



HAL
open science

Les processus biogéochimiques impliqués dans la mobilité de l'arsenic : recherche de bioindicateurs

Marianne Quemeneur

► **To cite this version:**

Marianne Quemeneur. Les processus biogéochimiques impliqués dans la mobilité de l'arsenic : recherche de bioindicateurs. Sciences de la Terre. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2008. Français. NNT : 2008NAN10088 . tel-01748420

HAL Id: tel-01748420

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748420v1>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Thèse

pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

Spécialité Géosciences

présentée par

Marianne QUEMENEUR

Les processus biogéochimiques impliqués dans la mobilité de l'arsenic : recherche de bioindicateurs

Soutenue publiquement le 21 novembre 2008 devant le jury :

Rapporteurs :	Mme Marie-Claire Lett M. Timothy Vogel	Professeur, Université Louis Pasteur, Strasbourg I Professeur, Université Claude Bernard, Lyon I
Examineurs :	Mme Pascale Bauda Mme Cécile Grand	Professeur, Université Paul Verlaine, Metz Ingénieur, ADEME, Angers
Invités :	Mme Catherine Joulian M. Patrick Billard M. Francis Garrido	Chercheur, BRGM, Orléans Maître de conférences, Université Henri Poincaré, Nancy I Chercheur, BRGM, Orléans
Directeurs de thèse :	Mme Corinne Leyval M. Michel Jauzein	Directrice de recherche, CNRS, Nancy I Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I



Laboratoire des Interactions Microorganismes-
Minéraux-Matière Organiques dans les Sols
UMR 7137 CNRS – Faculté des Sciences –
Vandoeuvre-lès-Nancy



Bureau de Recherches Géologiques et Minières
Service Environnement et Procédés Innovants
Unité Ecotechnologie
Orléans

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé à l'Unité Ecotechnologie du Bureau de Recherches Géologiques et Minières (BRGM) à Orléans et au Laboratoire des Interactions Microorganismes - Minéraux - Matière Organique dans les Sols (LIMOS) du CNRS et de l'Université Henri Poincaré (Nancy I).

Je remercie Dominique Morin, responsable de l'Unité Ecotechnologie du BRGM, Dominique Darmendrail et Hervé Gaboriau, chef et adjoint du service Environnement et Procédés Innovants du BRGM, respectivement, et Corinne Leyval, Directrice du LIMOS et co-directrice de ma thèse, pour m'avoir accueillie au sein de leurs laboratoires. Je remercie également le Professeur Michel Jauzein pour avoir accepté de diriger ma thèse et pour m'avoir accordé sa confiance.

Je remercie tout particulièrement Catherine Joulian (BRGM) pour m'avoir formée, conseillée et soutenue durant ces trois années. Je la remercie encore pour sa disponibilité et son investissement tout au long de ce travail. Pour tout cela, je lui en suis très reconnaissante.

Je remercie également Francis Garrido (BRGM) pour ces conseils et pour avoir contribué activement et régulièrement au bon déroulement de cette thèse.

Je remercie Patrick Billard (LIMOS) pour ces conseils particulièrement pertinents sur l'ensemble de ces travaux. Je remercie Aurélie Cébron (LIMOS) pour son aide concernant les manipulations de PCR en temps réel.

Je remercie le Professeur Philippe Bertin du Laboratoire de Génétique Moléculaire, Génomique et Microbiologie (GMGM, CNRS-ULP, Strasbourg) pour nos discussions et ses conseils avisés sur une partie de mon travail. Je remercie également Audrey Heinrich-Salmeron, Daniel Muller et Didier Lièvremont pour avoir collaboré à cette même partie de mon travail.

Je remercie les Professeurs Marie-Claire Lett de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg (GMGM, CNRS-ULP) et Timothy Vogel de l'Université Claude Bernard de Lyon (Environmental Microbial Genomics Group, Laboratoire AMPERE, Ecole Centrale de Lyon) pour avoir accepté de juger mon travail. Je remercie également le Professeur Pascale Bauda de l'Université Paul Verlaine de Metz pour avoir accepté d'examiner ma thèse ainsi que Cécile Grand (ADEME) pour avoir suivi mon travail au cours de ces trois années et accepté de l'examiner. Je remercie l'ADEME pour m'avoir accordé une bourse de doctorat.

Je remercie également Fabienne Battaglia (BRGM), grâce à qui l'étude sur les eaux du bassin de l'Isle a pu être réalisée. Merci à Dominique Breeze (BRGM) et Catherine Crouzet (BRGM) pour toutes les analyses d'arsenic et de fer effectuées. Merci à Antoine Joubert, pour sa gentillesse et pour avoir débuté l'étude biogéochimique sur les sites d'étude.

Je tiens également à remercier Laurie Casalot du laboratoire de Microbiologie et de Biotechnologie des Environnements Chauds de l'IRD (Marseille) pour m'avoir initiée à la microbiologie moléculaire durant mes six mois de stage de Master 2 et m'avoir donné le goût de la recherche.

Je remercie l'ensemble des membres de mes laboratoires d'accueil, qui m'ont permis de m'intégrer et de me sentir bien au sein des deux structures. Merci à Caroline, ma voisine d'en face ou « la femme chocolat », pour sa gaieté et son accent typique du Sud-Est. Merci à Sylvain, « le maître microscopiste » ou « l'historien » à ses heures perdues, pour sa gentillesse et ces précieux conseils sur Excel et aussi pour m'avoir supportée dans l'enceinte de notre bureau. Merci à Chris, « l'Anglais », pour nos bonnes soirées passées « rue de Bourgogne », nos vacances en Angleterre, au pays des « crags » et des « sheeps », et ses conseils de dernières minutes sur Word. Merci à mes collègues de paille (Hafida, Laurence et Stéphanie), pour l'entraide et la bonne entente. Merci aux stagiaires et thésards du LIMOS et à Thierry Beguiristain pour sa bonne humeur.

Je remercie enfin mon Willy, pour son soutien et sa patience (particulièrement durant la rédaction).

Table des matières

Introduction	1
I. Synthèse bibliographique	3
I.1. L'arsenic	3
I.1.1. Propriétés et formes	3
I.1.2. Toxicité	6
I.2. Sources et distribution	9
I.2.1. Sources naturelles et anthropiques	9
I.2.2. Distribution dans les compartiments environnementaux	12
I.3. Principaux mécanismes de mobilité de l'arsenic dans l'environnement	16
I.3.1. Réactions de (co-)précipitation/dissolution	17
I.3.2. Réactions d'adsorption/désorption	19
I.3.3. Importance du facteur microbien dans les processus de mobilité de l'As	22
I.4. Les bactéries et la biotransformation de l'As	26
I.4.1. Oxydation de l'As ^{III}	26
I.4.2. Réduction dissimilatrice, ou respiration, de l'As ^V	34
I.4.3. Résistance bactérienne à l'As	39
I.5. Stratégies d'études moléculaires des communautés microbiennes	43
I.5.1. Les marqueurs moléculaires	45
I.5.2. Les outils moléculaires pour analyser les échantillons environnementaux	50
I.6. Programme de travail et objectifs	60
II. Matériels et méthodes	62
II.1. Echantillons environnementaux	62
II.1.1. Sols du bassin de la Meuse	63
II.1.2. Sols du bassin du Gallego	64
II.1.3. Eaux du bassin de l'Isle	65
II.2. Souches bactériennes	66
II.3. Etudes en systèmes fermés (batch)	68
II.4. Enrichissements et isollements	70
II.5. Analyses physico-chimiques	72
II.6. Microbiologie moléculaire	73
II.6.1. Extractions d'acides nucléiques	73
II.6.2. Dessin d'amorces ciblant les gènes <i>aoxB</i>	74
II.6.3. Amplification par PCR	76
II.6.4. Quantification par PCR en temps réel	80
II.6.5. Profils des gènes <i>aoxB</i> par DGGE	85
II.6.6. Structures des communautés bactériennes totales par CE-SSCP	87
II.6.7. Construction de bibliothèques de gènes, criblage et séquençage	88
II.6.8. Analyses des séquences	89

III. Le gène *aoxB*, marqueur moléculaire des bactéries AsIII-oxydantes ... 91

III.1.	Contexte	91
III.2.	Collection de souches AsIII-oxydantes.....	91
III.3.	Dessin, sélection et évaluation d'amorces ciblant les gènes <i>aoxB</i>	93
III.4.	DGGE.....	97
III.5.	PCR en temps réel	99
III.6.	Conclusion.....	104

IV. Analyse et évolution des gènes *aoxB* 105

IV.1.	Contexte	105
IV.2.	Analyse des séquences <i>aoxB</i> et <i>AoxB</i>	105
IV.3.	Phylogénie des séquences <i>aoxB</i> et <i>AoxB</i> de souches connues	111
IV.4.	Phylogénies des séquences <i>AoxB</i> et de l'ARNr 16S	117
IV.5.	Conclusion.....	119

V. La structure et la quantité des gènes *aoxB* sont-elles liées aux concentrations et spéciations d'arsenic ? 121

V.1.	Contexte	121
V.2.	Comparaison des profils DGGE des gènes <i>aoxB</i>	122
V.3.	Diversité des gènes <i>aoxB</i>	124
V.4.	Abondance des gènes <i>aoxB</i>	130
V.5.	Conclusion.....	131

VI. Coexistence des communautés bactériennes AsIII-oxydantes et respirant l'AsV dans des sols industriels pollués 135

VI.1.	Contexte	135
VI.2.	Oxydation et réduction potentielles de l'As par les bactéries indigènes.....	135
VI.3.	Diversité des bactéries AsIII-oxydantes dans le sol T12R.....	138
VI.4.	Diversité des bactéries respirant l'AsV dans le sol T12R.....	143
VI.5.	Conclusion.....	145

VII. Dynamique de la mobilité de l'arsenic et des communautés bactériennes indigènes d'un sol industriel 147

VII.1.	Contexte	147
VII.2.	Dynamique des communautés bactériennes dans des sols remobilisant l'As (études préliminaires).....	148
VII.3.	Processus biogéochimiques impliqués dans la mobilité de l'As.....	152
VII.3.1.	Influence de conditions oxydantes	153
VII.3.2.	Influence de conditions réductrices.....	162
VII.4.	Conclusion.....	169

VIII. Réponse des communautés bactériennes indigènes de sols agricoles	
(faiblement pollués) à une accumulation d'As	173
VIII.1. Contexte	173
VIII.2. Potentiel de sols agricoles à oxyder et réduire l'As	174
VIII.3. Effet des activités microbiennes du sol G07 sur une accumulation d'AsIII en aérobiose 177	
VIII.3.1. Evolution de l'As et du fer	178
VIII.3.2. Communautés bactériennes totales	180
VIII.4. Effet des communautés microbiennes du sol G07 sur une accumulation d'AsV en anaérobiose.....	181
VIII.4.1. Evolution de l'As et du fer	181
VIII.4.2. Communautés bactériennes totales	187
VIII.5. Conclusion.....	188
 Conclusions et Perspectives	 191
 Valorisation du travail	 201
 Références	 203
 Annexes.....	 225

Liste des Abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique
Aox :	Arsénite oxydase
APS :	Persulfate d'ammonium
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
ARNr :	ARN ribosomique
Aro :	Arsénite oxydase
Arr :	Arséniate réductase respiratoire
Ars :	Arséniate résistance système
As :	Arsenic
AsIII :	Arsénite
AsV :	Arséniate
Aso :	Arsénite oxydase
BLAST :	Basic Local Alignment Search Tool
CE-SSCP :	Capillary Electrophoresis - Single Strand Conformation Polymorphism
CODEHOP :	COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primers
Ct :	Threshold cycle (en français : cycle seuil)
DGGE :	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DMSO :	Diméthyle Sulfoxyde
dNTP :	desoxyribonucléotide triphosphate
EDTA :	éthylène diamine tétra-acétate
Fe :	Fer
HFO :	Oxydes de fer hydratés
kDa :	kilodalton
OTU :	Operational Taxonomic Unit
pb :	paires de bases
PCR :	Polymerase Chain Reaction
TEMED :	Tétra-méthyl-éthylènediamine
SAA :	Spectroscopie par Absorption Atomique

Liste des Figures

Figure 1 : Diagramme Eh-pH des espèces aqueuses d'As à 25°C et 1 bar de pression.....	5
Figure 2 : Distribution mondiale des cas de contamination d'As dans les eaux souterraines et dans l'environnement (d'après Smedley, 2001, http://www.bgs.ac.uk/).....	9
Figure 3 : Cycle global de l'As (adapté de Matschullat, 2000).....	11
Figure 4 : Spéciation de l'As dans une colonne d'eau du lac Mono (CA, USA) (à gauche) en fonction des groupes bactériens métabolisant l'As (à droite). Cycle de l'As dans la chimiocline (d'après Oremland et Stolz, 2003).....	14
Figure 5 : Libération de l'AsV par des bactéries FeIII-réductrices, telles que <i>Shewanella</i> spp. ou <i>Geobacter</i> spp. (a) et libération de l'AsIII et du FeII par des bactéries respirant le FeIII et l'AsV, telles que <i>Sulfurospirillum barnesii</i> (b) (d'après Oremland et Stolz, 2005).....	18
Figure 6 : Cycle et transport de l'As proposé par Polizzotto <i>et al.</i> (2006).....	19
Figure 7 : Libération de l'As adsorbé sur les surfaces d'oxy-hydroxydes de Fe ou d'Al par réduction de l'AsV en AsIII par des bactéries respirant l'AsV (d'après Oremland et Stolz, 2005).....	20
Figure 8 : Cycle biogéochimique de l'As (adapté de Nicholas <i>et al.</i> , 2003)	23
Figure 9 : Modèle de l'AsIII-oxydase hétérodimérique d' <i>A. faecalis</i> (d'après Silver et Phung, 2005a).	31
Figure 10 : Modèle conceptuel décrivant l'implication des protéines AoxS et AoxR dans la régulation de l'expression de l'opéron <i>aox</i> chez <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (d'après Kashyap <i>et al.</i> , 2006).....	33
Figure 11 : Diversité des gènes impliqués dans l'oxydation de l'AsIII (d'après Muller <i>et al.</i> , 2007)	34
Figure 12 : Modèle de l'AsV réductase respiratoire (d'après Silver et Phung, 2005a)	37
Figure 13 : Organisation moléculaire de la région comprenant l'opéron <i>arrAB</i> chez <i>Shewanella</i> sp. ANA-3 (d'après Silver et Phung, 2005a).	38
Figure 14 : Diversité des gènes impliqués dans la respiration de l'AsV.....	39
Figure 15 : Localisation cellulaire et fonction des composants du système Ars (d'après Silver et Phung, 2005a).	40
Figure 16 : Étapes de la méthylation de l'As inorganique (d'après Silver et Phung, 2005). ...	42
Figure 17 : Représentation schématique de l'arbre de la vie basée sur l'analyse de séquences de la petite sous-unité des ARN ribosomiaux (d'après López-Garcia et Moreira, 2008).....	47
Figure 18: Processus des différentes techniques moléculaires utilisées en microbiologie environnementale.....	52
Figure 19 : Localisation des deux sites d'études du bassin de la Meuse : le site « De plateaux-Hageven » et le site de Fémalle (d'après Joubert, 2008).	64
Figure 20 : Carte du bassin de l'Ebre et du sous-bassin du Gallégo. Plan d'échantillonnage. (Adapté de Joubert, 2008).....	65
Figure 21 : Localisation des échantillons prélevés dans le bassin amont du bassin de l'Isle. .	66
Figure 22 : Exemple de résultats issus de Block Maker à partir des neuf séquences AoxB....	75
Figure 23 : Représentation appelée « Logo » des neuf séquences protéiques AoxB sélectionnés (créé à l'aide du site http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi).	75
Figure 24 : Exemple d'amorces proposées par le programme CODEHOP et séquences d'acides aminés à partir desquelles elles ont été dessinées.	76

Figure 25 : Fixation du SYBR Green I à l'ADN double brin (d'après Poitras et Houde, 2002)	81
Figure 26 : Modèle graphique de la PCR en temps réel ou l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles.	82
Figure 27: Courbe de calibration réalisée à partir de dilutions décimales de plasmides contenant une copie de gène codant l'ARNr 16S.	83
Figure 28 : Phylogénie basée sur l'ARNr 16S des isolats AsIII-oxydants	92
Figure 29 : Position des amorces en fonction des motifs protéiques ciblés sur les séquences AoxB.	94
Figure 30 : Efficacité de l'amplification PCR d'un fragment du gène <i>aoxB</i> chez <i>Thiomonas</i> spp. avec différents couples d'amorces.	94
Figure 31 : Test de sensibilité du couple d'amorces m1-2F/m3-2R sur différentes concentrations d'ADN de <i>H. arsenicoxydans</i> .	95
Figure 32 : Amplifications obtenues à l'aide des couples d'amorces m1-2F/m2-1R (A) et m1-2F/m3-2R (B).	96
Figure 33 : DGGE des fragments <i>aoxB</i> amplifiés avec le couple d'amorces consensus m1-2F-ND/m2-1R-ND-GC.	98
Figure 34 : Courbe de calibration réalisée à partir de dilutions décimales des plasmides pT12RS-13, pYI025-5, pYI025-13 et pYI025-20.	100
Figure 35 : Courbes de fusions obtenues pour les produits PCR amplifiés de différentes quantités d'ADN génomiques de <i>H. arsenoxydans</i> et <i>T. arsenivorans</i> .	102
Figure 36 : Exemple de courbe d'amplification par PCR en temps réel (A) et courbes de fusion (B) obtenues à partir d'une dilution décimale de plasmide avec le couple d'amorces m1-2F/m2-1R.	102
Figure 37 : Courbe de calibration (A) et courbes de fusion (B) obtenues à partir d'une dilution décimale du plasmide pYI025-5 amplifié à l'aide du couple d'amorces m4-1F/m2-1R.	103
Figure 38 : Evolution du nombre de transitions (× et s) et de transversions (Δ et v) au sein des séquences <i>aoxB</i> en fonction de la distance génétique calculée selon Jukes et Cantor (1969).	107
Figure 39 : Alignement de 15 séquences protéiques AoxB et structure secondaire putative des AsIII-oxydases.	110
Figure 40 : Comparaison des arbres phylogénétiques Neighbor-Joining construits à partir de 32 séquences partielles nucléotidiques <i>aoxB</i> ou protéiques AoxB de bactéries AsIII-oxydantes.	112
Figure 41 : Comparaison des arbres phylogénétiques Neighbor-Joining construits à partir de 32 séquences protéiques AoxB partielles (350 acides aminés) et des séquences protéiques AoxB partielles (163 acides aminés) des bactéries AsIII-oxydantes.	114
Figure 42 : Arbre phylogénétique Neighbor-Joining construit à partir de 50 séquences protéiques AoxB (145 acides aminés) de 47 bactéries AsIII-oxydantes.	116
Figure 43 : Comparaison des arbres phylogénétiques Neighbor-Joining construits à partir de séquences protéiques AoxB partielles et de séquences des gènes codant l'ARNr 16S de bactéries AsIII-oxydantes	118
Figure 44 : Dendrogramme de similarité et profils DGGE des gènes <i>aoxB</i> amplifiés à partir des eaux du bassin de l'Isle.	123
Figure 45 : Arbre phylogénétique Neighbor-Joining des séquences protéiques AoxB issues des eaux du bassin de l'Isle.	129
Figure 46 : Taux d'oxydation d'1mM d'AsIII (a) ou réduction de 3,5 mM d'AsV (b) dans les enrichissements des sols D2, D3, T5R ou T12R en condition chimioautotrophe ou chimiohétérotrophe.	136

Figure 47 : Arbre phylogénétique Neighbor-Joining des séquences protéiques AoxB.	140
Figure 48 : Arbre phylogénétique Neighbor-Joining des séquences protéiques ArrA de l'enrichissement du sol T12R en condition chimiohétérotrophe AsV-réductrice.	143
Figure 49 : Dynamique de la communauté bactérienne totale du sol D2 en condition anaérobie en fonction du temps (A), comparée à celle de la libération de l'As (B).	149
Figure 50 : Arbre phylogénétique Neighbor-Joining des séquences AoxB issues du sol T12R incubé en condition aérobie (condition 6) au temps T14 (en rouge).....	151
Figure 51 : Concentrations en As total, AsIII et AsV après 28 jours d'incubation du sol T12R en condition aérobie (A) et anaérobie (B).	152
Figure 52 : Evolution du pH dans les tests aérobie du sol T12R.....	154
Figure 53 : Dynamiques des concentrations de Fe et d'As totales en solution dans les tests 6 et 8 du sol T12R en condition aérobie.....	156
Figure 54 : Structures des communautés bactériennes totales les tests 6 et 8 du sol T12R menées en condition aérobie.....	158
Figure 55 : Dynamique de la communauté bactérienne AsIII-oxydante des tests 6 et 8 du sol T12R en condition aérobie.....	159
Figure 56 : Arbre phylogénétique Neighbor-Joining des séquences protéiques AoxB dans le test 8 du sol T12R en condition aérobie après 28 jours d'incubation.....	161
Figure 57 : Evolution du pH et du Eh dans les tests anaérobies du sol T12R.....	165
Figure 58 : Dynamiques des concentrations de Fe et d'As totales en solution dans les tests 6 et 8 du sol T12R en condition anaérobie.	166
Figure 59 : Effet des processus bactériens anaérobies sur la mobilité de l'As dans des systèmes d'oxy-hydroxydes de Fe (d'après Herbel et Fendorf, 2006).....	166
Figure 60 : Structures des communautés bactériennes totales des tests 6 et 8 du sol T12R en condition anaérobie.....	167
Figure 61 : Arbre phylogénétique Neighbor-Joining des séquences protéiques ArrA des tests 6 et 8 du sol T12R en condition anaérobie après 28 jours d'incubation.....	169
Figure 62 : Valeurs initiales et finales des pH et Eh dans les incubations biotiques et abiotiques des sols G04, G05 et G07 en condition aérobie (A) et anaérobie (B)..	176
Figure 63 : Concentrations finales en As total, AsIII et AsV dans les incubations biotiques et abiotiques des sols G04, G05 et G07 en condition aérobie (A) et anaérobie (B)..	176
Figure 64 : Cinétiques des concentrations d'As total, AsIII et AsV dans les incubations en condition aérobie du sol G07 en condition 1, condition 2 et condition 3.....	179
Figure 65 : Evolution des pH et Eh dans les incubations du sol G07 en condition aérobie...	179
Figure 66 : Dynamique de la communauté bactérienne totale des suspensions de sol G07 en condition biotique et aérobie c1, c2 et c3 (A), comparée à celle de la solubilisation de l'As (B).	180
Figure 67 : Aspect des suspensions de sols G07 incubées en conditions anaérobie (A) et aérobie (B).	182
Figure 68 : Evolution des pH et Eh dans les incubations du sol G07 en condition anaérobie.	183
Figure 69 : Dynamiques des concentrations de Fe et d'As total dans les incubations du sol G07 en condition anaérobie.	184
Figure 70 : Dynamiques des concentrations en As total, AsIII et AsV dans les incubations en condition anaérobie du sol G07 en condition 1, condition 2 et condition 3.	187
Figure 71: Structures des communautés bactériennes totales du sol G07 des incubations anaérobie en condition c1, c2 et c3, après 28 jours d'incubations.	188
Figure 72 : Mécanismes bactériens impliqués dans la mobilité de l'As dans les sols étudiés	196

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques de l'As.....	3
Tableau 2 : Principaux minéraux arséniés dans l'environnement (d'après Smedley et Kinniburgh, 2002).....	4
Tableau 3 : Influence du pH sur l'adsorption de l'As sur différentes phases solides.	21
Tableau 4 : Influence des anions compétiteurs sur l'adsorption d'As sur des phases solides .	22
Tableau 5 : Principales études du rôle de la microflore indigène dans la mobilisation d'As ..	25
Tableau 6 : Diversité des <i>Bacteria</i> et <i>Archaea</i> oxydant l'AsIII.....	29
Tableau 7 : Comparaison des AsIII-oxydases (d'après Vanden Hoven et Santini, 2004).	30
Tableau 8 : Diversité des <i>Bacteria</i> et <i>Archaea</i> respirant l'AsV.	36
Tableau 9 : Comparaison des AsV réductases respiratoires	37
Tableau 10 : Cultivabilité déterminée comme le pourcentage de bactéries cultivables par rapport aux cellules totales comptées directement (d'après Amann <i>et al.</i> , 1995) ...	44
Tableau 11 : Comparaison de techniques d'empreintes moléculaires : Principe, avantages et inconvénients (adapté à partir de Muyzer <i>et al.</i> , 1999).	55
Tableau 12 : Caractéristiques des échantillons étudiés.	63
Tableau 13 : Description des souches bactériennes utilisées dans cette étude.....	67
Tableau 14 : Concentrations et spéciation de l'As adsorbé sur les oxy-hydroxydes de fer.....	68
Tableau 15 : Composition des incubations du sol T12R.....	69
Tableau 16 : Composition des incubations des sols G04, G05 et G07	70
Tableau 17 : Conditions d'enrichissements des échantillons de sols et/ou d'eaux étudiés.....	70
Tableau 18 : Séquences utilisées pour le dessin d'amorces ciblant les gènes <i>aoxB</i>	74
Tableau 19 : Séquence et source des amorces.....	78
Tableau 20 : Couples d'amorces et conditions opératoires.....	79
Tableau 21 : Mélange réactionnel type.	80
Tableau 22 : Programme PCR type.....	80
Tableau 23 : Mélange réactionnel utilisé en PCR en temps réel.....	84
Tableau 24 : Programme utilisé en PCR en temps réel.....	84
Tableau 25 : Composition des solutions formant le gel DGGE.....	86
Tableau 26 : Nombre de copies de gènes <i>aoxB</i> de <i>H. arsenicoxydans</i> et <i>T. arsenivorans</i> ajoutés dans les réactions et nombre de copies mesuré par PCR en temps réel. ...	101
Tableau 27 : Matrice d'identité des séquences <i>aoxB</i> et <i>AoxB</i> de bactéries AsIII-oxydantes	106
Tableau 28 : Nombre de copies de gènes <i>aoxB</i> et de gènes codant l'ARNr 16S dans les échantillons d'eau du bassin de l'Isle.	131
Tableau 29: Identification des séquences du gène codant l'ARNr 16S des clones sélectionnés à partir du profil CE-SSCP de l'enrichissement T12ROH.	142
Tableau 30: Identification des séquences du gène codant l'ARNr 16S des clones issus de l'enrichissement du sol T12R en condition chimiohétérotrophe AsV-réductrice.	145
Tableau 31: Principales caractéristiques de la phase aqueuse des incubations du sol T12R en condition aérobie aux temps initial (T0) et final (T28).	153
Tableau 32 : Principales caractéristiques de la phase aqueuse des incubations du sol T12R en condition anaérobie aux temps initial (T0) et final (T28).....	162
Tableau 33 : Principales caractéristiques de la phase aqueuse des incubations du sol G07 en condition aérobie aux temps initial (T0) et final (T28).	177
Tableau 34 : Principales caractéristiques de la phase aqueuse des incubations du sol G07 en condition anaérobie aux temps initial (T0) et final (T28).....	181

Introduction

L, arsenic (As) est un métalloïde présent en faible quantité dans la croûte terrestre, cependant il est retrouvé dans la plupart des compartiments environnementaux (sols, eau, air, sédiments). Sa présence dans les sols est issue du fond géochimique (altération de la roche mère et activité volcanique) et des activités anthropiques qui ont largement contribué à son accumulation et sa diffusion dans les autres compartiments (aquifères, eaux de surface...). Deux formes d'As inorganique solubles (l'arsénite ou AsIII, et l'arséniate ou AsV) sont particulièrement toxiques pour les systèmes biologiques. L'exposition chronique à ces deux formes d'As présentes dans les eaux est à l'origine de graves problèmes de santé publique. La concentration maximale admissible (CMA) d'As dans les eaux destinées à la consommation humaine a été fixée depuis 2003 en France à $10 \mu\text{g.l}^{-1}$.

Afin de prévenir les risques de pollution des eaux liées à l'As, il est important de connaître les processus biogéochimiques prépondérants impliqués dans le transfert de l'As du sol vers l'hydrosphère. De nombreux facteurs (physico-chimiques et biologiques) sont impliqués dans la spéciation et la mobilité de l'As dans les sols. Les principaux mécanismes biologiques des sols et des sédiments qui interviennent dans la remobilisation de l'As résultent d'activités bactériennes directes et indirectes.

Etant donné que la forme réduite, l'AsIII, est beaucoup plus mobile et plus toxique que la forme oxydée, l'AsV, les activités bactériennes de réduction et d'oxydation de l'As sont directement impliquées dans le transfert de ce polluant dans l'environnement. Ce transfert est également fortement conditionné par le cycle biogéochimique du fer (Fe). Les oxyhydroxydes de Fe représentent en effet un des principaux pièges minéralogiques pour l'As dans les sols et sédiments.

La caractérisation de la biodiversité fonctionnelles et des activités bactériennes constituent un point clé pour l'analyse de ces processus biogéochimiques. C'est dans ce cadre que s'inscrit ce travail de thèse. Les techniques mises en œuvre porteront principalement sur la recherche de gènes de fonction impliqués dans le cycle de l'As. Leur utilisation comme bioindicateurs de la mobilité de l'As sera également étudiée. Cet outil pourrait alors contribuer à une surveillance optimisée d'un sol ou d'un site contaminé.

Les principaux objectifs de cette thèse sont :

- d'améliorer les connaissances de la biodiversité des bactéries impliquées dans la mobilité de l'As,
- de rechercher les gènes et/ou enzymes bactériens impliqués dans sa spéciation afin de les utiliser comme outils prédictifs de la genèse de certaines formes d'As,
- de mettre en évidence des relations entre ces activités et les principales caractéristiques physico-chimiques du milieu (sols et/ou sédiments, eaux),
- d'identifier des bioindicateurs qualitatifs voire quantitatifs de ces activités dans l'objectif d'intégrer à terme ces connaissances dans l'élaboration de modèles biogéochimiques.

L'originalité de ce travail est le développement et l'identification de bioindicateurs (biodiversité, présence de gènes de fonctions...) qui permettent de prédire la mobilité potentielle de l'As et sa biodisponibilité dans différents milieux.

I. Synthèse bibliographique

I.1. L'arsenic

I.1.1. Propriétés et formes

L'arsenic (As) est un métalloïde appartenant au groupe Va de la classification périodique, comme l'azote (N), le phosphore (P), le bismuth (Bi) et l'antimoine (Sb). Ses propriétés sont intermédiaires entre celles des métaux et des métalloïdes. L'électronégativité trop élevée de cet élément ne lui permet pas d'appartenir aux métaux lourds (ces derniers ayant tendance à capter les électrons). Il est plutôt décrit comme un métalloïde lourd. Le Tableau 1 indique quelques propriétés physico-chimiques de l'As.

Symbole atomique	As
Numéro atomique	33
Masse atomique (g.mol ⁻¹)	74,9216
Configuration électronique	[Ar]3d ¹⁰ 4s ² 4p ³
Point de sublimation (°C)	603
Densité à 20°C (g.cm ⁻³)	5,73
Valence	-3, 0, +3 et +5
Rayon atomique (pm)	125

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques de l'As

L'As est un élément mobile existant sous quatre états d'oxydation différents dans l'environnement : (-III), (0), (+III) et (+V). Il peut se présenter sous formes inorganiques (combiné aux atomes d'oxygène ou de soufre, par exemple) ou organiques (combiné avec du carbone ou de l'hydrogène) et peut évoluer réversiblement d'une forme solide, liquide à gazeuse. Ces transformations sont principalement dépendantes du pH, du potentiel d'oxydoréduction (Eh), de l'activité biologique et du type et de la quantité de phases porteuses.

L'As est principalement rencontré dans l'environnement sous les deux formes inorganiques, l'arsénite (AsIII) et l'arséniate (AsV), présentant les degrés d'oxydation (+III) et (+V), respectivement. En effet, l'As élémentaire est rarement détecté et le degré d'oxydation -III n'est présent que dans les environnements très réducteurs (Cullen et Reimer, 1989). Les formes organiques, quant à elles, sont principalement retrouvées dans les organismes vivants.

L'As est le principal constituant de plus de 200 espèces minérales, parmi lesquelles 60% sont des arsénates, 20% sont des sulfures et des sulfosels et 20% incluent des arséniures, des arsénites, des oxydes et l'As élémentaire (O'Neill, 1990). A l'état naturel, l'As est un solide sous sa forme élémentaire. Mais, de part ces propriétés chalcophiles, il est généralement retrouvé, seul ou associé à divers minéraux, dans des composés soufrés. L'arsénopyrite (FeAsS) est le plus commun des minéraux arséniés primaires. Ce minéral est formé en condition réductrice suite à la formation de sulfures de Fe sur lesquels l'As coprécipite. L'orpiment (As₂S₃) peut être formé de manière biotique ou abiotique dans des eaux géothermales (Webster et Nordstrom, 2003) ou non géothermales (Newman *et al.*, 1997). L'oxydation de ces minéraux primaires soufrés aboutit à la libération de l'As, sous forme As^{III} et As^V, dans le milieu naturel. Selon les conditions bio-physico-chimiques (c.f. paragraphe I.3), l'As peut ensuite être piégé au sein de minéraux secondaires. Le tableau 2 indique les principaux minéraux arséniés primaires ou secondaires retrouvés dans l'environnement.

Minéraux	Composition	Origine
As natif	As	Veines hydrothermales
Niccolite	NiAs	Dépôts en veines et norites
Réalgar	AsS	Dépôts veines, souvent associés avec l'orpiment, aux argiles et aux calcaires et aussi aux dépôts provenant de sources chaudes
Orpiment	As ₂ S ₃	Veines hydrothermales, sources chaudes, produit de sublimation volcanique
Cobaltite	CoAsS	Dépôts à hautes températures, roches métamorphiques
Arsénopyrite	FeAsS	Le plus abondant des minéraux arséniés, dominant dans les veines minérales
Tennantite	(Cu, Fe) ₁₂ As ₄ S ₁₃	Veines hydrothermales
Enargite	Cu ₃ AsS ₄	Veines hydrothermales
Arsénolite	As ₂ O ₃	Minéral secondaire issu de l'oxydation de l'arsénopyrite, de l'As natif ou d'autres minéraux arséniés
Claudérite	As ₂ O ₃	Minéral secondaire issu de l'oxydation du réalgar, de l'arsénopyrite ou d'autres minéraux arséniés
Scorodite	FeAsO ₄ . 2H ₂ O	Minéral secondaire
Annabergite	(Ni, Co) ₃ (AsO ₄) ₂ .8H ₂ O	Minéral secondaire
Hoernesite	Mg ₃ (AsO ₄) ₂ .8H ₂ O	Minéral secondaire, déchets de fonderies
Haematolite	(Mn, Mg) ₄ Al(AsO ₄)(OH) ₈	-
Conichalcite	CaCu(AsO ₄)(OH)	Minéral secondaire
Pharmacosidérite	Fe ₃ (AsO ₄) ₂ (OH) ₃ .5H ₂ O	Produit de l'oxydation de l'arsénopyrite et d'autres minéraux arséniés

Tableau 2 : Principaux minéraux arséniés dans l'environnement (d'après Smedley et Kinniburgh, 2002)

Les principales espèces d'As présentes dans les eaux sont des oxyanions ou des composés neutres inorganiques. Leur distribution en fonction des paramètres pH et Eh contrôlant la spéciation de l'As, est indiquée Figure 1. En condition oxydante, l'As inorganique est prédominant sous forme d'AsV. L' H_2AsO_4^- est l'espèce la plus stable entre les pH 2 et 7, contrairement à l' HAsO_4^{2-} , l'espèce la plus stable au-delà de pH 7. En condition réductrice modérée (Eh < 100), l'AsV peut être réduit en AsIII. L' H_3AsO_3^0 est l'espèce prédominante dans une gamme de pH compris entre 0 et 9. La forme ionisée de l'AsIII, H_2AsO_3^- , est présente seulement aux pH supérieurs à 9,2.

