enterobacter* et *Pseudomonas* (souche Y1000), issues du lac Baïkal, environnement pauvre en arsenic ( $<1 \mu\text{g L}^{-1}$  soit 10 fois moins que la concentration en arsenic total autorisée dans les eaux de consommation ; Bertin, communication personnelle), a permis de caractériser la présence de gène *ars* fonctionnels. Cela tend à conforter l'hypothèse selon laquelle la résistance à l'arsenic est un caractère commun à de nombreuses bactéries, stable dans le génome, même sans pression de sélection. Enfin, la forte similarité de ces gènes de résistance avec ceux d'organismes phylogénétiquement proches, indique que ces régions n'ont pas pu être acquises par des mécanismes de transferts horizontaux, mais bien héritées d'un ancêtre commun, puis conservées.

Néanmoins, certains génomes ne semblent pas posséder les gènes *ars* : c'est le cas notamment de la souche As[III] oxydante *Chloroflexus aurantiacus*, mais également de différentes bactéries lactiques.

Les banques de données révèlent aussi qu'un grand nombre de levures possèdent le système *acr* équivalent du système *ars*.



**Figure II.11.** Arbre phylogénétique des pompes à arsenic type ArsB et Acr3. Toutes les protéines des banques de données ne sont pas représentées, seule une ou deux protéines ont été gardées pour chacune des grandes branches. Cen ar : *Cenibacterium arsenoxidans* ; Pse pu : *Pseudomonas putida* ; Alc fa : *Alcaligenes faecalis* ; Pse sy : *Pseudomonas syringae* ; Pse ae : *Pseudomonas aeruginosa* ; E coli : *Escherichia coli* ; IncN R46 : plasmide IncN R46 ; Ent cl : *Enterobacter cloacae* ; Aci fe : *Acidithiobacillus ferrooxidans* ; Lis mon : *Listeria monocytogenes* ; Lact pl : *Lactobacillus plantarum* ; Bac su : *Bacillus subtilis* ; Sta au plas : *Staphylococcus aureus* plasmide ; Ter vo : *Thermoplasma volcanium* ; Fer pl : *Ferroplasma acidarmanus* ; Hel he : *Helicobacter hepaticus* ; Cam je : *Campylobacter jejuni subsp. jejuni* ; Bac ce : *Bacillus cereus* ; Bur fu : *Burkholderia fungorum* ; Agr tu : *Agrobacterium tumefaciens* ; Bra ja : *Bradyrhizobium japonicum* ; Pyr ab : *Pyrococcus abyssi* ; Pyr ho : *Pyro hori* ; Myc tub : *Mycobacterium tuberculosis* ; Fus nu2 : *Fusobacterium nucleatum.NP* ; Fus nu : *Fusobacterium nucleatum* ; Syn sp : *Synechococcus sp.* ; Bac ce : *Bacillus cereus* ; Bac su : *Bacillus subtilis* ; Chl te : *Chlorobium tepidum* ; Geo su : *Geobacter sulfurreducens* ; Des ha : *Desulfitobacterium hafniense* ; Clo as : *Clostridium acetobutylicum* ; Met ba : *Methanosarcina barkeri str. Fusaro* ; Vib pa : *Vibrio parahaemolyticus* ; Arc fu :

*Archaeoglobus fulgidus* ; Str co : *Streptomyces coelicolor* ; The fu : *Thermobifida fusca* ; Kin ra : *Kineococcus radiotolerans* ; Cor glu : *Corynebacterium glutamicum* ; Neu cr : *Neurospora crassa* ; Mag gr : *Magnaporthe grisea* ; Gib ze : *Gibberella zeae* ; Asp ni : *Aspergillus nidulans* ; Yar li : *Yarrowia lipolytica* ; Cry ne : *Cryptococcus neoformans* ; Ust ma : *Ustilago maydis* ; Can al : *Candida albicans* ; Deb ha : *Debaryomyces hansenii* ; Klu la : *Kluyveromyces lactis* ; Sac ce : *Saccharomyces cerevisiae* ; Azo vi : *Azotobacter vinelandii* ; Rub ge : *Rubrivivax gelatinosus* ; Bur fu : *Burkholderia cepacia* ; Ral me : *Ralstonia metallidurans* ; Rho ru : *Rhodospirillum rubrum* ; Rho pa : *Rhodopseudomonas palustris* ; Bac th : *Bacillus thuringiensis* ; Lis inn : *Listeria innocua* ; Nei me : *Neisseria meningitidis* ; She on : *Shewanella oneidensis* ; Syn sp : *Synechococcus sp.* ; Met ma : *Methanosarcina mazei* ; Pyr fu : *Pyrococcus furiosus* ; Nos sp : *Nostoc punctiform* ; Tri er : *Trichodesmium erythraeum* ; Pir sp : *Pirellula sp.*

## V. Conclusion

Nous avons montré que trois loci *ars* différents étaient présents chez *C. arsenoxidans*. Trois protéines ArsC putatives (arséniate réductase) ont été caractérisées lors de l'étude de l'expression différentielle de protéines. L'isolement des trois loci par complémentation démontre que ces systèmes sont fonctionnels chez *E. coli*. Nous mettons en évidence pour la première fois les deux mécanismes, oxydation et réduction, dans une souche As[III] oxydante (Figure II.12.). L'analyse de l'organisation génétique des loci suggère des acquisitions multiples des différents gènes de résistance.

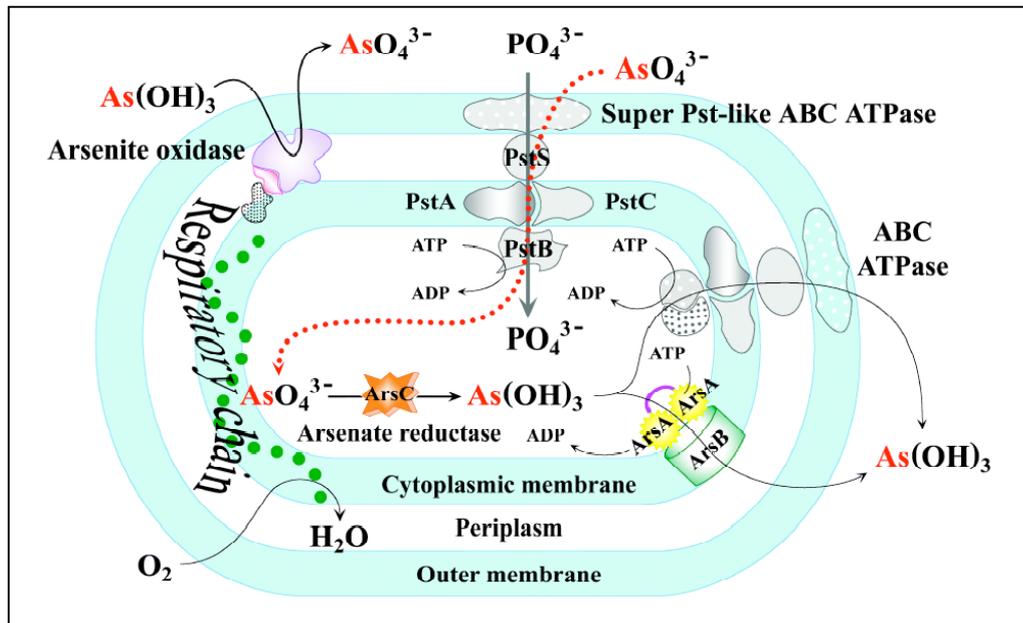


Figure II.12. Métabolisme de l'arsenic dans une cellule , communication personnelle).

**Chapitre V.**  
**Conclusions générales et perspectives**

L'arsenic est un métalloïde ubiquitaire qui entre dans la composition de plus de 200 minéraux de la croûte terrestre. C'est également un poison, connu et utilisé depuis l'Antiquité. Enfin, il devient ces dernières années un polluant environnemental majeur, en particulier des eaux de consommation de nombreux pays, conséquences naturelle (érosion...) et anthropique (industrie diverses...) de sa présence.

Les propriétés de toxicité et de mobilité de ce métalloïde, sont fonction de l'état d'oxydation et de l'espèce chimique sous lesquels il est présent. Les espèces inorganiques As[III] (arsénite) et As[V] (arséniate) sont les formes les plus abondantes mais également les plus toxiques. L'arsenic est un carcinogène et un tératogène reconnu.

De nombreuses études montrent l'importance du rôle des bactéries dans le cycle biogéochimique de l'arsenic. Quantité de microorganismes résistent à la toxicité de ce métalloïde, soit en réduisant l'As[V] intracellulaire en As[III], alors excrété par une pompe (système codé par l'opéron *ars*), soit en oxydant l'As[III] extracellulaire en la forme moins toxique et moins mobile As[V] (rôle de détoxification de l'arsénite-oxydase). Ces deux mécanismes contribuent à la résistance cellulaire au métalloïde.

Les mécanismes de réduction ont été abondamment étudiés, tant du point de vue enzymatique que génétique. En revanche, très peu de littérature, traitant des mécanismes d'oxydation biologique de As[III] ainsi que des mécanismes de stress liés à l'arsenic, existe. Seule, l'arsénite oxydase d'*Alcaligenes faecalis* a été isolée. Son analyse cristallographique a permis de montrer qu'il s'agit d'un hétérodimère composé d'une petite sous-unité à centre [2Fe-2S] de type Rieske et d'une grande sous-unité catalytique à cofacteur molybdoptérine.

Ce travail de thèse s'est fixé pour objectif, l'étude moléculaire et génétique de l'arsénite oxydase d'une  $\beta$ -protéobactérie *Cenibacterium arsenoxidans*. Il a donné lieu aux résultats résumés comme suit :

Le chapitre I de la seconde partie décrit la construction des mutants par transposition aléatoire à l'aide d'un mini Tn5. Pour la première fois, une structure opéronique constituée des

gènes *aoxA* et *aoxB*, codant l'arsénite oxydase de *C. arsenoxidans*, a été caractérisée. L'analyse des séquences génétiques de l'arsénite oxydase montre que tous les motifs de fixation des centres Fe-S et du cofacteur à molybdène sont conservés. La présence d'un peptide signal de type TAT permettant la translocation de protéines matures est présente en amont d'AoxA. Par ailleurs, nous avons identifié deux gènes potentiels, *aoxC* et *aoxD* codant des protéines du métabolisme énergétique. La physiologie des mutants d'insertion construits conduit à s'interroger sur la fonction première de l'enzyme. Son rôle est-il limité à la résistance à l'arsenic ? Nos résultats semblent favoriser l'hypothèse d'une enzyme dont le rôle ne serait justement pas limité à une fonction de résistance : elle pourrait également intervenir dans le métabolisme énergétique ?