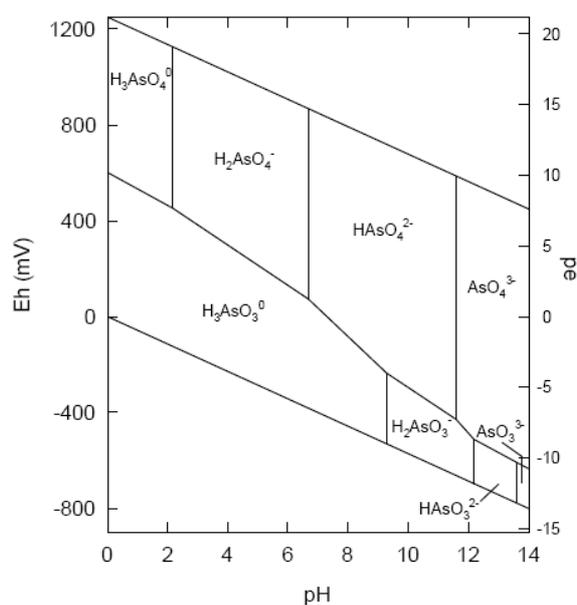


Figure 1 : Diagramme Eh-pH des espèces aqueuses d'As à 25°C et 1 bar de pression

L'AsIII et l'AsV coexistent généralement dans les sols ou les milieux aquatiques car les cinétiques de transformations redox de l'As sont relativement lentes (Masscheleyn *et al.*, 1991 ; Smedley et Kinniburgh, 2002). Néanmoins, le ratio AsIII/AsV augmente avec la diminution du Eh causée par la saturation de l'eau ou les conditions anoxiques (Weerasooriya *et al.*, 2003). En condition réductrice, des espèces solubles de sulfures d'AsIII, les thioarsénites, peuvent représenter la majorité des espèces d'As, en présence de concentrations élevées de sulfures et en absence de Fe (Wilkin *et al.*, 2003). Elles représentent une fraction majoritaire de l'As réduit dans la zone anoxique du lac Mono (CA, USA) (Hollibaugh *et al.*, 2005). Ces espèces aqueuses sont peu connues car elles précipitent rapidement et les formes solides de sulfures d'As sont assez insolubles. La stœchiométrie exacte des formes de thio-AsIII est controversée, mais les espèces les plus importantes sont probablement $\text{As}(\text{OH})(\text{SH})_2^0$ et ses deux formes déprotonées ainsi que $\text{As}(\text{OH})_2(\text{SH})_2^0$ et sa forme déprotonée, bien que d'autres

espèces avec seulement un ligand soufre (-S) ou un thiol (-SH) ont été proposées (Nordstrom et Archer, 2003 ; Wilkin *et al.*, 2003). En condition d'anoxie maximale, l'AsV et l'AsIII peuvent être volatilisés en arsine (AsH₃), un gaz extrêmement toxique (Cullen et Reimer, 1989).

L'arsine et les formes inorganiques AsIII et AsV sont connues pour être converties, dans différents compartiments environnementaux, en composés organiques méthylés par des processus biochimiques (Cullen *et al.*, 1989). Les espèces méthylées pentavalentes et trivalentes coexistent dans les sols, sédiments et eaux. Cependant, les espèces pentavalentes, telles que les acides monométhylarsonique (MMAsV), diméthylarsinique (DMAsV) et l'oxyde de triméthylarsine (TMAO), sont plus largement retrouvées que les espèces trivalentes, telles que l'acide monométhylarsineux (MMAsIII) et l'acide diméthylarsineux (DMAsIII), qui ont tendance à être rapidement oxydées (Abdullah *et al.*, 1995). Les méthylation successives de l'arsine conduisent à la formation des espèces très volatiles de monométhylarsine (MMA), le diméthylarsine (DMA) et le triméthylarsine (TMA). Des composés arséniés plus complexes (sucres et lipides arséniés, arsénobétaïne et arsénocholine) sont métabolisés par des organismes marins. La transformation de l'As inorganique en composés lipo-solubles est considérée comme un mécanisme adaptatif du phytoplancton marin pour compenser une limitation de la biodisponibilité du nitrate dans le milieu. L'arsénobétaïne est le composé arsénié organique majeur isolé d'un organisme marin et peut être dégradé en acides méthylarsoniques ou en acides inorganiques (Mukhopadhyay *et al.*, 2002).

1.1.2. Toxicité

La toxicité de l'As dépend de sa forme chimique, de son degré d'oxydation et donc de sa biodisponibilité, *i.e.* sa capacité à être libéré dans les différents compartiments environnementaux et atteindre les organes cible de l'hôte (Caussy, 2003).

A l'exception de l'arsine (AsH₃), considérée comme la plus toxique des formes d'As, les formes inorganiques ont pendant longtemps été considérées comme plus toxiques que les formes organiques. Parmi les formes inorganiques, la toxicité de l'AsIII est considérée comme 10 à 60 fois plus élevée que celle de l'AsV. Cependant, depuis quelques années, différentes études ont montré que les espèces méthylées pouvaient être plus toxiques que les

formes inorganiques, et plus particulièrement les formes méthylées d'AsIII (MMAsIII et DMAsIII) considérées comme plus toxiques que l'AsIII (Lin *et al.*, 1999 ; Thomas *et al.*, 2001 ; Dopp *et al.*, 2004 ; Hirano *et al.*, 2004 ; Drobna *et al.*, 2008). Dopp (2008) indique que le DMAsIII induit les effets cytotoxiques et génotoxiques les plus élevés. L'ensemble de ces études montrent que la méthylation n'est plus seulement un mécanisme de détoxication, mais peut également être considérée comme un mécanisme d'activation (Thomas *et al.*, 2001). Dans ce sens, Hirano *et al.* (2004) ont proposé l'ordre de toxicité des espèces arséniées suivant : DMAsIII ; MMAsIII > AsIII > AsV > DMAsV ; MMAsV > TMAO.

Chaque forme d'As présente des propriétés physico-chimiques différentes et donc des mécanismes de toxicité différents. L'AsV, un analogue structural du phosphate, entre dans la cellule *via* les systèmes de transport du phosphate, inhibant les processus de phosphorylation. Cette forme peut donc perturber la synthèse d'ATP et inhiber la glycolyse. L'AsIII entre dans la cellule *via* des aquaglycéroporines (les protéines de transport du glycérol et d'autres petites molécules non chargées) et est plus toxique car elle se fixe sur les composés sulfhydriles constitutifs de nombreuses protéines ou enzymes (telles que la pyruvate déshydrogénase et la 2-oxoglutarate déshydrogénase, enzymes clés du cycle de Krebs). Les composés arséniés méthylés d'AsIII (MMAsIII et DMAsIII) sont cytotoxiques et génotoxiques et sont de plus puissants inhibiteurs des activités enzymatiques que l'AsIII (Rossman, 2003). Le mode de toxicité le plus commun d'un élément est l'inactivation des systèmes enzymatiques. N'interagissant pas avec les sites actifs des enzymes, l'AsV exerce cet effet toxique lorsqu'il est réduit en AsIII. Reconnue comme une substance cancérigène, des recherches ont néanmoins démontré l'efficacité de l'AsIII pour le traitement d'une forme rare de leucémie (Antman, 2001).

La toxicité de l'As est également dépendante de son état physique, de son mode d'absorption et d'élimination, de la dose ingérée ainsi que de la durée d'exposition.

L'As pénètre dans notre organisme sous formes inorganiques et organiques, principalement par la voie orale, au travers de la nourriture et de la consommation d'eau. Il se distribue ensuite dans tous les organes. Chez de nombreux organismes vivants, dont l'homme, les différentes formes d'As sont métabolisées par méthylation puis excrétées dans les urines. Les espèces organiques sont éliminées plus rapidement que les espèces inorganiques. L'arsénobétaïne est absorbée et éliminée telle quelle. Une exposition aiguë à l'As va entraîner des symptômes immédiats comme des vomissements, des douleurs œsophagiennes et

abdominales et des diarrhées sanguinolentes. L'As se retrouva alors dans le tube digestif, le foie et les reins. Par contre, une exposition chronique à l'As inorganique, au travers de la consommation d'eau riche en As, est à l'origine de diverses maladies et va toucher toutes les parties du corps entraînant des problèmes de peau (dépigmentation et apparition de plaques rugueuses sur la paume des mains et la plante des pieds), des cancers de la peau, de la vessie, des reins et des poumons, des maladies des vaisseaux sanguins des jambes et des pieds (conduisant à la gangrène et connue sous le nom de « maladie du pied noir »), du diabète et des troubles de la reproduction. Les premiers symptômes peuvent apparaître après 5 à 10 ans d'exposition. Cependant les symptômes, provoqués par l'As, ne semblent pas seulement dus à la dose ingérée, car ils diffèrent selon les individus, les groupes de population et les zones géographiques considérées. Ils semblent être également influencés par l'âge, le sexe, le régime alimentaire et le patrimoine génétique.

Les pays les plus touchés par le problème de pollution de l'As (notamment inorganique car prévalent dans l'eau) sont indiqués Figure 2. Le cas le plus préoccupant est le Bangladesh où près de 50 millions de personnes sont exposées par l'eau qu'elles consomment qui peut contenir jusqu'à $1000 \mu\text{g.l}^{-1}$ d'As. L'humanité n'avait jamais connu une telle intoxication généralisée. Si des moyens ne sont mis en œuvre pour pourvoir ces régions en eau potable, l'empoisonnement par l'eau arséniée pourrait rapidement devenir la première cause de mortalité du pays (OMS, 2001).

En France, la concentration maximale admissible dans l'eau de boisson (limite de qualité) est de $10 \mu\text{g.l}^{-1}$. Cette valeur guide de l'OMS a été reprise en droit européen, par la directive 98/83/CE du 3 novembre 1998, puis transposée en droit français, *via* le décret 2001-1220 du 20 décembre 2001, codifié en 2003 dans le code de la santé publique.

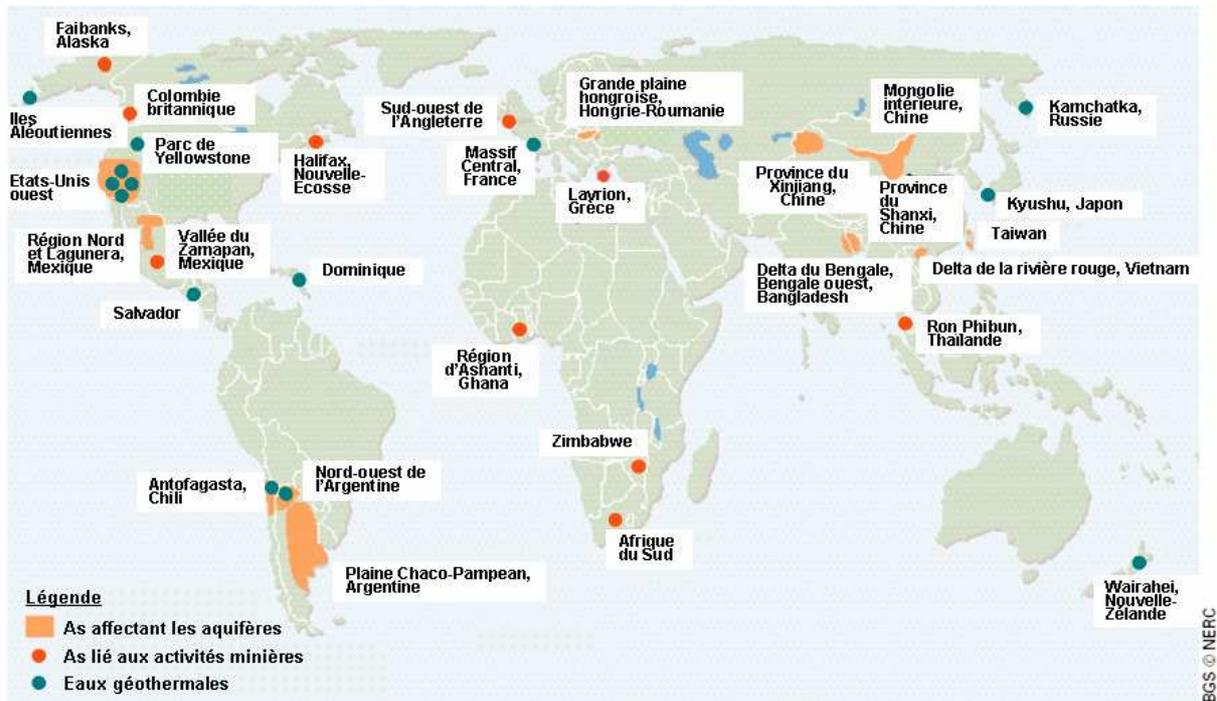


Figure 2 : Distribution mondiale des cas de contamination d'As dans les eaux souterraines et dans l'environnement (d'après Smedley, 2001, <http://www.bgs.ac.uk/>)

I.2. Sources et distribution

L'As peut pénétrer dans les différents compartiments environnementaux (air, eau, sol et sédiments et organismes vivants) aussi bien par des voies naturelles que par des processus d'origine anthropique.

I.2.1. Sources naturelles et anthropiques

Sources naturelles

L'As est le 20^{ème} élément le plus abondant dans la croûte terrestre, où sa concentration varie entre 2 et 5 mg.kg⁻¹. Il est largement répandu dans les roches, sous formes de minerais (c.f. paragraphe I.1.1) : elles renferment 99% de l'As total dans l'environnement (Bhumba et Keefer, 1994). Les teneurs en As géogène ou biogène peuvent atteindre plusieurs centaines de mg.kg⁻¹ dans certains minéraux communs et plusieurs centaines de pourcents dans les minéralisations. Les roches sédimentaires sont plus riches en As que les roches ignées. Les teneurs moyennes contenues dans les différents types de roches ignées montrent généralement peu de variations et sont comprises entre 1 et 4,3 mg.kg⁻¹ (concentrations équivalentes à celles rencontrées dans la croûte terrestre). Les roches métamorphiques présentent des

concentrations variant entre 1,1 et 18,1 mg.kg⁻¹. Les roches sédimentaires argileuses, quant à elles, montrent des concentrations plus élevées et plus variables (comprises entre 2,6 et 33,7 mg.kg⁻¹), expliquant les variations d'As retrouvées dans les milieux naturels (Boyle et Jonasson, 1973).

L'altération naturelle de ces roches renfermant de l'As entraîne une redistribution de cet élément vers les autres compartiments environnementaux. D'importantes quantités d'As sont libérées par les éruptions volcaniques, les sources thermales et les fumées dues aux feux de forêt. Environ un tiers de l'As dans l'atmosphère provient de sources naturelles, et le reste résulte de sources anthropiques.

Sources anthropiques

Les activités anthropiques contribuent également à accumuler de fortes concentrations d'As dans les compartiments environnementaux. L'As anthropogène est principalement libéré lors des activités agricoles, industrielles et minières.

Les activités agricoles, notamment les vignes, les vergers et les cultures maraîchères intensives, ont largement utilisé des pesticides sous formes d'AsV (*e.g.* arséniate de plomb) et d'AsIII (*e.g.* arsénite de calcium). Depuis l'introduction des pesticides organochlorés puis organophosphorés (entre les années 1940 et 1970), leur utilisation a beaucoup diminué. Ces produits sont maintenant interdits en France (novembre 2001 pour l'arsénite de sodium), mais l'As reste utilisé sous forme de diméthylarsinate de sodium dans les insecticides. L'As est également utilisé en complément alimentaire, sous forme organique (molécule Roxarsone), pour augmenter la croissance et améliorer la pigmentation des poulets. Excrétée, cette forme d'As se retrouve dans le fumier, où elle y est dégradée en As inorganique (Garbarino *et al.*, 2003). L'épandage du fumier de poulet contribue donc également à la pollution en As de certaines régions agricoles. L'utilisation de la Roxarsone est interdite en Union Européenne.

Les activités minières sont une source significative d'apport d'As dans l'environnement. L'As est présent à de fortes proportions dans des minéraux porteurs de métaux communément exploités, tels que le Cu, le Ni, le Co, le Pb, Ag, Au. Pendant l'extraction minière de ces éléments, l'As est mobilisé sous forme gazeuse ou solide en tant que produit secondaire et peut alors pénétrer dans un autre compartiment environnemental.

La nature récalcitrante des déchets miniers a conduit à la persistance de la pollution. Certains sites miniers fermés depuis 75 ans génèrent toujours des contaminations dans les rivières qui peuvent atteindre près de $200 \mu\text{g.l}^{-1}$. En France, l'exemple le plus connu de pollution historique est celui de Salsigne dans l'Aude.

Les activités industrielles contribuent également fortement à la libération d'As dans la nature. L'As est très utile dans les industries sidérurgiques, chimiques, pharmaceutiques et phytosanitaires, ainsi que dans celles du bois, du cuir, du verre, des peintures, de l'électronique et de l'armement. Ces industries produisent surtout de l'oxyde d'AsIII (As_2O_3). Les contaminations localisées près des fonderies de métaux indiquent que la plus grande partie de l'As contenu dans les fumées est recueillie rapidement sous forme de retombées sèches et dans les précipitations. Mélangé avec du cuivre et du chrome (CCA), l'AsV est également utilisé pour traiter et conserver le bois. Des niveaux élevés d'As sont retrouvés dans les sols entourant les bois traités (Zagury *et al.*, 2003). Bien que controversé, ce traitement reste autorisé et l'As peut ainsi se retrouver dans les matériaux des aires de jeux des enfants. La teneur en As dans le charbon varie entre 1 mg.kg^{-1} et plus de 10 g.kg^{-1} (Lombi *et al.*, 2006). L'utilisation de ce combustible dans les centrales thermiques entraîne un apport supplémentaire d'As dans l'environnement. Les cendres résultant de la calcination contiennent des teneurs en As variant entre 2 et 82 mg.kg^{-1} .

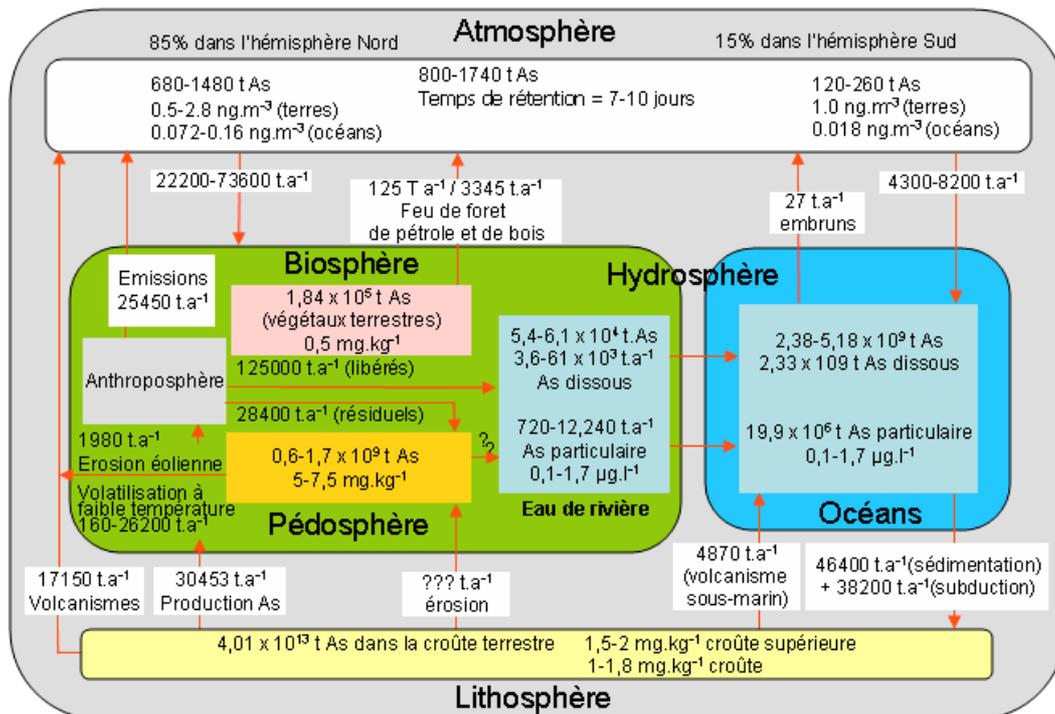


Figure 3 : Cycle global de l'As (adapté de Matschullat, 2000)

I.2.2. Distribution dans les compartiments environnementaux

Pédosphère

Tous les sols contiennent de l'As, même ceux n'ayant pas subi d'apport exogène des activités anthropiques. Il s'agit de teneurs naturelles qualifiées de « bruit de fond ». Des concentrations d'As différentes sont rapportées dans la littérature, car elles varient considérablement selon les régions géographiques considérées, en général entre 0,1 et 40 mg.kg⁻¹ avec une moyenne de 6 mg.kg⁻¹ (Mandal et Suzuki, 2002). Les concentrations les plus faibles sont associées à des sols sableux et dérivant de roches granitiques, alors que les plus élevées sont retrouvées dans des sols alluviaux ou des tourbières riches en matières organiques susceptibles d'adsorber l'As. En Europe, les concentrations les plus élevées sont retrouvées le long de la chaîne hercynienne : des Cornouailles en Bretagne jusqu'au Poitou, le Massif central, les Vosges, la Galice et le Portugal. Des anomalies ont également été détectées en Croatie, Slovénie et jusqu'au sud de la Hongrie et dans certains bassins secondaires (Londres, Lorraine, Nord du Piémont Pyrénéen, Ebre). En France, grâce aux travaux de prospection minière (l'As étant un indicateur de l'occurrence de différents métaux auxquels il est associé, tels que l'or), de très nombreuses données sont disponibles sur l'abondance de l'As dans les sols. Elles indiquent des teneurs comprises entre 2 mg.kg⁻¹ (fond géochimique) et plus de 1000 mg.kg⁻¹ (anomalies géochimiques) (Barbier, 2001).

Comme pour les sols, les teneurs d'As dans les sédiments varient considérablement à travers le monde et les teneurs naturelles moyennes sont de 10 mg.kg⁻¹ (Mandal et Suzuki, 2002).

L'As existe dans les sols soit adsorbé sur des phases solides minérales ou organiques, soit sous forme de minéraux arséniés secondaires (c.f. paragraphe I.1.1). Il provient principalement de l'altération des roches contenant cet élément. Néanmoins, l'usage de pesticides arséniés, les retombés atmosphériques de cendres ou les dépôts de déchets miniers contribuent également à son accumulation. L'As a tendance à résider longtemps dans les sols car les pertes par ruissellement, absorption racinaire ou volatilisation sont des processus très lents (Chilvers et Peterson, 1987). Néanmoins, un climat humide va favoriser l'entraînement de l'As par l'eau de percolation et réduire les teneurs d'As dans les sols. Au contraire, un climat sec va stabiliser les composés arséniés et conduire à des teneurs plus élevées d'As dans ces sols (Yan-Chu, 1994).

Hydrosphère

A l'échelle mondiale, de faibles concentrations d'As sont généralement détectées dans les eaux. Néanmoins, elles peuvent varier de $0,02 \mu\text{g.l}^{-1}$ à plus de 5 mg.l^{-1} , selon les régions géographiques considérées (Smedley et Kinniburgh, 2002), en fonction de la géologie locale, de l'hydrogéologie, des caractéristiques géochimiques de l'aquifère, des changements climatiques aussi bien que des activités humaines. Les sources naturelles de l'As dans l'eau sont attribuées à de nombreux processus biogéochimiques naturels, incluant l'oxydation des sulfures porteurs d'As, la désorption de l'As à partir d'oxy-hydroxydes de Fe, d'Al et de Mn, la réduction dissolutive d'oxy-hydroxydes de Fe piégeant l'As, la libération d'As à partir d'eaux géothermales, la concentration évaporatoire aussi bien que la libération de l'As des sulfures par les carbonates (Kim *et al.*, 2000) (c.f. paragraphe I.3).

Dans les eaux de rivières, les concentrations d'As de base sont assez faibles (de $0,1$ à $3,6 \mu\text{g.l}^{-1}$). Elles varient en fonction de la composition des recharges de surface, du débit, de la lithologie traversée et du climat. Les plus faibles concentrations ont été retrouvées dans des rivières drainant un lit de roches pauvres en As, *e.g.* calcaire karstique (Seyler et Martin, 1991). Tandis que des teneurs naturellement élevées en As peuvent être détectées dans des régions influencées par les entrées d'eaux géothermales ou souterraines. Nimick *et al.* (1998) ont retrouvé plus de $370 \mu\text{g.l}^{-1}$ d'As dans la rivière Madison (Parc national du Yellowstone, USA), affectée par des entrées d'eaux géothermales. Des teneurs d'As naturellement élevées ont également été retrouvées dans quelques rivières de régions arides, où les eaux de surfaces sont majoritairement celles en contact direct avec les roches du lit de la rivière et présentent une salinité et une alcalinité élevées. Des teneurs en As variant de 190 à $21800 \mu\text{g.l}^{-1}$ ont été détectées et attribuées au phénomène d'évaporation dans la rivière Loa (nord du Chili) (Caceres *et al.*, 1992). Les activités minières influencent également les niveaux d'As dans les eaux de rivières. Des concentrations variant entre 3 et $800 \mu\text{g.l}^{-1}$ ont été retrouvées dans la rivière Tinto en Espagne (Sanchez-Rodas *et al.*, 2005). Elles ont atteint 5000 à $10000 \mu\text{g.l}^{-1}$ ($300 \mu\text{g.l}^{-1}$ en moyenne) dans la rivière Ashanti au Ghana (Smedley *et al.*, 1996).

D'importantes variations d'As ont été remarquées dans les eaux de rivières en fonction des saisons, avec des valeurs maximales en été (Masson *et al.*, 2006 ; McLaren et Kim, 1995). Elles sont souvent liées aux débits des rivières (plus faibles en été et plus élevés en hiver). L'augmentation de la température des eaux en été influence également la mobilité de l'As, en

favorisant le développement de microorganismes capables de dissoudre les phases porteuses d'As et/ou de réduire l'AsV en AsIII, plus mobile. Baeyens *et al.* (2007) ont également mis en évidence une augmentation du ratio AsIII/AsV le long de la rivière Zenne (Belgique), affectée par des effluents industriels et urbains, concomitante à une diminution d'O₂ dissous et ont observé une corrélation entre les pourcentages d'As et de Fe dissous.

Dans les eaux de lacs, les concentrations d'As sont similaires ou plus faibles que celles retrouvées dans les eaux de rivières. Comme dans ces dernières, l'augmentation de la concentration de l'As dans ces eaux est principalement affectée par les eaux géothermales, les phénomènes d'évaporation et les activités minières. Ascue et Nriagu (1995) ont mis en évidence une stratification des concentrations d'As dans le lac Moira (Ontario, Canada), avec une augmentation des concentrations d'As avec la profondeur, probablement à cause de l'augmentation du ratio AsIII/AsV. Les teneurs d'As sont plus élevées en été avec une majorité d'AsIII et les fortes concentrations au fond du lac sont liées à la diminution du niveau d'O₂ et à l'activité microbienne. Les eaux du lac Mono (CA, USA) présentent des concentrations d'As dissous comprises entre 10 et 20 mg.l⁻¹, avec des pH de 9,5 à 10. Malgré ces conditions extrêmes, une importante activité microbienne capable de transformer l'As a été mise en évidence (Figure 4).

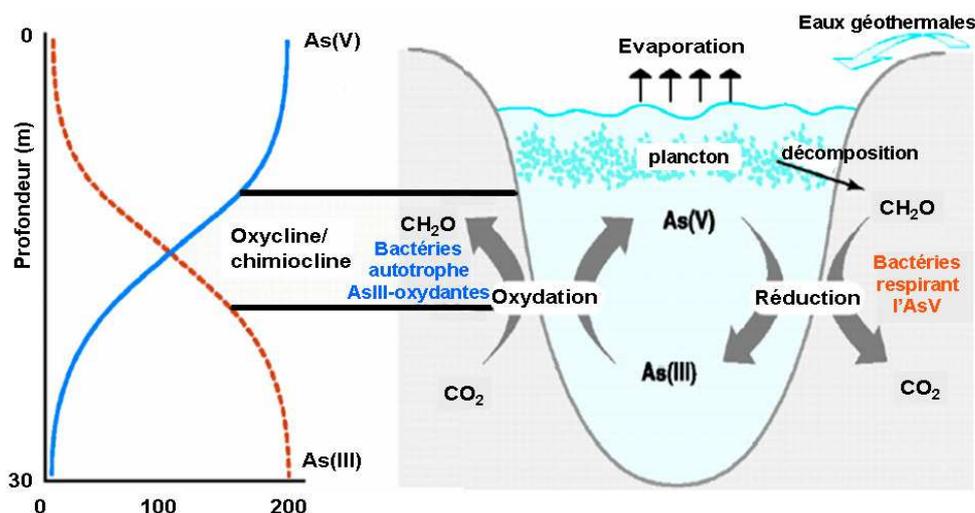


Figure 4 : Spéciation de l'As dans une colonne d'eau du lac Mono (CA, USA) (à gauche) en fonction des groupes bactériens métabolisant l'As (à droite). Cycle de l'As dans la chimiocline. La réduction de l'AsV est réalisée par des bactéries respirant l'AsV et utilisant la matière organique du plancton. L'oxydation de l'AsIII (en condition aérobie ou anaérobie) est réalisée par des bactéries chimioautotrophes oxydant l'AsIII qui contribuent à la production secondaire en fixant le CO₂ dans la matière organique. L'As dans ce lac alcalin (pH = 9,8) et salin (90 g.l⁻¹) provient des eaux géothermales. Les processus d'évaporation favorisent l'élévation des concentrations en As (d'après Oremland et Stolz, 2003).

Dans les eaux souterraines, les concentrations d'As sont inférieures à $10 \mu\text{g.l}^{-1}$ dans la plupart des pays. Cependant les valeurs données dans la littérature varient de moins de 0,5 à $5000 \mu\text{g.l}^{-1}$. Les fortes concentrations d'As dans les eaux souterraines proviennent principalement de sources naturelles et résultent de processus biogéochimiques (Villaescusa et Bollinger, 2008). Celles attribuées aux activités minières sont plus localisées, tandis que celles induites par les activités industrielles sont plus rares. Des concentrations élevées ont été retrouvées à Taiwan, en Argentine, au Chili, en Chine, en Inde dans l'ouest du Bengale et au Bangladesh (Figure 2) avec des concentrations variant entre 0,003 et 3700mg.l^{-1} (Dhar *et al.*, 1997 ; Mandal et Suzuki, 2002). Au Bangladesh, l'As provient probablement des sources himalayennes du Gange et du Brahmapoutre. Les alluvions dans cette région du globe étant plus épaisses et plus étendues que partout ailleurs, les eaux souterraines mettent des centaines ou des milliers d'années à filtrer à travers ces dépôts avant de rejoindre la mer. Durant tout ce temps, elles s'imprègnent de l'As présent (Smedley et Kinniburgh, 2002).

Dans l'eau de mer, les concentrations moyennes en As sont d'environ $1,5 \mu\text{g.l}^{-1}$. Les teneurs dans les eaux d'estuaires sont plus variables, car influencées par les entrées d'eaux de rivières, la salinité et les gradients redox, mais sont généralement faibles, moins de $4 \mu\text{g.l}^{-1}$.

Atmosphère

De très faibles teneurs en As sont généralement mesurées dans l'air ($<2 \text{ng.m}^{-3}$), mais elles peuvent varier entre $0,005 \text{ng.m}^{-3}$ à $1 \mu\text{g.m}^{-3}$ selon les régions géographiques. En Europe, les teneurs se situent généralement entre 0,2 et $1,5 \text{ng.m}^{-3}$ dans les campagnes, entre 0,5 et 3ng.m^{-3} en ville et n'excèdent pas les 0,5 et 3ng.m^{-3} dans les zones industrielles. L'As dans l'air se présente sous forme particulaire, généralement un mélange d'AsIII et d'AsV, avec des espèces organiques qui sont d'importances plus ou moins négligeables selon les régions (Mandal et Suzuki, 2002). Il provient principalement des activités volcaniques et industrielles, mais aussi de l'érosion naturelle et de la volatilisation microbienne.

Biosphère

L'As peut s'accumuler dans les tissus des organismes vivants. La plupart de ces organismes, y compris l'homme, présente des concentrations inférieures à 1mg.kg^{-1} (Hindmarsh et McCurdy, 1986). Chez l'homme, l'As s'accumule principalement dans les ongles et les cheveux. Ces tissus peuvent parfois présenter des concentrations plus élevées.

Les crustacés et les mollusques peuvent accumuler des concentrations d'As compris entre 0,005 et 0,3 mg.kg⁻¹. Néanmoins, certains mollusques peuvent contenir plus de 100 mg.kg⁻¹. La concentration d'As dans une plante dépend presque uniquement de la quantité d'As à laquelle elle est exposée. Cette concentration varie généralement entre 0,01 et 5 mg.kg⁻¹ (Mandal et Suzuki, 2002). Néanmoins, de nombreuses études ont montré les capacités accumulatrices d'As chez les fougères du genre *Pteris* (Ma *et al.*, 2001 ; Zhao *et al.*, 2002 ; Srivastava *et al.*, 2006). *Pteris vittata*, découverte sur un site contaminé par du bois de construction traité au CCA (Komar *et al.*, 1998), est capable de tolérer des concentrations d'As plus élevées que 1500 mg.kg⁻¹ dans un sol et sa concentration en As peut atteindre plus de 2,3% (Ma *et al.*, 2001). Ces aptitudes peuvent être utilisées en phytoremédiation, méthode d'élimination d'un toxique présent dans le sol grâce à une plante.

I.3. Principaux mécanismes de mobilité de l'arsenic dans l'environnement

La mobilité de l'As dans l'environnement est dépendante de sa forme et de sa spéciation. Elle est également dépendante de son interaction avec les phases minérales. Les réactions d'adsorption/désorption, précipitation/dissolution et la volatilisation contrôlent la mobilité de l'As dans l'environnement. Ces réactions sont influencées par :

- la caractéristique des phases solides fixant l'As (surface spécifique, charge de surface, changements structuraux de la phase solide)
- la chimie de la phase aqueuse (pH, potentiel redox, présence d'anions compétiteurs)
- les organismes vivants présents (principalement les microorganismes)

La volatilisation de l'As est principalement le résultat de la formation d'arsine et de ces dérivés méthylés volatiles par des microorganismes (Tamaki et Frankenberger, 1992). La méthylation microbienne de l'As sera détaillée au paragraphe I.4.3.

Différentes phases minérales, telles que les sulfures, les oxydes et hydroxydes de Fe, d'aluminium (Al) et de manganèse (Mn), les argiles et/ou les carbonates de calcium (calcite), présentes dans les sols, sédiments et aquifères sont susceptibles de piéger l'As.

I.3.1. Réactions de (co-)précipitation/dissolution

L'As est initialement présent dans la nature sous une forme réduite minérale comme l'arsénopyrite (FeAsS), l'orpiment (As₂S₃) et le réalgar (AsS) (c.f. I.1.1). La dissolution de ces sulfures d'As par oxydation *via* l'O₂, mais également le NO₃⁻, entraîne une libération d'As dans la phase aqueuse. Les microorganismes favorisent ces réactions d'oxydation en condition acide. En effet, le soufre élémentaire (S⁰) ou les ions sulfures (S²⁻) peuvent être convertis en acide sulfurique (H₂SO₄) par des bactéries chimolithotrophes acidophiles sulfo-oxydantes comme *Acidithiobacillus thiooxidans* (autrefois *Thiobacillus thiooxidans*) (Waksman et Joffe, 1922 ; Kelly et Wood, 2000) ou *Acidithiobacillus ferrooxidans* (autrefois *Thiobacillus ferrooxidans*). Cette dernière est également capable d'oxyder le FeII en FeIII. D'autres bactéries FeII-oxydantes sont également capables de provoquer ou d'accélérer une oxydation de Fe en condition aérobie, notamment celles appartenant aux genres *Leptothrix* et *Leptospirillum*. Elles contribuent à la formation d'oxydes de Fe hydratés (HFO). En condition abiotique, ces précipités sont capables d'oxyder partiellement voire totalement l'AsIII en AsV. L'oxydation de l'AsIII en AsV est également réalisée par de nombreuses bactéries décrites dans le paragraphe I.4.1. Récemment, Rhine *et al.* (2008) ont montré que la bactérie AsIII- et sulfo-oxydante *Bosea* sp. WAO améliore la libération de l'As à partir de l'arsénopyrite et ont émis l'hypothèse qu'elle puisse oxyder directement l'AsIII du minéral.

L'As libéré des minéraux primaires peut ensuite être piégé à la surface de phases porteuses et former des minéraux secondaires. Les oxydes de Fe sont ubiquitaires sur la surface de la terre, le Fe étant le quatrième constituant de la croûte terrestre et jouent un rôle important dans le contrôle de la concentration d'As dissous.

En condition acide et oxydante avec de fortes concentrations d'As dissous, l'As peut précipiter abiotiquement en scorodite, FeAsO₄.2H₂O, un arséniate de Fe cristallisé (Dove et Rimstidt, 1985). Cependant, si le pH diminue encore ces phases minérales se solubiliseront.

Récemment, Drewniak *et al.* (2008) ont montré que certaines bactéries résistantes à l'AsV (c.f. paragraphe I.4.3) produisent des sidérophores qui les aident à obtenir le FeIII à partir de phases porteuses minérales, telles que la scorodite. L'AsV libéré est ensuite réduit en AsIII.

En conditions réductrices, la réduction dissolutive des oxydes de Fe, sur lesquels l'As se fixe fortement, participe à la libération d'As dans le milieu aqueux. De nombreuses bactéries sont capables de réduire les ions Fe(III) insolubles. Elles sont majoritairement neutrophiles et se divisent en trois groupes : les fermentaires, les non fermentaires et les sulfato-réductrices. La bactérie *Shewanella alga* BrY est capable de libérer l'As(V) à partir de la scorodite après respiration des ions Fe(III) (Cummings *et al.*, 1999) (Figure 5A). *Sulfurospirillum barneseii* SES-3 est capable de réduire en même temps l'As(V) et le Fe(III), réalisant une rapide solubilisation de l'As par réduction des oxydes de Fe(III) et diminuant la capacité de sorption par ces oxydes (Zobrist *et al.*, 2000) (Figure 5B).

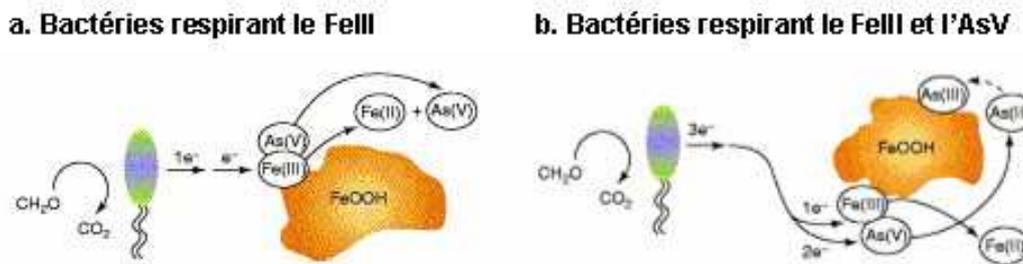


Figure 5 : Libération de l'AsV par des bactéries Fe(III)-réductrices, telles que *Shewanella* spp. ou *Geobacter* spp. (a) et libération de l'As(III) et du Fe(II) par des bactéries respirant le Fe(III) et l'AsV, telles que *Sulfurospirillum barneseii* (b) (d'après Oremland et Stolz, 2005).

Dans ces conditions, la matière organique naturelle joue un rôle particulièrement important car elle peut servir de donneurs d'électrons aux réactions de réduction des oxydes de Fe piégeant l'As. La dissolution en conditions réductrices des oxydes de Fe a été suggérée pour expliquer les fortes concentrations d'As dissous dans les eaux souterraines du Bangladesh (Nickson *et al.*, 2000 ; Bhattacharya *et al.*, 2002). Dans d'autres cas, l'apport de contaminants organiques anthropiques, tels que les BTEX (benzène, toluène, ethylbenzene, xylène) et/ou des acides organiques issus des décharges, peut augmenter le carbone organique dissous dans les eaux souterraines et entraîner la libération d'As en favorisant la dissolution des minéraux de Fe (Ogden, 1990).

Quand le milieu devient très réducteur et en présence de fortes teneurs en sulfate, la sulfato-réduction peut jouer un rôle important. L'As(III) peut précipiter sur des formes de sulfures secondaires, tels que l'orpiment As_2S_3 . La bactérie *Desulfotomaculum auripigmentum* précipite de l'As trisulfure l' As_2S_3 par réduction de l'As(V) en As(III) et du sulfate en sulfure

(Newman *et al.*, 1997). Récemment, Lee *et al.* (2007) ont montré la production de nanotubes d'As-S par *Shewanella* sp. HN-41 par réduction de l'AsV et $S_2O_3^{2-}$.

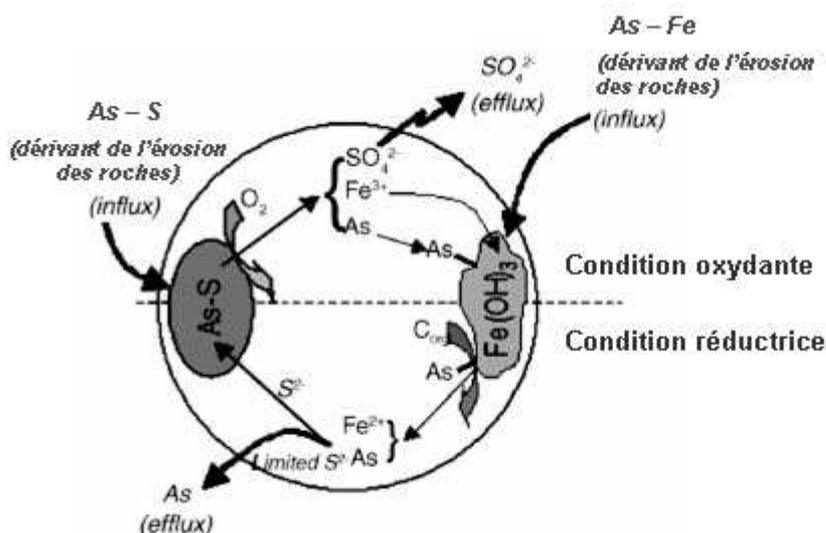


Figure 6 : Cycle et transport de l'As proposé par Polizzotto *et al.* (2006). En condition oxydante, les sulfures sont oxydés et forment des oxy-hydroxydes de Fe, qui sont soumis à une réduction dissolutive en condition anaérobie.

1.3.2. Réactions d'adsorption/désorption

La force des réactions d'adsorption et désorption de l'As sur les phases porteuses varie selon les espèces d'As présentes. La différence de charge des espèces d'As affecte les caractéristiques des interactions électrostatiques avec les surfaces solides. Les mécanismes de fixation sont aussi dépendants du pH et du potentiel redox.

L'adsorption de l'As sur les phases solides minérales est décrite par des phénomènes de complexation de surface. Dans ce type de réaction, l'As va se fixer à la surface du minéral sur les groupements hydroxyles de type « S-OH » (Goldberg et Glaubig, 1998 ; Laperche *et al.*, 2003, Chatain *et al.*, 2005). L'adsorption de l'As sur les oxydes de Mn est plus complexe et nécessite des processus d'oxydation de l'As et de réduction du Mn (Oscarson *et al.*, 1981).

La fixation de l'As sur les phases solides est liée à leur charge de surface spécifique et à leur cristallinité (Bissen et Frimmel, 2003). Le changement structural de la phase solide affecte les réactions d'adsorption/désorption. Les oxydes de Fe amorphes hydratés (HFO), comme la ferrihydrite, présentent un pourcentage nettement plus fort de fixation de l'As que les oxydes

de Fe cristallisés, en accord avec des surfaces spécifiques plus élevées (jusqu'à $600 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$) (Bowell, 1994). La forme hydratée de ces phases permet aux ions hydratés de diffuser librement à travers la structure sans être limité aux sites de surface externes comme pour les solides cristallins (Bhumba et Keefer, 1994). Néanmoins, la conversion de la ferrihydrite en goethite (ou en autres oxydes de Fe cristallisés) peut être réalisée graduellement au cours du temps (Dzombak et Morel, 1990). Elle diminue la densité des sites d'adsorption (Fuller *et al.*, 1993) et entraîne la désorption de l'As adsorbé. Le changement structural d'autres phases solides affecte également la mobilité de l'As.

Les conditions redox influencent la forme d'As présente (c.f. paragraphe I.1.1) et la stabilité des phases porteuses. En condition réductrice, l'AsV adsorbé sur les phases solides minérales peut être libéré par des bactéries capables de le respirer et de le réduire en AsIII (Ahmann *et al.*, 1994) (Figure 7). Ce groupe bactérien respirant l'AsV est décrit au paragraphe I.4.2.

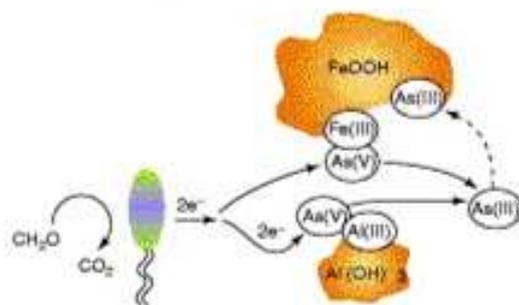


Figure 7 : Libération de l'As adsorbé sur les surfaces d'oxy-hydroxydes de Fe ou d'Al par réduction de l'AsV en AsIII par des bactéries respirant l'AsV (d'après Oremland et Stolz, 2005). A noter que l'AsIII libéré peut se réadsorbé sur le FeIII.

Des études d'adsorption de l'AsV et de l'AsIII ont été réalisées sur une large gamme de phases porteuses minérales, incluant les oxydes et hydroxydes métalliques, les argiles ou les carbonates (Tableau 3). L'adsorption est fortement dépendante du pH. L'adsorption de l'AsV est généralement plus forte que l'AsIII sur les HFO (Pierce et Moore, 1982), les oxydes d'Al (Gupta et Chen, 1978) et les argiles (Frost et Griffin, 1977). Néanmoins, à des pH supérieurs à 7, l'adsorption de l'AsIII est souvent plus forte que celle de l'AsV sur les HFO (Jain et Loeppert, 2000 ; Goldberg et Johnston, 2001 ; Dixit et Hering, 2003).

	Oxydes de Fe	Oxydes d'Al	Argiles	Carbonates
Phases porteuses minérales	Hydroxydes de Fe amorphe (Pierce et Moore, 1982) Goethite (Manning et Goldberg, 1996) Hématite (Xu <i>et al.</i> , 1988)	Hydroxydes d'Al amorphe (Anderson <i>et al.</i> , 1976) Gibbsite (Manning et Goldberg, 1996 ; 1997) Alumine (Gupta et Chen, 1978)	Kaolinite Illite Montmorillonite (Manning et Goldberg, 1996 ; 1997)	Calcite (Goldberg et Glaubig, 1988)
Adsorption de l'AsIII	Adsorption augmente à des pH faibles (max. pH 7-8) et diminue à des pH élevés		Adsorption augmente à des pH >9	-
Adsorption de l'AsV	Adsorption augmente à des pH faibles (max. entre pH 3 et 7) et diminue à des pH élevés			Adsorption entre pH 6 et 12 (max. pH 10) – Phase dissoute à pH acide

Tableau 3 : Influence du pH sur l'adsorption de l'As sur différentes phases solides.

La matière organique naturelle présente dans le milieu peut significativement augmenter les concentrations d'As dissous et la mobilité de l'As (Jackson et Miller, 1999). Des concentrations de 10 mg.l⁻¹ ou plus d'acides fulviques réduisent généralement l'adsorption de l'As sur des oxydes de Fe, d'Al et les argiles dans une gamme de pH 5 à 7 (Xu *et al.*, 1991 ; Redman *et al.*, 2002). Tandis que les faibles concentrations, généralement détectées dans les aquifères non contaminés, diminuent l'adsorption de l'AsIII, mais affectent faiblement l'adsorption de AsV sur la ferrihydrite à pH 6 (Hering *et al.*, 1997). Les acides humiques peuvent exister sous forme soluble ou adsorbable dans les sols et les milieux aquatiques. Ils sont capables de former des complexes avec l'AsIII et l'AsV et peuvent oxyder l'AsIII en AsV (Redman *et al.*, 2002). Ko *et al.* (2004), ont montré que ces formes complexées représentent environ 40% et 15% de l'AsIII et de l'AsV, respectivement dans les eaux interstitielles de certains sols.

L'adsorption de l'As sur les phases minérales est également affectée par la présence d'ions compétiteurs (Tableau 4). Les ions phosphate ont un effet plus prononcé sur l'adsorption de l'As sur les phases que les ions sulfate (Goh et Lim, 2004) et les ions silicate (Davis *et al.*, 2001).

Finalement, l'influence du pH est beaucoup plus significative que celle des ions compétiteurs et la matière organique naturelle. Ainsi, une augmentation d'une unité pH augmente la fraction d'As libéré d'un facteur 3-4. (Ghosh *et al.*, 2006).

Anions compétiteurs	Adsorption de l'AsIII	Adsorption de l'AsV
Phosphate (PO₄³⁻)	De fortes concentrations réduisent l'adsorption de l'AsIII et de l'AsV sur la ferrihydrite (Jain et Loeppert, 2000) et les argiles (Lin et Puls, 2000)	
	Réduction de l'adsorption à pH acides (Jain et Loeppert, 2000)	Réduction de l'adsorption à pH alcalin (Jain et Loeppert, 2000)
Sulfate (SO₄²⁻)	Réduction de l'adsorption sur la ferrihydrite à des pH < 7 (Jain et Loeppert, 2000)	Aucun effet sur la ferrihydrite (Jain et Loeppert, 2000)
Bicarbonate (HCO₃⁻)	Peu d'effet de faibles concentrations sur l'adsorption sur les oxydes de Fe (Arai <i>et al.</i> , 2004 ; Meng <i>et al.</i> , 2000). Corrélation entre la teneur d'anions et celle de l'As en solution dans les aquifères (Kim <i>et al.</i> , 2000).	
Silicate (SiO₃²⁻)	-	Réduction de l'adsorption sur les oxydes de Fe à des pH alcalins (plus faible qu'avec les ions PO ₄ ³⁻) (Davis <i>et al.</i> , 2001)

Tableau 4 : Influence des anions compétiteurs sur l'adsorption de l'As sur des phases solides

1.3.3. Importance du facteur microbien dans les processus de mobilité de l'As

Les microorganismes interviennent directement et/ou indirectement sur le cycle de l'As en (Figure 8) :

- oxydant l'AsIII en AsV ;
- réduisant l'AsV en AsIII ;
- méthylant l'As ;
- libérant l'As adsorbé ou co-précipité sur les oxy-hydroxydes de Fe en (i) réduisant les ions FeIII, (ii) respirant l'AsV ou (iii) couplant ces deux actions (Oremland et Stolz, 2005) ;
- libérant l'As présent initialement en oxydant le soufre, le FeII et/ou l'AsIII ;
- précipitant l'AsV avec le FeIII en oxydant le FeII et en oxydant l'AsIII ;
- précipitant l'AsIII sur des phases de sulfures secondaires.

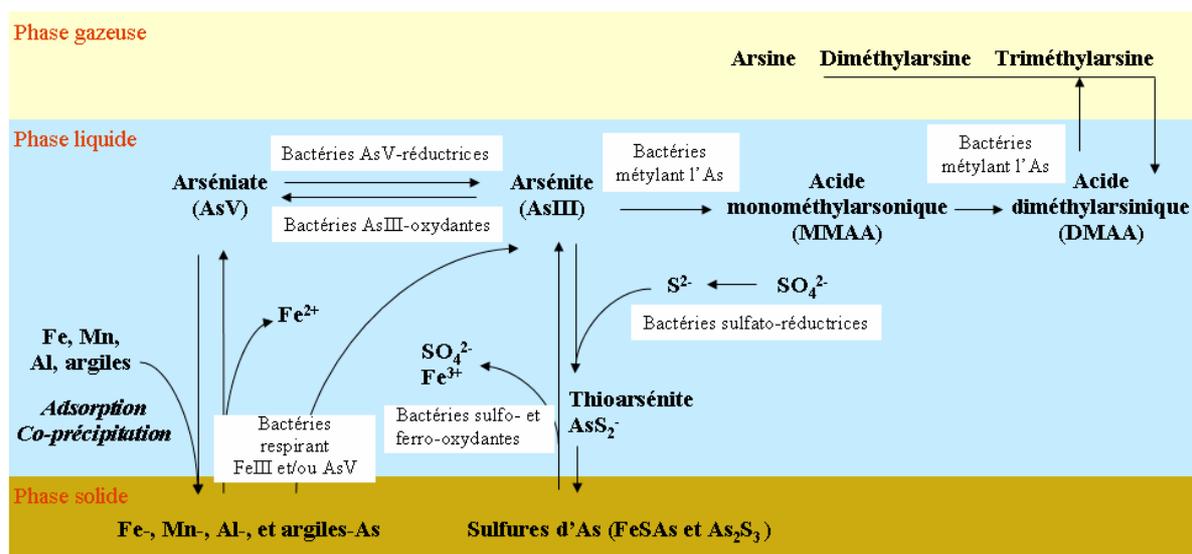


Figure 8 : Cycle biogéochimique de l'As (adapté de Nicholas *et al.*, 2003)

Les bactéries peuvent transférer l'As d'un compartiment (sols, eaux, sédiments) à un autre à l'aide de différents mécanismes. Ainsi, plusieurs études ont été réalisées en laboratoire pour montrer leur influence dans la mobilisation de l'As dans les sites contaminés (Tableau 5). Turpeinen *et al.* (1999) ont montré que les microorganismes accélèrent de 19 à 24 % la mobilisation de ce métalloïde. La présence de bactéries indigènes aux sites pollués par l'As augmente d'un facteur 4 la concentration d'As lixivié (en majorité AsV) en condition aérobie et favorise aussi très nettement son augmentation en condition anaérobie. Dans cette dernière condition, elle semble être la conséquence de la solubilisation du Fe (Park *et al.*, 2006).

Weldom et MacRae (2005) ont montré une corrélation entre l'évolution de la concentration en As dans les eaux souterraines et les populations bactériennes présentes. L'augmentation des concentrations d'AsIII et d'As total (résultant du processus indirect de libération d'As) est corrélée respectivement au développement d'une bactérie respirant l'AsV, *Sulfurospirillum* sp. NP4, et de bactéries FeIII-réductrices du genre *Geobacter*. Les communautés microbiennes de sols contaminés par l'As, jouant un rôle important dans les processus de mobilisation, ont été caractérisées dans certains sites afin de rechercher un lien entre leur structure et la présence d'As. De nombreuses souches résistantes à l'AsV ont pu être identifiées (Turpeinen *et al.*, 2004, Anderson et Cook, 2004). Des microorganismes ont récemment été caractérisés dans deux sites pollués par l'As afin de les utiliser comme bioindicateurs de la qualité du sol. Cette étude a montré que les familles *Pseudomonaceae* et

Bacillaceae dominant et que la structure de la communauté bactérienne et non sa densité est modifiée par la présence d'As (Avidano *et al.*, 2005).

Ainsi les bactéries jouent un rôle important dans le transfert de l'As dans les différents compartiments environnementaux. Dans le cadre de cette thèse, seuls les mécanismes directement impliqués dans la mobilité de l'As inorganique ont été étudiés. La diversité des bactéries qui entrent en jeu, les mécanismes qu'elles développent, les enzymes qui interviennent et les gènes qui les codent, sont développés dans le paragraphe suivant.

Origine et nature des échantillons	Principaux résultats	Conclusions et Hypothèses	Références
Sédiments de la rivière Aberjona, MA, USA	Libération de l'As dans la phase aqueuse par la réduction de l'AsV, fixé sur des oxy-hydroxydes de Fe, réalisée par la microflore indigène.	Rôle des bactéries respirant l'AsV dans la libération d'As dans le milieu.	Ahmann <i>et al.</i> , 1997
Sédiments du delta du Gange (Chakdaha block), Bengale ouest, Inde	Libération d'As après réduction et libération de Fe (avec ajout d'acétate dans le milieu). Augmentation de l'abondance des bactéries FeIII-réductrices dans les incubations.	Rôle important des bactéries FeIII-réductrices dans la libération d'As dans le milieu.	Islam <i>et al.</i> (2004)
Sédiments de la mine d'or Hwachon, Corée	Libération d'As en condition aérobie et avec ajout d'acétate et de lactate. En condition biotique, plus de 99% de l'As dissous est présent sous la forme AsV contre 50% en condition abiotique.	Les bactéries indigènes contribuent à l'augmentation d'As total dissous à partir des sédiments et réduisent l'AsIII en AsV.	Lee <i>et al.</i> , 2005
Sédiments de la mine d'or Hwachon, Corée	Libération simultanée d'As et de FeII en condition anaérobie. Libération maximale d'As avec ajout d'acétate.	Rôle important des bactéries FeIII-réductrices dans la libération d'As dans le milieu.	Park <i>et al.</i> , 2006
Aquifère solide d'une base militaire de l'Utah, USA	En condition anaérobie, libération d'As et de FeII. La libération de Fe intervient après celle de l'As.	La libération d'As semble être le résultat d'une utilisation directe de l'As comme accepteurs d'électron par des bactéries respirant l'AsV.	McLean <i>et al.</i> , 2006
Sédiments du delta du Ganges–Meghna, Bangladesh	Augmentation des concentrations d'As dissous concomitante à la diminution des valeurs d'Eh (dès les premiers jours d'incubation). Relation inverse entre les concentrations d'As et de Fe dissous et les valeurs d'Eh. Après l'atteinte de valeurs maximales, les concentrations d'As et de Fe tendent à diminuer car le Eh augmente. Le mélange de glucose-polypeptone contribue à stimuler l'activité de bactéries en condition réductrice.	L'oxydation microbienne de la matière organique et la réduction dissolutrice des oxy-hydroxydes de Fe et de Mn sont des processus importants responsables de la mobilité de l'As. La majorité du FeII dans les eaux des sédiments résulte probablement de la dissolution réductrice microbienne des oxy-hydroxydes de FeIII. Libération d'As à partir des sédiments par réduction dissolutive du FeIII quand le potentiel redox diminue un court temps sous un environnement N ₂ .	Anawar <i>et al.</i> , 2003
Sédiments du delta du Ganges–Meghna, Bangladesh	Libération simultanée de l'As et du FeII en condition biotique et anaérobie.	Rôle important des bactéries FeIII-réductrices dans la libération d'As dans le milieu.	Anawar <i>et al.</i> , 2006
Sol d'une ancienne mine d'or, France	En condition biotique et anaérobie : Importante libération d'As par l'activité microbienne stimulée par l'addition de sources de carbone.	Rôle important des bactéries indigènes dans la libération d'As dans le milieu.	Chatain <i>et al.</i> , 2005
Sédiments du Gange, Bangladesh ouest	Libération d'As à de faibles valeurs d'Eh quelques jours après l'ajout de nutriments contenant du glucose, poly-peptone et extrait de levures, urée et fertilisant sous une atmosphère dominante en N ₂ .	Rôle important des bactéries indigènes stimulées par l'ajout de glucose et de peptone et les conditions réductrices dans la libération d'As dans le milieu.	Akai <i>et al.</i> , 2004
Sédiments du bassin du Datong, Chine	Les concentrations d'As et de Fe dans la phase aqueuse des microcosmes biotiques anaérobies, en présence d'acétate et de glucose, sont plus élevées que dans les microcosmes abiotiques	Rôle important des activités microbiennes dans la mobilité du Fe et de l'As	Duan <i>et al.</i> , 2008

Tableau 5 : Principales études du rôle de la microflore indigène dans la mobilisation de l'As à partir de sols et sédiments

I.4. Les bactéries et la biotransformation de l'As

De nombreuses bactéries ont développé des mécanismes qui leur permettent de résister à la toxicité de ces composés arséniés et certaines bactéries peuvent même utiliser ces formes pour générer ou conserver de l'énergie.

I.4.1. Oxydation de l'AsIII

Les bactéries AsIII-oxydantes

Les bactéries AsIII-oxydantes permettent d'oxyder l'AsIII plus mobile et plus toxique, en AsV qui tend à se fixer plus fortement sur les phases minérales solides et donc contribuent à diminuer la biodisponibilité de l'As dans l'environnement.

Depuis la première bactérie isolée pour sa capacité à oxyder l'AsIII, *Bacillus arsenoxydans* (Green, 1918), plus de 85 bactéries possédant cette aptitude ont été isolées d'environnements variés (Tableau 6) incluant les sols, les mines d'or, les exhaures et sédiments miniers, les eaux d'égouts, les lacs hypersalés, les points chauds géothermiques et les eaux contaminées par l'As. Récemment, la capacité d'oxyder l'AsIII en AsV a été mise en évidence chez une algue eucaryote (Lehr *et al.*, 2007).

Ces bactéries sont phylogénétiquement diverses. Elles appartiennent principalement au phylum *Proteobacteria*, mais également aux phyla des *Firmicutes* et des *Actinobacteria* et aux genres *Thermus* (Phylum *Deinococcus-Thermus*) et *Aquifex* (Phylum *Aquificae*), ainsi qu'au phylum archéen des *Crenarchaeota* (Tableau 6).

Elles sont également physiologiquement diverses. Des bactéries chimiohétérotrophes, telles que *H. arsenicoxydans* ULPAs1 (Weeger *et al.*, 1999) ou *Agrobacterium tumefaciens* 5A (Macur *et al.*, 2004), ainsi que des bactéries chimioautotrophes, telles que *Hydrogenobaculum acidophilum* H55 (Donahoe-Christiansen *et al.*, 2004), peuvent oxyder l'AsIII dans un but de détoxification. D'autres bactéries chimioautotrophes utilisent l'AsIII en tant que seul donneur d'électrons pour générer de l'énergie. En condition aérobie, *Thiomonas arsenivorans* (Battaglia-Brunet *et al.*, 2006a) ou *Rhizobium* sp. NT-26 (Santini *et al.*, 2000), par exemple,

peuvent oxyder l'AsIII en utilisant l'O₂ comme accepteur d'électrons. En condition anaérobie, les souches *Alkalilimnicola ehrlichii* MLHE-1 (Oremland *et al.*, 2002), *Azoarcus* sp. DAO1 et *Sinorhizobium* sp. DAO10 (Rhine *et al.*, 2006), sont également capables d'oxyder l'AsIII en utilisant le NO₃⁻ comme accepteur d'électrons.

Souches	Sources	Références
Classe Alphaproteobacteria (Phylum Proteobacteria)		
<i>Acidicaldus</i> sp. AO5	Sources géothermales (Dragon Spring, PNY, USA)	D'Imperio <i>et al.</i> , 2007
<i>Agrobacterium albertimagni</i> AOL15	Sources géothermales (Hot Creek, CA, USA)	Salmassi <i>et al.</i> , 2002
<i>Agrobacterium</i> sp. BEN-5	Mine d'or de Central Deborah (Australie)	Santini <i>et al.</i> , 2002
<i>Agrobacterium</i> sp. CL3	Déchets solides de mine de charbon (Province Jangxi, Chine)	Xiong <i>et al.</i> , 2006
<i>Agrobacterium</i> sp. GW4	Sédiment pollué par l'As (Province Shanxi, Chine)	Fan <i>et al.</i> , 2008
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 5A	Sol pollué par l'As de la vallée de la rivière Madison (MT, USA)	Macur <i>et al.</i> , 2004
<i>Ancylobacter</i> sp. OL1	Sédiment pollué du lac d'eau douce Onondaga (NY, USA)	Rhine <i>et al.</i> , 2005
<i>Bosea</i> sp. L7506	Eaux souterraines polluées par l'As (Région du Blackfoot, Taiwan)	Hsu <i>et al.</i> , 2008
<i>Bosea</i> sp. WAO	Schiste pollué par l'As (Newark Basin, NJ, USA)	Rhine <i>et al.</i> , 2007
<i>Mezorhizobium</i> sp. DM1	Sol (Amsterdam)	Inskeep <i>et al.</i> , 2007
<i>Rhizobium/Agrobacterium</i> sp. M-14	Mine d'or (Zloty Stock, Pologne)	Drewniak et Sklodowska, 2007
<i>Rhizobium/Agrobacterium</i> sp. NT-25	Mine d'or (NT, Australie)	Santini <i>et al.</i> , 2000
<i>Rhizobium</i> sp. NT-26		
<i>Sinorhizobium</i> sp. DAO10*	Sol industriel contaminé par l'As (NJ, USA)	Rhine <i>et al.</i> , 2005
<i>Sinorhizobium</i> sp. GW3	Sédiment pollué par l'As (Shanxi Province, Chine)	Fan <i>et al.</i> , 2008
<i>Sinorhizobium</i> sp. NT-2, NT-3 et NT-4	Mine d'or (NT, Australie)	Santini <i>et al.</i> , 2001
<i>Thiobacillus</i> sp. S1	Sol industriel contaminé par l'As (NJ, USA)	Rhine <i>et al.</i> , 2005
<i>M4</i>	Site agricole (Bulgarie)	Krumova <i>et al.</i> , 2008
Classe Betaproteobacteria (Phylum Proteobacteria)		
<i>Achromobacter arsenoxydans</i>	Bac parasiticide à bétail (Afrique du sud)	Turner et Legge, 1954
<i>Achromobacter</i> sp. BEN-4	Mine d'or de Central Deborah (Australie)	Santini <i>et al.</i> , 2002
<i>Achromobacter</i> sp. GW1	Sédiments pollués par l'As (Shanxi Province, Chine)	Fan <i>et al.</i> , 2008
<i>Achromobacter</i> sp. NT-10	Mine d'or (NT, Australie)	Santini <i>et al.</i> , 2002
<i>Achromobacter</i> sp. WA20	Sédiments du lac Yangebup (Australie)	Inskeep <i>et al.</i> , 2007
<i>Acidovorax</i> sp. GW2	Sédiment pollué par l'As (Shanxi Province, Chine)	Fan <i>et al.</i> , 2008
<i>Alcaligenes eutrophus</i> 280	dépôt Au/As	Abdrashitova <i>et al.</i> , 1981
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Effluent d'égout	Turner et Legge, 1954
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Sol	Osborne et Erhlich, 1976
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Sol	Suttigarn et Wang, 2005
<i>Azoarcus</i> sp. DAO1*	Sol industriel contaminé par l'As (NJ, USA)	Rhine <i>et al.</i> , 2005
<i>Azoarcus</i> sp. V4	Sol (Pirdop, Pologne)	Krumova <i>et al.</i> , 2008
<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	Boues industrielles contaminées par l'As	Weeger <i>et al.</i> , 1999
<i>Hydrogenophaga</i> sp. CL3	Sédiments d'un bassin de collecte d'une raffinerie pétrole (Venezuela)	Rhine <i>et al.</i> , 2005
<i>Hydrogenophaga</i> sp. NT5, NT6, NT14	Mine d'or (NT, Australie)	Santini <i>et al.</i> , 2002
<i>Hydrogenophaga</i> sp. YE-D6 -4, -18, -21	Eaux géothermales (Hot Creek, CA, USA)	Salmassi <i>et al.</i> , 2006
<i>Hydrogenophaga</i> sp. WA13	Sédiments du lac Yangebup (Australie)	Inskeep <i>et al.</i> , 2007
<i>Leptothrix</i> sp. S1.1	Mine d'or (Lopérec, Bretagne, France)	Battaglia-Brunet <i>et al.</i> , 2006b
<i>Leptothrix</i> sp. B2	Biofilm de procédé de traitement d'eau souterraine (Vosges)	Casiot <i>et al.</i> , 2006
<i>Thiomonas arsenivorans</i>	Mine d'or (Cheni, Limousin, France)	Battaglia-Brunet <i>et al.</i> , 2006a

<i>Thiomonas cuprina</i>	Mine d'uranium (Allemagne)	Moreira et Amils, 1997
<i>Thiomonas delicata</i>	Eaux de mine	Katayama-Fujimura <i>et al.</i> , 1984
<i>Thiomonas intermedia</i>	Eau de ruisseau	London, 1963 ; Moreira and Amils 1997
<i>Thiomonas</i> sp. B1, B2, B3	Site minier (Carnoulès, Languedoc-Roussillon, France)	Bruneel <i>et al.</i> , 2003
<i>Thiomonas</i> sp. NO115	Site minier (Norvège)	Battaglia-Brunet <i>et al.</i> , 2006
<i>Thiomonas</i> sp. WJ68	Mine d'étain (Sud-ouest des Cornouailles, Angleterre)	Coupland <i>et al.</i> , 2004
<i>Thiomonas</i> sp. 3As	Site minier (Carnoulès, Languedoc-Roussillon, France)	Duquesne <i>et al.</i> , 2007
<i>Variovorax paradoxus</i>	Mine d'or (Lopérec, Bretagne, France)	Macur <i>et al.</i> , 2004
<i>Variovorax</i> sp. RM1	Sol pollué par l'As du bassin de la rivière Madison (MT, USA)	Inskip <i>et al.</i> , 2007
Classe Gammaproteobacteria (Phylum Proteobacteria)		
<i>Alkalilimnicola ehrlichei</i> MLHE-1*	Lac Mono hypersalé (CA, USA)	Oremland <i>et al.</i> , 2002
<i>Acinetobacter</i> sp. WA19	Sédiments du lac Yangebup (Australie)	Inskip <i>et al.</i> , 2007
C3 (Acetobacteraceae)	Eaux de rivière (Maritza, Pologne)	Krumova <i>et al.</i> , 2008
<i>Pseudomonas arsenitoxidans</i>	Eaux de mine d'un dépôt Au-As	Ilaletdinov et Abdrashitova, 1981
<i>Pseudomonas arsenoxydans</i>	Bac parasiticide à bétail (Afrique du sud)	Turner et Legge, 1954
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 1	Sol pollué par l'As du bassin de la rivière Madison (MT, USA)	Macur <i>et al.</i> , 2004
<i>Pseudomonas putida</i> 18	Dépôt Au-As	Abdrashitova <i>et al.</i> , 1981
<i>Pseudomonas</i> sp. C2 et C6 (<i>P. fulva</i>), C4 (<i>P. medocina</i>), C5 (<i>P. pseudoalcalignes</i>), C7 (<i>P. aeruginosa</i>), C8	Eaux de rivière (Maritza, Pologne)	Krumova <i>et al.</i> , 2008
<i>Pseudomonas</i> sp. K5 (<i>P. stutzeri</i>)	Sol proche d'un canal d'évacuation d'eaux usées (Bulgarie)	Krumova <i>et al.</i> , 2008
<i>Pseudomonas</i> sp. M2 (<i>P. putida</i>), M3 (<i>P. mendocina</i>)	Site agricole situé à proximité de fonderies (Bulgarie)	Krumova <i>et al.</i> , 2008
<i>Pseudomonas</i> sp. OS-5 (<i>P. putida</i>)	Mine d'Ag (Myoung-bong, Corée du Sud)	Chang <i>et al.</i> , 2007
<i>Pseudomonas</i> sp. V1 (<i>P. mendocina</i>)	Sol (Pirdop, Pologne)	Krumova <i>et al.</i> , 2008
<i>Pseudomonas</i> sp. 81D3 (<i>P. stutzeri</i>)	Sol proche d'une clôture de fer de l'usine KZM (Plovdiv, Bulgarie)	Krumova <i>et al.</i> , 2008
<i>Xanthomonas arsenoxydans</i>	Bac parasiticide à bétail (Afrique du sud)	Turner et Legge, 1954
Phylum Aquificae		
<i>Hydrogenobaculum acidophilum</i> H55	Sources géothermales (PNY, USA)	Donahoe-Christiansen <i>et al.</i> , 2004
Phylum Deinococcus-Thermus		
<i>Thermus aquaticus</i> YT1	Sources géothermales (PNY, USA)	Gihring <i>et al.</i> , 2001
<i>Thermus</i> sp. HR13	Sources géothermales (CA, USA)	Gihring et Benfield, 2001
<i>Thermus thermophilus</i> HB8	Sources géothermales (PNY, USA)	Gihring <i>et al.</i> , 2001
Phylum Firmicutes		
<i>Bacillus arsenoxydans</i>	Bac parasiticide à bétail (Afrique du sud)	Green, 1918
<i>Bacillus</i> sp. ML-SRAO *	Eaux du lac salé Mono (CA, USA)	Fisher et Hollibaugh, 2008
Phylum Actinobacteria		
<i>Microbacterium lacticum</i>	Eaux d'égout municipales	Mokashi et Paknikar, 2002
Phylum Crenarchaeota		
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	Sources chaudes acides	Sehlin <i>et al.</i> , 1992

Tableau 6 : Diversité des *Bacteria* et *Archaea* oxydant l'AsIII

L'AsIII-oxydase

En condition aérobie, l'oxydation de l'AsIII est réalisée par une AsIII-oxydase qui a été purifiée et caractérisée chez *Alcaligenes faecalis* (Anderson *et al.*, 1992), *Rhizobium* sp. NT-26 (Santini *et al.*, 2004a) et *Hydrogenophaga* sp. NT-24 (Vanden Hoven et Santini, 2004). Les caractéristiques de ces enzymes sont décrites dans le Tableau 7.