Le chapitre II de la seconde partie détaille l'analyse phylogénétique des deux sous-unités de l'arsénite oxydase. Celle-ci révèle que des homologues de ces deux sous-unités existent chez d'autres familles enzymatiques assurant des fonctions diverses ; les sous-unités de type Rieske se retrouvent dans les complexes protéiques cytochrome *b/c*, et la grande sous-unité catalytique à cofacteur molybdoptérine dans la grande famille des DMSO-réductases (formiate déshydrogénase, nitrate réductase, arséniate réductase respiratoire...).

Une question peut dès lors être posée sur l'origine de l'enzyme arsénite oxydase ou, de façon plus générale, de la famille d'enzymes de type arsénite oxydase. Est-elle apparue « récemment » au cours de l'évolution, par association de sous-unités existantes ? ou cette famille est-elle d'une origine extrêmement ancienne ? L'étude des liens phylogénétiques entre ces différentes familles permet de favoriser l'hypothèse suivante : l'énergie récupérée par la bactérie lors de l'oxydation de l'arsénite constitue un avantage sélectif important, plus particulièrement dans les environnements « originels », ainsi, l'apparition précoce d'enzymes de type arsénite oxydase aurait été facilitée.

Le chapitre III de la seconde partie a pour objectif de comprendre la réponse globale des bactéries se trouvant en contact avec l'arsenic. L'étude est basée sur le criblage de la banque des mutants d'insertion (une vingtaine), obtenus au cours de la caractérisation des gènes de l'arsénite oxydase. Seuls, deux mutants ne montrent plus le phénotype d'oxydation de l'As[III] : ceux affectant des gènes *aoxAB*.

Nous avons alors caractérisé les autres mutants, dont le gène rapporteur était induit par l'arsenic, et mené parallèlement une approche protéomique, nous permettant une meilleure

compréhension de la réponse bactérienne au stress arsenic. Ainsi, nous montrons que les gènes régulés par le stress arsenic interviennent dans une variété de fonctions ; l'information (gènes de régulation, réplication de l'ADN...), le métabolisme intermédiaire, la synthèse des membranes bactériennes ou encore la résistance à l'arsenic (gènes *aoxAB* et protéines ArsC). En accord avec les données de la littérature montrant que l'arsenic induit des cassures de l'ADN et dénature les protéines, certains de ces gènes identifiés codent des protéines qui interviennent dans les mécanismes de réparation et de protection de l'ADN (ADN polymérase I, RecQ...). C'est, à notre connaissance, la seule étude globale des effets pléiotropiques de l'As[III] sur une cellule bactérienne.

Par ailleurs, de façon intéressante, nous avons caractérisé deux type de protéines ArsC (arséniate réductase) chez la souche As[III] oxydante *C. arsenoxidans*. Jusqu'à présent, les deux mécanismes n'ont jamais été mis en évidence dans la même souche bactérienne. Cette observation suggère que plusieurs mécanismes de résistance coexistent chez *C. arsenoxidans*. Cette hypothèse est vérifiée par la caractérisation de trois loci *ars* de structure distincte, isolés lors de la transformation de la souche *Escherichia coli* AW3110 sensible à l'arsenic par la banque génomique de *C. arsenoxidans*. L'expression de ces gènes *ars* est confirmée par gel de protéines bidimensionnel ainsi que par une analyse de l'expression des gènes par la technique du slot-blot.

Nous sommes ainsi les premiers à démontrer la présence de systèmes de résistance du type *ars* fonctionnels dans une souche As[III] oxydante.

Les perspectives ouvertes par ce travail sont nombreuses.

À courts et moyens termes, il s'agira de s'attacher à déterminer le système de régulation de l'arsénite oxydase. En outre, le séquençage en cours de la souche *C. arsenoxidans* ainsi que celui de la souche *Thiomonas spp.* (chimolithotrophe, acidotolérante, As[III] oxydante) étudiée par l'équipe de Bonnefoy (Marseille, France) permettra d'appréhender l'implication du métabolisme de l'arsenic dans les processus énergétiques, de résistance et de détoxification, par des approches de génomique comparative, fonctionnelle et structurale.

À plus long terme, l'attention sera portée sur le rôle physiologique de la protéine arsénite-oxydase qu'il faudra préciser (rôle énergétique, réponse aux stress...). Il sera également

intéressant, dans l'optique de la construction de nouveaux outils de biorémediation, d'envisager d'augmenter l'activité catalytique de la protéine par des techniques de mutagenèse dirigée.

## **Références**



1968. Arsenic and cancer. *British Medical Journal* 2: 191.
1999. *Arsenic in Drinking Water*. National Academy Press, Washington DC.
- Abernathy, C. O., Y. P. Liu, D. Longfellow, H. V. Aposhian, B. Beck, B. Fowler, R. Goyer, R. Menzer, T. Rossman, C. Thompson, and L. Waalkes.** 1999. Arsenic: health effects, mechanisms of actions, and research issues. *Environ Health Perspect* 107: 593-597.
- Ades, S. E., I. L. Grigorova, and C. A. Gross.** 2003. Regulation of the Alternative Sigma Factor  $\sigma^E$  during Initiation, Adaptation, and Shutoff of the Extracytoplasmic Heat Shock Response in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 185: 2512-2519.
- Afkar, E., J. Lisak, C. Saltikov, P. Basu, R. S. Oremland, and J. F. Stolz.** 2003. The respiratory arsenate reductase from *Bacillus selenitireducens* strain MLS10. *FEMS Microbiol Lett* 226: 107-112.
- Ahmann, D., A. L. Roberts, L. R. Krumholz, and F. M. Morel.** 1994. Microbe grows by reducing arsenic. *Nature* 371: 750.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nuc Acid Res* 25: 3389-3402.
- Anderson, G. L., P. J. Ellis, P. Kuhn, and R. Hille.** 2002. Oxidation of Arsenite by *Alcaligenes faecalis* in T. F. Williams, Jr., ed. *Environmental Chemistry of arsenic*. Marcel Dekker, Inc, New-York; Basel.
- Anderson, G. L., J. Williams, and R. Hille.** 1992. The purification and characterization of arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis*, a molybdenum-containing hydroxylase. *J Biol Chem* 267: 23674-23682.
- Aposhian, H. V.** 1997. Enzymatic methylation of arsenic species and other new approaches to arsenic toxicity. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 37: 397-419.
- Aposhian, H. V., R. A. Zakharyan, M. D. Avram, M. J. Kopplin, and M. L. Wollenberg.** 2003. Oxidation and detoxification of trivalent arsenic species. *Toxicol Appl Pharmacol* 193: 1-8.
- Aterman, K.** 1999. From Horus the child to Hephaestus who limps: a romp through history. *Am J Med Genet* 83: 53-63.
- Barchowsky, A., E. J. Dudek, M. D. Treadwell, and K. E. Wetterhahn.** 1996. Arsenic induces oxidant stress and NF-kappa B activation in cultured aortic endothelial cells. *Adv Free Radic Biol Med* 21: 783-790.
- Basu, A., J. Mahata, S. Gupta, and A. K. Giri.** 2001. Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: a review. *Mutat Res* 488: 171-194.
- Battaglia-Brunet, F., M. C. Dictor, F. Garrido, C. Crouzet, D. Morin, K. Dekeyser, M. Clarens, and P. Baranger.** 2002. An arsenic[III]-oxidizing bacterial population:

- selection, characterization, and performance in reactors. *J Appl Microbio* 93: 656-667.
- Bau, D.-T., T.-S. Wang, C.-H. Chung, A. S. S. Wang, A. S. S. Wang, and K.-Y. Jan.** 2002. Oxidative DNA adducts and DNA-protein cross-links are the major DNA lesions induced by arsenite. *Environ Health Perspect* 110: 753-756.
- Baymann, F., E. Lebrun, M. Brugna, B. Schoepp-Cothenet, M. T. Giudici-Orticoni, and W. Nitschke.** 2003. The redox protein construction kit: pre-last universal common ancestor evolution of energy-conserving enzymes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358: 267-274.
- Beam, C. E., C. J. Saveson, and S. T. Lovett.** 2002. Role for radA/sms in Recombination Intermediate Processing in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184: 6836-6844.
- Bennett, M. S., Z. Guan, M. Laurberg, and X.-D. Su.** 2001. *Bacillus subtilis* arsenate reductase is structurally and functionally similar to low molecular weight protein tyrosine phosphatases. *PNAS* 98: 13577-13582.
- Bentley, R., and T. G. Chasteen.** 2002. Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony, and bismuth. *Microbiol Mol Biol Rev* 66: 250-271.
- Berks, B. C., S. J. Ferguson, J. W. B. Moir, and D. J. Richardson.** 1995. Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1232: 97-173.
- Bhattacharjee, H., J. Li, M. Y. Ksenzenko, and B. P. Rosen.** 1995. Role of cysteinyl residues in metalloactivation of the oxyanion-translocating ArsA ATPase. *J Biol Chem* 270: 11245-11250.
- Bhattacharjee, H., and B. P. Rosen.** 1996. Spatial proximity of Cys113, Cys172, and Cys422 in the metalloactivation domain of the ArsA ATPase. *J Biol Chem* 271: 24465-24470.
- Bhattacharjee, H., and B. P. Rosen.** 2000. Role of conserved histidine residues in metalloactivation of the ArsA ATPase. *Biometals* 13: 281-288.
- Bhumbla, D., and R. Keefer.** 1994. Arsenic mobilisation and bioavailability in soil. Pages p 51-82 in J. Nriagu, ed. *Arsenic in the Environment, Part I: Cycling and Characterization*. Wiley, New York.
- Bode, A. M., and Z. Dong.** 2002. The paradox of arsenic: molecular mechanisms of cell transformation and chemotherapeutic effects. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 42: 5-24.
- Boyle, R. W.** 1987. *Gold: History and Genesis of Deposits*, New York.
- Broer, S., G. Ji, A. Broer, and S. Silver.** 1993. Arsenic efflux governed by the arsenic resistance determinant of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *J Bacteriol* 175: 3480-3485.
- Brown, J., and W. Doolittle.** 1997. Archaea and the prokaryote-to-eukaryote transition. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 456-502.