Caractéristiques	<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Rhizobium</i> sp. NT-26	<i>Hydrogenophaga</i> sp. NT-24
Localisation	Membranaire	Périplasmique	Périplasmique
Poids moléculaire	100 kDa	219 kDa	309 kDa
Poids des sous-unités	AsoA (85 kDa)	AroA (98 kDa)	AroA (86 kDa)
	AsoB (15 kDa)	AroB (14 kDa)	AroB (16 kDa)
Structure	$\alpha_1\beta_1$ (hétérodimère)	$\alpha_2\beta_2$ (hétérotétramère)	$\alpha_3\beta_3$ (hétérohexamère)

Tableau 7 : Comparaison des AsIII-oxydases de *Alcaligenes faecalis*, *Rhizobium* sp. NT-26 et *Hydrogenophaga* sp. NT-24 (d'après Vanden Hoven et Santini, 2004).

Chez *A. faecalis*, l'AsIII-oxydase est un hétérodimère composé d'une grosse sous-unité catalytique (AsoA) possédant un cofacteur à molybdène et un centre [3Fe-4S] et d'une petite sous-unité (AsoB) de type Rieske à centre [2Fe-2S] qui sert à transférer les électrons (Figure 9).

La structure cristalline de cette enzyme a également été étudiée (Ellis *et al.*, 2001). Au niveau de la séquence AsoA, le motif Cys21-X2-Cys24-X3-Cys28-X70-Ser99 est impliqué dans la coordination du groupe [3Fe-4S]. Les résidus His195, Glu203, Arg419 et His423 représenteraient le site de fixation de l'AsIII. Cette sous-unité est similaire aux enzymes à molybdoptérine de la famille des DMSO réductase. Au niveau de la séquence AsoB, le motif Cys60-X-His62-X15-Cys78-X2-His81 est impliqué dans la coordination du centre [2Fe-2S]. Cette sous-unité est similaire aux domaines protéiques de Rieske des cytochromes bc1, b6f et de la naphthalène 1,2-dioxygénase.

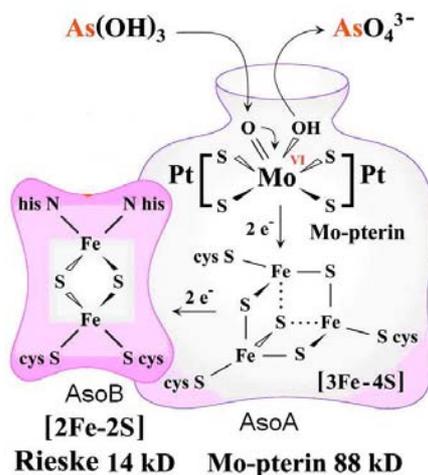


Figure 9 : Modèle de l'AsIII-oxydase hétérodimérique d'*A. faecalis* (adapté de Silver et Phung, 2005a). AsoA est la grosse sous-unité catalytique et AsoB est la petite sous-unité qui sert au transfert des électrons.

Les gènes impliqués dans l'oxydation de l'AsIII

Trois abréviations mnémoniques, *aso*, *aro* et *aox*, sont généralement utilisées pour désigner les gènes codant la fonction d'oxydation de l'AsIII et présentant un niveau de conservation élevé (Silver et Phung, 2005). Kashyap *et al.* (2006) suggèrent de garder l'abréviation mnémonique *aox* utilisée pour la première caractérisation officielle des gènes *aox* (Muller *et al.*, 2003).

Chez *A. faecalis*, les gènes *asoA* et *asoB*, ainsi que d'autres gènes codant des fonctions associées, ont été clonés (Silver et Phung, 2005). Quatre autres souches ont fait l'objet d'une étude génétique fonctionnelle détaillée au niveau des gènes impliqués dans l'oxydation de l'AsIII. Quatre gènes, *aoxA* (522 nt), *aoxB* (2478 nt), *aoxC* et *aoxD* codant respectivement la petite sous-unité et la grosse sous-unité de l'AsIII-oxydase, une réductase et un cytochrome c, ainsi qu'une partie d'un cinquième gène en amont de *aoxA*, ont été identifiés chez *H. arsenicoxydans* ULPAs1 (Muller *et al.*, 2003). Chez la souche NT-26, deux gènes, *aroB* (528 pb) et *aroA* (2538 pb), qui codent respectivement la petite et la grosse sous-unité de l'AsIII-oxydase, ont été mis en évidence (Santini et Vanden Hoven, 2004).

La première caractérisation des mécanismes impliqués dans la régulation de l'oxydation de l'AsIII a été réalisée chez *Agrobacterium tumefaciens* (Kashyap *et al.*, 2006). Plusieurs gènes *aox*, transcrits en opéron, ont été mis en évidence : *aoxS* codant une protéine putative ayant les caractéristiques d'un senseur histidine kinase, *aoxR* codant un régulateur de réponse de système de transduction de signal à deux composants, *aoxA* et *aoxB* codant respectivement la

petite sous-unité et la grosse sous-unité de l'AsIII-oxydase et possédant respectivement 94 % d'identité et 97 % d'identité avec les gènes *aroB* et *aroA* de la souche NT-26, et enfin *cyt c₂* et un homologue du gène *chlE* de *Escherichia coli* (qui sert à la biosynthèse de la molybdoptérine). Cette étude a montré que l'expression des gènes *aoxA* et *aoxB* est induite par la présence d'AsIII et est aussi contrôlée par un mécanisme de régulation dépendant de la densité bactérienne, appelé « quorum-sensing » (communication cellulaire). Chez *Alcaligenes faecalis*, il avait déjà été montré que l'oxydation de l'AsIII était réalisée lorsque les cultures atteignaient la phase stationnaire. Chez *Agrobacterium tumefaciens*, l'oxydation de l'AsIII est aussi régulée via un système à deux composants AoxRS (Figure 10).

Chez la bactérie *Thiomonas* sp. 3AS, les gènes *aoxA* et *aoxB* appartiennent à un même opéron. Cet opéron code aussi deux cytochromes c, lesquels peuvent être des partenaires physiologiques de l'AsIII-oxydase, et un régulateur transcriptionnel appartenant à la famille des régulateurs métallo-régulés ArsR/SmtB, qui peut contrôler l'expression de l'opéron *aox*. L'expression de l'opéron est plus importante en présence qu'en absence d'AsIII et semble réprimée en présence de thiosulfate, un substrat plus énergétique (Duquesne *et al.*, 2007).

Chez la bactérie *Variovorax* sp. RM1, le gène *aroA* n'est pas exprimé en absence d'AsIII. L'expression de ce gène n'est détectée qu'après 1 heure de traitement avec 10 µM d'AsIII et corrèle avec la cinétique rapide d'oxydation de l'AsIII obtenue (Inskeep *et al.*, 2007).

De nombreuses séquences d'autres gènes *aoxA* et *aoxB* homologues sont accessibles dans GenBank. Ces gènes ont été retrouvés dans deux souches AsIII-oxydantes aérobies et thermophiles, sur le génome de la bactérie photosynthétique *Chloroflexus aurantiacus* et sur un plasmide de *Thermus thermophilus*, ainsi que sur le génome de souches pour lesquelles la capacité d'oxyder l'AsIII n'a pas été testée expérimentalement, *Rhodoflex ferrireducens*, *Burkholderia multivorans*, *Xanthobacter autotrophicus*, *Roseovarius* sp. 217, *Nitrobacter hamburgensis*, *Chlorobium phaeobacteroides*, et les archées *Aeropyrum pernix* et *Sulfolobus tokodai* (Figure 11, Muller *et al.*, 2007).

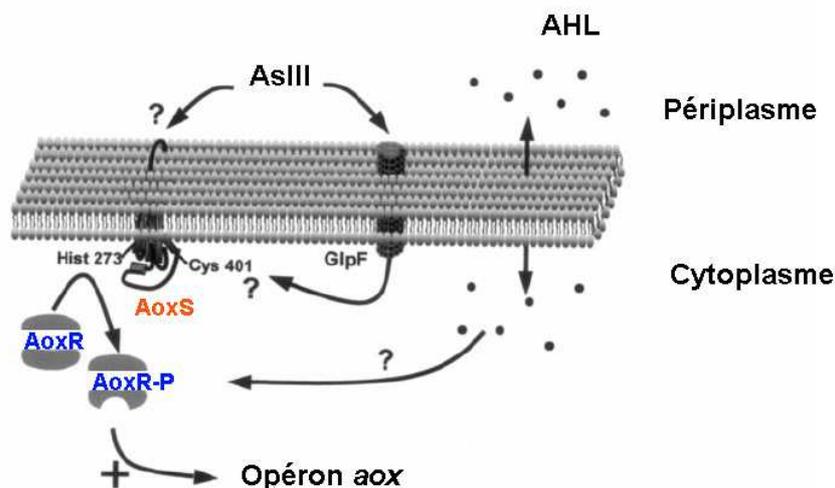


Figure 10 : Modèle conceptuel décrivant l'implication des protéines AoxS et AoxR dans la régulation de l'expression de l'opéron *aox* chez *Agrobacterium tumefaciens*. Le domaine récepteur dans le périplasm est une chaîne de 14 acides aminés, agissant potentiellement comme un récepteur de signaux environnementaux, tels que l'AsIII ou un auto-inducteur (les acyl-homosérine lactone, AHL), lesquels sont en équilibre à travers la membrane cytoplasmique. Cys401 est indiqué comme un récepteur du signal cytoplasmique et Hist273, comme un site de phosphorylation. Après phosphorylation, AoxR agit comme un régulateur positif de l'opéron *aox*. L'AsIII rentre dans la cellule via une aquaglycéroporine, GlpF (d'après Kashyap *et al.*, 2006).

Les séquences protéiques de l'AsIII-oxydase de *Bacteria* et d'*Archaea* montrent de fortes homologies entre elles, indiquant que cette enzyme a une origine ancestrale précédant la divergence entre les *Bacteria* et les *Archaea* (Lebrun *et al.*, 2003).

Le gène *aoxB* a été amplifié à partir d'une souche anaérobie facultative, *Sinorhizobium* sp. DAO10, mais aucune amplification n'a été obtenue à partir de *Azoarcus* sp. DAO1, toutes deux capables d'oxyder l'AsIII en condition anaérobie (Rhine *et al.*, 2007). Les gènes *aox* n'ont pas été retrouvés sur le génome de la souche anaérobie facultative *Alkalilimnicola ehrlichii*, capable également d'oxyder l'AsIII en condition anaérobie (Hoeft *et al.*, 2007). Ces données suggèrent donc qu'une autre voie enzymatique serait impliquée dans l'oxydation anaérobie de l'AsIII.

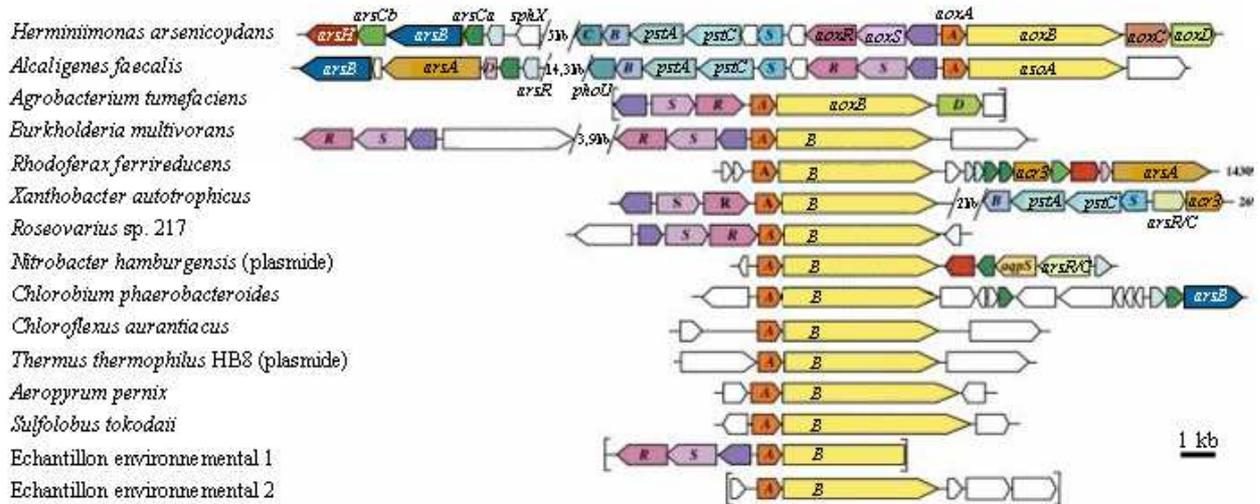


Figure 11 : Diversité des gènes impliqués dans l'oxydation de l'AsIII (d'après Muller *et al.*, 2007)

1.4.2. Réduction dissimilatrice, ou respiration, de l'AsV

Les bactéries qui respirent l'AsV

Les bactéries qui réalisent la réduction dissimilatrice de l'AsV produisent l'énergie nécessaire à leur croissance en couplant la réduction de l'AsV à l'oxydation de composés organiques ou inorganiques (H_2 et S^{2-}). Ce système de réduction de l'AsV a été beaucoup moins étudié que le système Ars (c.f. paragraphe 3.3.1) car il a été découvert plus tard. Pourtant, ce mécanisme est d'une importance majeure d'un point de vue biogéochimique, car il permet la réduction de l'AsV associé à des phases solides et la libération d'AsIII dans les écosystèmes (Zobrist *et al.*, 2000). À noter que ce système, comme le système Ars, permet aussi la réduction de l'AsV soluble en condition anaérobie.

La respiration de l'AsV a été montrée chez des bactéries occupant des environnements variés : sédiments d'eaux douces (Ahmann *et al.*, 1994), eaux de lacs salés (Switzer Blum *et al.*, 1998), de points chauds (Gihring et Banfield, 2001), de mines d'or (Macy *et al.*, 1996) ou encore d'intestins d'animaux (Herbel *et al.*, 2002).

Sulfurospirillum arsenophilum MIT-13 est la première bactérie décrite pour sa capacité à réaliser ce processus (Ahmann *et al.*, 1994). Ce type de respiration est maintenant connu chez une vingtaine de bactéries (Tableau 8) incluant les genres *Desulfomaculum*,

Desulfitobacterium, *Bacillus*, *Chrysiogenes*, *Shewanella*, *Wolinella*, *Thermus* et *Pyrobaculum*. La diversité phylogénétique de ces bactéries suggère que ce processus est d'origine ancienne (Stolz et Oremland, 1999).

Métaboliquement diverse, la plupart des bactéries respirant l'AsV sont capables d'utiliser d'autres accepteurs terminaux d'électrons (*e.g.* nitrate, nitrite, séléniate et/ou sulfate). L'acétate, le lactate, le pyruvate, le formate, des aromatiques, aussi bien que l'H₂ peuvent servir de donneurs d'électrons (Stolz *et al.*, 2006). Les deux souches SLAS-1 et MLMS-1 isolées de lacs hypersalés, sont capables de coupler la réduction de l'AsV à l'oxydation de l'H₂S (Hoeft *et al.*, 2004 ; Oremland *et al.*, 2005).

Souches	Sources	Références
Phylum Crenarchaeota		
<i>Pyrobaculum arsenaticum</i>	Eaux géothermales (PNY, USA)	Huber <i>et al.</i> , 2000
<i>Pyrobaculum aerophilum</i>	Eaux géothermales (PNY, USA)	Huber <i>et al.</i> , 2000
Phylum Deinococcus_Thermus		
<i>Thermus</i> sp. HR13	Eaux géothermales (PNY, USA)	Gihring <i>et al.</i> , 2001
Phylum Aquificae		
<i>Sulfurihydrogenibium subterraneum</i> HGMK-1	Aquifère chaud d'une mine d'or (Japon)	Takai <i>et al.</i> , 2003
Phylum Deferribacteres		
<i>Deferribacter desulfuricans</i>	Sources hydrothermales profondes (Japon)	Takai <i>et al.</i> , 2003
Phylum Chrysiogenetes		
<i>Chrysiogenes arsenatis</i>	Effluent de mine d'or	Macy <i>et al.</i> , 1996
Classe Epsilonproteobacteria (Phylum Proteobacteria)		
<i>Sulfurospirillum arsenophilum</i> MIT-13	Eaux usées d'Aberjona (MA, USA)	Ahmann <i>et al.</i> , 1994
<i>Sulfurospirillum barnesii</i> SES-3	Eaux douces du marais Massie Slough (NV, USA)	Lavermann <i>et al.</i> , 1995
<i>Wolinella</i> sp. BRA-1	Fluides ruminiaux de bovin	Herbel <i>et al.</i> , 2002
Classe Gammaproteobacteria (Phylum Proteobacteria)		
<i>Citrobacter</i> sp. TSA-1	Intestin de termite	Herbel <i>et al.</i> , 2002
<i>Enterobacter</i> sp. GS4	Lac d'eau douce Onondaga (NY, USA)	Rhine <i>et al.</i> , 2005
<i>Shewanella trabarsenatis</i> ANA-3	Bois traité par l'As de l'estuaire Woods Hole (MA, USA)	Saltikov <i>et al.</i> , 2003
<i>Shewanella</i> sp. HAR-4		
Classe Deltaproteobacteria (Phylum Proteobacteria)		
<i>Desulfomicrobium</i> sp. Ben-RB	Boues d'un système de traitement à lit de roseau (Australie)	Macy <i>et al.</i> , 2000
MLMS-1	Eaux profondes du lac salé Mono (CA, USA)	Hoelt <i>et al.</i> , 2004
Phylum Firmicutes		
<i>Alkaliphilus oremlandii</i> OhILAs	Sédiments de la rivière Ohio (USA)	Fisher <i>et al.</i> , 2008
<i>Bacillus arsenicoselenatis</i>	Sédiments du lac salé Mono (CA, USA)	Switzer Blum <i>et al.</i> , 1998
<i>Bacillus benzoevorans</i> HT-1	Matière fécale d'hamster	Herbel <i>et al.</i> , 2002
<i>Bacillus selenitireducens</i>	Sédiments du lac salé Mono (CA, USA)	Switzer Blum <i>et al.</i> , 1998
<i>Bacillus macyae</i> JMM-4	Boues d'une mine d'or, Bendigo, Australie	Santini <i>et al.</i> , 2002
<i>Bacillus selenatarsenatis</i> SF-1	Sédiments d'effluent contaminé d'une usine de verre (Japon)	Yamamura <i>et al.</i> , 2003
<i>Clostridium</i> sp. ARCL1	Lac d'eau douce Onondaga (NY, USA)	Rhine <i>et al.</i> , 2005
<i>Clostridium</i> sp. AKAR3	Lac d'eau douce Onondaga (NY, USA)	Rhine <i>et al.</i> , 2005
<i>Desulfosporosinus auripigmentum</i>	Eaux douces du lac Upper Mystic (MA, USA)	Newman <i>et al.</i> , 1997
<i>Desulfosporosinus</i> sp. Y-5	Lac d'eau douce Onondaga (NY, USA)	Liu <i>et al.</i> , 2004
<i>Desulfitobacterium</i> sp. GBFH	Sédiments du lac Cœur d'Alène (ID, USA)	Niggemyer <i>et al.</i> , 2001
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> DCB-2 ^T et PCP-1 ^T	Boues d'égouts	
SLAS-1	Sédiments du lac salé Searles (CA, USA)	Oremland <i>et al.</i> , 2005

Tableau 8 : Diversité des *Bacteria* et *Archaea* respirant l'AsV.

L'AsV-réductase respiratoire

La respiration de l'AsV est réalisée par une AsV réductase respiratoire qui a été purifiée et caractérisée chez *Chrysiogenes arsenatis* (Krafft et Macy, 1998), *Bacillus selenitireducens* (Afkar *et al.*, 2003) et *Shewanella* sp. ANA-3 (Malasarn *et al.*, 2008). Les caractéristiques de ces enzymes sont décrites dans le Tableau 9.

Caractéristiques	<i>Chrysiogenes arsenatis</i>	<i>Bacillus selenitireducens</i>	<i>Shewanella</i> sp. ANA-3
Localisation	Périplasmique	Associé à la membrane	Périplasmique
Poids moléculaire	123 kDa	150 kDa	131 kDa
Poids des sous-unités	84 kDa (ArrA) 29 kDa (ArrB)	110 kDa (ArrA) 34 kDa (ArrB)	95 kDa (ArrA) 27 kDa (ArrB)
Structure	$\alpha_1\beta_1$	$\alpha_1\beta_1$	$\alpha_1\beta_1$

Tableau 9 : Comparaison des AsV réductases respiratoires de *C. arsenatis*, *B. selenitireducens* et *Shewanella* sp. ANA-3.

Ces enzymes sont des protéines hétérodimériques (Figure 12) constituées d'une grosse sous-unité catalytique, ArrA, à molybdoptérine et centre [4Fe-4S] (similaire aux enzymes à molybdoptérine de la famille des DMSO réductase, comme l'AsIII-oxydase) et d'une petite sous-unité à centre [4Fe-4S], ArrB, qui sert au transfert des électrons. Cette petite sous-unité n'est pas homologue de la protéine de Rieske de l'AsIII-oxydase. Aucune structure cristalline n'est pour l'instant disponible.

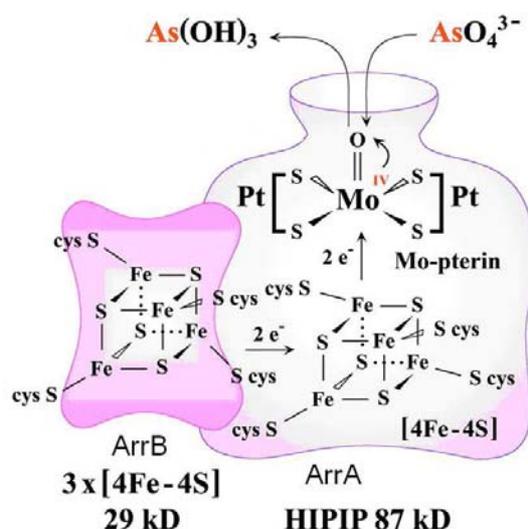


Figure 12 : Modèle de l'AsV réductase respiratoire (adapté de Silver et Phung, 2005a). ArrA est la grosse sous-unité catalytique et ArrB est la petite sous-unité qui sert au transfert des électrons

L'AsV réductase respiratoire de *Shewanella* sp. ANA-3 n'a pas été étudiée au niveau biochimique, mais en détail au niveau génétique (Saltikov *et al.*, 2003). Les poids moléculaires de ArrA et ArrB ont été prédits comme étant de 95,2 kDa et 27,5 kDa. La séquence N-terminale de ArrA comprend une séquence leader Tat, suivie d'une région hydrophobe faiblement chargée, suggérant la localisation périplasmique de cette enzyme. Cette séquence ArrA inclut un motif riche en cystéine C-X₂-C-X₃-C-X₂₇-C qui sert probablement à la fixation du groupement [4Fe-4S] et la séquence ArrB contient également ces motifs riches en cystéines. À noter qu'aucune séquence leader Tat n'a été retrouvée au niveau de cette petite sous-unité (Saltikov et Newman, 2003).

Les gènes impliqués dans la respiration de l'AsV

Chez *Shewanella* sp. ANA-3, deux gènes, *arrA* et *arrB*, organisés en opéron, ont été mis en évidence en aval d'un opéron divergent *arsDABC* (codant pour les fonctions de résistance à l'AsV et l'AsIII) (Figure 13). Il a été montré que le système Ars n'intervient pas dans la respiration de l'AsV et que ces deux gènes *arr* suffisent à la réaliser (Saltikov *et al.*, 2003).

Entre les gènes *arsD* et *arrA*, se trouvent des sites de fixation de type Fnr, un facteur de transcription chez *E. coli* qui régule la transcription de beaucoup de gènes en condition anaérobie, suggérant que l'opéron *arr* est contrôlé par un régulateur de ce type. En effet, il a été montré que ce système n'est exprimé qu'en condition anaérobie et qu'il est réprimé par l'O₂ et le NO₃⁻, contrairement à l'opéron *ars* qui est exprimé en condition aérobie et anaérobie. Toutefois, ces deux opérons sont induits par l'AsIII et l'AsV, mais de faibles concentrations de ces formes suffisent à induire l'opéron *arr* (Saltikov *et al.*, 2005).

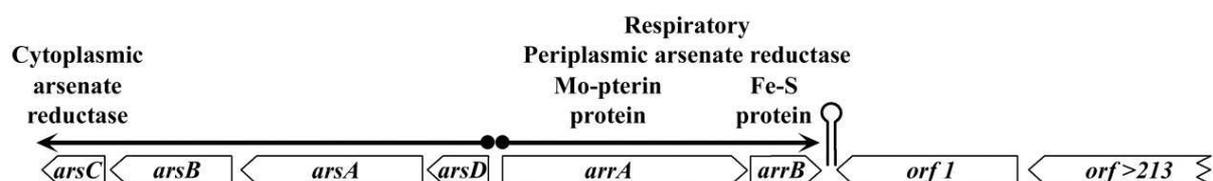


Figure 13 : Organisation moléculaire de la région comprenant l'opéron *arrAB* chez *Shewanella* sp. ANA-3 (d'après Silver et Phung, 2005a).

Des gènes similaires ont été retrouvés chez d'autres bactéries de genres différents et chez des *Archaea* (Figure 14). Chez *Wollinella succinogenes* (Baar *et al.*, 2003) et *Desulfitobacterium hafniense* DCB-2 (Copeland *et al.*, 2002), bactéries dont le génome a été séquencé, un gène *arrC* a été retrouvé en aval du gène *arrA*, et pourrait coder une protéine membranaire putative

qui pourrait servir à la fixation du complexe Arr à la membrane. Chez *D. hafniense* DCB-2, d'autres gènes ont été trouvés. En aval de *arrB*, *arrD* est prédit pour coder une protéine chaperonne et en amont de *arrC*, *arrR* et *arrS* pourraient être des gènes codant un système de régulation à deux composantes.

Les séquences ArrA de *C. arsenatis*, *Shewanella* sp. ANA-3, *B. selenitireducens*, *W. succinogenes* et *D. hafniense* montrent de fortes similarités entre elles avec le même motif cystéine compris dans une séquence conservée de 36 acides aminés C-Q-G-C-T-X-W-C-X12-K-X14-C à l'extrémité N-terminale et l'alignement de la séquence C-terminale montre une région conservée de 15 acides aminés K-C-Y-G-Q-G-H-X-A-X-G-X₃-S.

Le fort degré de similarité des gènes *arrA* d'espèces phylogénétiquement distantes suggère que cette enzyme soit hautement conservée.

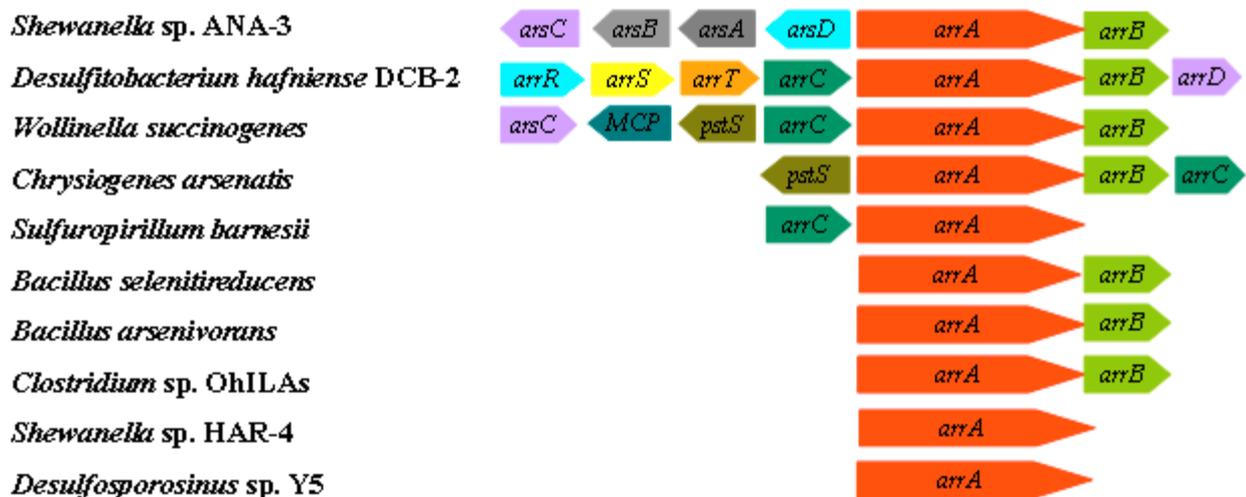


Figure 14 : Diversité des gènes impliqués dans la respiration de l'AsV.

1.4.3. Résistance bactérienne à l'As

Le système Ars

Un grand nombre de microorganismes est connu pour résister à l'As *via* le système Ars (Mukhopadhyay *et al.*, 2002 ; Silver et Phung, 2005). Découvert pour la première fois sur un plasmide, ce système a été identifié sur le chromosome de nombreux microorganismes

(Cervantes *et al.*, 1994 ; Xu *et al.*, 1998). Trois systèmes différents, mais comparables ont été retrouvés chez les bactéries gram-négatives (avec comme modèle *E. coli*), les bactéries gram-positives (avec comme modèle *Staphylococcus*) et les levures (avec comme modèle *Saccharomyces*), et ont évolué de manière convergente (Mukhopadhyay *et al.*, 2002).

Ce système de résistance fait intervenir une AsV réductase cytoplasmique, ArsC, qui réduit l'AsV entré dans la cellule *via* des transporteurs phosphate. Chez *E. coli*, le système de transport phosphate Pst, permet de résister plus fortement à l'AsV en l'absence du système Pit, moins spécifique. L'AsIII produit est ensuite expulsé de la cellule par une pompe d'efflux, ArsB ou ArsAB, selon les bactéries (Figure 15).

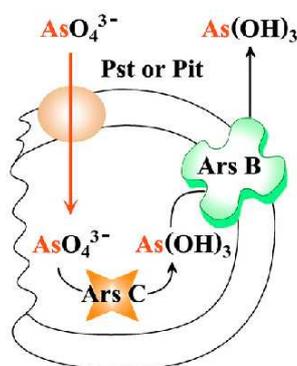


Figure 15 : Localisation cellulaire et fonction des composants du système Ars (d'après Silver et Phung, 2005a). Pst ou Pit sont les transporteurs de phosphate, ArsC est l'AsV réductase cytoplasmique et ArsB est la pompe d'efflux d'AsIII.

Le système Ars est codé par un opéron d'au moins trois gènes (*arsR*, *arsB* et *arsC*), situé sur un plasmide (Rhie *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2006) ou sur le chromosome (Carlin *et al.*, 1995 ; Cai *et al.*, 1998). Le premier opéron *ars* a été trouvé sur le plasmide R773 d'*E. coli*, lui conférant la capacité à résister à l'AsIII, l'AsV et l'antimoine (Hedges et Baumberg, 1973 ; Chen *et al.*, 1986). Cet opéron est composé de cinq gènes (*arsRDABC*): deux gènes régulateurs, *arsR* codant un répresseur inductible à l'As et *arsD* codant une protéine régulatrice du niveau de transcription, ainsi que de trois gènes structuraux, *arsA* codant une sous-unité ATPase soluble qui s'associe au produit du gène *arsB*, une protéine membranaire intégrale, et *arsC* codant l'AsV réductase cytoplasmique. D'autres systèmes de résistances, tels que ceux des plasmides pSX267 et pI258 de bactéries Gram-positives du genre *Staphylococcus* et de chromosomes d'*E. coli* ou de *Pseudomonas aeruginosa* ne sont

composés que de trois gènes, *arsRBC* (Carlin *et al.*, 1995 ; Cai *et al.*, 1998). Cela indique que la protéine ArsB est capable d'exporter l'AsIII en absence de la protéine ArsA (Dey *et al.*, 1995). À noter que le gène *arsA* n'a été retrouvé jusqu'à présent que sur les opérons plasmidiques de bactéries Gram-négatif (Stolz *et al.*, 2002). De plus, la protéine ArsD ne semble pas nécessaire dans le processus de détoxification en agissant seulement comme un régulateur secondaire (Rouch *et al.*, 1995). Récemment, de nombreux autres opérons *ars* ont été caractérisés et peuvent différer des modèles *arsRBC* ou *arsRDABC* par une organisation différente ou par la présence de gènes supplémentaires : *arsM* codant une S-adénosyl-méthionine méthyl-transférase (c.f. paragraphe 3.3.2), *arsH* codant une protéine de fonction inconnue, *arsO* codant une mono-oxygénase putative et *arsT* codant une thioredoxine réductase (Wang *et al.*, 2006).

Les AsV-réductases ont été bien caractérisées chez *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Saccharomyces cerevisiae*. Bien qu'ayant des fonctions similaires, la séquence protéique de ces enzymes montre un faible pourcentage d'homologie. Ces AsV réductases sont divisées en trois catégories : celles dépendantes du glutathion et de la glutarédoxine retrouvées chez les bactéries Gram-négatif, celles dépendantes de la thioredoxine trouvées initialement chez les bactéries Gram-positif et plus récemment chez des bactéries Gram-négatif (Protéobactéries) et celles dépendantes de la glutarédoxine trouvée seulement chez les levures. Des gènes *arsC* apparentés à ceux présents chez des bactéries Gram-positif ont aussi été retrouvés chez des *Archaea* (Mukhopadhyay *et al.*, 2002).

Les études phylogénétiques et évolutives des gènes *arsC* suggèrent une origine commune et ancienne de ces gènes (Jackson et Dugas, 2003). Les arbres phylogénétiques basés sur ce gène montrent certaines similitudes avec ceux basés sur l'ARNr 16S. Par conséquent, ces résultats remettent en cause l'hypothèse d'une évolution convergente (Mukhopadhyay *et al.*, 2002). Néanmoins, des incohérences ont été mises en évidence pour certains taxons. En effet, les *Cyanobacteria* et quelques β -*Proteobacteria* possèdent des gènes *arsC* similaires à ceux des *Firmicutes*. De plus, les gènes *arsC* plasmidiques ne forment pas un groupe monophylétique suggérant de nombreux échanges chromosomes-plasmides et des transferts horizontaux (Jackson et Dugas, 2003). Les opérons *ars* peuvent également être retrouvés en multicopies dans certaines souches bactériennes (Muller *et al.*, 2007). Il a été montré que le gène *arsC* étaient largement répandus dans l'environnement et leur présence a été détectée dans un lac qui n'a connu aucune pollution significative à l'As (Jackson *et al.*, 2005).

Ce processus de réduction de l'AsV et de détoxication peut prendre place aussi bien en condition aérobie qu'en condition anaérobie et joue donc un rôle non négligeable dans l'accumulation d'AsIII dans l'environnement (Macur *et al.*, 2004).

Méthylation de l'As

La deuxième méthode de détoxication est la méthylation d'espèces d'As à l'aide d'une S-Adénosyl Méthionine (SAM), qui sert de donneur de groupements méthyle. Ainsi l'AsV peut être réduit en AsIII puis transformé en MMA₅V, DMA₅V et TMAO, *via* des méthylation successives (Figure 16). Ces méthylation peuvent conduire à la formation des formes volatiles méthylées (d'arsines) : MMA, DMA et TMA (Turpeinen *et al.*, 2002).

Différentes bactéries semblent impliquées dans la méthylation des espèces d'As (Bentley et Chasteen, 2002).

Récemment, un mécanisme de résistance à l'AsIII par méthylation a été décrit. Le gène *arsM* de *Rhodospseudomonas palustris* a pu être exprimé chez *E. coli* lui conférant la faculté de résister à l'AsIII. Il a été montré que ArsM catalyse la formation d'intermédiaires méthylés jusqu'à l'As(CH₃)₃. De plus, les gènes *arsM* homologues sont répandus dans la nature : ils ont été identifiés dans 125 bactéries et 16 archées. Ces données semblent indiquer que la méthylation bactérienne joue un rôle important dans le cycle de l'As (Qin *et al.*, 2006).

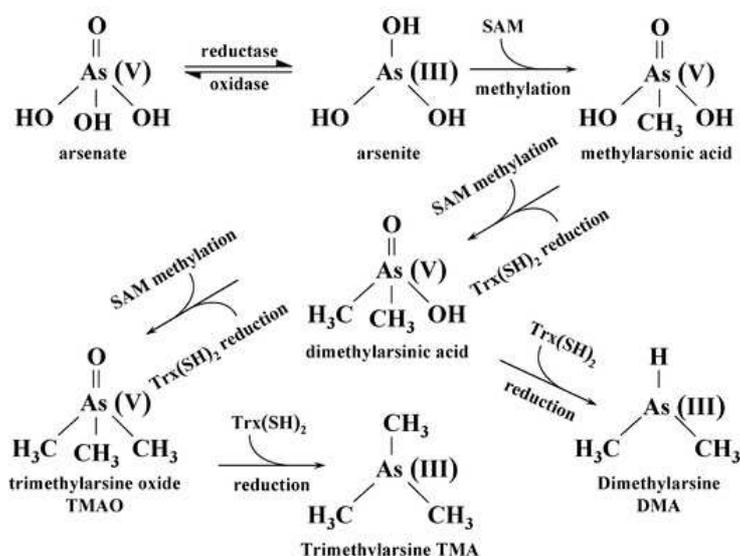


Figure 16 : Étapes de la méthylation de l'As inorganique (d'après Silver et Phung, 2005).

I.5. Stratégies d'études moléculaires des communautés microbiennes

De nombreuses bactéries possèdent des mécanismes qui leur permettent d'intervenir dans les processus biogéochimiques impliqués dans la mobilité de l'As et de part leur diversité taxonomique et fonctionnelle, elles jouent un rôle majeur dans le cycle de l'As. Un challenge important de l'écologie microbienne est donc d'identifier et de comprendre les facteurs qui régulent ces processus. Leur rapidité est fortement liée aux variations de la composition et/ou de l'activité des communautés microbiennes indigènes.

L'analyse de leur diversité est importante pour (Øvreas, 2000) :

- connaître la diversité des ressources génétique d'une communauté ;
- comprendre le rôle fonctionnel de cette diversité ;
- identifier des différences de diversité associée à des perturbations environnementales ;
- comprendre la régulation et la conséquence de la diversité.

Durant des décennies, les études d'écologie microbienne se sont basées sur des méthodes de cultures et ont permis de détecter, isoler et caractériser les bactéries d'environnements variés (eaux, sols, sédiments). Cependant, ces approches culturelles sont fastidieuses et ne mettent en évidence qu'une fraction limitée de la diversité naturelle des bactéries (Amann *et al.*, 1995). Seulement 0,001% à 15% des bactéries présentes dans un écosystème sont en effet cultivables par des méthodes de cultures classiques (Tableau 10). La description de la composition des communautés microbiennes naturelles *via* ces méthodes est limitée par (Amann *et al.*, 1995 ; Muyzer et Ramsing, 1995) :

- la difficulté de mimer les conditions environnementales pour la croissance microbienne dans les conditions de laboratoire ;
- la disparition d'interactions majeures entre les microorganismes d'une communauté (à l'origine de l'existence de la biodiversité de l'environnement naturel) ;
- la meilleure adaptation de bactéries faiblement représentées dans l'environnement sur un milieu de culture donné (au détriment de bactéries majoritaires) ;
- l'absence de développement sur milieu solide de bactéries enrichies en milieu liquide ;

- le passage dans un état viable mais non cultivable de certaines bactéries hors de leur écosystème ;
- le manque de variabilité morphologique parmi certaines bactéries.

La sélection imposée par les méthodes de cultures peut donc fournir une image inexacte des communautés bactérienne naturelles et entraîne une sous-estimation de la richesse et de l'abondance de la diversité bactérienne (Theron et Cloete, 2000).

Habitat	Cultivabilité (%)*
Eau de mer	0,001-0,1
Eau douce	0,25
Lac mésotrophique	0,1-1
Eaux d'estuaires non polluées	0,1-3
Boues actives	1-15
Sédiments	0,25
Sol	0,3

* Bactéries cultivables mesurées en tant qu'unités formant des colonies (UFC)

Tableau 10 : Cultivabilité déterminée comme le pourcentage des bactéries cultivables par rapport aux cellules totales déterminées par comptage direct (d'après Amann *et al.*, 1995)

L'avènement des outils moléculaires en microbiologie environnementale, il y a 20 ans, a permis de s'affranchir des limitations liées aux cultures et a permis de révéler une diversité bactérienne environnementale plus importante. Les premiers inventaires moléculaires ont utilisé une approche de clonage et de séquençage des ARNr 16S pour appréhender la diversité des communautés bactériennes (Giovannoni *et al.*, 1990). Ils ont permis d'améliorer considérablement nos connaissances sur la diversité microbienne présente dans divers écosystèmes, incluant les plus inhospitaliers, en mettant en évidence de nombreuses séquences issues de clones environnementaux et non affiliées à des séquences de bactéries cultivées (Amann *et al.*, 1995 ; Pace, 1996) et par la découverte des *Archaea* (Woese *et al.*, 1987 ; Woese *et al.*, 1990). Parmi les 52 divisions du domaine *Bacteria*, la moitié n'a pas de représentants cultivés (Rappe et Giovannoni, 2003).

I.5.1. Les marqueurs moléculaires

Les marqueurs moléculaires phylogénétiques

Zuckerlandl et Pauling (1965) ont été les premiers à considérer les molécules comme des marqueurs de l'histoire évolutive et ont développé le concept d'horloge moléculaire. Quelques années plus tard, Woese et Fox (1977) ont procédé à des comparaisons systématiques de séquences d'ARN ribosomiques (ARNr). Ils ont ainsi constaté que ces molécules sont des marqueurs phylogénétiques pertinents et fiables, car :

- elles sont présentes dans tous les organismes ;
- elles sont abondantes dans la cellule ;
- elles accomplissent un rôle important dans la cellule, et donc leur structure secondaire a été conservée durant l'évolution ;
- elles possèdent des régions hautement conservées ou variables. Certaines sont identiques dans l'ensemble des bactéries et sont ciblées par des amorces universelles. D'autres sont spécifiques à un groupe et permettent l'identification des taxa (espèce, genre, phyla ou encore domaine). La comparaison de régions conservées permet d'évaluer les relations phylogénétiques entre microorganismes éloignées, tandis que les régions variables permettent l'étude d'espèces plus proches ;
- elles ont une taille adéquate pour les méthodes moléculaires.

En quelques années, l'analyse comparative des séquences de la petite sous-unité des ARNr amplifiées à partir de souches pures et d'échantillons environnementaux a totalement changé notre vision de la biosphère et a permis de reconstruire l'arbre de la vie (Figure 17). Les organismes vivants sont alors répartis en trois domaines : *Bacteria*, *Archaea* et *Eucarya*.

Les procaryotes possèdent trois molécules d'ARNr, l'ARNr 5S, l'ARNr 16S et l'ARNr 23S, réparties dans deux sous-unités et codées par des gènes généralement organisés en opéron, l'opéron *rnm*. Bien que l'ARNr 23S possède une plus grande quantité d'information phylogénétique (~2300 nt), sa taille plus importante et la présence de structures secondaires particulièrement marquées ont longtemps rendu son clonage et son séquençage difficile. De plus, l'efficacité de l'ARNr 5S (~120 nt) pour l'étude de communauté complexe est limitée par sa petite taille. Par conséquent, les bases de données de séquences d'ARNr 16S (~1500 nt)

sont rapidement devenues plus importantes et ont permis de mieux comparer les bactéries. Plus de 600000 séquences de gènes codant l'ARNr 16S sont aujourd'hui disponibles dans Genbank.

L'ARNr 16S est devenu le marqueur de référence pour identifier et déterminer les relations phylogéniques entre les différentes bactéries (Muyzer et Ramsing, 1995). L'identification d'une bactérie peut être simplement réalisée en évaluant la position de sa séquence d'ARNr 16S au sein d'un arbre phylogénétique (Figure 17). Deux bactéries appartiennent à la même espèce si leur ARNr 16S présente plus de 97% d'homologie de séquence. Néanmoins, Normand *et al.* (1996) ont indiqué que le gène codant l'ARNr 16S n'est souvent pas assez divergent pour permettre une bonne séparation au sein d'espèces d'un même genre. Ce problème peut être résolu par l'analyse de la région localisée entre les gènes codant l'ARNr 16S et l'ARNr 23S, caractérisée par une taille et une composition de séquences fortement variables au sein de groupes phylogénétiquement proches, et donc bien plus discriminante pour étudier la diversité de bactéries étroitement apparentées (García-Martínez *et al.*, 1999).

Le choix de l'ARNr 16S pour déterminer la phylogénie bactérienne s'est basé sur une diversité de séquences purement due aux changements évolutifs et non pas influencée par des transferts horizontaux. Pourtant, dès 1993, Sneath a mis en évidence l'échange horizontal de fragments de gènes codant l'ARNr 16S chez des espèces d'*Aeromonas*. D'autres études ont mis en évidence des transferts latéraux de fragments de gènes d'ARNr chez des espèces de *Rhizobium*, *Helicobacter*, *Bradyrhizobium* et d'actinomycètes (Schouls *et al.*, 2003, Eardly *et al.*, 1996, Parker *et al.*, 2001, Ueda *et al.*, 1999, Wang et Zhang, 2000, Dewhirst *et al.*, 2005). Des transferts d'opérons *rrn* complets, inter- ou intra-espèces peuvent également avoir lieu (Lan et Reeves, 1998 ; Yap *et al.*, 1999). Bien que ces événements restent rares, leur possibilité impose une vérification plus rigoureuse de la validité d'arbres phylogénétiques basés sur les ARNr.

Plusieurs exemplaires de l'opéron *rrn* peuvent être retrouvées au sein d'une même souche (*e.g.*, il en existe 10 chez *B. subtilis*). Bien qu'ils soient généralement identiques ou très proches, d'importantes variations peuvent être retrouvées au sein d'une même souche, tandis que des gènes codant l'ARNr 16S presque identiques ont été retrouvés chez des bactéries phénotypiquement différentes (Fox *et al.*, 1992). Ainsi, de nouveaux marqueurs phylogénétiques ont été proposés, en complément à l'ARNr 16S pour la caractérisation de

certaines espèces et genres bactériens cultivables, tels que le gène *rpoB*, codant la sous-unité β de l'ARN polymérase et présent en une seule copie dans les génomes (Dahllöf *et al.*, 2000 ; Kim *et al.*, 2004). Ces marqueurs peuvent posséder un pouvoir discriminant plus grand pour analyser la diversité des espèces au sein d'un même genre. Néanmoins, aucune molécule analysée individuellement, incluant l'ARNr 16S, est complètement fiable pour reconstruire la phylogénie d'un organisme et des analyses intégrant différents marqueurs sont de plus en plus réalisées (Holmes *et al.*, 2004, Bavykin *et al.*, 2004).

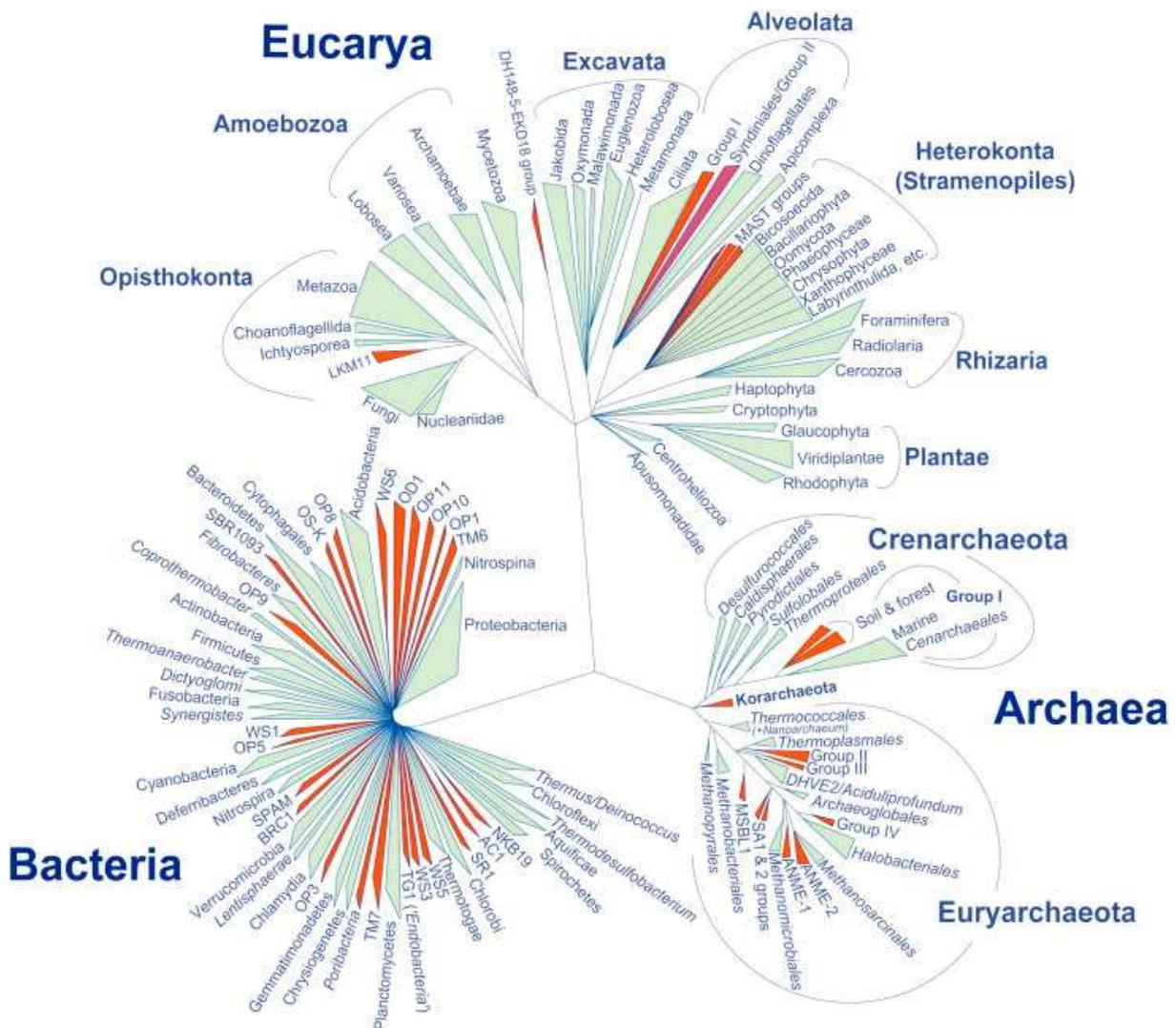


Figure 17 : Représentation schématique de l'arbre de la vie basée sur l'analyse des séquences de la petite sous-unité des ARN ribosomiaux. Les triangles verts représentent les phyla, divisions ou groupes de rangs taxonomiques élevés pour lesquels au moins un membre a été cultivé et/ou convenablement décrit. Les triangles rouges représentent les phylotypes et les lignées retrouvés exclusivement à partir de séquences issues de clones environnementaux (d'après López-García et Moreira, 2008).

Si l'analyse des gènes codant l'ARNr 16S (ou d'autres marqueurs phylogénétiques) permet d'identifier les espèces présentes au sein d'une communauté bactérienne dans un environnement donné, l'analyse des ARNr (après une transcription inverse) permet la détection et l'identification d'espèces métaboliquement active, car la quantité d'ARNr produit est directement relié à l'activité de croissance des bactéries (Wagner, 1994).

Le principal inconvénient de l'approche moléculaire basée sur les ARNr 16S est son incapacité à fournir des informations directes sur les capacités métaboliques des bactéries détectées, contrairement à des espèces isolées par des méthodes culturales. Des prédictions peuvent néanmoins être réalisées si elles sont étroitement apparentées à des espèces cultivées déjà connues pour présenter une capacité métabolique d'intérêt (*e.g.* méthanogènes, sulfato-réductrices...). Cependant, peu de groupes phylogénétiques correspondent à un type métabolique donné. Le rôle fonctionnel d'une espèce détectée dans un écosystème *via* une séquence d'ARNr 16S reste donc indéterminé si cette séquence est phylogénétiquement éloignée de celle de souches connues. Les bactéries transformant l'As forment un groupe polyphylétique très divers avec des organismes étroitement apparentés à d'autres incapables de le transformer. La capacité à détecter et identifier spécifiquement de tels groupes métaboliques dans l'environnement par des approches basées sur l'ARNr 16S est donc réduite.

Les marqueurs moléculaires fonctionnels

Une approche alternative pour identifier un métabolisme spécifique à partir de séquences environnementales est de cibler les gènes de fonction codant les enzymes spécifiques du métabolisme ciblé. Le degré de conservation de ces gènes est moins important que celui des gènes codant l'ARNr 16S, mais pour certains, il l'est suffisamment pour pouvoir dessiner des amorces qui les ciblent spécifiquement. Ainsi, de nombreux gènes de fonction ont été utilisés pour détecter et analyser la diversité de bactéries impliquées dans un métabolisme particulier, tels que ceux impliqués dans la sulfato-réduction (*dsrAB* codant la bisulfite réductase, *apsA* codant l'APS réductase), dans la nitrification (*amoA* codant l'ammoniaque monooxygénase) ou dans la résistance aux métaux. De plus, l'analyse des ARN messagers (ARNm) de certains gènes fonctionnels a permis de détecter et identifier des bactéries exprimant les activités enzymatiques clés dans des conditions environnementales spécifiques.

Récemment, des gènes de fonction ont également été utilisés pour étudier les bactéries présentes et actives impliquées dans le cycle de l'As dans divers écosystèmes.

Les gènes codant la sous-unité catalytique de l'As^{III}-oxydase (gènes *aoxB* ou *aroA*) ont été utilisés pour étudier la diversité des bactéries As^{III}-oxydantes dans des environnements naturels. Ces gènes semblent répandus dans les différents compartiments environnements (sols, eaux et sédiments) (Inskip *et al.*, 2007, Fan *et al.*, 2008). Inskip *et al.* (2007) ont montré que l'expression des gènes *aroA* issus d'eaux géothermales (YNP, USA) est associée à une oxydation d'As *in situ*.

Les gènes *arrA* ont été utilisés comme marqueur moléculaire de la respiration de l'As^V dans l'environnement (Malasarn *et al.*, 2004). L'expression et la quantité de ces gènes, amplifiés à l'aide d'amorces dégénérées, sont directement corrélées à l'augmentation d'As^{III} solubilisé à partir d'oxy-hydroxydes de Fe amorphe piégeant l'As^V dans les sédiments du réservoir d'eau Haiwee (CA, USA). Cependant, la petite taille des fragments amplifiés (~180 pb) à l'aide de ces amorces a pour effet d'augmenter la similarité parmi les séquences *arrA* (Pérez-Jiménez *et al.*, 2005). En effet, ces fragments montrent 83 % de similarité entre eux en moyenne. Une autre étude a été réalisée avec ces amorces à partir d'eaux du lac hypersalé Mono (CA, USA) et la phylogénie basée sur les fragments du gène *arrA* obtenus se montre cohérente avec celle basée sur le gène codant l'ARNr 16S (Hollibaugh *et al.*, 2005). Cependant, ces amorces ont permis l'amplification de gènes *arrA* paralogues chez la souche MLHE-1 incapable de respirer l'As^V. Néanmoins, les auteurs ont précisé que des analyses réalisées sur un fragment court ne permettent pas de certifier à l'aide des pourcentages d'identité que la région étudiée est bien spécifique du gène ciblé. Les amorces utilisées n'ont pas permis l'amplification du gène *arrA* chez *Desulfosporosinus auripigmentum*, pourtant connue pour respirer l'As^V (Malarsarn *et al.*, 2004). Le gène *arrA* d'une souche du même genre, *Desulfosporosinus* sp. Y5, a toutefois pu être amplifié à l'aide d'autres amorces (Perez-Jimenez *et al.*, 2005). Kulp *et al.* (2006) ont dessiné de nouvelles amorces dégénérées permettant d'amplifier un fragment plus long (~600 pb) de gènes *arrA* à partir d'un plus large panel de bactéries et à partir de sédiments de deux lacs hypersalés (Mono et Searles, USA), où des activités de réduction de l'As^V sont mesurées. Lear *et al.* (2007) ont également développé des amorces permettant de cibler les gènes *arrA* à partir de sédiments collectés d'un aquifère cambodgien.

Sun *et al.* (2004) ont également proposé une méthode de détection et de quantification des gènes *arsC*, codant l'AsV-reductase cytoplasmique, pour évaluer l'abondance des bactéries AsV-réductrices dans des échantillons de sols (Sun *et al.*, 2004).

Néanmoins, l'utilisation de ce type de marqueurs peut être compliquée par : (i) la variabilité interne au sein de communautés naturelles, inconnue pour ce type de gènes, entraînant des difficultés pour la formation d'OTU (operating taxon unit), (ii) les transferts horizontaux, induisant une faible valeur phylogénétique, (iii) l'absence d'amorces universelles pour les gènes fonctionnels et (iv) le dessin d'amorces, lié aux séquences déjà existantes, les banques de séquences fonctionnelles étant bien moins riches que celles d'ARNr 16S.

1.5.2. Les outils moléculaires pour analyser les échantillons environnementaux

Différents outils moléculaires sont disponibles pour étudier et suivre la diversité et l'abondance des communautés microbiennes présentes et actives dans les différents compartiments environnementaux. Ces outils peuvent être divisés en deux catégories, selon qu'ils impliquent ou non une étape d'amplification par PCR (polymerase chain reaction).

La technique d'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) est un exemple d'outil indépendant de la PCR. Elle permet non seulement de s'affranchir des biais inhérents à l'amplification par PCR mais également à ceux de l'étape d'extraction d'acides nucléiques, en ciblant directement les ARNr abondants dans les cellules avec des sondes fluorescentes spécifiques à un taxon. Les cellules rendues ainsi fluorescentes sont visualisées en microscopie optique. La quantité importante de séquences d'ARNr 16S disponibles dans les bases de données a permis de dessiner des sondes ciblant un large éventail de taxa : espèces, genre ou domaine. Généralement, une sonde ciblant le domaine *Bacteria* est utilisée en combinaison avec des sondes plus spécifiques. Cette technique a permis de décrire, qualitativement et quantitativement, la structure de communauté bactérienne de différents écosystèmes, tels que les aquifères contaminés. Récemment, Weldom et MacRae (2005) ont mis en évidence une corrélation entre l'augmentation d'As dans des eaux souterraines et l'abondance de la bactérie respirant l'AsV, *Sulfurospirillum* sp. NP4, et d'autres du genre *Geobacter* respirant le FeIII.

Néanmoins, l'application de cette technique peut conduire à la production de faux positifs ou de faux négatifs, notamment dans le cas des sols. De surcroît, elle est difficilement applicable à l'étude des communautés bactériennes fonctionnelles d'intérêt puisqu'elle ne cible que les ARNr. Au contraire, les outils moléculaires dépendants de la PCR sont particulièrement pertinents pour analyser les communautés bactériennes fonctionnelles d'écosystèmes complexes, tels que les sols.

Les principaux avantages des outils PCR dépendants *vs.* les autres outils moléculaires sont :

- la sensibilité de détection de petite quantité d'acides nucléiques dans l'environnement ;
- la détection de fonctions microbiennes particulières *et/ou* actives (*via* les ARNm). En comparant les produits PCR obtenus de l'ADN génomique et des ARNm extraits, il est possible de déterminer l'expression préférentielle de certaines fonctions dans une population selon les différentes conditions du milieu ;
- l'identification des microorganismes et la vérification de la spécificité de la méthode ;
- la rapidité de l'analyse.

La Figure 18 cible la procédure et les différentes techniques utilisées durant cette thèse, dont le principe et les conditions de réalisation seront détaillées dans le chapitre 2. Toutes ces techniques font appel à la PCR et requièrent donc l'utilisation d'amorces adéquates permettant de cibler les bactéries d'intérêt. Elles présentent des biais communs, liés à l'extraction d'acides nucléiques et à la génération de produits artefacts de la PCR et des biais spécifiques à chacune d'entre elles.

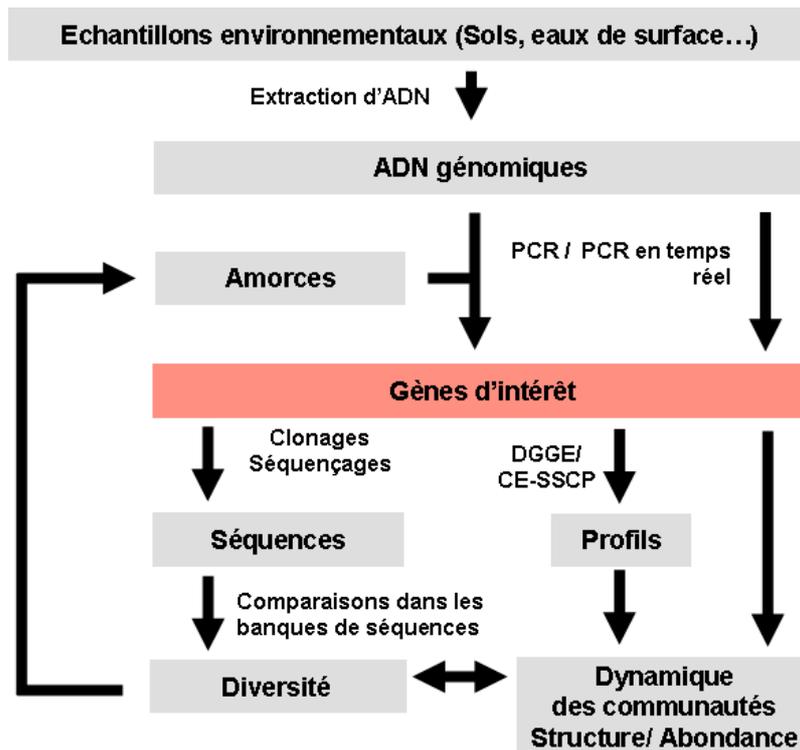


Figure 18: Processus des différentes techniques moléculaires utilisées en microbiologie environnementale

L'ensemble de ces méthodes moléculaires PCR-dépendantes nécessite une étape préalable d'extraction des acides nucléiques. Cette étape est cruciale et consiste à isoler des acides nucléiques « propres » et représentatifs de la communauté bactérienne à partir d'écosystèmes « sales », tels que les sols.

Deux approches peuvent être utilisées pour l'isolement d'acides nucléiques à partir d'échantillons environnementaux: (i) l'extraction directe consistant en une lyse directe des cellules en présence de la matrice de sol ou de sédiments, et (ii) l'extraction indirecte consistant à extraire préalablement les microorganismes des sols avant la lyse des cellules et la récupération des acides nucléiques (Saano *et al.*, 1995). Différents types de lyse pour extraire les acides nucléiques des cellules existent (Sørensen *et al.*, 2002), mais les lyses mécaniques permettent d'obtenir rapidement et de façon reproductible des acides nucléiques de qualité et en plus grande quantité et mettent ainsi en évidence une plus forte diversité bactérienne dans un écosystème tel qu'un sol (Cullen et Hirsch, 1998 ; de Liphay *et al.*, 2004). L'utilisation de la méthode indirecte peut fournir des résultats biaisés (Primé *et al.*, 1996 ; Aakra *et al.*, 2000), par l'extraction d'une fraction cellulaire plus facilement desorbable des sols (durant l'étape de dispersion) et non représentative de la fraction totale. Ranjard *et al.* (2000) ont montré un effet plus prononcé d'un apport d'Hg sur le changement d'empreintes

moléculaires dans la fraction externe des agrégats de sol. Ils suggèrent que les bactéries localisées dans la partie externe sont moins protégées des toxiques, contribuant à une disparition des populations sensibles et à l'enrichissement de populations plus résistantes. Aujourd'hui, la méthode de lyse directe de cellule microbienne dans le sol est la plus utilisée.

La lyse directe est également utilisée pour extraire les ARN. Mais celle-ci s'avère plus laborieuse car les ARN sont plus prédisposés aux dégradations par les nucléases que les ADN. Cela explique le peu d'études décrivant les populations actives dans l'environnement. Néanmoins, différentes méthodes ont été proposées pour extraire les ARNr (Felske *et al.*, 1996), les ARNr et les ARNm (Chang *et al.*, 1993 ; Fleming *et al.*, 1998) et les ADN et ARN en parallèle (Bürgmann *et al.*, 2003).

Le choix de protocoles appropriés pour l'isolement d'ADN et d'ARN est essentiel pour la caractérisation des populations bactériennes (Martin-Laurent *et al.*, 2001 ; Stach *et al.*, 2001 ; Sessitsch *et al.*, 2002). Chacun peut donner des profils de communauté différents à partir d'un même échantillon. Ils peuvent non seulement influencer sur la diversité phylogénétique des communautés, mais également sur la diversité fonctionnelle. Il est donc essentiel d'utiliser la même procédure lors d'un suivi de communauté.

Une fois l'échantillon d'acides nucléiques obtenu, l'étape de PCR peut elle aussi poser problème. L'étape de lyse directe des acides nucléiques peut conduire à une contamination de l'ADN avec les acides humiques, les métaux et autres inhibiteurs, qui peuvent inhiber les ADN polymérase et donc limiter l'efficacité des amplifications PCR. Néanmoins, des produits PCR peuvent être obtenus d'ADN contaminé par des métaux lourds et des acides humiques (Yeates *et al.*, 1997 ; von Wintzingerode *et al.*, 1997 ; Kozdrój et van Elsas, 2001). L'addition de facilitateurs de PCR, tels que la BSA, peut réduire les effets inhibiteurs des contaminants.

Si l'étape de PCR semble avoir été réalisée avec succès, les efficacités d'amplification PCR ne sont pas les mêmes pour toutes les molécules. Des amplifications préférentielles d'ARNr 16S de certaines bactéries au détriment d'autres sont observées. Par exemple, les matrices présentant un fort taux de bases GC vont être dissociées moins efficacement que celles avec un faible taux de bases GC, ce qui entraîne une amplification préférentielle des matrices à faibles taux de bases GC (von Wintzingerode *et al.*, 1997). L'addition de DMSO peut

optimiser les PCR sur matrices d'ADN riches en bases GC difficiles à dénaturer. De plus, les produits PCR dépendent fortement de la spécificité des amorces et des conditions PCR. L'amplification PCR peut également entraîner la formation de chimères, produites lors des premiers cycles PCR au cours desquels deux brins d'ADN distincts possédant des régions fortement similaires peuvent s'apparier, et favorisées par l'amplification d'ADN fragmenté par des procédures de lyses mécaniques. Enfin, les ADN polymérases sont connues pour faire des erreurs, mais leurs faibles taux n'auront pas d'effet significatif sur les analyses phylogénétiques.

Librairies de clones

Les techniques de clonage et de séquençage sont très utiles pour analyser la diversité et identifier les bactéries d'intérêt. La comparaison des séquences d'ARNr 16S issus de clones avec celles disponibles dans les banques de séquences permettent d'établir des relations entre les nouvelles séquences et les espèces connues et permettent d'appréhender la diversité bactérienne dans l'environnement. Récemment, ces techniques ont été utilisées pour des études de diversité des bactéries impliquées dans le cycle de l'As dans des écosystèmes variés *via* les gènes de fonction *arrA* ou *aoxB* (Hollibaugh *et al.*, 2006 ; Kulp *et al.*, 2006 ; Lear *et al.*, 2007; Inskeep *et al.*, 2007 ; Fan *et al.*, 2008).

Néanmoins, l'analyse de communautés complexes par ces techniques peut s'avérer longue, laborieuse et coûteuse (Muyzer et Smalla, 1998). Pour ces raisons, cette approche est particulièrement inadaptée pour étudier la dynamique de communautés bactériennes présentes et/ou actives en fonction du temps, de l'espace géographique et/ou des perturbations environnementales naturelles ou anthropiques.

Les techniques d'empreintes moléculaires

Les techniques d'empreintes moléculaires permettent d'obtenir rapidement une image de la diversité et de la richesse des communautés bactériennes présentes et/ou actives dans un écosystème donné, ainsi que l'analyse simultanée de plusieurs échantillons et la comparaison des communautés complexes, le suivi des changements de structure de ces communautés en fonction de la variation de certaines conditions environnementales et le criblage de librairies de clones.

Différentes techniques offrent la possibilité d'étudier non seulement la dynamique de communautés bactériennes totales, mais également celles de communautés bactériennes fonctionnelles : la « denaturing/temperature gradient gel electrophoresis » (D/TGGE) et la « temporal temperature gradient gel electrophoresis » (TTGE) (Muyzer et Smalla, 1998), la « Single-Strand Conformation Polymorphism » (SSCP) et la « Capillary Electrophoresis-SSCP » (CE-SSCP) (Lee *et al.*, 1996 ; Delbès *et al.*, 2000), la « Restriction Fragment Length Polymorphism » (RFLP) et la « Terminal – RFLP » (T-RFLP) (Liu *et al.*, 1997) (Tableau 11). Les membres d'une communauté sont différenciés en fonction de la taille ou de la composition de la séquence des fragments PCR (Tableau 11). Chaque méthode présente des avantages et des inconvénients en termes de résolution, de débit et de longueur et qualité des séquences permettant d'identifier les bactéries présentes (Tableau 11). Deux techniques ont été utilisées durant cette thèse pour étudier les communautés bactériennes naturelles : la DGGE (basée sur une électrophorèse sur gel) et la CE-SSCP (basée sur une électrophorèse capillaire).

Techniques	Principe de séparation	Principaux avantages	Principaux Inconvénients
DGGE/TGGE ¹	Variabilité de conformation moléculaire de fragment PCR double brin en condition dénaturante	Identification possible des membres de la communauté	Analyse de fragments courts (max. 700 pb) ; Formation de molécules hétéroduplexes
SSCP ¹	Variabilité de conformation moléculaire de fragment PCR simple brin en condition non dénaturante		Analyse de fragments courts (150-400 pb) ; Problèmes de reproductibilité
CE-SSCP ²	fragment PCR simple brin en condition non dénaturante	Haut-débit ; Résolution élevée, marqueurs internes	Aucune information phylogénétique directe ³ ; Equipement cher
RFLP ¹	Variabilité de la taille de fragments PCR double brins digérés par des endonucléases en condition non dénaturante	Equipement peu coûteux	Aucun lien entre le nombre de bandes dans un profil et le nombre fragments PCR;
T-RFLP ²		Haut-débit ; Détection de membres rares d'une communauté ; Existence d'une base de T-RF ⁴	Equipement cher

¹Electrophorèse sur gel

²Electrophorèse capillaire de fragments PCR amplifiés avec une amorce fluorescente

³ Identification phylogénétique en analysant en parallèle une librairie de clone générée à partir du même échantillon et en séquençant les clones correspondant aux pics de la communauté.

⁴ Identification phylogénétique possible *via* la taille des fragments de restriction terminaux (T-RF) en utilisant les bases de données indiquant la taille des T-RF de bactéries connus

Tableau 11 : Comparaison de techniques d'empreintes moléculaires : Principe, avantages et inconvénients (adapté à partir de Muyzer *et al.*, 1999).

La DGGE a été utilisée pour la première fois en écologie microbienne pour étudier, *via* la région V3 du gène codant l'ARNr 16S, les communautés bactériennes totales de mats microbiens de la mer des Wadden et de biofilms bactériens de réacteurs de traitements d'eaux usées (Muyzer *et al.* 1993). Elle consiste à séparer les fragments PCR double brin en fonction de la conformation moléculaire qu'ils adoptent, conformation dépendante de la composition de leur séquence, dans un gel de polyacrylamide en condition dénaturante (c.f. chapitre 2). Cette technique a été utilisée dans des écosystèmes variés (Muyzer et Smalla, 1998, Nakatsu, 2007). Elle a récemment été utilisée pour évaluer l'impact des métaux lourds sur les communautés bactériennes totales des sols (Gremion, 2003 ; Li *et al.*, 2005). Elle a également permis d'évaluer la dynamique de communautés bactériennes impliqués dans un métabolisme particulier, tels que la sulfato-réduction (Geets *et al.*, 2006) ou la nitrification (Nicolaisen *et al.*, 2002).