- Brown, J., C. Douady, M. Italia, W. Marshall, and M. Stanhope.** 2001. Universal trees based on large combined protein sequence data sets. *Nat Genet* 28: 281-285.
- Bruneel, O., J. C. Personne, C. Casiot, M. Leblanc, F. Elbaz-Poulichet, B. J. Mahler, A. Le Fleche, and P. A. Grimont.** 2003. Mediation of arsenic oxidation by *Thiomonas* sp. in acid-mine drainage (Carnoules, France). *J Appl Microbiol* 95: 492-499.
- Busenlehner, L. S., M. A. Pennella, and D. P. Giedroc.** 2003. The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: structural insights into prokaryotic metal resistance. *FEMS Microbiology Reviews* 27: 131-143.
- Butcher, B. G., S. M. Deane, and D. E. Rawlings.** 2000. The chromosomal arsenic resistance genes of *Thiobacillus ferrooxidans* have an unusual arrangement and confer increased arsenic and antimony resistance to *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 66: 1826-1833.
- Butcher, B. G., and D. E. Rawlings.** 2002. The divergent chromosomal ars operon of *Acidithiobacillus ferrooxidans* is regulated by an atypical ArsR protein. *Microbiology* 148: 3983-3992.
- Canovas, D., I. Cases, and V. de Lorenzo.** 2003. Heavy metal tolerance and metal homeostasis in *Pseudomonas putida* as revealed by complete genome analysis. *Environ Microbiol* 5: 1242-1256.
- Carlin, A., W. Shi, S. Dey, and B. P. Rosen.** 1995. The ars operon of *Escherichia coli* confers arsenical and antimonial resistance. *J Bacteriol* 177: 981-986.
- Cervantes, C., G. Ji, J. L. Ramirez, and S. Silver.** 1994. Resistance to arsenic compounds in microorganisms. *FEMS Microbiol Rev* 15: 355-367.
- Challenger, F.** 1945. Biological methylation. *Chem Rev* 36: 315-362.
- Challenger, F.** 1951. Biological methylation. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* 12: 429-91.
- Chen, C. M., T. K. Misra, S. Silver, and B. P. Rosen.** 1986. Nucleotide sequence of the structural genes for an anion pump. The plasmid-encoded arsenical resistance operon. *J Biol Chem* 261: 15030-15038.
- Chen, C. M., H. L. Mobley, and B. P. Rosen.** 1985. Separate resistances to arsenate and arsenite (antimonate) encoded by the arsenical resistance operon of R factor R773. *J Bacteriol* 161: 758-63.
- Chen, G. Q., X. G. Shi, W. Tang, S. M. Xiong, J. Zhu, X. Cai, Z. G. Han, J. H. Ni, G. Y. Shi, and a. Jia et.** 1997. Use of arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): I. As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> exerts dose-dependent dual effects on APL cells. *Blood* 89: 3345-3353.
- Chen, Y., and B. P. Rosen.** 1997. Metalloregulatory properties of the ArsD repressor. *J Biol Chem* 272: 14257-14262.
- Chen, Y.-C., Y.-L. L. Guo, H.-J. J. Su, Y.-M. Hsueh, T. J. Smith, L. M. Ryan, M.-S. Lee, S.-**

- C. Chao, J. Y.-Y. Lee, and D. C. Christiani.** 2003. Arsenic methylation and skin cancer risk in southwestern Taiwan. *Journal of Occupational and Environmental Medicine / American College of Occupational and Environmental Medicine* 45: 241-248.
- Chen, Y. C., S. Y. Lin-Shiau, and J. K. Lin.** 1998. Involvement of reactive oxygen species and caspase 3 activation in arsenite-induced apoptosis. *J Cell Physiol* 177: 324-333.
- Cole, S. P., K. E. Sparks, K. Fraser, D. W. Loe, C. E. Grant, G. M. Wilson, and R. G. Deeley.** 1994. Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res* 54: 5902-5910.
- Crane, R. K., and F. Lipmann.** 1953. The effect of arsenate on aerobic phosphorylation. *J Biol Chem* 201: 235-243.
- Cullen, W. R., and K. J. Reimer.** 1989. Arsenic speciation in the environment. *Chem Rev* 89: 713-764.
- de Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik, and K. N. Timmis.** 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J Bacteriol* 172: 6568-6572.
- Del Razo, L. M., B. Quintanilla-Vega, E. Brambila-Colombres, E. S. Calderon-Aranda, M. Manno, and A. Albores.** 2001. Stress proteins induced by arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol* 177: 132-148.
- Dey, S., and B. P. Rosen.** 1995. Dual mode of energy coupling by the oxyanion-translocating ArsB protein. *J Bacteriol* 177: 385-389.
- Doonan, R., P. Day, D. Wilson, and N. Dimopoulou.** 2004. Tracing the Footprints of Hephæstus: Evidence for Intentional Arsenic Alloying in Early Third Millenium BC Crete. *Archaeometry 2004, The 34th International Symposium of Archaeometry*, Zaragoza Spain.
- Duquesne, K.** 2004. Rôle des bactéries dans la bioremédiation de l'arsenic dans les eaux acides de drainage de la mine de Carnoulès. Pages 207. Université de la Méditerranée, Marseille.
- Ehrlich, H. L.** 2001. *Bacterial oxidation of As(III) compounds*. Marcel Dekker, New York.
- Ellis, J., A. Carlin, C. Steffes, J. Wu, J. Liu, and B. P. Rosen.** 1995. Topological analysis of the lysine-specific permease of *Escherichia coli*. *Microbiology* 141: 1927-1935.
- Ellis, P. J., T. Conrads, R. Hille, and P. Kuhn.** 2001. Crystal structure of the 100 kDa arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis* in two crystal forms at 1.64 Å and 2.03 Å. *Structure (Camb)* 9: 125-132.
- Fitz, W. J., and W. W. Wenzel.** 2002. Arsenic transformations in the soil-rhizosphere-plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation. *J Biotechnol* 99: 259-278.
- Fleet, M. E., S. L. Chryssoulis, P. J. MacLean, R. Davidson, and G. Weisener.** 1993. Arsenian pyrite from gold deposits: Au and As distribution investigated by SIMS and EP,

- and color staining and surface oxidation by XPS and LIMS. *Canadian Mineralogist* 31: 1–17.
- Fong, K., F. Lee, and R. Bockrath.** 1980. Effects of sodium arsenite on single-strand DNA break formation and post-replication repair in *E. coli* following UV irradiation. *Mutat Res* 70: 151-156.
- Forbes, R.** 1964. *Studies in ancient Technology*. Brill, Leiden.
- Forst, C. V., and K. Schulten.** 2001. Phylogenetic analysis of metabolic pathways. *J Mol Evol* 52: 471-489.
- Friedberg, E. C., G. C. Walker, and W. Siede.** 1995. *DNA repair and mutagenesis*. ASM Press, Washington, D.C.
- Frost, D. V.** 1969. Arsenic and cancer. *The Journal of Allergy* 44: 320.
- Ghosh, M., J. Shen, and B. P. Rosen.** 1999. Pathways of As(III) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS USA* 96: 5001-5006.
- Gihring, T. M., and J. F. Banfield.** 2001. Arsenite oxidation and arsenate respiration by a new *Thermus* isolate. *FEMS Microbiol Lett* 204: 335-340.
- Gihring, T. M., P. L. Bond, S. C. Peters, and J. F. Banfield.** 2003. Arsenic resistance in the archaeon "*Ferroplasma acidarmanus*": new insights into the structure and evolution of the arsgenes. *Extremophiles* 7: 123-130.
- Gihring, T. M., G. K. Druschel, R. B. McCleskey, R. J. Hamers, and J. F. Banfield.** 2001. Rapid arsenite oxidation by *Thermus aquaticus* and *Thermus thermophilus*: field and laboratory investigations. *Environ Sci Technol* 35: 3857-3862.
- Gladysheva, T. B., K. L. Oden, and B. P. Rosen.** 1994. Properties of the arsenate reductase of plasmid R773. *Biochemistry* 33: 7288-7293.
- Goessler, W., and D. Kuehnelt.** 2002. Analytical Methods for Determination of Arsenic and Arsenic Compound in the Environment. Pages 37-50 in T. F. Williams, Jr., ed. *Environmental Chemistry of arsenic*. Marcel Dekker, Inc, New-York; Basel.
- Gorby, M. S.** 1994. Arsenic in human medicine. Pages 1-6 in J. O. Nriagu, ed. *Arsenic in the Environment, PartII, Human Health and Ecosystem Effects*. Wiley, New-York.
- Green, H. H.** 1918. Isolation and description of a bacterium causing oxidation of arsenite to arsenate in cattle-dipping baths. *Rep Dir Vet S Afr* 6: 593-599.
- Gresser, M. J.** 1981. ADP-arsenate. Formation by submitochondrial particles under phosphorylating conditions. *The Journal of Biological Chemistry* 256: 5981-5983.
- Gualco, L., S. Roveta, A. Marchese, and E. A. Debbia.** 2004. Pleiotropic effect of sodium arsenite on *Escherichia coli*. *Research in Microbiology* 155: 275-282.
- Gurian, P. L., M. J. Small, J. R. Lockwood, and M. J. Schervish.** 2001. Addressing uncertainty and conflicting cost estimates in revising the arsenic MCL. *Environ Sci Technol* 35: 4414-4420.