Le principal atout de la DGGE est la possibilité de parfaire les résultats par : (i) la détection de bandes plus rares ou d'espèces spécifiques par hybridation sur membrane *via* des sondes spécifiques et/ou (ii) l'extraction de bandes à partir du gel pour une identification par séquençage et la détermination de l'affiliation phylogénétique des bactéries détectées. La reproductibilité de la méthode a également été démontrée par de nombreuses études.

Un inconvénient de cette technique est la visualisation de molécules hétéroduplexes formées durant l'amplification PCR (molécules avec des brins provenant de deux produits PCR), rendant difficile l'interprétation de la complexité des profils DGGE et entraînant une surestimation du nombre réel de taxons. La présence de multiples copies du gène étudié dans une même souche ou l'utilisation d'amorces dégénérées peut également entraîner la présence de différentes bandes représentant une même souche dans un profil (Nübel *et al.*, 1996 ; Kowalchuck *et al.*, 1997). Au contraire, une bande DGGE ne représente pas toujours une seule espèce (Sekiguchi *et al.*, 2004) et la co-migration de fragment d'ADN entraîne une sous-estimation de la richesse de la communauté. Cette technique nécessite un choix pertinent d'amorces et l'optimisation des conditions d'électrophorèse pour analyser le polymorphisme de gènes d'intérêt, car un changement de ces paramètres peut entraîner une résolution différente de la séparation des fragments. De plus, l'analyse de fragments courts, réduisant la variation de séquence, peut rendre la séparation difficile (Vallaeyts *et al.*, 1997 ; Buchholz-Cleven *et al.*, 1997). Néanmoins, cet inconvénient est valable pour d'autres techniques d'empreintes moléculaires (TGGE et SSCP/CE-SSCP), et des études ont montré que deux

fragments différant seulement d'une base pouvaient être différenciés (Nübel *et al.*, 1996 ; Kowalchuk *et al.*, 1997).

Comme d'autres techniques basées sur une électrophorèse sur gel (SSCP, TGGE et RFLP), un nombre maximum de fragments d'ADN peuvent être séparés par profils et des difficultés peuvent être rencontrées pour comparer des profils complexes.

L'utilisation de **l'électrophorèse capillaire SSCP** (CE-SSCP) permet de s'affranchir de certains de ces problèmes. De part sa nature haut-débit, elle permet d'analyser rapidement et simultanément de nombreux échantillons (jusqu'à 96 par analyse). De plus, l'électrophorèse capillaire permet une analyse hautement résolutive et reproductible par : (i) l'ajout d'un standard interne qui permet de s'affranchir des problèmes liés aux variations de gels à gels, (ii) la standardisation des réactifs et (iii) le contrôle automatique des conditions d'électrophorèse. L'analyse du polymorphisme de fragments PCR simple brin (SSCP) de gènes codant l'ARNr 16S a été utilisée pour la première fois pour accéder à la diversité des communautés microbiennes totales naturelles par Lee *et al.* (1996). La séparation est basée sur la différence de conformation moléculaire de fragments simple brin, qui va influencer leur mobilité électrophorétique. Elle est optimale pour des fragments compris entre 150 et 400 bp de longueur. Cette technique a été appliquée à différents écosystèmes, tels que la rhizosphère (Schmalenberger et Tebbe, 2003) et a également été adaptée aux gènes fonctionnels, tels que ceux impliqués dans la dégradation des BTEX (Witzig *et al.*, 2006). En CE-SSCP, les fragments PCR sont amplifiés avec une amorce fluorescente, puis dénaturés et directement séparés par électrophorèse capillaire avant d'être détectés par un laser (c.f. chapitre 2). La CE-SSCP a récemment été appliquée à l'étude de communautés complexes (Dabert *et al.*, 2005 ; Peu *et al.*, 2006).

La CE-SSCP permet d'accéder rapidement et efficacement à la diversité et à l'abondance relative des différentes bactéries constituant une communauté par : (i) le dénombrement total de pic distinct (pouvant être considéré comme représentant une espèce) à l'intérieur d'un profil (représentant la communauté), (ii) l'identification des pics en analysant parallèlement une librairie de clone générée à partir du même échantillon et en séquençant les clones correspondant aux pics de la communauté, (iii) la quantification relative des bactéries détectées par détermination de la mesure de fluorescence de chaque pic par rapport à la

somme de la fluorescence. Cependant, comme pour la DGGE, la présence de plusieurs copies du gène au sein d'une même souche peut biaiser ces résultats.

Bien qu'encore peu utilisée, la CE-SSCP offre de nombreux avantages par rapport aux techniques existantes. Hong *et al.* (2007) ont comparé les techniques CE-SSCP et DGGE pour suivre les communautés complexes remédiant les drainages acides. Ils ont montré que ces deux méthodes sont reproductibles, mais la résolution de la CE-SSCP est plus élevée en terme de nombre de pics total résolu, réduisant la co-migration de séquences d'ADN distinctes, et de longueur et de lisibilité des données de séquençage d'ADN des clones utilisés pour identifier les pics. Aussi, le principal avantage de la CE-SSCP vs. la T-RFLP, une autre technique à haut débit basée sur une électrophorèse capillaire, est qu'elle ne nécessite pas la digestion des cibles, pouvant entraîner une digestion incomplète ou la formation de pics multiples par OTU (Clément *et al.*, 1998). Cependant, une saturation du nombre de pics a été rapportée pour des profils de CE-SSCP issus de systèmes complexes et comptant plus de 35 pics (Loisel *et al.*, 2006).

Quantification

Deux techniques de PCR sont généralement utilisées pour détecter et quantifier les ADN d'intérêt dans l'environnement : la PCR compétitive (quantification en fin de réaction) et la PCR en temps réel (quantification à chaque cycle de la réaction PCR).

La PCR compétitive consiste à amplifier, dans le même tube, l'échantillon et une concentration connue d'un compétiteur qui présente une séquence très proche du fragment à amplifier, ne différant que par quelques bases qui permettent de les différencier. Les produits d'amplification, séparés sur gel, sont de même intensité si la concentration de l'échantillon est proche de celle du compétiteur, permettant ainsi de déduire la concentration de la cible dans l'échantillon. Différentes dilutions d'échantillon doivent être testées pour obtenir un ratio fiable entre la cible et le compétiteur et l'efficacité d'amplification de la cible et du compétiteur doit être similaire. Néanmoins, ce dernier problème peut également être rencontré en PCR en temps réel. Le nombre d'échantillon à analyser peut également devenir un facteur limitant. Cette technique a été utilisée pour suivre de nombreuses communautés fonctionnelles environnementales, telles que celles impliquées dans le métabolisme du méthane (Inagaki *et al.*, 2004) ou la nitrification (Cébron *et al.*, 2003).

La PCR en temps réel consiste à détecter et quantifier un signal fluorescent produit de façon proportionnelle à la quantité des produits d'amplification durant la réaction PCR. Deux types de marqueurs peuvent être utilisés pour la détection quantitative des produits PCR : les marqueurs non spécifiques se liant à l'ADN double brin, tels que le SYBR Green I et les sondes spécifiques. La technologie SYBR Green I a été utilisée dans ce travail et est donc décrite dans le chapitre 2. Les sondes spécifiques sont des oligonucléotides, marqués avec deux fluorophores (un « reporter » et un « quencher »), homologues à la séquence du produit amplifié et s'appariant avec l'ADN cible durant l'amplification. La fluorescence émise par le « reporter » peut être adsorbé par le « quencher » en fonction de la distance (Poitras et Houde, 2002). Les sondes spécifiques sont divisées en deux catégories : les sondes d'hydrolyse (comme la sonde TaqMan) et les sondes d'hybridation (comme les Molecular Beacons ou les amorces Scorpion). Les sondes TaqMan sont hydrolysées par l'activité exonucléase 5'-3' de l'ADN polymérase après chaque cycle et cette hydrolyse entraîne une émission de la fluorescence proportionnelle au nombre de molécules ciblées amplifiées. Les sondes d'hybridation ne sont pas hydrolysées durant le cycle PCR. Au contraire, la fluorescence est générée par un changement de leur structure secondaire après fixation de l'ADN ciblé, lequel est également proportionnel au nombre de molécules amplifiées. La quantification *via* ces méthodes de PCR en temps réel nécessite le développement d'une courbe standard et la définition d'un cycle seuil, le Ct (c.f. chapitre 2). La quantité initiale d'un échantillon inconnu est obtenue en comparant son Ct à la droite standard, obtenue après amplification d'une dilution en série de quantité connue de cible. Les principaux avantages de cette technique sont : sa précision, sa sensibilité et la rapidité d'analyse d'un grand nombre d'échantillons. Cette technique a récemment été utilisée pour évaluer l'abondance de nombreuses communautés fonctionnelles environnementales, telles que celles impliquées dans le métabolisme du méthane (Inagaki *et al.*, 2004), de l'azote (Okano *et al.*, 2004 ; Henry *et al.*, 2006 ; Geets *et al.*, 2007) et notamment de l'As, en ciblant les gènes *arsC* (Sun *et al.*, 2004).

Si les techniques moléculaires ont permis de considérablement accroître le champ des connaissances en écologie microbienne, il est désormais indéniable que seul l'emploi combiné d'une approche moléculaire et culturale permettra de relier les informations concernant la diversité et la fonction des communautés microbiennes dans l'environnement et de s'affranchir des inconvénients de chaque méthode. Les méthodes culturales sont faciles à mettre en œuvre et ne nécessitent pas un matériel coûteux. Elles permettent d'étudier séparément les différents facteurs environnementaux susceptibles de contrôler les activités

microbiennes dans l'environnement, et donc de mieux comprendre les mécanismes de régulations. De plus, l'isolement et la caractérisation de souches phylogénétiquement et physiologiquement diverses impliqués dans des processus biogéochimiques spécifiques sont nécessaires à la définition de nouveaux marqueurs moléculaires et au dessin d'amorces et de sondes suffisamment pertinentes.

I.6. Programme de travail et objectifs

Le but de cette thèse était d'étudier les communautés et les activités bactériennes bioindicatrices de la mobilité de l'As. Deux groupes bactériens directement impliqués dans la transformations de l'As ont été particulièrement étudiés : les bactéries AsIII-oxydantes contribuant à l'atténuation de la mobilité de l'As en diminuant sa biodisponibilité par oxydation de l'AsIII, plus mobile et plus toxique, en AsV (qui tend à se fixer sur des phases minérales des sols et sédiments) et les bactéries respirant l'AsV et capables de libérer l'As piégé sur ces phases minérales.

Au début de cette thèse aucun outil moléculaire ne permettait de cibler spécifiquement les bactéries AsIII-oxydantes dans l'environnement. Ces bactéries sont physiologiquement diverses, mais utilisent une même enzyme dédiée à l'oxydation de l'AsIII en AsV : l'AsIII-oxydase. Dans un premier temps, des outils moléculaires ont donc été développés sur les gènes *aoxB* codant la sous-unité catalytique de cette enzyme pour analyser qualitativement et quantitativement les bactéries AsIII-oxydantes dans l'environnement (chapitre 3). Ce travail a nécessité au préalable d'établir une banque de souches pures AsIII-oxydantes et de dessiner des amorces capables de cibler spécifiquement les gènes *aoxB* de l'ensemble de ces isolats (chapitre 3). La sensibilité, la spécificité et l'efficacité de détection de ces amorces ont été estimées au sein de souches pures et d'échantillons complexes. La pertinence du gène *aoxB* pour analyser et discriminer les différentes bactéries AsIII-oxydantes présentes dans un écosystème donné a été appréciée (chapitre 4). Des méthodes d'empreinte moléculaire (DGGE) et de quantification (PCR en temps réel) ont également été développées afin de visualiser la modification de structure et d'abondance de ces communautés dans les environnements ciblés. La faisabilité de l'usage de l'ensemble de ces outils moléculaires pour

analyser la diversité, la structure et l'abondance des bactéries AsIII-oxydantes dans échantillons environnementaux a été évaluée (chapitres 4 et 5).

Ensuite, des relations entre les communautés bactériennes (totales, AsIII-oxydantes et AsV-réductrices) ciblées par les outils moléculaires disponibles, les variations du comportement de l'As et les principales caractéristiques du milieu, ont été recherchées au sein de systèmes naturels et d'expérimentations en systèmes fermés (batch).

Les communautés AsIII-oxydantes ont été évaluées comme bioindicateurs de la biodisponibilité de l'As dans des eaux présentant des concentrations et des spéciations en As contrastées (chapitre 5).

Le potentiel de bio-oxydation et de bio-réduction de l'As a été évalué dans différents sols *via* des méthodes d'enrichissement et des méthodes moléculaires détectant les gènes de fonction *aoxB* et *arrA* (codant l'AsV-réductase respiratoire). La diversité des bactéries AsIII-oxydantes, mais également celle des bactéries AsV-réductrices ont été étudiées dans des sols pollués du bassin de la Meuse (chapitre 6).

Des expérimentations en systèmes fermés (incubations de sol) ont été réalisées pour étudier le comportement de l'As et du Fe ainsi que la dynamique des populations bactériennes dans différentes conditions opératoires, telles que la disponibilité ou non en oxygène, l'amendement en As. Des corrélations entre la composition/fonction des communautés bactériennes et le comportement de l'As ont été établies, afin d'évaluer la capacité des communautés bactériennes à prédire la mobilisation/immobilisation de l'As (chapitre 7 et 8).

L'ensemble de ce travail a pour but d'améliorer la compréhension des relations structure/fonction susceptibles d'affecter la mobilité de l'As à l'échelle de l'écosystème.

II. Matériels et méthodes

II.1. Echantillons environnementaux

Différents sites d'études ont été choisis afin de répondre aux critères d'évaluation et de validation des bioindicateurs bactériens identifiés dans ce travail. Les sols et eaux testés proviennent de sites européens dont l'historique est connu et présentent des caractéristiques contrastées en termes de climat, nature et usage de sols et contamination arséniée.

En effet, selon leur nature, leur localisation, leurs propriétés minéralogiques et physico-chimiques, différents échantillons de sols pollués par des métaux lourds, notamment par l'As, provenant de sites industriels ou agricoles, ont été sélectionnés. Le plan d'échantillonnage de ces sites, la collecte et l'analyse des échantillons de sols ont été réalisés dans le cadre du projet AquaTerra (<http://www.attempto-projects.de/aquaterra/>) et de la thèse d'A. Joubert (2008). De même, différents échantillons d'eaux naturellement pauvres ou riches en As et d'exhaures miniers fortement pollués par l'As ont été sélectionnés, collectés et analysés dans le cadre du projet BRGM AREDIE (Approche régionale des enjeux de la déprise de l'Industrie Extractive) (Itard *et al.*, 2007).

Le Tableau 12 récapitule la nature, la localisation, l'origine et la concentration en As des échantillons sélectionnés. Les analyses minéralogiques et chimiques des sols et eaux étudiées sont données en Annexes 1 et 2.

Nom	Type	Localisation	Origine de la contamination	As (mg.kg ⁻¹ ou µg.l ⁻¹)	Total ou Ratio AsV/AsTot (%)
D2	Sol	Bassin de la Meuse (Pays-Bas)	Industrielle	10	n.d.
D3				13	n.d.
T5R		Bassin de la Meuse (Belgique)		43	n.d.
T12R				44 (64 ¹)	100
G04		Bassin du Gallego (Espagne)	Fond géochimique	19	56
G05				10	58
G07				13	63
YI009	Eaux de surface	Bassin de l'Isle (France)	Fond géochimique	15	n.d.
YI016				0	n.d.
YI011			Fond géochimique	75	92
YI019				60	92
YI020			Fond géochimique/minière	55	92
AB001			Fond géochimique/minière	55	n.d.
YI025			Minière	92	22
PZR10				Eau souterraine	1846

¹ Mesure effectuée lors d'un second prélèvement à 1m de profondeur sur un échantillon composite
n.d. : non déterminé

Tableau 12 - Caractéristiques des échantillons étudiés.

II.1.1. Sols du bassin de la Meuse

Deux sols, T5R et T12R, proviennent d'une ancienne cokerie située au bord de la Meuse au sein de la ville de Flémalle, localisée près de Liège (Belgique) (Figure 19). Ce site comprend des zones fortement impactées par des polluants organiques et métalliques et des zones de dépôt de déchets. Des concentrations élevées en As (concentration maximale de 307 mg.kg⁻¹ mesurée entre 0,8 et 1,6 m) sont présentes sur toute l'épaisseur du remblai. Une première campagne d'échantillonnage a eu lieu en avril 2005, à 2 m de profondeur (à mi-épaisseur de la couche du remblai), les sols T5R et T12R contenaient alors 43 et 44 mg.kg⁻¹ d'As. Une seconde campagne d'échantillonnage a été menée en juin 2007 ; le sol T12R contenait alors 64 mg.kg⁻¹ d'As. La différence de teneur en As peut être expliquée par un prélèvement réalisé ici à 1 m de profondeur et la nature composite de cet échantillon.

Deux sols, D2 et D3, proviennent de la réserve naturelle de « De plateaux-Hageven » située à la frontière entre la Belgique et Pays-Bas, dans le sous-bassin de la rivière Dommel (un

affluent de la Meuse) (Figure 19). Ce lieu est un ancien dépôt de cendre d'origine industrielle (fonderies de zinc). Les points de prélèvement D2 et D3 se trouvent consécutivement dans le sens supposé d'écoulement de la nappe, suivant un gradient d'anthropisation décroissant. L'échantillonnage a été réalisé en novembre 2004, à une profondeur comprise entre 0 et 25 cm. Les sols D2 et D3 contenaient alors 10 et 13 mg.kg^{-1} d'As, respectivement.

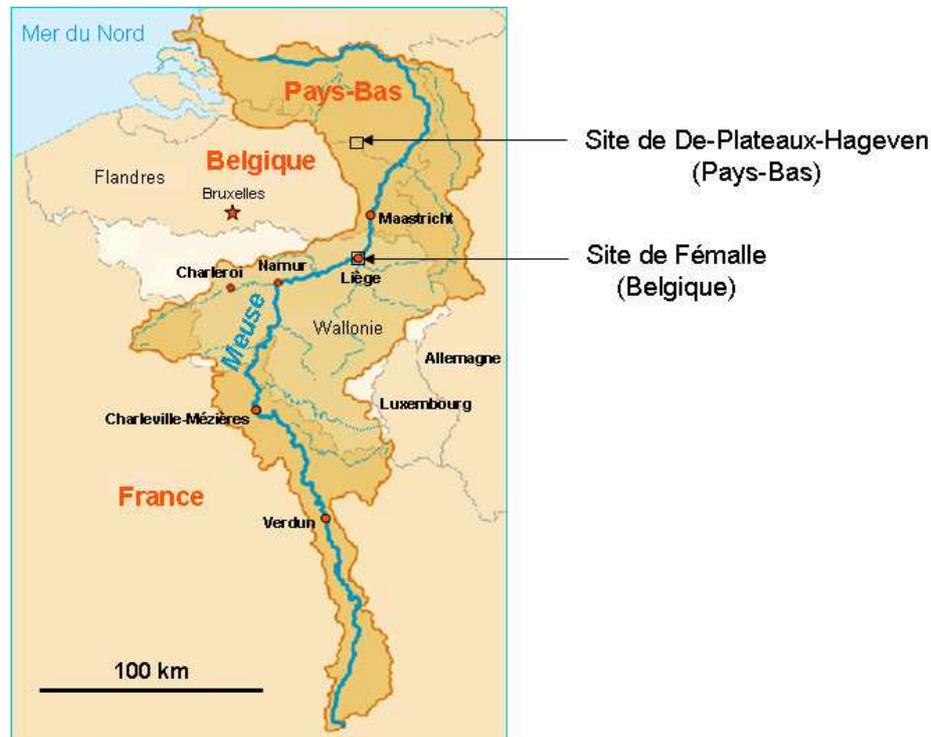


Figure 19 : Localisation des deux sites d'études du bassin de la Meuse : le site « De plateaux-Hageven » et le site de Fémalle (d'après Joubert, 2008).

II.1.2. Sols du bassin du Gallego

Trois sols, G04, G05 et G07, proviennent du bassin de la rivière Gallego, un affluent de l'Ebre (Espagne) (Figure 20), et présentent peu ou pas de pollution en As. Cette rivière s'écoule au sein d'une zone agricole, approvisionne un système de canaux permettant l'irrigation de cultures de céréales et de luzerne localisées à proximité et se jette dans l'Ebre au niveau de Saragosse, qui présente une importante activité industrielle. Les sols ont été prélevés en octobre 2007, à une profondeur comprises entre 5 et 20 cm, par l'IIQAB (Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales de Barcelona) dans le cadre du projet Aquaterra, à trois endroit distincts : en amont du canal (G05) (« Ontinar »), dans un champ cultivé irrigué par l'eau issue du Gallego (G04) (« Villanueva ») et en aval du canal (G07) (« Justibol »). De

l'eau du canal a également été collectée aux points de prélèvement G05 et G07. Les sols G04, G05 et G07 contenaient alors 19, 10 et 13 mg.kg⁻¹ d'As, respectivement.



Figure 20 : Carte du bassin de l'Ebre et du sous-bassin du Gallégo. Plan d'échantillonnage. (Adapté de Joubert, 2008).

II.1.3. Eaux du bassin de l'Isle

Huit échantillons d'eaux de surface et souterraines (YI009, YI011, YI016, YI019, YI020, YI025, AB001 et PZR10) proviennent du bassin versant amont de la rivière Isle (Limousin, France) (Figure 21). Cette rivière s'écoule au sein d'une zone fortement impactée par de l'As provenant d'anomalies géochimiques et d'anciennes activités minières. Ces échantillons ont été prélevés en octobre 2005 à différents points de ce bassin (Figure 21) et couvrent une large gamme de concentrations et de spéciations d'As (Tableau 12). Des mesures physico-chimiques (pH, Eh, conductivité, concentration en oxygène et température) ont été effectuées sur site (Annexe 2). Les échantillons YI009 et YI016 prélevés en amont présentent des concentrations en As faibles par rapport aux autres échantillons malgré le fond géochimique élevé en As, tandis que les échantillons AB001 et YI020 prélevés en aval présentent une concentration modérée en As (45-100 µg.l⁻¹). L'As présent dans les échantillons YI011 et YI019 provient d'un fond géochimique élevé et est majoritairement sous forme d'AsV, tandis

que l'As présent dans les échantillons YI025 et PZR10 provient de l'activité minière et est présent majoritairement sous forme d'AsIII (Itard *et al.*, 2007).



Figure 21 : Localisation des échantillons prélevés dans le bassin amont du bassin de l'Isle.

II.2. Souches bactériennes

Les souches utilisées pour le développement d'outils moléculaires (amorces, PCR en temps réel et DGGE) spécifiques ciblant les gènes *aoxB* sont décrites dans le Tableau 13. Des souches AsIII-oxyantes ont été isolées durant cette thèse. Nous avons également eu accès à des souches du laboratoire « Génétique Moléculaire, Génomique et Microbiologie » (GMGM, CNRS-ULP, Strasbourg). *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) et *E. coli* JM109 (Promega) ont également été utilisées comme hôtes dans les expériences de transformations.

Souches	Taxonomie	Références
Souches AsIII-oxydantes		
<i>Acidovorax</i> sp. 75	β - Proteobacteria	GMGM, CNRS-ULP, Strasbourg
<i>Acinetobacter</i> sp. 33	γ - Proteobacteria	GMGM, CNRS-ULP, Strasbourg
<i>Aeropyrum pernix</i>	<i>Crenarchaeta</i>	Sako <i>et al.</i> , 1996
<i>Alcaligenes</i> sp. T12RB	β - Proteobacteria	isolée durant cette étude
<i>Alcaligenes</i> sp. YI013H	β - Proteobacteria	isolée durant cette étude
<i>Aminobacter</i> sp. 86	α - Proteobacteria	GMGM, CNRS-ULP, Strasbourg
<i>Burkholderia</i> sp. YI09A	β - Proteobacteria	isolée durant cette étude
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	<i>Chloroflexi</i>	Pierson et Castenholz, 1974
<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	β - Proteobacteria	Weeger <i>et al.</i> , 1999
<i>Leptothrix</i> sp. S1.1	β - Proteobacteria	Battaglia-Brunet <i>et al.</i> , 2006b
<i>Limnobacter</i> sp. 83	β - Proteobacteria	GMGM, CNRS-ULP, Strasbourg
<i>Pseudomonas</i> sp. D2OHCJ	γ - Proteobacteria	isolée durant cette étude
<i>Pseudomonas</i> sp. 1	γ - Proteobacteria	GMGM, CNRS-ULP, Strasbourg
<i>Pseudomonas</i> sp. 46	γ - Proteobacteria	GMGM, CNRS-ULP, Strasbourg
<i>Pseudomonas</i> sp. 72	γ - Proteobacteria	GMGM, CNRS-ULP, Strasbourg
<i>Pseudomonas</i> sp. 73	γ - Proteobacteria	GMGM, CNRS-ULP, Strasbourg
<i>Pseudomonas</i> sp. 89	γ - Proteobacteria	GMGM, CNRS-ULP, Strasbourg
<i>Ralstonia</i> sp. 22	β - Proteobacteria	GMGM, CNRS-ULP, Strasbourg
<i>Thiomonas arsenivorans</i>	β - Proteobacteria	Battaglia-Brunet <i>et al.</i> , 2006a
<i>Thiomonas cuprina</i>	β - Proteobacteria	Moreira and Amils, 1997
<i>Thiomonas delicata</i>	β - Proteobacteria	Kelly and Wood, 2006
<i>Thiomonas arsenivorans</i>	β - Proteobacteria	Battaglia-Brunet <i>et al.</i> , 2006a
<i>Thiomonas</i> sp. NO115	β - Proteobacteria	Coupland <i>et al.</i> , 2004
<i>Thiomonas</i> sp. WJ-68	β - Proteobacteria	Coupland <i>et al.</i> , 2004
<i>Variovorax</i> sp. 4.2	β - Proteobacteria	Battaglia-Brunet <i>et al.</i> , 2006b
Souches respirant l'AsV		
<i>Bacillus selenitireducens</i>	<i>Firmicutes</i>	Switzer Blum <i>et al.</i> , 1998
<i>Desulfotobacterium hafniense</i>	<i>Firmicutes</i>	Niggemyer <i>et al.</i> , 2001
Autres souches portant une enzyme de la famille des DMSO-réductase		
<i>Escherichia coli</i> JM103	γ - Proteobacteria	Messing and Vieira, 1982
<i>Geobacter metallireducens</i>	δ -Proteobacteria	Lovley <i>et al.</i> , 1995
<i>Halomonas denitrificans</i>	γ - Proteobacteria	Dobson and Franzmann, 1996
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	α - Proteobacteria	Imhoff <i>et al.</i> , 1984

Tableau 13 : Description des souches bactériennes utilisées dans cette étude

II.3. Etudes en systèmes fermés (batch)

Des incubations des sols T12R (du bassin de la Meuse) et G04, G05, G07 (du bassin du Gallego) ont été menées dans différentes conditions :

- biotique ou abiotique afin d'identifier les mécanismes de mobilisation/immobilisation de l'As liée aux activités bactériennes.
- aérobie ou anaérobie, pour favoriser respectivement l'oxydation de l'AsIII et la réduction de l'AsV.
- avec ou sans ajout de sources de carbone, pour favoriser ou non le développement de la microflore indigène.
- avec ou sans ajout d'As sous forme d'AsIII (HFO-AsIII) ou d'AsV (HFO-AsV) adsorbé sur des oxy-hydroxydes de Fe (HFO) (Garrido *et al.*, 2002), afin de se rapprocher des conditions réelles des sols où l'As est principalement associé à des phases porteuses de type HFO. Des HFO-AsIII ou des HFO-AsV ont été utilisés pour les incubations menées en condition aérobie ou anaérobie, respectivement. La teneur et la spéciation de l'As contenu dans ces HFO sont présentées dans le Tableau 14.

	As Total (mg.kg ⁻¹)	AsIII (%)	AsV (%)	Humidité (%)
HFO-AsIII	42000	79,5	20,5	85,6
HFO-AsV	45000	0	100	82,4

Tableau 14 : Concentrations et spéciation de l'As adsorbé sur les oxy-hydroxydes de fer (HFO).

Les quatre échantillons de sols ont été préalablement tamisés à 5 mm en conditions stériles. Le choix du maillage a été défini de manière à préserver des micro-niches anaérobies.

Pour les incubations du sol T12R du bassin de la Meuse, 35 g de sol frais tamisé ont été distribués dans des erlenmeyers et flacons de 500 ml stériles. Dans les tests abiotiques, les sols ont été autoclavés trois fois à 105°C, durant 1 heure, à 24 heures d'intervalle dans les contenants. Dans les tests avec ajout d'As : 3,5 g d'HFO-As humide, soit 21,2 mg d'As (contenant 79,5% d'AsIII) ou 27,7 mg d'As (contenant 100% d'AsV) ont été ajoutés, respectivement en condition aérobie ou anaérobie, aux 2,1 mg présents initialement dans les 35 g de sol T12R (soit plus de 10 fois la concentration initiale en As). Les HFO-AsV ont été simultanément autoclavés avec le sol dans les contenants. Tandis que les HFO-AsIII avaient

été préalablement irradiés aux rayons gamma (doses externes minimale 40 kGy et maximale 70 kGy) et ont été ensuite ajoutés aux sols. Ensuite, 350 ml d'eau distillée supplémentée ou non par 5 mM d'acétate et 5 mM de lactate (tests avec ou sans ajout de sources de carbone) ont été ajoutés en condition stérile afin d'obtenir un ratio liquide/solide de 10 (v/w de sol humide). Au total, 16 tests ont été menés sur le sol T12R : 8 tests en condition aérobie dans des erlenmeyers afin de favoriser les échanges d'air avec l'extérieur, et 8 tests en condition anaérobie dans des flacons hermétiquement fermés à l'aide de bouchons à plasma stériles ; une purge par mise sous vide (10 min) suivi d'un remplissage à l' N_2 (20 min) à l'aide de filtre 0,2 μm et d'aiguilles stériles ont été répétés trois fois. Les incubations ont été réalisées à 25°C et sous agitation durant 28 jours. La composition de ces incubations est résumée Tableau 15.

Tests		Sol humide (35g) Eau distillée (350 ml)	HFO-As humide (3,5g)	Acétate (5 mM) Lactate (5 mM)
Abiotiques	1	✓		
	2	✓		✓
	3	✓	✓	
	4	✓	✓	✓
Biotiques	5	✓		
	6	✓		✓
	7	✓	✓	
	8	✓	✓	✓

Tableau 15 : Composition des incubations du sol T12R en condition aérobie ou anaérobie.

Pour les incubations des trois sols G04, G05 et G07 du bassin du Gallego, 20 g de sol frais tamisé ont été distribués dans des erlenmeyers et flacons de 500 ml stériles. Ici, l'ensemble des tests a été effectué avec ajout d'As et de sources de carbone. Trois concentrations croissantes d'As ont été ajoutées aux sols : 50, 500 ou 1000 mg d'As/kg de sol (soit 0,1, 1 et 2 g d'HFO-As humides). Pour les expériences préliminaires réalisées sur les trois sols, la stérilisation des phases solides a été réalisée comme précédemment décrite pour le sol T12R. Pour les expériences réalisées uniquement sur le sol G07, l'ensemble des phases solides ont été irradiées aux rayons gamma (doses externes minimale 40 kGy et maximale 70 kGy). Ensuite, 200 ml d'eau distillée contenant 5 mM d'acétate et 5 mM de lactate ont été ajoutés en condition stérile afin d'obtenir un ratio liquide/solide de 10 (v/w de sol humide). Les incubations en aérobiose et anaérobiose ont été réalisées comme précédemment décrites pour le sol T12R et leur composition est résumée Tableau 16.

Tests		Sol humide (20g) Eau distillée (200 ml) Acétate (5 mM) Lactate (5 mM)	HFO-As humide (0,1g)	HFO-As humide (1g)	HFO-As humide (2g)
Abiotiques	c1	✓	✓		
	c2	✓		✓	
	c3	✓			✓
Biotiques	c1	✓	✓		
	c2	✓		✓	
	c3	✓			✓

Tableau 16 : Composition des incubations des sols G04, G05 et G07 en condition aérobie ou anaérobie.

Le suivi de l'ensemble des expérimentations a été réalisé tous les 7 jours en prélevant 20 ml de suspension de sol (sous boîte à gants avec atmosphère N₂ pour les expérimentations en condition anaérobie). 5 ml ont été utilisés pour mesurer le pH et le Eh. 15 ml d'échantillons ont été centrifugés stérilement 10 minutes à 7000 x g. Le culot a été stocké à -20°C pour les extractions d'ADN et le surnageant a été filtré à 0,2 µm. 5 ml du filtrat ont été prélevés pour les analyses de spéciation d'As et le reste a été acidifié avec 250 µl d'HNO₃ à 69% pour les analyses d'As et de Fe totaux. L'ensemble du solide a été récupéré, en fin d'expérience, et stocké à -20°C avant de déterminer les teneurs totales et la spéciation de l'As.

II.4. Enrichissements et isolements

Les conditions d'enrichissement des bactéries AsIII-oxydantes ou respirant l'AsV à partir des sols du bassin de la Meuse et des eaux du bassin de l'Isle sont indiquées Tableau 17.

Microorganismes sélectionnés	Donneurs d'électrons	Source de carbone	Accepteurs d'électrons
AsV réducteurs chimioautotrophes	H ₂	CO ₂ , HCO ₃	AsV 3,5 mM
AsV réducteurs chimiohétérotrophes	Na-lactate 10 mM, acétate 10 mM, extrait de levure 0,2 %		AsV 3,5 mM
AsIII oxydants chimioautotrophes	AsIII 1 mM	CO ₂	O ₂
AsIII oxydants chimiohétérotrophes	AsIII 1 mM, Na-lactate 5 mM, acétate 5 mM, glucose 5 mM, extrait de levure 0,2 %		O ₂

Tableau 17 : Conditions d'enrichissements des échantillons de sols et/ou d'eaux étudiés.

Le milieu de base pour l'enrichissement sélectif de bactéries aérobies oxydant l'AsIII est composé de deux solutions (Battaglia-Brunet *et al.*, 2002). La solution A contient 0,5 g de K_2HPO_4 , 0,5 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de NaCl, 0,05 g de $(NH_4)_2SO_4$ et 1 ml de solution d'oligo-éléments dans 500 ml d'eau déminéralisée. La solution B contient 0,1 g de $MgSO_4$ et 0,1 g de $CaCl_2$ dans 500 ml. Pour la sélection de bactéries chimiohétérotrophes, 5 mM de Na-lactate, 5 mM d'acétate, 5 mM de glucose et 0,2 % d'extrait de levure, sont ajoutés à la solution A. Les deux solutions sont stérilisées séparément par autoclavage (20 min, 120 °C), puis mélangées et 90 ml sont répartis stérilement dans des erlenmeyers. Le milieu est supplémenté avec 1 ml d'une solution stérile de vitamines (Annexe 3) et 2 ml d'une solution stérile d'AsIII (As_2O_3 , Annexe 3) pour une concentration finale de 1 mM.

Le milieu de base pour l'enrichissement sélectif de bactéries anaérobies respirant l'AsV est le suivant : à 1L d'eau déminéralisée sont ajoutés 0,2 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de NaCl, 0,2 g de NH_4Cl , 0,1 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,1 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1 ml d'une solution d'oligo-éléments (Annexe 3), 0,5 ml d'une solution de rézazurine ($1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$). 45 ml sont répartis dans des flacons pénicilline. Pour la sélection de bactéries chimiohétérotrophes, ce milieu est enrichi par ajout de 10 mM de Na-lactate, 10 mM d'acétate et 0,2 % d'extrait de levure et les flacons sont scellés et mis sous atmosphère N_2 . Pour la sélection de microorganismes chimioautotrophes, les flacons sont scellés et mis sous atmosphère H_2/CO_2 (80/20, v/v). Les flacons sont stérilisés par autoclavage (20 min, 120 °C). Après stérilisation, 0,1 % de $NaHCO_3$, 0,2 % de Na_2S , des vitamines (Annexe 3), ainsi que 3,5 mM d'AsV ($Na_2HAsO_4 \cdot 7 H_2O$) ou 0,7 mM d'AsV et 1 mM de thiosulfate ($NaS_2O_3 \cdot H_2O$), sont ajoutés à partir de solutions stériles.

Pour les enrichissements à partir des sols, 10 g de sol tamisé à 5 mm en conditions stériles ont été dilués dans 90 ml d'eau physiologique stérile (NaCl 0,9 %), puis homogénéisés par agitation durant 30 min. 10 ml de chacune de ces suspensions de sol sont ensuite injectés dans des flacons contenant 90 ml de milieu de base. Ces dernières dilutions ont servi à inoculer à 10 % les enrichissements en condition d'oxydation de l'AsIII et en condition de réduction de l'AsV.

Pour les enrichissements à partir des eaux, 10 ml d'eau ont été directementensemencés à 10 % dans le milieu préparé pour sélectionner les bactéries oxydant l'AsIII.

Ces cultures ont été incubées à 25 °C, pendant deux semaines, sous agitation dans le cas de l'oxydation de l'AsIII. Les concentrations en As total et AsV ont été mesurées sur des

prélèvements périodiques. Les enrichissements pour lesquels la totalité de l'As a été transformée ont ensuite été repiqués 3 à 4 fois dans leurs milieux de sélection respectifs.

Les enrichissements pour lesquels l'oxydation hétérotrophe de l'AsIII a été complète ont été dilués en série, étalés sur boîte de Pétri et incubés à 25 °C. Après croissance, des colonies d'aspect différent ont été repiquées et testées pour leur capacité à oxyder 1 mM d'AsIII.

II.5. Analyses physico-chimiques

L'As et le Fe total présents dans la phase aqueuse ont été analysés par Spectrométrie d'Absorption Atomique (SAA) four (Varian SpectrAA 300).

Le dosage de l'AsV et de l'AsIII a été réalisé après séparation des deux formes. Dans une gamme de concentration comprise entre 0 et 150 mg.l⁻¹, l'AsV est préalablement séparé de l'AsIII par extraction à l'aide d'un solvant organique. Dans des fioles de 50 ml, 2 ml de l'échantillon (dilué si nécessaire), 4 ml de tampon acétique 0,1 M (pH 5), 1 ml de pyrrolidine dithiocarbamate d'ammonium (PDC) à 5 g.l⁻¹, 8 ml de méthylisobutylcétone de qualité analytique (MIBK) et 5 ml d'eau déminéralisée ont été ajoutés. Dans une gamme de concentration comprise entre 0 et 100 µg.l⁻¹, l'AsV est retenu sur une résine échangeuse d'anions (préciser la nature de la résine Biorad) alors que l'AsIII est élué sans rétention pour des solutions dont le pH est compris entre 3,5 et 8,5. L'AsV est ensuite désorbé par une solution d'acide chlorhydrique (méthode BRGM MO 263).

L'AsV et l'As total ont ensuite été dosés séparément par SAA, en utilisant leurs standards respectifs. La concentration d'AsIII a été déterminée en calculant la différence entre celles obtenues pour l'As total et l'AsV ($[AsIII]=[AsT]-[AsV]$).

L'As présent dans la phase solide a été extrait en réacteur fermé sous micro-onde (15 min, 135 W) à l'aide d'une solution de phosphate et d'acide ascorbique (méthode adaptée de celle de Garcia-Manyes *et al.*, 2002). La quantification de l'As total a été réalisée par spectrométrie d'émission plasma (inductive coupled plasma - atomic emission spectroscopy, ICP/AES) (méthode BRGM MO 042) et celle de l'AsIII par voltampérométrie (méthode adaptée de celle de Barra et Correira dos Santos, 2001).

L'**humidité résiduelle** des échantillons de sols (environ 10 g) a été mesurée après séchage à l'étuve (105 °C) pendant 24H. Le taux d'humidité résiduelle (Hr) est déterminé à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Hr (\%)} = [(\text{masse initiale} - \text{masse finale}) / \text{masse initiale}] \times 100$$

Le **pH et le potentiel d'oxydo-réduction (Eh)** des suspensions de sols ont été mesurés simultanément sans agitation à l'aide de deux électrodes combinées (pH-mètre Heito P310). L'étalonnage a été réalisé à l'aide de deux solutions tampons à pH 4 et 7 et d'une solution étalon dont le Eh est de +220 mV à 25°C. Le matériel utilisé et les résultats obtenus donnent le potentiel redox par rapport au couple Ag/AgCl.

II.6. Microbiologie moléculaire

II.6.1. Extractions d'acides nucléiques

Les ADN génomiques bactériens des cultures pures isolées dans cette étude ont été extraits à l'aide du kit FastPrep MH (Bio101). Les ADN extraits des autres souches AsIII-oxydantes ont été fournis par le laboratoire de Dynamique, Évolution et Expression des Génomes de Micro-Organismes (ULP, Strasbourg).

Les ADN génomiques bactériens des cultures d'enrichissements, des incubations de sols et des sols ont été extraits à l'aide du kit Ultra Clean Soil DNA (MoBio), à l'exception des incubations de sols réalisées dans le cadre de la thèse d'A. Joubert pour lesquelles le kit FastDNA® SPIN for Soil (Bio101) a été utilisé.

Le kit FastDNA® SPIN for Soil (Bio101) a été utilisé pour les eaux prélevées dans le bassin de l'Isle. Environ 2 l d'eau ont été filtrés (à 0,22 µm) et la procédure d'extraction a été réalisée sur chaque filtre préalablement découpé à l'aide d'une lame stérile.

Les ADN plasmidiques ont été extraits et purifiés à l'aide des kits NucleoSpin® Multi-8 Plus Plasmid (Macherey-Nagel) et FastPlasmid Mini (Eppendorf).

Les concentrations en ADN ont été mesurées à l'aide du spectrophotomètre BioPhotometer (Eppendorf) ou à l'aide du kit de quantification d'ADN Hoechst 33258 (un agent intercalant de l'ADN fluorescent) et du fluoromètre VersaFluor (Biorad). Tous les ADN ont été stockés à - 20 °C.

II.6.2. Dessin d'amorces ciblant les gènes *aoxB*

Des amorces dégénérées et consensus ciblant les gènes *aoxB* ont été dessinées et évaluées dans cette étude.

Pour le dessin des amorces, neuf séquences protéiques AoxB provenant de souches bactériennes appartenant à des genres différents des domaines *Bacteria* et *Archaea* ont été sélectionnées (Tableau 18).

Nom des souches	Taxonomie	N° d'accension Genbank des séquences <i>aoxB</i>
<i>Alcaligenes faecalis</i>	β -Proteobacteria	AY297781
<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	β -Proteobacteria	AF509588
<i>Thiomonas arsenivorans</i>	β -Proteobacteria	EU304260
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	α -Proteobacteria	DQ151549
<i>Rhizobium</i> sp. NT-26	α -Proteobacteria	AY345225
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	<i>Chloroflexi</i>	NZ_AAAH01000321
<i>Thermus thermophilus</i>	<i>Thermus</i>	NC_006462
<i>Aeropyrum pernix</i>	<i>Crenarcheota</i>	NC_000854
<i>Sulfolobus tokodaii</i>	<i>Crenarcheota</i>	NC_003106

Tableau 18 : Séquences utilisées pour le dessin d'amorces ciblant les gènes *aoxB*.

Afin de combiner les avantages des amorces dégénérées et des amorces consensus et donc obtenir des amorces à la fois sensibles et spécifiques, le programme CODEHOP (Rose *et al.*, 1998) qui génère des amorces « hybrides » a été utilisé. Ces amorces sont composées de deux parties :

- une longue séquence en 5' (*consensus clamp*), qui est un consensus généré à partir des acides aminés d'une région de séquences sélectionnées ;
- une courte séquence dégénérée en 3' (*core degenerate*), qui contient toutes les combinaisons possibles de codon de 3 à 4 acides aminés conservés.

Nous avons soumis au programme Block Maker les séquences AoxB des bactéries sélectionnées (http://blocks.fhcr.org/blockmkr/make_blocks.html). Elles ont été alignées et huit régions conservées ont été reconnues. Par exemple, la première région conservée de 36 acides aminés sélectionnée par Block Maker se situe entre les acides aminés 6 et 42 de la séquence de *Herminiimonas arsenicoxydans* (Figure 22).

<i>Aeropyrum pernix</i>	8	GRVPLPPKGAQHYYTMCQFCNVGCGYDVYVWPAGAE
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	8	DRLPIIPADAKKHNVTCHFICVGGCYHAYTWPINKQ
<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	6	DRVALPPVNAQKTNMTCHFICVGGCYHVYKWDENKE
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	8	DRMVLPPVDAEKYQTVCHYCI VGGCYHVYKWPEGRS
<i>Rhizobium</i> sp. NT-26	8	DRLPIIPADAKKHNVTCHFICVGGCYHAYTWPINKQ
<i>Sulfolobus tokodaii</i>	16	NKVPLPPVTAERYSVTCRFCNVGCGYDVVFVFPVPG
<i>Thermus thermophilus</i>	8	DRLPIPPKNAKVYNQVCQYCTVGGCYKVYVWPVGEE
<i>Thiomonas arsenivorans</i>	6	DRVALPPVDAKKTNLTCQFCIVGGCYHAYKWDARE
<i>Alcaligenes faecalis</i>	6	DRITLPPANAQRTNMTCHFICVGGCYHVYKWPELQE

Figure 22 : Exemple de résultats issus de Block Maker à partir des neuf séquences AoxB.

Ces régions conservées ont ensuite été soumises au programme CODEHOP (lien à partir du site http://blocks.fhcrc.org/blockmkr/make_blocks.html). Ce programme génère des amorces à partir d'un motif conservé, visualisé sur la Figure 23 grâce à une représentation appelée « Logo » des séquences protéiques qui montre la conservation des acides aminés.

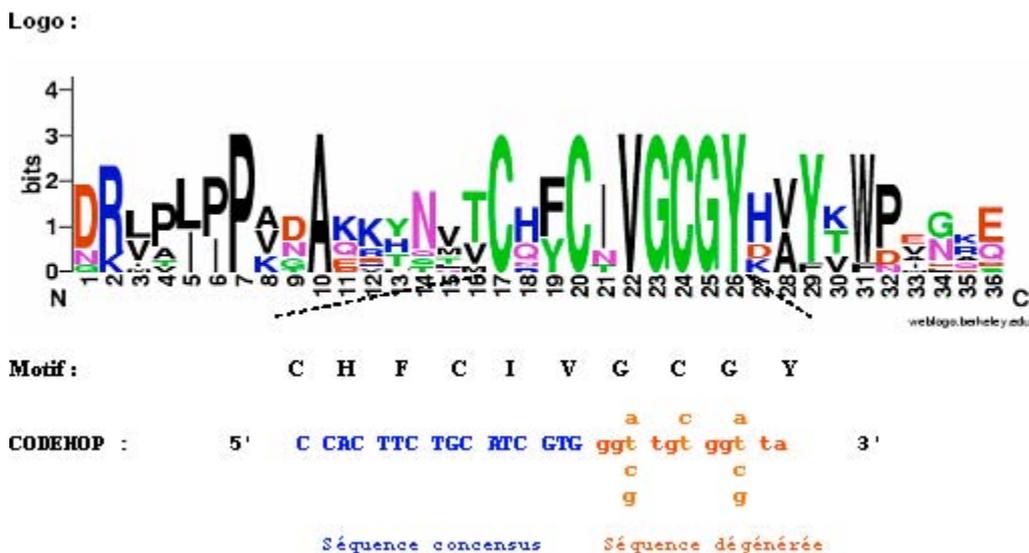


Figure 23 : Représentation appelée « Logo » des neuf séquences protéiques AoxB sélectionnés (créée à l'aide du site <http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>). L'amorce CODEHOP et le motif à partir duquel elle a été dessinée sont indiqués.

À partir des régions conservées issues de Block Maker, une matrice de score à position spécifique (PSSM) est calculée. À chaque position, celle-ci attribue un score à chaque résidu d'acides aminés selon sa fréquence. Cela permet de déterminer un acide aminé consensus, pour lequel un codon sera sélectionné. Cette étape permet de créer la partie 5' consensus de l'amorce. Ensuite une PSSM ADN est calculée à partir de la matrice d'acides aminés, qui va permettre de déterminer toutes les combinaisons de nucléotides possibles à chaque position. Cette étape permet de créer l'extrémité 3' de l'amorce, dont la dégénérescence d'un

maximum de 128, peut être ensuite changée. Les deux parties sont ensuite fusionnées et la longueur de la partie consensus est contrôlée en calculant la température d'hybridation (60°C).

À partir de la première région conservée présentée sur la Figure 22, trois amorces sens ont été générées par le programme CODEHOP (Figure 24). Selon les régions conservées ciblées, trois à six amorces ont été conçues par ce programme. Celles-ci ont ensuite été sélectionnées selon les motifs à partir desquels elles ont été dessinées et leur degré de dégénérescence. Pour certaines d'entre elles, ce degré a été diminué après comparaison des alignements de séquences nucléiques. Par exemple, pour l'amorce m1-4f, le V a été remplacé par un M (Figure 24).

De même, dans le cas des expérimentations en DGGE, les amorces CODEHOP m1-2f et m2-1r ont été transformées en amorces consensus (non dégénérées) m1-2f-ND et m2-1r-ND-GC. Enfin leur aptitude à s'hybrider à leur site spécifique sur les séquences de gènes *aoxB* disponibles dans Genbank et leur incapacité à former des structures secondaires ont été testées à l'aide du logiciel FastPCR v.4.0 (<http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/programs/fastpcr.htm>; Kalendar, 2005).

Les amorces ainsi générées et utilisées dans cette étude sont listées dans le Tableau 19.

```

Motif : C H F C I V G C G
Oligo : 5'-TGCCACTTCTGCATCgtnggntgyygg-3' degen=32
Motif : H F C I V G C G Y
Oligo : 5'-CCACTTCTGCATCGTgggntgyygmta-3' degen=32 (am-m1-2f)
Motif : F C I V G C G Y H
Oligo : 5'-TTCTGCATCGTGGCtgyygmtayva-3' degen=48 (am-m1-4f)

```

Figure 24 : Exemple d'amorces proposées par le programme CODEHOP et séquences d'acides aminés à partir desquelles elles ont été dessinées.

II.6.3. Amplification par PCR

La PCR est une procédure rapide pour amplifier in vitro des fragments d'ADN. L'efficacité d'amplification dépend de divers paramètres ou réactifs utilisés dans la réaction, tels que :

- la quantité, la pureté et la qualité (ex. : pourcentage en bases GC) des cibles d'ADN ;
- la quantité et la qualité (distance, complémentarité, longueur et séquences) des amorces ;
- la concentration de dNTPs et de sels (MgCl₂) ;

- la température et le temps des étapes de dénaturation, d'hybridation et d'élongation ;
- le type d'enzyme.

Avant toute réaction PCR, ces facteurs doivent donc être évalués et optimisés afin de parvenir à l'amplification spécifique du fragment recherché.

L'ensemble des amorces utilisées dans ce travail est indiqué dans le Tableau 19. En fonction des couples d'amorces utilisés (Tableau 20), trois paramètres ont été optimisés : la concentration en $MgCl_2$, la température d'hybridation et le temps d'élongation. De plus, des adjuvants du type DMSO, BSA et T4gp32, ont été utilisés pour l'optimisation des PCR sur matrices d'ADN riches en bases GC, difficiles à dénaturer. Les Tableaux 21 et 22 résument le mélange réactionnel type ainsi que le programme de base ayant servi à l'amplification, réalisée dans un thermocycleur iCycler de Biorad.

Dans ce travail, la communauté bactérienne totale a été détectée et analysée par amplification des gènes codant l'ARNr 16S et les groupes bactériens directement impliqués dans la mobilité de l'As par amplification des gènes fonctionnels participant à la biotransformation de l'As : *aoxB* (codant la sous-unité catalytique de l'AsIII-oxydase), *arsC* (codant l'AsV réductase cytoplasmique) et *arrA* (codant la grosse sous-unité de l'AsV réductase respiratoire). Dans les expérimentations sur le sol G07 du bassin du Gallego, la microflore sulfato-réductrice a également été recherchée en ciblant les gènes fonctionnels *dsrAB* codant les sous-unités α et β de la sulfite réductase dissimilatrice, enzyme clé de la réduction du sulfate. Les couples d'amorces utilisés pour amplifier chacun de ces gènes à partir des ADN extraits sont indiqués dans le Tableau 20.

Afin de rechercher les inserts de taille attendue après un clonage, les bibliothèques de gènes ont été criblées par PCR sur colonies. Les colonies d'intérêt ont été resuspendues dans 20 μ l d'eau et 1 μ l de ce mélange a été utilisé comme matrice pour une amplification avec des amorces ciblant le vecteur de clonage de part et d'autre de l'insert.

Les produits PCR ont été analysés sur gel d'agarose (1 ou 2 % selon la taille du fragment amplifié) après coloration au bromure d'éthidium et visualisation par fluorescence aux UV à l'aide de l'imageur GeneGenius et du logiciel GeneSnap (SynGene).

Amorces	Séquence (de 5' à 3')	Sources
Amorces ciblant les gènes <i>aox</i>		
uniaoxaF	TGTACCCATATGGGATGTCC	GMGM, CNRS-ULP, Strasbourg
aoxb763R	CTTGRTGWCCGCCATGCGCAC	GMGM, CNRS-ULP, Strasbourg
aoxb65F	GTCATTTTTGTATAGTCGGCTGTGG	GMGM, CNRS-ULP, Strasbourg
degaoxb1F	CGCGANATGGGRYTCGGCGA	GMGM, CNRS-ULP, Strasbourg
degaoxb4R	CCATTCATYGACGTGAGRTT	GMGM, CNRS-ULP, Strasbourg
degaoxb5R	GCRCGGCCRTTRTTGATC	GMGM, CNRS-ULP, Strasbourg
m1-2F	CCACTTCTGCATCGTGGGNTGYGGNTA	cette étude
m1-2F-ND	CCACTTCTGCATCGTGGGCTGTGGCTA	cette étude
m1-4F	TTCTGCATCGTGGGCTGYGGNTAYMA	cette étude
m2-1R	GGAGTTGTAGGCGGGCCKRTTRTGDAT	cette étude
m2-1R-ND-GC	GGAGTTGTAGGCGGGCCGTTGTGGAT	cette étude
m3-2R	TGTCGTTGCCCCAGATGADNCCYTTYTC	cette étude
m2-3F	TCGGAGTTGTAGGCGGGNCKRTTRTG	cette étude
m3-1R	TGCCCCAGATGATGCCYTTYTCRWA	cette étude
m2-1F	GGATCCACAACCGCCNGCNTAYAA	cette étude
m4-1F	GCCGCGGGGGNTWYGARRAYA	cette étude
m4-2F	CCGCGGGGGCTTYGARRAYARNT	cette étude
Amorces ciblant les gènes <i>arrA</i>		
ArrAfwd	AAGGTGTATGGAATAAAGCGTTTGTBGGHGAYTT	Malasarn <i>et al.</i> , 2004
ArrArev	CCTGTGATTTTCAGGTGCCAYTYVGGNGT	Malasarn <i>et al.</i> , 2004
HAArrA-D1F	CCGCTACTACACCGAGGGCWYTTGGGRNTA	Kulp <i>et al.</i> , 2006
HAArrA-G2R	CGTGCGGTCTTGAGCTCNWDRTTCCACC	Kulp <i>et al.</i> , 2006
ArrPJ0100F	CARCARGTGATYATCC	Pérez-Jimenez <i>et al.</i> , 2005
ArrPJ2100R	CWYAACGCTTYGTCCCAA	Pérez-Jimenez <i>et al.</i> , 2005
Amorces ciblant les gènes <i>arsC</i>		
amlt-42-f	TCGCGTAATACGCTGGAGAT	Sun <i>et al.</i> , 2004
amlt-376-r	ACTTTCTCGCCGTCTTCCTT	Sun <i>et al.</i> , 2004
smrc-42-f	TCACGCAATACCCTTGAAATGATC	Sun <i>et al.</i> , 2004
smrc-376-r	ACCTTTTCACCGTCCTCTTTCGT	Sun <i>et al.</i> , 2004
Amorces ciblant les gènes <i>dsrAB</i>		
DSR1Fdeg	ACSCAYTGGAARCACG	Klein <i>et al.</i> , 2001
DSR4Rdeg	GTGTARCAAGTTDCCRCA	Klein <i>et al.</i> , 2001
Amorces ciblant les gènes codant l'ARNr 16S		
w49	ACGGTCCAGACTCCTACGGG	Delbès <i>et al.</i> , 1998
w34-marqué VIC (ou FAM) en 5'	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	Zumstein <i>et al.</i> , 2000
1406R	GACGGGCGGTGTGTRCA	Lane <i>et al.</i> , 1985
1401R	CGGTGTGTACAAGACCC	Felske <i>et al.</i> , 1998
968F	AACGCGAAGAACCTTAC	Felske <i>et al.</i> , 1998
Fd1deg	CAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Weisburg <i>et al.</i> , 1991
Amorces ciblant les plasmides		
T3	ATTAACCCTCACTAAAGGGA	-
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	-
SP6	TATTTAGGTGACACTATAG	-

B = C ou G ou T ; H = A ou C ou T ; N = G ou A ou T ou C ; R = A ou G ; V = A ou C ou G ; W = A ou T ; Y = C ou T.

Tableau 19 : Séquence et source des amorces.

Couples d'amorces	Application	Température d'hybridation (°C)	Taille du produit (pb)
Amorces ciblant les gènes <i>aox</i>			
uniaoxaF/aoxb763R		54	~ 1 500
uniaoxaF/ degaoxb5R	Recherche des gènes <i>aoxB</i> au sein des isolats	54	~ 2 500
aoxb65F/aoxb763R		54	~ 1 200
degaoxb1F/degaoxb4R		57	~ 1 000
degaoxb1F/degaoxb5R		57	~ 1 500
m1-2F/m3-2R		Recherche des gènes <i>aoxB</i> au sein des isolats et d'échantillons environnementaux	52
m1-4F/m3-2R	52		~ 1 100
m1-4F/m2-1R	52		~ 550
m2-1F/m3-2R		52	~ 600
m1-2F/m2-1R	Quantification des communautés AsIII-oxydantes par PCR en temps réel	54	~ 550
m4-1F/m2-1R		54	~ 110
m4-2F/m2-1R		54	~ 110
m1-2F-ND/m2-1R-ND-GC	Structure des communautés AsIII-oxydantes (DGGE)	60	~ 550
Amorces ciblant les gènes <i>arrA</i>			
ArrAfwd/ArrArev	Recherche des bactéries respirant l'AsV dans l'environnement	50	~ 200
HAArrA-D1F/ HAArrA-G2R		53,5	~ 500
ArrPJ0100F/ArrPJ2100R	Recherche des gènes <i>arrA</i> au sein des isolats	52	~ 2 000
Amorces ciblant les gènes <i>arsC</i>			
amlt-42-f/amlt-376-r	Recherche des bactéries AsV-réductrices dans l'environnement	54	~ 350
smrc-42-f/smrc-376-r		54	~ 350
Amorces ciblant les gènes <i>dsrAB</i>			
DRS1Fdeg/DSR4Rdeg	Recherche des bactéries sulfato-réductrices dans l'environnement	54	~ 1 900
Amorces ciblant les gènes codant l'ARNr 16S			
Fd1deg/1406R	Recherche des bactéries totales	55	~ 1 500
W49/w34-marqué VIC ou FAM en 5'	Structure des communautés bactériennes totales par CE-SSCP	61	~ 200
968F/1401R		Quantification des communautés bactériennes totales par PCR en temps réel	55
Amorces ciblant les plasmides			
SP6/T7	Criblage des bibliothèques de gènes	50	variable
T3/T7		50	variable

Tableau 20 : Couples d'amorces et conditions opératoires.

ADN (ng)	1-50
Tampon 5X (µl)	4
MgCl ₂ 25 mM (µl)	1,6-2
dNTP 10 mM (µl)	0,2
Amorce antisens 50 pmol/ml (µl)	0,2
Amorce sens 50 pmol/ml (µl)	0,2
GoTaq polymérase (Promega, 5U/µl)	0,2
DMSO (µl)	0,2
H ₂ O (µl)	qsp 20 µl

Tableau 21 : Mélange réactionnel type.

Étapes	Température (°C)	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation	95 °C	1 min	1
Dénaturation	95 °C	30 s	
Hybridation	50-61 °C (selon les couples d'amorces utilisées)	30 s	25-40
Élongation	72 °C	1 min/kb	
Élongation finale	72 °C	5 min	1
Attente	15 °C	∞	

Tableau 22 : Programme PCR type.

II.6.4. Quantification par PCR en temps réel

La PCR en temps réel des gènes *aoxB* a été développée dans cette étude afin de quantifier ces gènes dans des échantillons environnementaux et ainsi estimer l'abondance de la microflore AsIII-oxydante dans l'environnement. Les gènes codant l'ARNr 16S ont également été quantifiés par PCR en temps réel comme décrit dans Cébron *et al.* (2008).

Principe

La PCR en temps réel permet de détecter et de quantifier un émetteur fluorescent durant le processus d'amplification. L'agent fluorescent, le SYBRGreen I, est un agent intercalant qui se lie à l'ADN double brin lors des phases d'hybridation et d'élongation de la PCR. Durant l'étape d'élongation, une augmentation du signal d'émission est associée à la quantité de SYBRGreen I se fixant à l'ADN double brin naissant (Figure 25).

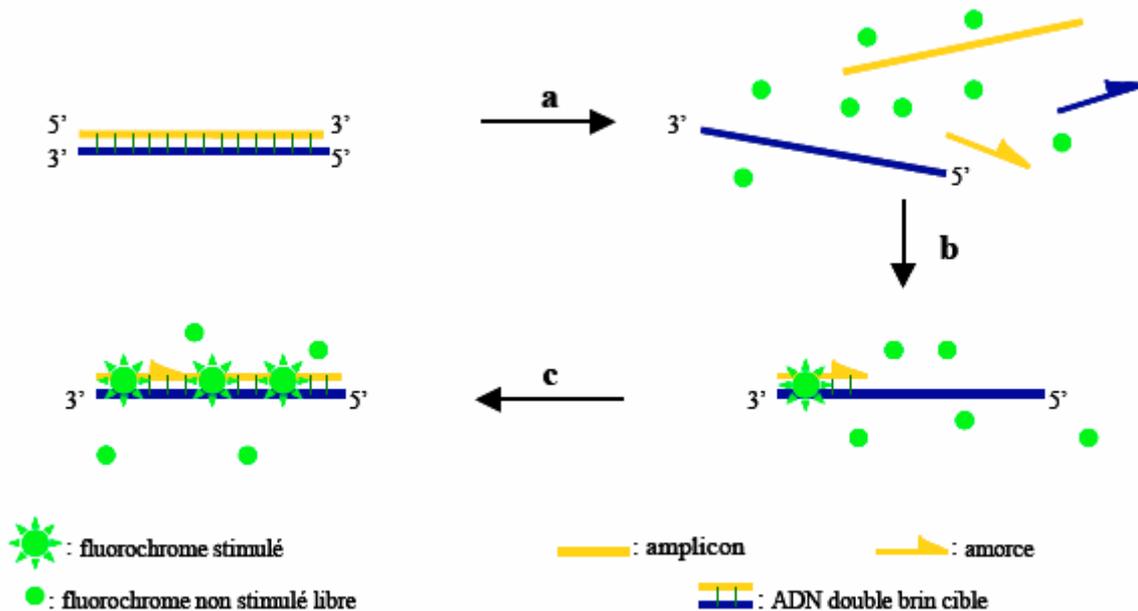


Figure 25 : Fixation du SYBR Green I à l'ADN double brin. (a) Durant la dénaturation, le SYBR Green I libre exhibe peu de fluorescence. (b) A la température d'hybridation des amorces, quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant conduisant à une émission de fluorescence. (c) Durant la phase d'élongation, de plus en plus de molécules se lient au brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut-être suivi en temps réel (d'après Poitras et Houde, 2002).

Les valeurs de fluorescence sont enregistrées au cours de chaque cycle et représentent la quantité de produits d'amplification formés au cours de la réaction. Trois phases sont observées durant cette réaction : une phase d'initiation, une phase exponentielle et une phase plateau (Figure 26). Au cours des premiers cycles d'amplification, l'intensité de la fluorescence émise est très faible et définit le bruit de fond. Après un certain nombre de cycles, l'accumulation des produits d'amplification entraîne une variation mesurable de l'intensité de fluorescence émise. Plus il y a de matrices à amplifier au début de la réaction, moins élevé sera le nombre de cycles requis pour atteindre un point où le signal de fluorescence sera significativement plus élevé que le bruit de fond. Ce point est défini comme étant le cycle seuil « threshold cycle (Ct) ». Le Ct représente donc le nombre de cycle à partir duquel le signal de fluorescence est significativement plus élevé que la ligne de base. L'intensité de fluorescence est proportionnelle à la concentration de produits PCR. La valeur du Ct peut ainsi être traduite en résultat quantitatif en la comparant avec les valeurs de Ct obtenues avec des quantités connues de gènes.

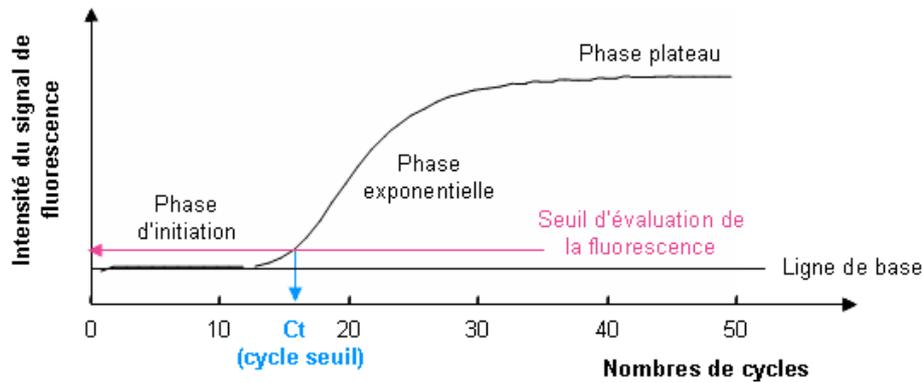


Figure 26 : Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles.

La spécificité de la réaction basée sur la détection du SYBRGreen I repose entièrement sur la spécificité des amorces utilisées. Une augmentation de la fluorescence liée à un mauvais appariement des amorces peut entraîner des amplifications non spécifiques (faux positifs) conduisant à une surestimation de la quantité de gènes. Cependant, la formation d'un produit non spécifique peut être détectée par l'analyse de la courbe de dissociation. La présence de plus d'un pic signale la formation de produits non spécifiques. Cette courbe est obtenue à la fin des cycles d'amplification en augmentant progressivement la température jusqu'à 95°C, afin de re-dénaturer l'ADN tout en enregistrant en continu le signal de fluorescence. Une diminution brutale de la fluorescence indique la séparation de brins d'ADN d'un produit amplifié et se traduit par l'apparition d'un pic sur le graphique reportant la dérivée première négative du signal de fluorescence par rapport au temps ($-dF/dt$) en fonction de la température.

Conditions de réalisation

Préparation des gammes étalon

Les droites standard pour la quantification des gènes *aoxB* ont été réalisées à partir de trois plasmides linéarisés ou non et contenant un fragment *aoxB* de 1100 pb amplifié à l'aide du couple d'amorces m1-2F/m3-2R : un plasmide pCR4-TOPO contenant un insert *aoxB* amplifié à partir du sol T12R (clones T12RS13) ou de l'eau YI025 (clone YI025-13) et un plasmide pGEMT-easy dont l'insert *aoxB* a été amplifié à partir d'*H. arsenicoxydans*. Le plasmide pCR4-TOPO circulaire a été linéarisé par digestion par l'enzyme de restriction *BglI* ayant un seul site de coupure sur l'ADN plasmidique. Une gamme étalon a également été

réalisée à partir de l'ADN génomique de *H. arsenicoxydans*, dont le génome a récemment été séquencé et contient un seul gène *aoxB*.

Les droites standard pour la quantification des gènes codant l'ARNr 16S ont été réalisées selon la méthode décrite par Cébron et *al.* (2008), à partir d'un plasmide pCR4-TOPO linéarisé à l'aide de l'enzyme de restriction *Bgl*II et contenant un fragment du gène codant l'ARNr16S amplifié à partir de *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 à l'aide du couple d'amorces 968f/1401R.

La concentration des solutions d'ADN a ensuite été mesurée, et la valeur obtenue, exprimée en $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, a ensuite été convertie en $\text{copies}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, après avoir calculé la masse du plasmide ou du génome, à l'aide de la formule suivante :

$$m = (n) \times (1 \text{ mole} / 6,023 \times 10^{23}) \times (660 \text{ g/mole})$$

m = masse du plasmide ou du génome contenant le fragment d'intérêt (en g)

n = taille du plasmide ou du génome contenant le fragment d'intérêt (en pb)

$$\text{Nombre d'Avogadro} = 6,023 \times 10^{23} \text{ molécules/mole}$$

$$\text{Masse moléculaire d'une paire de base} = 660 \text{ g/mole}$$

Les gammes étalon ont été obtenues par dilutions en série à partir d'une solution stock. La gamme d'ADN plasmidique varie de 10^8 à 10^1 $\text{copies}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ et celle d'ADN génomique de 10^6 à 10^1 $\text{copies}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Un exemple de droite standard obtenue à partir de dilution de plasmides contenant un fragment du gène codant l'ARNr 16S est donné Figure 27.

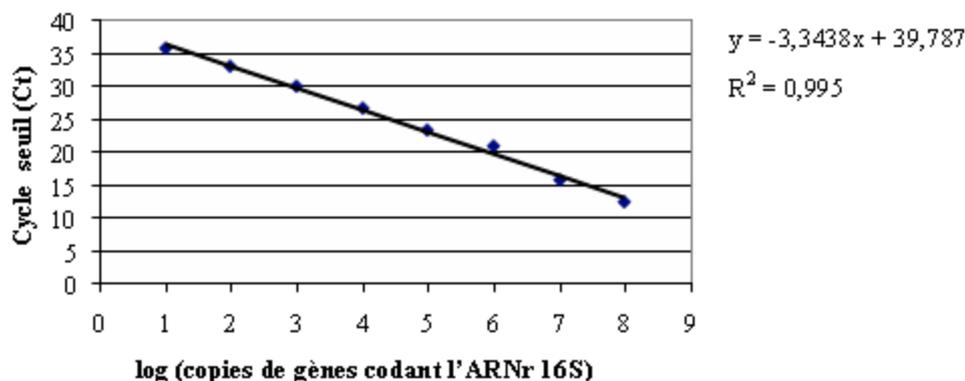


Figure 27: Courbe de calibration réalisée à partir de dilutions décimales de plasmides contenant une copie de gène codant l'ARNr 16S.

La présence d'inhibiteurs de PCR a été évaluée en mélangeant 1 µl d'ADN issu d'échantillons environnementaux avec 1 µl de 10⁶ copies de plasmide standard contenant un insert *aoxB* (paox-YI025-13). Les résultats d'amplification PCR sont ensuite comparés avec ceux obtenus à partir d'une dilution décimale en série du standard testé (droite standard).

Programme et mélange réactionnel

Les PCR en temps réel ont été réalisées dans un thermocycleur MyIQ (Biorad) en utilisant le IQ SYBR GREEN SuperMIX (Biorad). Le couple d'amorces m1-2F/m2-1R est utilisé pour l'amplification spécifique de fragments *aoxB* de 550 pb environ. Le couple 968F/1401R est utilisé pour l'amplification spécifique de fragments du gène codant l'ARNr *16S* de 450 pb environ. Les réactions ont été réalisées dans un volume total de 20 µl. 1µl d'ADN cible a été utilisé aussi bien pour les standards que pour les échantillons. Le mélange réactionnel et le programme ayant servi aux tests sont indiqués dans les Tableaux 23 et 24.