- Gutman, P. D., P. Fuchs, and K. W. Minton.** 1994. Restoration of the DNA damage resistance of *Deinococcus radiodurans* DNA polymerase mutants by *Escherichia coli* DNA polymerase I and Klenow fragment. *Mutat Res* 314: 87-97.
- Han, F. X., Y. Su, D. L. Monts, M. J. Plodinec, A. Banin, and G. E. Triplett.** 2003. Assessment of global industrial-age anthropogenic arsenic contamination. *Die Naturwissenschaften* 90: 395-401.
- Harper, M.** 1987. Possible toxic metal exposure of prehistoric Bronze workers. *Br J Ind Med* 44: 652-656.
- Healy, S. M., R. A. Zakharyan, and H. V. Aposhian.** 1997. Enzymatic methylation of arsenic compounds: IV. In vitro and in vivo deficiency of the methylation of arsenite and monomethylarsonic acid in the guinea pig. *Mutat Res* 386: 229-239.
- Hedges, R. W., and S. Baumberg.** 1973. Resistance to arsenic compounds conferred by a plasmid transmissible between strains of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 115: 459-460.
- Hei, T. K., and M. Filipic.** 2004. Role of oxidative damage in the genotoxicity of arsenic. *Free Radical Biology and Medicine* 37: 574-581.
- Hei, T. K., S. X. Liu, and C. Waldren.** 1998. Mutagenicity of arsenic in mammalian cells: role of reactive oxygen species. *PNAS USA* 95: 8103-8107.
- Hendrick, J. P., and F. U. Hartl.** 1993. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Ann Rev Biochem* 62: 349-384.
- Hochstein, L. I., and B. P. Dalton.** 1973. Studies of a halophilic NADH dehydrogenase. I. Purification and properties of the enzyme. *Biochim Biophys Acta* 302: 216-228.
- Hodgman, C., R. Weast, S. Selby, and e. al.** 1961. *Handbook of Chemistry and Physics*. The chemical rubber publishing co, Cleveland, Ohio.
- Hoeft, S. E., T. R. Kulp, J. F. Stolz, J. T. Hollibaugh, and R. S. Oremland.** 2004. Dissimilatory arsenate reduction with sulfide as electron donor: experiments with Mono lake water and isolation of strain MLMS-1, a chemoautotrophic arsenate respirer. *Appl Environ Microbiol* 70: 2741-2747.
- Hoffman, R. D., and M. D. Lane.** 1992. Iodophenylarsine oxide and arsenical affinity chromatography: new probes for dithiol proteins. Application to tubulins and to components of the insulin receptor-glucose transporter signal transduction pathway. *J Biol Chem* 267: 14005-11.
- Hombourg, H., and C. Le Brun.** 1992. *Quatre traités de Paracelse*. Dervy.
- Hommais, F., E. Krin, C. Laurent-Winter, O. Soutourina, A. Malpertuy, J. P. Le Caer, A. Danchin, and P. Bertin.** 2001. Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. *Mol Microbiol* 40: 20-36.
- Hsie, A. W., Z. D. Xu, Y. J. Yu, M. A. Sognier, and P. Hrelia.** 1990. Molecular analysis of reactive oxygen-species-induced mammalian gene mutation. *Teratogen Carcino Muta* 10:

- 115-124.
- Hu, Y., L. Su, and E. T. Snow.** 1998. Arsenic toxicity is enzyme specific and its effects on ligation are not caused by the direct inhibition of DNA repair enzymes. *Mutat Res* 408: 203-218.
- Hughes, M. F.** 2002. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol Lett* 133: 1-16.
- Ilialdinov, A. N., and S. A. Abdrashitova.** 1981. Autotrophic arsenic oxidation by a *Pseudomonas arsenitoxidans* culture. *Mikrobiologiya* 50: 197-204.
- Jackson, C. R., and S. L. Dugas.** 2003. Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal arsC gene sequences suggests an ancient, common origin for arsenate reductase. *BMC Evol Biol* 3: 18.
- Ji, G., E. A. Garber, L. G. Armes, C. M. Chen, J. A. Fuchs, and S. Silver.** 1994. Arsenate reductase of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *Biochemistry* 33: 7294-7299.
- Ji, G., and S. Silver.** 1992a. Reduction of Arsenate to Arsenite by the ArsC Protein of the Arsenic Resistance Operon of *Staphylococcus aureus* Plasmid pI258. *PNAS* 89: 9474-9478.
- Ji, G., and S. Silver.** 1992b. Regulation and expression of the arsenic resistance operon from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *J Bacteriol* 174: 3684-3694.
- Johnson, D. L.** 1972. Bacterial reduction of arsenate in sea water. *Nature* 240: 44-45.
- Joyce, C., W. Kelley, and N. Grindley.** 1982. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* polA gene and primary structure of DNA polymerase I. *J Biol Chem* 257: 1958-1964.
- Jungmann, G.** 1966. Arsenic cancer in vintagers. *Der Landarzt* 42: 1244-1247.
- Kala, S. V., M. W. Neely, G. Kala, C. I. Prater, D. W. Atwood, J. S. Rice, and M. W. Lieberman.** 2000. The MRP2/cMOAT transporter and arsenic-glutathione complex formation are required for biliary excretion of arsenic. *J Biol Chem* 275: 33404-33408.
- Kaniuga, Z.** 1963. The Transformation of Mitochondrial NADH Dehydrogenase into NADH: Cytochrome C Oxidoreductase. *Biochim Biophys Acta* 73: 550-564.
- Kayser, M. F., M. T. Stumpp, and S. Vuilleumier.** 2000. DNA polymerase I is essential for growth of *Methylobacterium dichloromethanicum* DM4 with dichloromethane. *J Bacteriol* 182: 5433-5439.
- Kochhar, T. S., W. Howard, S. Hoffman, and L. Brammer-Carleton.** 1996. Effect of trivalent and pentavalent arsenic in causing chromosome alterations in cultured Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Toxicol Lett* 84: 37-42.
- Kohler, M., K. Hofmann, F. Volsgen, K. Thurow, and A. Koch.** 2001. Bacterial release of arsenic ions and organoarsenic compounds from soil contaminated by chemical warfare agents. *Chemosphere* 42: 425-9.
- Konkola, K.** 1992. More than a coincidence? The arrival of arsenic and the disappearance of

- plaque in early modern Europe. *J Hist Med Allied Sci* 47: 186-209.
- Krafft, T., and J. M. Macy.** 1998. Purification and characterization of the respiratory arsenate reductase of *Chrysiogenes arsenatis*. *Eur J Biochem* 255: 647-653.
- Kreppel, H., J. Liu, Y. Liu, F. X. Reichl, and C. D. Klaassen.** 1994. Zinc-induced arsenite tolerance in mice. *Fundamental and Applied Toxicology: Official Journal of the Society of Toxicology* 23: 32-37.
- Kuroda, M., S. Dey, O. I. Sanders, and B. P. Rosen.** 1997. Alternate energy coupling of ArsB, the membrane subunit of the Ars anion-translocating ATPase. *J Biol Chem* 272: 326-331.
- Langner, H. W., C. R. Jackson, T. R. McDermott, and W. P. Inskeep.** 2001. Rapid oxidation of arsenite in a hot spring ecosystem, Yellowstone National Park. *Environ Sci Technol* 35: 3302-9.
- Laverman, A., J. Blum, J. Schaefer, E. Phillips, D. Lovley, and R. Oremland.** 1995. Growth of Strain SES-3 with arsenate and other diverse electron acceptors. *Appl Environ Microbiol* 61: 3556-3561.
- Lechtman, H., and S. Klein.** 1999. The production of copper-arsenic alloys (Arsenic Bronze) by cosmelting: modern experiment, ancient practice. *J Archaeol Sci* 26: 497-526.
- Legge, J. W.** 1954. Bacterial oxidation of arsenite. IV. Some properties of the bacterial cytochromes. *Aust J Biol Sci* 7: 504-514.
- Legge, J. W., and A. W. Turner.** 1954. Bacterial oxidation of arsenite. III. Cell-free arsenite dehydrogenase. *Aust J Biol Sci* 7: 496-503.
- Li, J., and B. P. Rosen.** 2000. The linker peptide of the ArsA ATPase. *Mol Microbiol* 35: 361-367.
- Li, S., Y. Chen, and B. P. Rosen.** 2001. Role of vicinal cysteine pairs in metalloïd sensing by the ArsD As(III)-responsive repressor. *Mol Microbiol* 41: 687-696.
- Li, S., B. P. Rosen, M. I. Borges-Walmsley, and A. R. Walmsley.** 2002. Evidence for cooperativity between the four binding-sites of dimeric ArsD, an As(III)-responsive transcriptional regulator. *J Biol Chem* 29: 29.
- Lim, C. K., and D. A. Cooksey.** 1993. Characterization of chromosomal homologs of the plasmid-borne copper resistance operon of *Pseudomonas syringae*. *J Bacteriol* 175: 4492-4498.
- Lind, K. E.** 1972. Dihydropteridine reductase. Investigation of the specificity for quinoid dihydropteridine and the inhibition by 2,4-diaminopteridines. *Eur J Biochem / FEBS* 25: 560-562.
- Lindstrom, E. B., and L. Gunneriusson.** 1990. Thermophilic bioleaching of arsenopyrite using *Sulfolobus* and a semi-continuous laboratory procedure. *J Ind Microbio* 5: 375-382.
- Liu, F., and K. Y. Jan.** 2000. DNA damage in arsenite and cadmium treated bovine aortic endothelial cells. *Adv Free Radic Biol Med* 28: 55-63.
- Liu, S. X., M. Athar, I. Lippai, C. Waldren, and T. K. Hei.** 2001. Induction of oxyradicals by

- arsenic: Implication for mechanism of genotoxicity. *PNAS* 98: 1643-1648.
- Liu, Z., J. Shen, J. M. Carbrey, R. Mukhopadhyay, P. Agre, and B. P. Rosen.** 2002. Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. *PNAS* 99: 6053-6058.
- Lovley, D. R., and E. J. P. Phillips.** 1988. Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Appl Environ Microbiol* 54: 1472-1480.
- Lovley, D. R., E. J. P. Phillips, Y. A. Gorby, and E. R. Landa.** 1991. Microbial reduction of uranium. *Nature* 350: 413-416.
- Lynn, S., H. T. Lai, J. R. Gurr, and K. Y. Jan.** 1997. Arsenite retards DNA break rejoining by inhibiting DNA ligation. *Mutagenesis* 12: 353-358.
- Lynn, S., J.-N. Shiung, J.-R. Gurr, and K. Y. Jan.** 1998. Arsenite Stimulates Poly(ADP-Ribosylation) by Generation of Nitric Oxide. *Free Radical Biol Med* 24: 442-449.
- Macur, R. E., C. R. Jackson, L. M. Botero, T. R. McDermott, and W. P. Inskeep.** 2004. Bacterial populations associated with the oxidation and reduction of arsenic in an unsaturated soil. *Environ Sci Technol* 38: 104-111.
- Macy, J. M., K. Nunan, K. D. Hagen, D. R. Dixon, P. J. Harbour, M. Cahill, and L. I. Sly.** 1996. *Chrysiogenes arsenatis* gen. nov., sp. nov., a new arsenate-respiring bacterium isolated from gold mine wastewater. *Int J Syst Bacteriol* 46: 1153-1157.
- Maddox, L. M., G. M. Bancroft, M. J. Scaini, and J. W. Lorimer.** 1998. Invisible gold: Comparison of Au deposition on pyrite and arsenopyrite. *Am Mineral* 83: 1240-1245.
- Magnus, A.** 1995. *De Mineralibus: le Monde minéral*. Éditions du cerf.
- Mandal, B. K., Y. Ogra, K. Anzai, and K. T. Suzuki.** 2004. Speciation of arsenic in biological samples. *Toxicol Appl Pharmacol* 198: 307-318.
- Mandal, B. K., and K. T. Suzuki.** 2002. Arsenic round the world: a review. *Talanta* 58: 201-235.
- Martin, P., S. DeMel, J. Shi, T. Gladysheva, D. L. Gatti, B. P. Rosen, and B. F. Edwards.** 2001. Insights into the structure, solvation, and mechanism of ArsC arsenate reductase, a novel arsenic detoxification enzyme. *Structure (Camb)* 9: 1071-1081.
- Martin, W., and M. J. Russell.** 2003. On the origins of cells: a hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358: 59-83; discussion 83-85.
- Mass, M. J., A. Tennant, B. C. Roop, W. R. Cullen, M. Styblo, D. J. Thomas, and A. D. Kligerman.** 2001. Methylated trivalent arsenic species are genotoxic. *Chem Res Toxicol* 14: 355-361.
- Matschullat, J.** 2000. Arsenic in the geosphere -- a review. *Sci Total Environ* 249: 297-312.
- McBride, B. C., and R. S. Wolfe.** 1971. Biosynthesis of dimethylarsine by *Methanobacterium*.

- Biochemistry* 10: 4312-4317.
- McEwan, A. G., J. P. Ridge, C. A. McDevitt, and P. Hugenholtz.** 2002. The DMSO reductase family of microbial molybdenum enzymes; Molecular properties and role in the dissimilatory reduction of toxic elements. *Geomicrobiol J* 19: 3-21.
- Mergeay, M., S. Monchy, T. Vallaey, V. Auquier, A. Benotmane, P. Bertin, S. Taghavi, J. Dunn, D. van der Lelie, and R. Wattiez.** 2003. *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiology Reviews* 27: 385-410.
- Messens, J., G. Hayburn, A. Desmyter, G. Laus, and L. Wyns.** 1999. The essential catalytic redox couple in arsenate reductase from *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry* 38: 16857-16865.
- Miller, W. H., Jr, H. M. Schipper, J. S. Lee, J. Singer, and S. Waxman.** 2002. Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Research* 62: 3893-3903.
- Mills, D. A., and S. Ferguson-Miller.** 2003. Understanding the mechanism of proton movement linked to oxygen reduction in cytochrome c oxidase: lessons from other proteins. *FEBS Letters* 545: 47-51.
- Miquel, G.** 2001. Rapport sur les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé. Pages 365. Sénat, Paris.
- Mobley, H. L., R. J. Doyle, U. N. Streips, and S. O. Langemeier.** 1982. Transport and incorporation of N-acetyl-D-glucosamine in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 150: 8-15.
- Mobley, H. L., and B. P. Rosen.** 1982. Energetics of plasmid-mediated arsenate resistance in *Escherichia coli*. *PNAS U S A* 79: 6119-6122.
- Moody, C. S., and H. M. Hassan.** 1982. Mutagenicity of oxygen free radicals. *PNAS USA* 79: 2855-2859.
- Moore, S. A., D. M. Moennich, and M. J. Gresser.** 1983. Synthesis and hydrolysis of ADP-arsenate by beef heart submitochondrial particles. *The Journal Of Biological Chemistry* 258: 6266-6271.
- Moszer, I.** 1998. The complete genome of *Bacillus subtilis*: from sequence annotation to data management and analysis. *FEBS Letters* 430: 28-36.
- Muhly, J. D.** 1988. The beginnings of metallurgy in the Old World. Pages 2-20 in R.Maddin, ed. *The Beginning of the Use of Metals and Alloys*. Cambridge, MA: MIT Press, Cambridge.
- Mukhopadhyay, R., and B. P. Rosen.** 2002. Arsenate reductases in prokaryotes and eukaryotes. *Environ Health Perspect* 110: 745-748.
- Mukhopadhyay, R., B. P. Rosen, T. Phung le, and S. Silver.** 2002. Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiol Rev* 26: 311-25.
- Mukhopadhyay, R., J. Shi, and B. P. Rosen.** 2000. Purification and characterization of ACR2p, the *Saccharomyces cerevisiae* arsenate reductase. *J Biol Chem* 275: 21149-21157.

- Muller, D., D. Lièvreumont, D. D. Simeonova, J. C. Hubert, and M. C. Lett.** 2003. Arsenite oxidase aox genes from a metal-resistant beta-proteobacterium. *J Bacteriol* 185: 135-141.
- Myers, C. R., and K. H. Nealson.** 1988. Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. *Science* 240: 1319-1321.
- Nakamuro, K., and Y. Sayato.** 1981. Comparative studies of chromosomal aberration induced by trivalent and pentavalent arsenic. *Mutat Res* 88: 73-80.
- Nesnow, S., B. C. Roop, G. Lambert, M. Kadiiska, R. P. Mason, W. R. Cullen, and M. J. Mass.** 2002. DNA damage induced by methylated trivalent arsenicals is mediated by reactive oxygen species. *Chem Res Toxicol* 15: 1627-1634.
- Newman, D. K., D. Ahmann, and F. Morel.** 1998. A brief review of microbial arsenate respiration. *Geomicrobiol J* 15: 255-268.
- Newman, D. K., and J. F. Banfield.** 2002. Geomicrobiology: how molecular-scale interactions underpin biogeochemical systems. *Science* 296: 1071-1077.
- Neyt, C., M. Iriarte, V. H. Thi, and G. R. Cornelis.** 1997. Virulence and arsenic resistance in *Yersinia*. *J Bacteriol* 179: 612-619.
- Nickoloff, J. A., L. N. Spirio, and R. J. Reynolds.** 1998. A comparison of calcium phosphate coprecipitation and electroporation. Implications for studies on the genetic effects of DNA damage. *Molecular Biotechnology* 10: 93-101.
- Nicolli, H. B., J. M. Suriano, M. A. Gomez Peral, L. H. Ferpozzi, and O. A. Baleani.** 1989. Groundwater contamination with arsenic and other trace elements in an area of the pampa, province of Cordoba, Argentina. *Environmental Geology and Water Sciences* 14: 3-16.
- Nicoloff, H.** 2001. Biodiversité et expression des voies métaboliques chez les bactéries lactiques: biosynthèse du carbamylphosphate chez *Lactobacillus plantarum* — Régulation de deux protéines homologues. Pages 507. Université Louis Pasteur, Strasbourg I, Strasbourg.
- Niggemyer, A., S. Spring, E. Stackebrandt, and R. F. Rosenzweig.** 2001. Isolation and characterization of a novel As(V)-reducing bacterium: Implications for arsenic mobilization and the genus *Desulfitobacterium*. *Appl Environ Microbiol* 67: 5568-5580.
- Novick, R. P., and C. Roth.** 1968. Plasmid-linked resistance to inorganic salts in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 95: 1335-1342.
- Nriagu, J.** 2002. Arsenic Poisoning Through the Ages. Pages 1-26 in T. F. Williams, Jr., ed. *Environmental Chemistry of arsenic*. Marcel Dekker, Inc, New-York; Basel.
- Nriagu, J., and J. Azcuee.** 1994. Arsenic: Historical perspectives. Pages 1-15 in J. Nriagu, ed. *Arsenic in the environment*. Wiley.
- Nriagu, J. O., and J. M. Pacyna.** 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333: 134-139.
- Oden, K. L., T. B. Gladysheva, and B. P. Rosen.** 1994. Arsenate reduction mediated by the

- plasmid-encoded ArsC protein is coupled to glutathione. *Mol Microbiol* 12: 301-6.
- Oller, A. R., and W. G. Thilly.** 1992. Mutational spectra in human B-cells. Spontaneous, oxygen and hydrogen peroxide-induced mutations at the hprt gene. *Journal of Molecular Biology* 228: 813-826.
- Oremland, R. S., S. E. Hoefl, J. M. Santini, N. Bano, R. A. Hollibaugh, and J. T. Hollibaugh.** 2002. Anaerobic oxidation of arsenite in Mono Lake water and by a facultative, arsenite-oxidizing chemoautotroph, strain MLHE-1. *Appl Environ Microbiol* 68: 4795-802.
- Oremland, R. S., and J. F. Stolz.** 2003. The ecology of arsenic. *Science* 300: 939-44.
- Osborne, F. H., and H. L. Enrich.** 1976. Oxidation of arsenite by a soil isolate of *Alcaligenes*. *J Appl Bacteriol* 41: 295-305.
- Otten, M. F., J. van der Oost, W. N. Reijnders, H. V. Westerhoff, B. Ludwig, and R. J. Van Spanning.** 2001. Cytochromes c(550), c(552), and c(1) in the electron transport network of *Paracoccus denitrificans*: redundant or subtly different in function? *J Bacteriol* 183: 7017-7026.
- Park, J. H., and M. H. Saier, Jr.** 1996. Phylogenetic characterization of the MIP family of transmembrane channel proteins. *The Journal of Membrane Biology* 153: 171-180.
- Pearce, L., and W. H. Brown.** 1915. Variations in the Character and Distribution of the Renal Lesions Produced by Compounds of Arsenic. *PNAS* 1: 463-464.
- Pelham, H. R.** 1986. Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell* 46: 959-961.
- Perkins, C., C. N. Kim, G. Fang, and K. N. Bhalla.** 2000. Arsenic induces apoptosis of multidrug-resistant human myeloid leukemia cells that express Bcr-Abl or overexpress MDR, MRP, Bcl-2, or Bcl-x(L). *Blood* 95: 1014-1022.
- Petrick, J. S., F. Ayala-Fierro, W. R. Cullen, D. E. Carter, and H. Vasken Aposhian.** 2000. Monomethylarsonous acid (MMA(III)) is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 163: 203-207.
- Philips, S. E., and M. L. Taylor.** 1976. Oxidation of arsenite to arsenate by *Alcaligenes faecalis*. *Appl Environ Microbiol* 32: 392-399.
- Pulido, M. D., and A. R. Parrish.** 2003. Metal-induced apoptosis: mechanisms. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 533: 227-241.
- Poulsen, M.** 1973. Letter: Arsenic and cancer. *Ugeskrift For Laeger* 135: 1536-1538.
- Pourbaix.** 1963. *Atlas d'équilibres électrochimiques à 25°C*, Paris.
- Raina, S., D. Missiakas, and C. Georgopoulos.** 1995. The rpoE gene encoding the sigma E (sigma 24) heat shock sigma factor of *Escherichia coli*. *EMBO J* 14: 1043-1055.
- Rensing, C., M. Ghosh, and B. P. Rosen.** 1999. Families of soft-metal-ion-transporting ATPases. *J Bacteriol* 181: 5891-5897.
- Rosen, B. P.** 1999a. Families of arsenic transporters. *Trends Microbiol* 7: 207-212.

- Rosen, B. P.** 1999b. The role of efflux in bacterial resistance to soft metals and metalloids. *Essays Biochem* 34: 1-15.
- Rosen, B. P.** 2002a. Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett* 529: 86-92.
- Rosen, B. P.** 2002b. Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eukaryotic and prokaryotic microbes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 133: 689-693.
- Rosenberg, H., R. G. Gerdes, and K. Chegwiddden.** 1977. Two systems for the uptake of phosphate in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 131: 505-511.
- Rosenstein, R., A. Peschel, B. Wieland, and F. Gotz.** 1992. Expression and regulation of the antimonite, arsenite, and arsenate resistance operon of *Staphylococcus xylosus* plasmid pSX267. *J Bacteriol* 174: 3676-3683.
- Rossman, T. G.** 1981a. Effect of metals on mutagenesis and DNA repair. *Environ Health Perspect* 40: 189-195.
- Rossman, T. G.** 1981b. Enhancement of UV-mutagenesis by low concentrations of arsenite in *E. coli*. *Mutat Res* 91: 207-211.
- Rossman, T. G., M. S. Meyn, and W. Troll.** 1977. Effects of arsenite on DNA repair in *Escherichia coli*. *Environ Health Perspect* 19: 229-233.
- Rossman, T. G., D. Stone, M. Molina, and W. Troll.** 1980. Absence of arsenite mutagenicity in *E coli* and Chinese hamster cells. *Environ Mutagen* 2: 371-379.
- Rothman, J. E.** 1989. Polypeptide chain binding proteins: Catalysts of protein folding and related processes in cells. *Cell* 59: 591-601.
- Rouviere, P. E., A. De Las Penas, J. Mecsas, C. Z. Lu, K. E. Rudd, and C. A. Gross.** 1995. rpoE, the gene encoding the second heat-shock sigma factor, sigma E, in *Escherichia coli*. *EMBO J* 14: 1032-1042.
- Russell, M. J., and A. J. Hall.** 1997. The emergence of life from iron monosulphide bubbles at a submarine hydrothermal redox and pH front. *J Geol Soc (London)* 154: 377-402.
- Salmassi, T. M., K. Venkateswaren, M. Satomi, K. H. Nealson, D. K. Newman, and J. G. Hering.** 2002. Oxidation of arsenite by *Agrobacterium albertimagni*, AOL15, sp nov., isolated from Hot Creek, California. *Geomicrobiol J* 19: 53-66.
- Saltikov, C. W., A. Cifuentes, K. Venkateswaran, and D. K. Newman.** 2003. The ars detoxification system is advantageous but not required for As(V) respiration by the genetically tractable *Shewanella* species strain ANA-3. *Appl Environ Microbiol* 69: 2800-2809.
- Saltikov, C. W., and D. K. Newman.** 2003. Genetic identification of a respiratory arsenate reductase. *PNAS USA* 100: 10983-10988.
- Sanders, O. I., C. Rensing, M. Kuroda, B. Mitra, and B. P. Rosen.** 1997. Antimonite is accumulated by the glycerol facilitator GlpF in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179: 3365-

3367.

- Santini, J. M., R. D. Schnagl, J. M. Macy, and L. I. Sly.** 2000. A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: Phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies. *Appl Environ Microbiol* 66: 92-97.
- Santini, J. M., and R. N. vanden Hoven.** 2004. Molybdenum-containing arsenite oxidase of the chemolithoautotrophic arsenite oxidizer NT-26. *J Bacteriol* 186: 1614-1619.
- Sato, T., and Y. Kobayashi.** 1998. The ars operon in the skin element of *Bacillus subtilis* confers resistance to arsenate and arsenite. *J Bacteriol* 180: 1655-1661.
- Schiferl, D., and C. S. Barrett.** 1969. The crystal structure of arsenic at 4.2, 78 and 299 degrees K. *J Appl Cryst* 2: 30-36.
- Schulte, A., and J. Gehrman.** 1996. Entwicklung der Niederschlags-Deposition von Schwermetallen in Westdeutschland 2. Arsen, Chrom, Kobalt und Nickel. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 159: 385-389.
- Schulz, E. J.** 1967. Arsenic as a cause of skin cancer, with notes on its occurrence in Pretoria. *South African Medical Journal. Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Geneeskunde* 41: 819-822.
- Sehlin, H. M., and E. B. Lindstrom.** 1992. Oxidation and reduction of arsenic by *Sulfolobus acidocaldarius* strain BC. *FEMS Microbiol Lett* 93: 87-92.
- Shariatpanahi, M., and A. C. Anderson.** 1981. Effect of sodium arsenate on microbial growth in a chemostat. *J Environ Sci Health B* 16: 283-91.
- Shariatpanahi, M., and A. C. Anderson.** 1984. Uptake, distribution and elimination of monosodium methanearsonate following long term oral administration of the herbicide to sheep and goats. *J Environ Sci Health Part B* 19: 555-564.
- Shariatpanahi, M., A. C. Anderson, A. A. Abdelghani, A. J. Englande, J. Hughes, and R. F. Wilkinson.** 1981. Biotransformation of the pesticide sodium arsenate. *J Environ Sci Health B* 16: 35-47.
- Shen, Z. X., G. Q. Chen, J. H. Ni, X. S. Li, S. M. Xiong, Q. Y. Qiu, J. Zhu, W. Tang, G. L. Sun, and a. Yang et.** 1997. Use of arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. *Blood* 89: 3354-3360.
- Shi, J., A. Vlamis-Gardikas, F. Aslund, A. Holmgren, and B. P. Rosen.** 1999. Reactivity of glutaredoxins 1, 2, and 3 from *Escherichia coli* shows that glutaredoxin 2 is the primary hydrogen donor to ArsC-catalyzed arsenate reduction. *J Biol Chem* 274: 36039-36042.
- Shi, W., J. Wu, and B. P. Rosen.** 1994. Identification of a putative metal binding site in a new family of metalloregulatory proteins. *J Biol Chem* 269: 19826-19829.
- Silver, S.** 1996. Bacterial resistances to toxic metal ions — a review. *Gene* 179: 9-19.
- Silver, S.** 1998. Genes for all metals--a bacterial view of the periodic table. The 1996 Thom Award Lecture. *J Ind Microbiol Biotechnol* 20: 1-12.
- Silver, S., K. Budd, K. M. Leahy, W. V. Shaw, D. Hammond, R. P. Novick, G. R. Willsky,**

- M. H. Malamy, and H. Rosenberg.** 1981. Inducible plasmid-determined resistance to arsenate, arsenite, and antimony (III) in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 146: 983-996.
- Silver, S., and D. Keach.** 1982. Energy-dependent arsenate efflux: the mechanism of plasmid-mediated resistance. *PNAS USA* 79: 6114-6118.
- Silver, S., T. Phung Le, and B. P. Rosen.** 2002. Arsenic Metabolism: Resistance, Reduction, and oxidation in T. F. Williams, Jr., ed. *Environmental Chemistry of arsenic*. Marcel Dekker, Inc, New-York; Basel.
- Silver, S., and L. T. Phung.** 1996. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu Rev Microbiol* 50: 753-89.
- Smedley, P. L., and D. G. Kinniburgh.** 2002. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry* 17: 517-568.
- Smith, A. H., M. L. Biggs, C. Hopenhayn-Rich, and D. Kalman.** 1995. Arsenic risk assessment. *Environ Health Perspect* 103: 13-17.
- Smith, A. H., C. Hopenhayn-Rich, M. N. Bates, H. M. Goeden, I. Hertz-Picciotto, H. M. Duggan, R. Wood, M. J. Kosnett, and M. T. Smith.** 1992. Cancer risks from arsenic in drinking water. *Environ Health Perspect* 97: 259-267.
- Sofia, H. J., V. Burland, D. L. Daniels, G. Plunkett, 3rd, and F. R. Blattner.** 1994. Analysis of the *Escherichia coli* genome. V. DNA sequence of the region from 76.0 to 81.5 minutes. *Nuc Acid Res* 22: 2576-2586.
- Song, Y., and N. Sargentini.** 1996. *Escherichia coli* DNA repair genes *radA* and *sms* are the same gene. *J Bacteriol* 178: 5045-5048.
- Stolz, J. F., and R. S. Oremland.** 1999. Bacterial respiration of arsenic and selenium. *FEMS Microbiol Rev* 23: 615-627.
- Styblo, M., L. M. Del Razo, E. L. LeCluyse, G. A. Hamilton, C. Wang, W. R. Cullen, and D. J. Thomas.** 1999. Metabolism of arsenic in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Chem Res Toxicol* 12: 560-565.
- Styblo, M., S. V. Serves, W. R. Cullen, and D. J. Thomas.** 1997. Comparative inhibition of yeast glutathione reductase by arsenicals and arsenothiols. *Chem Res Toxicol* 10: 27-33.
- Sweet, D. M., and B. E. Moseley.** 1976. The resistance of *Micrococcus radiodurans* to killing and mutation by agents which damage DNA. *Mutat Res* 34: 175-186.
- Thiers, H., D. Colomb, G. Moulin, and L. Colin.** 1967. Cutaneous arsenical cancer in viticultivators in Beaujolais. *Annales De Dermatologie Et De Syphiligraphie* 94: 133-158.
- Thomas, D. J., M. Styblo, and S. Lin.** 2001. The Cellular Metabolism and Systemic Toxicity of Arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol* 176: 127-144.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson.** 1994. CLUSTAL W: improving the

- sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nuc Acid Res* 22: 4673-4680.
- Turner, A. W.** 1949. Bacterial oxidation of arsenite. *Nature (London)* 164: 76-77.
- Turner, A. W.** 1954. Bacterial oxidation of arsenite. I. Description of Bacteria isolated from from Cattle-dipping fluids. *Aust J Biol Sci* 7: 452-78.
- Turner, A. W., and J. W. Legge.** 1954. Bacterial oxidation of arsenite. II. The activity of washed suspension. *Aust J Biol Sci* 7: 479-95.
- Ure, A. M., and M. L. Berrow.** 1982. *The elemental constituents of soils.*
- Vanden Hoven, R. N., and J. M. Santini.** 2004. Arsenite oxidation by the heterotroph *Hydrogenophaga* sp. str. NT-14: the arsenite oxidase and its physiological electron acceptor. *Biochim Biophys Acta* 1656: 148-155.
- Venter, J. C., K. Remington, J. F. Heidelberg, A. L. Halpern, D. Rusch, J. A. Eisen, D. Wu, I. Paulsen, K. E. Nelson, W. Nelson, D. E. Fouts, S. Levy, A. H. Knap, M. W. Lomas, K. Neelson, O. White, J. Peterson, J. Hoffman, R. Parsons, H. Baden-Tillson, C. Pfannkoch, Y.-H. Rogers, and H. O. Smith.** 2004. Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304: 66-74.
- Walker, J. E., M. Saraste, M. J. Runswick, and N. J. Gay.** 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J* 1: 945-951.
- Wang, T. S., T. Y. Hsu, C. H. Chung, A. S. Wang, D. T. Bau, and K. Y. Jan.** 2001. Arsenite induces oxidative DNA adducts and DNA-protein cross-links in mammalian cells. *Adv Free Radic Biol Med* 31: 321-330.
- Wang, T. S., C. F. Kuo, K. Y. Jan, and H. Huang.** 1996. Arsenite induces apoptosis in Chinese hamster ovary cells by generation of reactive oxygen species. *J Cell Physiol* 169: 256-268.
- Wang, T. S., Y. F. Shu, Y. C. Liu, K. Y. Jan, and H. Huang.** 1997. Glutathione peroxidase and catalase modulate the genotoxicity of arsenite. *Toxicology* 121: 229-237.
- Weeger, W., D. Lièvreumont, M. Perret, F. Lagarde, J. C. Hubert, M. Leroy, and M. C. Lett.** 1999. Oxidation of arsenite to arsenate by a bacterium isolated from an aquatic environment. *Biometals* 12: 141-149.
- Wilde, S. A., J. W. Valley, W. H. Peck, and C. M. Graham.** 2001. Evidence from detrital zircons for the existence of continental crust and oceans on the Earth 4.4 Gyr ago. *Nature* 409: 175-178.
- Willsky, G. R., and M. H. Malamy.** 1974. The loss of the PhoS periplasmic protein leads to a change in the specificity of a constitutive inorganic phosphate transport system in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 60: 226-233.
- Willsky, G. R., and M. H. Malamy.** 1980. Effect of arsenate on inorganic phosphate transport in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 144: 366-374.

- Wu, J., and B. P. Rosen.** 1993a. The *arsD* gene encodes a second trans-acting regulatory protein of the plasmid-encoded arsenical resistance operon. *Mol Microbiol* 8: 615-623.
- Wu, J., and B. P. Rosen.** 1993b. Metalloregulated expression of the *ars* operon. *J Biol Chem* 268: 52-58.
- Wu, J., L. S. Tisa, and B. P. Rosen.** 1992. Membrane topology of the ArsB protein, the membrane subunit of an anion-translocating ATPase. *J Biol Chem* 267: 12570-12576.
- Wysocki, R., P. Bobrowicz, and S. Ulaszewski.** 1997. The *Saccharomyces cerevisiae* *ACR3* gene encodes a putative membrane protein involved in arsenite transport. *J Biol Chem* 272: 30061-30066.
- Wysocki, R., C. C. Chery, D. Wawrzycka, M. Van Hulle, R. Cornelis, J. M. Thevelein, and M. J. Tamas.** 2001. The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 40: 1391-1401.
- Xu, C., and B. P. Rosen.** 1997. Dimerization is essential for DNA binding and repression by the ArsR metalloregulatory protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 272: 15734-15738.
- Xu, C., W. Shi, and B. P. Rosen.** 1996. The chromosomal *arsR* gene of *Escherichia coli* encodes a trans-acting metalloregulatory protein. *J Biol Chem* 271: 2427-2432.
- Yamanaka, K., A. Hasegawa, R. Sawamura, and S. Okada.** 1991. Cellular response to oxidative damage in lung induced by the administration of dimethylarsinic acid, a major metabolite of inorganic arsenics, in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 108: 205-213.
- Yamanaka, K., H. Hayashi, K. Kato, A. Hasegawa, M. Tachikawa, N. Oku, and S. Okada.** 1997. Metabolic methylation is a possible genotoxicity-enhancing process of inorganic arsenics. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 394: 95-101.
- Yamanaka, K., M. Hoshino, M. Okamoto, R. Sawamura, A. Hasegawa, and S. Okada.** 1990. Induction of DNA damage by dimethylarsine, a metabolite of inorganic arsenics, is for the major part likely due to its peroxy radical. *Biochem Biophys Res Com* 168: 58-64.
- Yamanaka, K., M. Tezuka, K. Kato, A. Hasegawa, and S. Okada.** 1993. Crosslink formation between DNA and nuclear proteins by in vivo and in vitro exposure of cells to dimethylarsinic acid. *Biochem Biophys Res Com* 191: 1184-1191.
- Yeh, S.** 1973. Skin cancer in chronic arsenicism. *Human Pathology* 4: 469-485.
- Zachariae, H.** 1972. Arsenic and the risk for cancer. *Ugeskrift For Laeger* 134: 2720-2721.
- Zaman, G. J., J. Lankelma, O. van Tellingen, J. Beijnen, H. Dekker, C. Paulusma, R. P. Oude Elferink, F. Baas, and P. Borst.** 1995. Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein. *PNAS USA* 92: 7690-4.
- Zegers, I., J. C. Martins, R. Willem, L. Wyns, and J. Messens.** 2001. Arsenate reductase from *S. aureus* plasmid pI258 is a phosphatase drafted for redox duty. *Nat Struct Biol* 8: 843-

847.

**Zehnacker, H.** 1983. *Pline l'Ancien, Histoire naturelle*. éd. Les Belles Lettres, Paris.

**Zhao, C. Q., M. R. Young, B. A. Diwan, T. P. Coogan, and M. P. Waalkes.** 1997. Association of arsenic-induced malignant transformation with DNA hypomethylation and aberrant gene expression. *PNAS USA* 94: 10907-10912.

**Zhou, T., S. Radaev, B. P. Rosen, and D. L. Gatti.** 2000. Structure of the ArsA ATPase: the catalytic subunit of a heavy metal resistance pump. *Embo J* 19: 4838-4845.

**Zhou, T., and B. P. Rosen.** 1997. Tryptophan fluorescence reports nucleotide-induced conformational changes in a domain of the ArsA ATPase. *J Biol Chem* 272: 19731-19737.

Zhu, J., M. H. M. Koken, F. Quignon, M. K. Chelbi-Alix, L. Degos, Z. Y. Wang, Z. Chen, and H. de The. 1997. Arsenic-induced PML targeting onto nuclear bodies: Implications

## **Liste des tableaux et figures**



## Liste des figures et tableaux

<b>Tableau I.1.</b> Propriétés physico-chimiques de l'élément arsenic (Schiferl et Barrett, 1969).	1
<b>Tableau I.2.</b> Principales formes minéralisées retrouvées dans l'environnement (d'après Smedley <i>et al.</i> , 2002).	2
<b>Tableau I.3.</b> Principales utilisations de l'arsenic (d'après Han, 2003).	11
<b>Tableau I.4.</b> Bactéries capables de méthyler l'arsenic (D'après Cullen <i>et al.</i> , 1989).	19
<b>Tableau II.1.</b> Identification de gènes induits par l'arsenic chez <i>Cenibacterium arsenoxidans</i> . (a) analyse quantitative de l'induction de la $\beta$ -galactosidase en présence d'As[III].	113
<b>Tableau II.2.</b> Temps de génération des cultures de <i>C. arsenoxidans</i> et des mutants <i>aoxA</i> , <i>rpoE</i> , <i>polA</i> , <i>radA</i> et <i>recQ</i> . Concentration en As[III] : 4 mM.	114
<b>Tableau II.3.</b> Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de différentes souches de la collection réalisées sur milieu solide. Concentration maximale en As[V] : 200 mM. A des concentrations supérieures, As[V] précipite dans le milieu. La CMI de la souche W3110 n'a pas été réalisée avec As[V].	123
<b>Tableau II.4</b> Concentration minimale inhibitrice (CMI) de différentes souches de la collection réaliser sur milieu solide. 200mM As(V) est la concentration maximum testée, car au-delà l'As(V) précipite dans le milieu	127
<b>Figure I.1.</b> Cycle global de l'arsenic. Flux et réservoirs dans les différents compartiments de la biosphère (d'après Matschullat, 2000).	1
<b>Figure I.2.</b> Spéciation de l'arsenic dans une colonne d'eau du lac Mono (Californie) en fonction des populations microbiennes présentes (à gauche). Cycle de l'arsenic dans la chémocline. La réduction de l'arséniate est réalisée par l'intermédiaire des DARPs (dissimilatory arsenate-reducing prokaryotes) qui utilisent la matière organique du plancton. L'oxydation de l'arsénite (aérobie et anaérobie) est réalisée par l'intermédiaire des CAOs (chemolithoautotrophic arsenite oxidizers) qui contribuent également à la production secondaire en fixant le CO <sub>2</sub> dans la matière organique. L'arsenic entre dans le lac salin (90 g/L) et basique (pH=9,8) sous forme dissoute par les eaux hydrothermales (d'après Oremland, 2003).	5
<b>Figure I.3.</b> A gauche, diagramme Eh-pH des espèces aqueuses de l'arsenic à 25°C et 1 bar de pression. A droite, spéciation de l'arsenic en fonction du pH (Pourbaix, 1963).	6
<b>Figure I.4.</b> Exemple de production d'un alliage de cuivre-arsenic. En chauffant un sulpharsénide de Cu, on observe l'émission de fumé d'oxyde (Lechtman et Klein, 1999).	8
<b>Figure I.5.</b> Représentation du dieu Héphaïstos sur un cheval. On remarquera la difformité de ses membres inférieurs (Aterman, 1999).	9
<b>Figure I.6.</b> Carte mondiale des populations à risque d'après les données bibliographiques actuelles. Estimations des personnes contaminées. <sup>1</sup> Nombres de personnes consommant quotidiennement une eau dont la concentration en arsenic est supérieure à 50 $\mu$ g L <sup>-1</sup> , <sup>2</sup> eau	

- supérieure à  $10\mu\text{g L}^{-1}$ . 13
- Figure I.7.** Représentation schématique des différents mécanismes d'entrée de l'arsenic dans la cellule. (d'après Rosen 1999). 16
- Figure I.8.** Méthylation de l'arsenic (D'après Challenger, 1951). 17
- Figure I.9.** Structures de différents opérons *ars* décrits. 20
- Figure I.10.** Schéma de fonctionnement de l'ATPase ArsA (d'après Rensing, 1999). 24
- Figure I.11.** Les deux familles de ArsC (d'après Silver *et al.*, 2002). 26
- Figure I.12.** Evolution de l'opéron *ars*. (a) La résistance originelle ne demande que l'expression constitutive du gène *arsB*. (b) L'acquisition de *arsR* résulte en un opéron régulé de deux gènes. (c) Un opéron à trois gènes apparaît par fusion avec l'un ou l'autre des deux types de gènes *arsC*. (d) La fusion avec un opéron *arsDA* résulte en un opéron à cinq gènes (d'après Rosen, 1999). 29
- Figure I.13.** Représentation schématique de l'opéron *arrAB* et *ars* de la souche *Schewanella* A NA-3 (d'après Saltikov et Newman, 2003). 31
- Figure I.14.** Représentation schématique des liaisons Hydrogène intervenant dans la liaison au centre molybdoptérine (Ellis *et al.*, 2001). 34
- Figure I.15.** Fixation de As[III] aux groupements SH des protéines et intervention de As[V] dans la glycolyse. A) exemple du mode toxique de As[III] ; B) exemple du mode toxique de As[V] (d'après Mandal *et al.*, 2002). 39
- Figure I.16.** Mécanisme d'altération de la cellule provoqué par l'arsenic. La réduction intracellulaire de la forme pentavalente As[V] en une forme trivalente As[III] conduit à la formation de radicaux libres (ROS) toxiques pour la cellule. L'As[III] peut se complexer aux groupements SH des protéines et contribuer à la diminution de la concentration du glutathion (GSH) et perturber la fonction des groupements thiols (d'après Del Razo *et al.*, 2002). 42
- Figure II.1.** Représentation schématique de l'opéron *aox* chez *C. arsenoxidans*. 60
- Figure II.2.** Représentation schématique du mécanisme de fonctionnement probable de l'arsénite oxydase (d'après Vanden Hoven, 2004). L'arsénite est oxydé en arséniate au niveau du centre catalytique à molybdène de la grande sous-unité (AoxA). Les deux électrons sont ensuite transférés au centre [3Fe-4S] de AoxA d'où ils passent au centre [2Fe-2S] de la petite sous-unité de type Rieske (AoxB). Les électrons passeraient ensuite au cytochrome c551/552 (AoxD) qui est associé à AoxB, puis au CuA et à l'hème du complexe cytochrome c oxydase aa3. Quatre électrons seront nécessaires au total pour réduire l'O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O dans le cytoplasme, et quatre protons seront pompés hors de la cellule créant une force proton motrice qui peut être utilisée dans la production d'ATP. 61
- Figure II.2.2** Point initiation de la transcription a) photographie de l'expérience. b) représentation schématique. 62
- Figure II.3.** Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des ADN 16S des souches As[III]-

oxydantes issues de la littérature et de la collection interne au laboratoire. En rouge, les noms des souches isolées pour le phénotype arsénite oxydase. Les numéros d'accèsion sont les suivants : souche NT-26 (AF159453) ; souche NT-25 (AF159452) ; *Ochrobactrum anthropi* (AJ249720) ; *Ultrabacterium* souche ND5 (AB008506) ; *Pseudomonas huttiensis* (AB021366) ; *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (AF137508) ; *Matsuebacter* sp9 (AB008503) ; *Methylophilic proteobacterium* (AF107722) ; *Alcaligenes faecalis* (AF155147) ; *Nocardioides simplex* (U81990) ; souche 31 (U81990) ; souche 21 (AF107722) ; *Thiomonas* C19 (AF176594) ; *Thiomonas* C02 (AF176594) ; *Cenibacterium arsenoxidans* ULPAS1 (AB008506) ; souche 43 (AF177916) ; *Ralstonia metallidurans* (AF067657) ; *Pseudomonas putida* (D85994) ; *Ochrobactrum intermedium* (AJ249720) ; *Pseudomonas* DhA-91 souche DhA-91 (AF177916) ; *Bordetella* sp souche KP22 (AB015607) ; *Thiomonas thermosulphata* ATCC51 520 (U27839) ; *Thiomonas cuprina* DSM5495 (U67162) ; *Agrobacterium albertimagni* (AF316615) ; *Agrobacterium tumefaciens* IAM 13129 (D12784) ; *Agrobacterium rubi* (D12787) ; *Rhizobium gallicum* souche R602sp. (U86343) ; *Alcaligenes faecalis* subsp. *dimethylsulfidosus* souche M3A (AB015607) ; *Ralstonia solanacearum* (RS06158). Les séquences des ADNr 16S des souches de la collection ne sont pas encore dans les banques de données. Les souches *Aeropyrum pernix* et *Sulfolobus tokodai* ne sont pas représentées. 77

**Figure II.4.** Structure opérannique de l'arsénite oxydase. 78

**Figure II.5.** Tests de survie aux UV des mutants et de la souche sauvage cultivés en présence et en absence d'As[III] (concentration 0,75 mM). Légende : ULP (souche sauvage), M19, M21 et M35 cultivés sans As[III] et ULPA (souche sauvage), M19As, M21As et M35As cultivés avec As[III]. 115

**Figure II.6.** Construction d'une banque d'ADN par la technique de nébulisation. **A)** Principe du clonage lors d'une construction d'une banque d'ADN génomique. **B)** plasmide pcDNA2.1. 121

**Figure II.7.** Représentation schématique des trois opérons *ars* présents dans le génome de la souche *C. arsenoxidans*. Outre la structure classique *arsRBC*, les trois opérons possèdent le gène *arsH*. Les trois opérons codent la protéine ArsCa (type thiérodoxine). Les opérons *ars(II)* et *ars(III)* sont pourvus d'un second gène codant une ArsC de type glutathiorédoxine *arsCb*. Les pourcentages représentent l'identité en aa entre les trois opérons. 124

**Figure II.8.** Analyse protéomique de l'expression différentielle de trois arsénites. Le spot A correspond à la protéine ArsCa de l'opéron B3, le spot B à ArsCa de l'opéron B1 et le spot C à ArsCb de l'opéron B3. Aucune des protéines ArsC de l'opéron A1 n'a été identifiée. 126

**Figure II.9.** Expression différentielle des opérons *ars* de la souche *Cenibacterium arsenoxidans*. **A)** Représentation des résultats d'hybridation des sondes *arsB* sur l'ARN total. **B)** Représentation schématique de l'expression différentielle des 3 gènes *arsB* (*arsB(I)*, *arsB(II)* et *arsB(III)*). L'expression des *arsB(I)* et *arsB(II)* est fortement induite par 0,75 mM As[III], tandis que l'expression de *arsB(III)* ne semble pas affectée par 0,75 mM As[III]. 126

**Figure II.10.** Représentation schématique des opérons *ars* chez *Pseudomonas putida* (Canovas *et al.*, 2003). Organisation génétique des gènes *ars*, avec le degré d'identité entre les protéines. 130

**Figure II.11.** Arbre phylogénétique des pompes à arsenic type ArsB et Acr3. Toutes les protéines des banques de données ne sont pas représentées, seule une ou deux protéines ont

été gardées pour chacune des grandes branches. Cen ar : *Cenibacterium arsenoxidans* ; Pse pu : *Pseudomonas putida* ; Alc fa : *Alcaligenes faecalis* ; Pse sy : *Pseudomonas syringae* ; Pse ae : *Pseudomonas aeruginosa* ; E coli : *Escherichia coli* ; IncN R46 : plasmide IncN R46 ; Ent cl : *Enterobacter cloacae* ; Aci fe : *Acidithiobacillus ferrooxidans* ; Lis mon : *Listeria monocytogenes* ; Lact pl : *Lactobacillus plantarum* ; Bac su : *Bacillus subtilis* ; Sta au plas : *Staphylococcus aureus* plasmide ; Ter vo : *Thermoplasma volcanium* ; Fer pl : *Ferroplasma acidarmanus* ; Hel he : *Helicobacter hepaticus* ; Cam je : *Campylobacter jejuni subsp. jejuni* ; Bac ce : *Bacillus cereus* ; Bur fu : *Burkholderia fungorum* ; Agr tu : *Agrobacterium tumefaciens* ; Bra ja : *Bradyrhizobium japonicum* ; Pyr ab : *Pyrococcus abyssi* ; Pyr ho : *Pyro hori* ; Myc tub : *Mycobacterium tuberculosis* ; Fus nu2 : *Fusobacterium nucleatum.NP* ; Fus nu : *Fusobacterium nucleatum* ; Syn sp : *Synechococcus sp.* ; Bac ce : *Bacillus cereus* ; Bac su : *Bacillus subtilis* ; Chl te : *Chlorobium tepidum* ; Geo su : *Geobacter sulfurreducens* ; Des ha : *Desulfitobacterium hafniense* ; Clo as : *Clostridium acetobutylicum* ; Met ba : *Methanosarcina barkeri str. Fusaro* ; Vib pa : *Vibrio parahaemolyticus* ; Arc fu : *Archaeoglobus fulgidus* ; Str co : *Streptomyces coelicolor* ; The fu : *Thermobifida fusca* ; Kin ra : *Kineococcus radiotolerans* ; Cor glu : *Corynebacterium glutamicum* ; Neu cr : *Neurospora crassa* ; Mag gr : *Magnaporthe grisea* ; Gib ze : *Gibberella zeae* ; Asp ni : *Aspergillus nidulans* ; Yar li : *Yarrowia lipolytica* ; Cry ne : *Cryptococcus neoformans* ; Ust ma : *Ustilago maydis* ; Can al : *Candida albicans* ; Deb ha : *Debaryomyces hansenii* ; Klu la : *Kluyveromyces lactis* ; Sac ce : *Saccharomyces cerevisiae* ; Azo vi : *Azotobacter vinelandii* ; Rub ge : *Rubrivivax gelatinosus* ; Bur fu : *Burkholderia cepacia* ; Ral me : *Ralstonia metallidurans* ; Rho ru : *Rhodospirillum rubrum* ; Rho pa : *Rhodopseudomonas palustris* ; Bac th : *Bacillus thuringiensis* ; Lis inn : *Listeria innocua* ; Nei me : *Neisseria meningitidis* ; She on : *Shewanella oneidensis* ; Syn sp : *Synechococcus sp.* ; Met ma : *Methanosarcina mazei* ; Pyr fu : *Pyrococcus furiosus* ; Nos sp : *Nostoc punctiform* ; Tri er : *Trichodesmium erythraeum* ; Pir sp : *Pirellula sp.*

132

**Figure II.12.** Métabolisme de l'arsenic dans une cellule bactérienne (d'après Silver, communication personnelle).

133

## **Annexe**