Les signaux obtenus sont analysés à l'aide du logiciel MyIQ (Biorad).

IQ SYBR GREEN SuperMIX	10 µl
Amorce m1-2F ou amorce 968F	0,5 µM ou 0,2 µM
Amorce m2-1R ou amorce 1401R	0,5 µM ou 0,2 µM
DMSO	5 %
T4gp32 (Qbiogene)	0,1 µl
H ₂ O	qsp 20 µl

Tableau 23 : Mélange réactionnel utilisé en PCR en temps réel

Cycle (répétitions)	Etapes	Température (°C)	Temps
1 (1)	1	95,0°C	5 min
2 (50)	1	95,0°C	30 s
	2	54,0°C	30s
	3	72,0°C	30s
	4	81,0°C	10s
	Collecte des données et analyses en temps réel		
3 (1)	1	72,0°C	7 min
4 (1)	1	95,0°C	30s
5 (88)	1	55,0°C	10 s
	Augmentation progressive de la température + 0.5°C		
	Collecte des données de courbe de dissociation et analyses		
6 (1)	1	4,0°C	∞

Tableau 24 : Programme utilisé en PCR en temps réel

II.6.5. Profils des gènes *aoxB* par DGGE

La technique d’empreinte moléculaire DGGE a été développée et optimisée pour les gènes *aoxB*, dans le but d’étudier la structure, la diversité et l’évolution des bactéries AsIII-oxydantes dans l’environnement (principalement dans les eaux du bassin de l’Isle).

Principe

Cette technique permet de séparer des fragments d’ADN de taille identique, mais de séquence nucléotidique différente. La séparation des fragments d’ADN s’effectue par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide contenant un gradient linéaire et croissant de substances dénaturantes (urée et formamide). Initialement introduits sous forme double-brin, les fragments migrent sous l’influence du champ électrique jusqu’à ce qu’ils atteignent les conditions dénaturantes qui provoquent la dissociation de leur domaine de fusion le moins stable. Ce changement de conformation entraîne une perte de mobilité du fait de leur structure plus encombrante. La migration des fragments est fortement ralentie voire stoppée à une position précise du gel. Les fragments d’ADN présentant des différences de séquences dans leurs domaines de fusion le moins stable prennent alors des positions variables le long du gradient de concentration en substances dénaturantes. L’ajout d’une répétition de bases guanine et cytosine (GC clamp) à l’extrémité 5’ de l’une des amorces permet d’éviter la dénaturation totale des fragments d’ADN amplifiés et donc l’élution du gel.

La séparation des fragments est basée sur quatre fondamentaux : (i) la dénaturation de fragments d’ADN sous l’action d’un dénaturant s’opère par fusions successives de régions distinctes (domaines de fusion), caractérisées par des températures de fusion (T_m) différentes ; ces domaines sont plus ou moins stables selon leur composition en bases azotés (AT et GC), (ii) deux fragments qui ne diffèrent que d’une seule base ont une T_m différente, (iii) la conformation (double-brin, partielle ou totale) d’un fragment d’ADN affecte sa mobilité électrophorétique au sein d’un gel dénaturant et (iv) la vitesse de migration d’un fragment dépend principalement de sa conformation, de la porosité du gel et du voltage appliqué.

Conditions de réalisation

Les qualités phylogénétiques des régions ciblées ici sont fondamentales car elles permettent de caractériser les espèces inconnues par détection sur gel. Nous avons donc choisi d'analyser la région variable comprise entre les motifs 1 et 2 du gène *aoxB* et s'étalant sur 550 pb car elle présente les mutations les plus pertinentes et peut-être ciblée aisément à l'aide d'amorces dessinées à partir de ces motifs. Cette région permet de plus de reconstruire une phylogénie cohérente des gènes *aoxB*. Les couples d'amorces permettant d'amplifier les fragments spécifiques sont citées ci-dessus (Tableau 20).

La séparation des fragments PCR *aoxB* a été réalisée à l'aide du système D-code (Biorad). Les gels de polyacrylamide à 8% contenant un gradient d'urée-formamide ont été obtenus par mélange de 12 ml de deux solutions dénaturantes dont la composition est donnée dans le Tableau 25. Les gradients de dénaturant testés sont les suivants : 0-100%, 40-80%, 40-70% et 50-70%. Un gel de départ (« starting gel ») est également réalisé en ajoutant à 4 ml de solution 0%, 4 µl de TEMED et 40 µl d'APS 10%. La migration a été réalisée dans 7 litres de tampon TAE 1X (40 mM Tris-acétate, 20 mM sodium acétate, 1 mM EDTA, pH 8.0) à 60°C et 80V pendant 15 heures. A l'issue de la migration, les gels ont été placés pendant 15 minutes dans un bain de TAE 1X contenant 10% de SYBR Gold, puis observés sous UV.

Pour 100 ml des solutions dénaturantes suivantes (%) :	0	40	50	70	80	100
Solution d'acrylamide/bisacrylamide (37.5:1) (ml)				20		
TAE (ml)				2		
Urée (g)	-	16,8	21	29,4	33,6	42
Formamide (ml)	-	16	20	28	32	40
Eau (ml)				q.s.p. 100 ml		
Pour 12 ml de solution dénaturante :						
TEMED (µl)				6		
Ammonium persulfate 10% (µl)				60		

Tableau 25 : Composition des solutions formant le gel DGGE

Les profils DGGE ont été comparés en utilisant le logiciel Quantity one v.4.6.1 (Biorad). Les similarités entre profils ont été calculées en utilisant l'indice de similarité de Dice, basé sur la présence/absence de bandes dans chaque profil. Les matrices de similarité obtenues à partir de

ces valeurs ont été utilisées pour construire des dendrogrammes à l'aide de l'algorithme UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Mathematical Averages).

Les bandes d'intérêt ont été excisées du gel à l'aide d'un cône de pipette stérile et placée dans un microtube contenant 20 μ l d'eau exempte de DNase. 1 μ l a ensuite été utilisé comme matrice pour une PCR à 20 cycles afin de ré-amplifier les fragments *aoxB* avec les amorces m1-2F/m2-1R.

II.6.6. Structures des communautés bactériennes totales par CE-SSCP

La technique d'empreinte moléculaire CE-SSCP a été appliquée à la région V3 des gènes codant l'ARNr 16S, dans le but d'étudier la structure, la diversité et l'évolution de la communauté bactérienne totale dans les enrichissements et incubations décrites aux paragraphes I.3 et I.4.

Principe

Tout comme la DGGE, cette technique permet de séparer des fragments d'ADN, de taille identique mais de séquence nucléotidique différente. Ici, les fragments, amplifiés à l'aide d'amorces marquées, sont préalablement dénaturés, introduits sous forme simple brin et leur séparation s'effectue en condition non dénaturante. Chaque fragment d'ADN adopte une structure secondaire simple brin spécifique de sa séquence conduisant à une vitesse de migration précise. Le brin marqué est alors détecté par un laser et visualisé sous forme de pic. Chaque pic de fluorescence correspond à une séquence unique et donc à une espèce bactérienne donnée lorsqu'il s'agit d'une séquence de la région V3 du gène codant l'ARNr 16S. La surface des pics est proportionnelle à la quantité d'ADN détectée.

Conditions de réalisation

Un μ l de produit PCR amplifié à l'aide du couple d'amorces w49/w34-marqué en 5' (fluorophore VIC ou FAM) et dilué si nécessaire dans de l'eau (5 à 100 fois), afin que la fluorescence ne dépasse pas la limite de détection du laser, est ajouté à un mélange de formamide deionisée ultra pure (18,8 μ l) et de standard (1 μ l). Le standard interne (Genescan-

500 LIZ ou Genescan-600 LIZ, Applied Biosystems) permet d'attribuer à chaque fragment une position de migration spécifique de sa structure secondaire, donc de sa séquence. Les ADN double brin sont dénaturés par chauffage (5 mn à 95 °C), puis refroidis rapidement (10 min dans de la glace).

La séparation des molécules se fait par électrophorèse capillaire (12 kV, 32 °C) à travers un polymère non dénaturant (5,6 % CAP polymer, Applied Biosystems) dans un séquenceur ABI Prism 310 (Applied Biosystems). Les profils de pics obtenus sont analysés et alignés avec le logiciel GeneScan 3.1 (Applied Biosystems).

Dans le cas du sol industriel D2, les similarités entre profils ont été calculées en utilisant l'indice de similarité de Sorensen, basé sur la présence et l'absence de pics dans chaque profil. Les matrices de similarité obtenues à partir de ces valeurs ont été utilisées pour construire des dendrogrammes à l'aide de XL-STAT.

II.6.7. Construction de bibliothèques de gènes, criblage et séquençage

Avant leur clonage, les produits PCR (fragments de gènes *aoxB*, *arrA* ou codant l'ARNr 16S) ont été excisés sur gel et purifiés à l'aide du kit GeneClean Turbo (Qiagen) et leur quantité a été évaluée par électrophorèse sur gel d'agarose.

Pour les souches pures AsIII-oxydantes, des bibliothèques de gènes *aoxB* et codant l'ARNr 16S ont été construites à l'aide du kit pGEM®-T easy (Promega). Ce kit a également été utilisé pour cloner certaines bandes d'intérêt visualisées par DGGE. Pour les enrichissements, incubations et échantillons environnementaux, des bibliothèques de gènes *aoxB*, *arrA* et codant l'ARNr 16S ont été construites à l'aide du kit TOPO® TA Cloning for Sequencing (Invitrogen). L'insertion d'un fragment de taille attendue dans le vecteur de clonage a été vérifiée sur un nombre variable de clones par PCR sur colonies (voir paragraphe II.6.3).

Les bibliothèques de gènes issues des enrichissements, incubations, sols et eaux ont été criblées une seconde fois afin de regrouper les clones selon la séquence de l'insert. Des analyses de restriction ont été utilisées pour distinguer les différents type d'inserts *aoxB* (fragment m1-2F/m3-2R) et *arrA* (fragment HAArrA-D1F/ HAArrA-G2R). Chaque enzyme de restriction reconnaît et coupe un site particulier du fragment d'ADN cible, produisant un ou plusieurs fragments de longueurs variables. Le mélange réactionnel (2 µl de produits PCR, 2 µl de

tampon 5X et 0,5 U d'enzyme *RsaI* ou *HaeIII* pour un volume total de 20 µl) a été incubé 2 h à 37 °C. Le profil de restriction (nombre et longueur des fragments produits) a été visualisé en gel d'agarose 2 %. Les différents types d'inserts du gène *aoxB* ont été distingués par DGGE afin de les identifier aux bandes du profil DGGE de l'échantillon environnemental. Dans le cas des bibliothèques de gènes codant l'ARNr 16S, les clones ont été classés selon leur profil de migration en CE-SSCP.

Un clone représentatif de chacun de ces groupes ainsi définis, de même qu'un clone issu de chacune des bibliothèques de gènes d'isolats (*aoxB* et codant l'ARNr 16S) et de bandes DGGE *aoxB* ont été sélectionnés pour le séquençage. Après purification des plasmides (voir paragraphe II.6.1), les inserts ont été séquencés par Genome Express (Grenoble, France) avec des amorces spécifiques des vecteurs de clonage ou du gène *aoxB* (amorce m1-2F-ND). Cette amorce a de plus été utilisée pour séquencer des produits PCR issus de la réamplification de bandes DGGE.

II.6.8. Analyses des séquences

Les séquences d'ADN obtenues à partir de ces travaux ont été comparées avec celles disponibles dans les bases de données GenBank et Ribosomal Database Project II (pour les séquences d'ARNr 16S). Les similarités de séquence avec les séquences références obtenues ont été recherchées à l'aide des programmes BLASTn ou BLASTP, disponibles sur le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.

Les manipulations, les analyses et les alignements de séquences ont été réalisés en utilisant le logiciel BioEdit (Hall, 1999). Les séquences d'acides aminés ont été déduites des séquences nucléiques *aoxB* et *arrA*. L'alignement des séquences a été réalisé avec le logiciel CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994), puis retouché manuellement dans BioEdit. Seuls les nucléotides et acides aminés non ambigus ont été utilisés pour les analyses phylogénétiques par les méthodes de distances, Neighbor joining (Saitou et Nei, 1987) avec la correction de Jukes et Cantor (1969) ou de Kimura (1980), et de parcimonie DNAPars ou ProtPars (Felsenstein, 1989). Les séquences environnementales AoxB partageant plus de 90% d'identité ont été considérées comme appartenant à un même OTU.

Les arbres phylogénétiques ont été construits en utilisant les logiciels Treecon (Van de Peer et De Wachter, 1994) pour les analyses *via* la méthode des distances, ou BioEdit pour les

analyses *via* la méthode de parcimonie. La confiance dans la topologie des arbres ainsi construits a été évaluée par des analyses de bootstrap sur 100 répliques (Felsenstein, 1985). Quelle que soit la méthode utilisée, Neighbor joining et parcimonie, la topologie des arbres est très proche.

Les positions et proportions de sites conservés ou variables dans les séquences nucléotidiques *aoxB* ont été identifiées et calculées à l'aide du logiciel DNAsp version 4 (Rozas *et al.*, 2003). Les mutations synonymes et non-synonymes dans les séquences protéiques AoxB ont été recherchées en comparant les alignements de séquences *aoxB* et AoxB. L'analyse de saturation des acides nucléiques a été réalisée en utilisant le logiciel DAMBE version 4.0.50 (Xia et Xie, 2001).

III. Le gène *aoxB*, marqueur moléculaire des bactéries AsIII-oxydantes

III.1. Contexte

Les gènes de fonction *aoxB* codant la sous-unité catalytique de l'AsIII-oxydase sont particulièrement prometteurs pour détecter par PCR les bactéries AsIII-oxydantes et donc une potentielle oxydation de l'As dans l'environnement. Cependant, au début de cette thèse aucun outil moléculaire ne permettait de cibler ce gène dans des échantillons complexes.

De nouvelles amorces ont donc été dessinées pour cibler le gène *aoxB* chez un panel de souches AsIII-oxydantes. Pour dessiner, tester et valider ces amorces, une collection de souches AsIII-oxydantes appartenant à des classes, genres et espèces variés a été utilisée.

Ensuite, une approche par PCR-DGGE a été développée sur les gènes *aoxB* pour différencier les séquences de différentes souches AsIII-oxydantes et suivre l'évolution de la structure des communautés AsIII-oxydantes dans l'environnement.

Enfin, une approche de PCR en temps réel a également été développée afin de quantifier les gènes *aoxB* et suivre l'abondance des bactéries AsIII-oxydantes dans l'environnement.

III.2. Collection de souches AsIII-oxydantes

Dans cette étude, 24 α -, β -, γ -*Proteobacteria* ou *Chloroflexi* oxydant l'AsIII en condition chimioautotrophe et/ou chimiohétérotrophes ont été utilisées (c.f. Tableau 13), pour tester et valider de nouvelles amorces ciblant les gènes *aoxB*.

Quatre souches ont été isolées dans ce travail à partir d'environnements pollués par l'As. Les isolats D2OHCJ et T12RB proviennent de deux sols de sites industriels du bassin de la Meuse et les isolats YI013H et YI019A proviennent d'eaux de surface collectées le long du bassin de l'Isle impacté par des activités minières. Ces quatre souches sont capables de totalement oxyder 200 mg l⁻¹ d'AsIII en AsV (mesure effectuée après 7 jours) et seul l'isolat YI019A est capable de réaliser cette oxydation en condition chimioautotrophe.

Les analyses phylogénétiques sur 1214 nucléotides du gène codant l'ARNr 16S ont montré que les séquences de ces isolats sont identiques à plus de 99% à celles de souches connues et appartenant aux β - et γ -*Proteobacteria* (Figure 28). L'isolat D2OHCJ est étroitement apparenté à *Pseudomonas putida* (AY918067, 99,8% d'identité), les deux isolats T12RB et YI013H à *Alcaligenes faecalis* (AJ509012, 99,7% d'identité) et l'isolat YI019A à *Burkholderia phenazinium* (AY154375, 99,7% d'identité). La limite de définition d'une espèce bactérienne étant fixée à 97% d'identité sur la séquence de l'ARNr 16S (Wayne *et al.*, 1987), ces isolats représentent donc des nouvelles souches des espèces citées ci-dessus.

Si les espèces *Alcaligenes faecalis* et *Pseudomonas putida* ont déjà été décrites dans la littérature pour leur capacité à oxyder l'AsIII (Abdrashitova *et al.*, 1981 ; Phillips et Taylor, 1976 ; Suttigarn et Wang, 2005; Krumova *et al.*, 2008), l'isolat YI019A est le premier exemple de la capacité d'une espèce du genre *Burkholderia* à réaliser cette oxydation. Il est intéressant de noter ici que les souches *A. faecalis* T12RB et *A. faecalis* YI013H ont été isolées de deux environnements pollués par l'As très différents et géographiquement éloignés (le sol industriel T12R du bassin de la Meuse et l'eau YI013 du bassin de l'Isle, respectivement). Cette observation est discutée plus en détail dans le Chapitre 5.

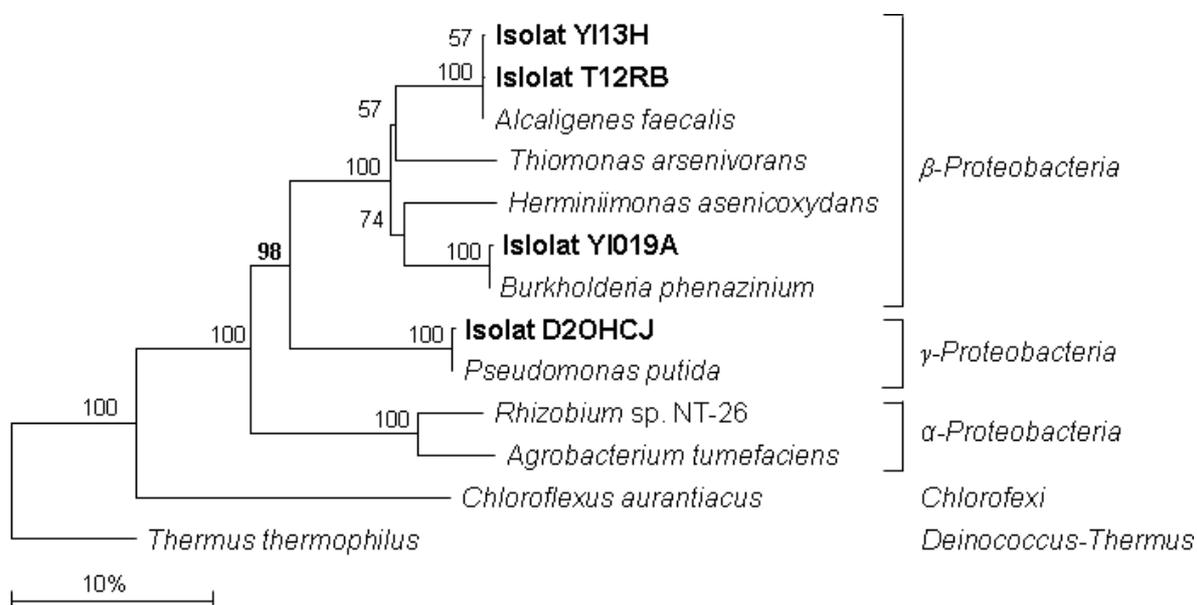


Figure 28 : Phylogénie basée sur l'ARNr 16S (1214 nucléotides) des isolats AsIII-oxydants (en gras). Les valeurs de bootstrap supérieures à 50% sont indiquées.

III.3. Dessin, sélection et évaluation d'amorces ciblant les gènes

aoxB

Les gènes *aoxA* et *aoxB* codant respectivement la petite et la grosse sous-unité de l'AsIII-oxydase ont été recherchés chez quatre souches pures AsIII-oxydantes de notre collection de souches : *Thiomonas arsenivorans*, *Thiomonas* sp. WJ68, *Thiomonas* sp. NO115 et *Leptothrix* sp. S1.1. Des fragments migrant à la taille attendue ont été obtenus à partir des trois souches du genre *Thiomonas* avec les couples d'amorces, uniaoxaF/aoxb763R (environ 1500 pb des gènes *aoxAB*), uniaoxaF/degaoxb5R (environ 2000 pb des gènes *aoxAB*) et aoxb65F/aoxb763R (environ 1 200 pb du gène *aoxB*), fournis par le laboratoire de l'ULP. L'amorce uniaoxaF nous a permis d'amplifier l'extrémité 3' du gène *aoxA*, la séquence intergénique séparant les gènes *aoxA* et *aoxB* ainsi qu'une partie du gène *aoxB*. Cependant, aucun fragment de gène *aox* n'a pu être amplifié à partir de *Leptothrix* sp. S1.1 à l'aide de ces couples d'amorces. De plus, de nombreuses amplifications non spécifiques ont été observées, rendant plus difficile la détection des fragments d'intérêt. Ces amorces n'ont donc pas un spectre suffisamment large pour cibler des genres divergents et elles sont donc inadaptées pour rechercher les gènes *aoxB* dans des échantillons complexes.

Des amorces hybrides ciblant les gènes *aoxB* ont donc été dessinées à l'aide du programme CODEHOP, afin de favoriser l'amplification spécifique de gènes homologues chez des souches phylogénétiquement diverses. Les sites de fixation potentiels de ces amorces ont été recherchés à partir de neuf séquences protéiques AoxB provenant de souches bactériennes appartenant à des genres différents des domaines *Bacteria* et *Archaea*. Trois motifs protéiques ont été sélectionnés parmi ceux proposés par le logiciel Block Maker : les deux motifs les plus éloignés (par environ 1100 pb) afin d'extraire le maximum d'information phylogénétique, et un motif situé à mi-distance (Figure 29). La première région conservée (s'étendant entre les résidus 383 et 391 de la séquence protéique AoxB d'*H. arsenicoxydans*) comprend la première partie du motif CX₂CX₃CX₇₀S requis pour la fixation du groupement [3Fe-4S] (CHFCIVGCGYH, m1), la deuxième inclut une des histidines et la glutamine qui forment probablement le site de fixation de l'AsIII (HNRPAYNSE, m2) et la dernière région, s'étendant entre les résidus 383 et 391, correspond au motif consensus YEKGIIWGN (m3).

Parmi les amorces hybrides dessinées sur ces motifs par le programme CODEHOP, seulement sept ont montré leur capacité à cibler spécifiquement leur site de fixation au cours d'une simulation de PCR.

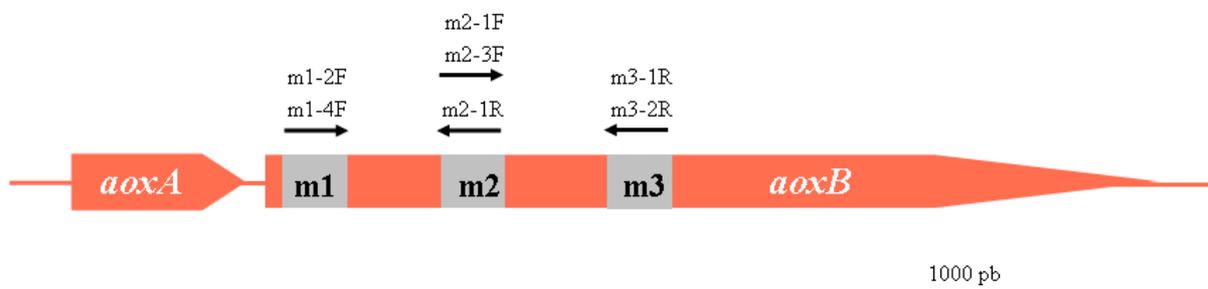


Figure 29 : Position des amorces en fonction des motifs protéiques ciblés sur les séquences AoxB.

La capacité des 10 combinaisons possibles de ces sept amorces à amplifier spécifiquement les gènes *aoxB* a donc été testée sur les trois souches du genre *Thiomonas* citées au premier paragraphe. Un fragment spécifique de taille attendue a été obtenu avec les cinq couples d'amorces suivants : m1-2F/m2-1R (538 pb) ; m1-2F/m3-2R (1112 pb) ; m1-4F/m2-1R (536 pb) ; m1-4F/m3-2R (1108 pb) ; m2-1F/m3-2R (595 pb) (Figure 30). Au contraire, aucune amplification (puits 3, 4 et 8) ou des amplifications non spécifiques (puits 7 et 9) ont été obtenues avec les couples contenant les amorces m2-3F et m3-1R. Des deux amorces sens ciblant le motif m1 (CHFCIVGCGYH), l'amorce m1-2F a été préférée à l'amorce m1-4F, plus dégénérée (respectivement 32 et 36). Au vu de ces résultats, les deux couples d'amorces m1-2F/m2-1R et m2-1F/m3-2R (donnant un produit PCR d'environ 550 pb) et le couple m1-2F/m3-2R (donnant un produit PCR d'environ 1 100 pb) ont été retenus pour la suite des expériences.

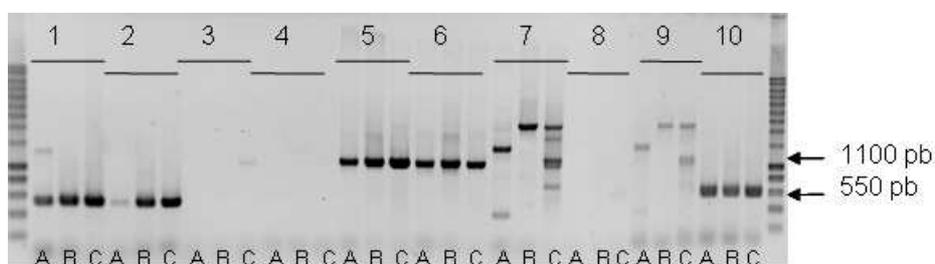


Figure 30 : Efficacité de l'amplification PCR d'un fragment du gène *aoxB* chez *Thiomonas* spp. avec différents couples d'amorces. Couples d'amorces: (1) m1-2F/m2-1R, (2) m1-4F/m2-1R, (3) m1-2F/m3-1R, (4) m1-4F/m3-1R, (5) m1-2F/m3-2R, (6) m1-4F/m3-2R, (7) m2-3F/m3-1R, (8) m2-1F/m3-1R, (9) m2-3F/m3-2R, (10) m2-1F/m3-2R. Souches pures: (A) *Thiomonas* sp. WJ-68, (B) *Thiomonas arsenivorans*, (C) *Thiomonas* sp. NO115.

La spécificité de la réaction PCR étant similaire avec ces 3 couples pour des températures d'hybridation variant de 52°C à 62°C et des concentrations de MgCl₂ de 1,5 mM à 2,5 mM, les conditions de plus faible stringence, c'est à dire 52°C et 2,5 mM de MgCl₂, ont été préférées afin de cibler également des séquences divergentes. Leur sensibilité a ensuite été évaluée dans ces conditions sur des dilutions en séries d'ADN génomique des deux souches AsIII-oxydantes dont le génome a été séquencé et contient un seul gène *aoxB* : *Herminiimonas arsenicoxydans* et *Chloroflexus aurantiacus*. Le couple m1-2F/m3-2R permet une amplification spécifique avec moins de 8,3 pg d'ADN cible (Figure 31). Sachant que le génome d'*H. arsenicoxydans* mesure 3,4 Mb environ et contient seulement un gène *aoxB* (Muller *et al.*, 2007), cela représente environ $2,2 \times 10^3$ copies de gènes *aoxB*. La sensibilité est plus faible pour la souche phylogénétiquement plus éloignée *C. aurantiacus*, la limite de détection étant de $1,7 \times 10^4$ copies de gènes *aoxB*. Le couple m2-1F/m3-2R montre également une bonne sensibilité, avec seulement 4,15 ng d'ADN de *H. arsenicoxydans*, soit $1,1 \times 10^5$ copies, nécessaires pour amplifier un fragment spécifique. Par contre, 415 pg d'ADN, soit $1,1 \times 10^6$ copies, sont nécessaires avec le couple d'amorces m1-2F/m2-1R. Au vu de ces tests de sensibilité, les deux couples d'amorces m1-2F/m2-1R et m1-2F/m3-2R ont été retenus pour la suite des expériences.

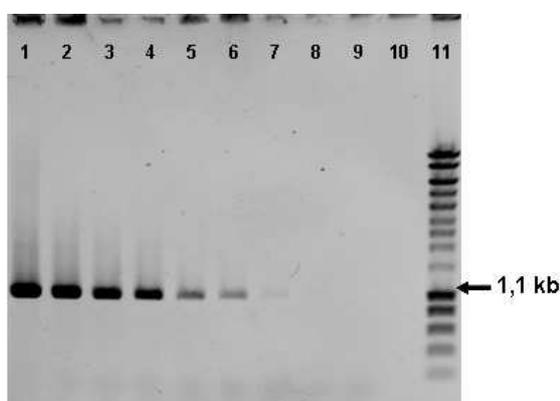


Figure 31 : Test de sensibilité du couple d'amorces m1-2F/m3-2R sur différentes concentrations d'ADN de *H. arsenicoxydans*. Pistes 1 à 10 : amplifications obtenues avec 88.3 ng, 8,3 ng, 4,15 ng, 830 pg, 415 pg, 83 pg, 41,5 pg, 8,3 pg, 4,15 pg et 830 fg d'ADN. Piste 11 : marqueur de poids moléculaire.

Ces deux couples d'amorces ont conduit à des amplifications spécifiques à partir des 18 autres souches AsIII-oxydantes disponibles dans notre collection (c.f. Tableau 13) et appartenant à divers genres des *Proteobacteria* : *Lepthotrix* sp. S1.1 (dont aucun fragment *aoxB* n'avait pu être amplifié à l'aide des autres amorces citées au premier §), *Thiomonas cuprina*, *Thiomonas delicata*, *Variovorax* sp. 4.2, *Acidovorax* sp. 75, *Acinetobacter* sp. 33, *Alcaligenes* sp.

YI013H, *Alcaligenes* sp. T12RB, *Aminobacter* sp. 86, *Burkholderia* sp. YI019A, *Limnobacter* sp. 83, *Pseudomonas* sp. 1, 46, 72, 73, 89, D2OHCI, *Ralstonia* sp. 22. Une amplification moins spécifique a été obtenue à partir de l'*Archaea*, *Aeropyrum pernix*, dont le génome a été séquencé et contient un gène *aoxB*. Aucune amplification n'a été observée à partir de 10 souches bactériennes n'oxydant pas l'AsIII, dont 6 possèdent une enzyme à molybdène de la famille des DMSO-réductase (comme l'AsIII-oxydase), *i.e.* *Rhodobacter sphaeroides*, *Desulfotobacterium hafniense*, *Bacillus selenitireducens*, *Geobacter metallireducens*, *Escherichia coli*, *Halomonas denitrificans*.

La pertinence de ces couples à cibler spécifiquement les gènes *aoxB* a également été démontrée par l'amplification spécifique d'un fragment de taille attendue à partir d'ADN extraits d'échantillons environnementaux : (i) les quatre sols des sites industriels du bassin de la Meuse (D2, D3, T5R et T12R), (ii) les huit eaux collectées dans le bassin de l'Isle (YI009, YI011, YI016, YI019, YI020, YI025, AB001 et PZR10) (Figure 32). Des expériences de clonage et séquençage des certains produits PCR obtenus ont confirmé que ces bandes correspondaient bien aux gènes *aoxB* recherchés (c.f. chapitres 5 et 6).

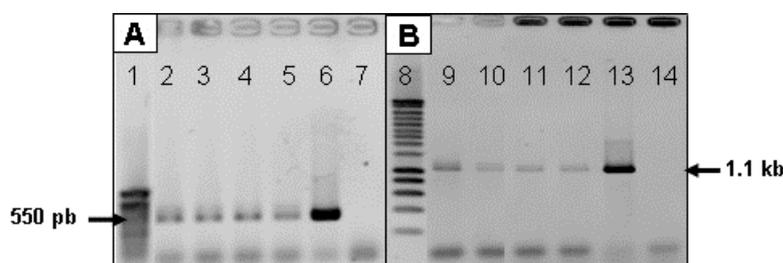


Figure 32 : Amplifications obtenues à l'aide des couples d'amorces m1-2F/m2-1R (A) et m1-2F/m3-2R (B). Pistes 2 et 9 : sol D2 ; Pistes 3 et 10 : sol D3 ; Pistes 4 et 11 : sol T5R ; Pistes 5 et 12 : sol T12R ; Pistes 6 et 13 : *Thiomonas* sp. N0115 (témoin positif) ; Pistes 7 et 14 : *B. selenitireducens* (témoin négatif) ; Pistes 1 et 8 : marqueur de poids moléculaire d'ADN.

III.4. DGGE

La taille maximale requise pour une bonne résolution des fragments en DGGE est approximativement de 500 pb (Myers *et al.* 1985). La région encadrée par les amorces m1-2F et m2-1R mesurant environ 550 pb et contenant des segments plus ou moins variables selon les espèces bactériennes AsIII-oxydantes (c.f. chapitre 4), a été choisie pour les analyses de DGGE.

L'analyse du profil de dénaturation de la région sélectionnée pour plusieurs séquences *aoxB* doubles brins, à l'aide du serveur « Poland » (<http://www.biophys.uni-duesseldorf.de/local/POLAND/poland.html>), montre que le domaine de fusion le plus élevé se situe à l'extrémité 3' des séquences. Afin de stabiliser le comportement de fusion des fragments et d'augmenter la résolution de la séparation, une queue GC a donc été rajoutée à l'extrémité 5' de l'amorce inverse m2-1R.

Ce couple d'amorce m1-2F/m2-1R-GC a permis d'amplifier un fragment *aoxB* spécifique de 550 pb à partir de toutes les souches testées, à l'exception d'*H. arsenicoxydans*. Un profil de migration spécifique est obtenu pour chaque souche. Cependant, des bandes multiples sont obtenues pour certaines souches. Pour rappel, une amorce dégénérée est un mélange d'amorces de séquences similaires mais présentant des variations à une ou plusieurs positions ; les dégénérescences des amorces m1-2F et m2-1R-GC sont de 32 et 24, respectivement. Certes, ce mélange permet de cibler un spectre plus large de séquences, mais il peut également conduire à l'obtention de séquences légèrement différentes au niveau des extrémités (*i.e.* du site de fixation des amorces). Cela peut entraîner un profil DGGE multi-bandes à partir de souches pures, et la surestimation du nombre de bactéries présentes dans les communautés naturelles (Muyzer et Smalla, 1998).

Afin de s'affranchir de ces problèmes, un nouveau couple d'amorces consensus, donc non dégénérées, m1-2F-ND/m2-1R-ND-GC, a été dessiné pour répondre aux besoins spécifiques des expérimentations en DGGE. Des amplifications spécifiques ont été obtenues avec ce nouveau couple d'amorces à partir de l'ensemble des 24 souches AsIII-oxydantes testées. Aucune amplification n'a été obtenue à partir des souches qui n'oxydent pas l'AsIII. La séparation par DGGE montre une seule bande spécifique pour toutes les souches sauf 2 (cf. paragraphes suivants) ainsi qu'une bonne résolution des bandes. Ces amorces consensus,

appelée amorces DGGE, ont donc été validées pour poursuivre l'optimisation de cette technique.

Parmi les différents gradients de dénaturation testés (10%-90%, 20%-80%, 40%-70%, 50%-70%), la séparation des fragments *aoxB* des différentes souches est optimale dans un gradient variant de 40 à 70%, voire de 50 à 70%.

En général, le profil DGGE de chaque souche est composé d'une seule bande, indiquant la présence d'une seule copie de gène *aoxB* (Figure 33A). Cependant, le profil de *Leptothrix* sp. S1.1 est composé de 2 bandes, tandis que celui de *T. arsenivorans* en compte 3. L'excision, la ré-amplification et l'analyse DGGE de chacune de ces bandes montre un profil de migration mono bande identique à l'original, à l'exception de la bande 1 de *T. arsenivorans* qui produit le profil de la bande 2, indiquant qu'il s'agit d'un hétéroduplexe des produits migrants à la position 2 (Figure 33B et 33C). Ces résultats suggèrent que ces deux souches possèdent deux copies différentes du gène *aoxB*. Cette hypothèse a été confirmée par séquençage (c.f. chapitre suivant). La capacité des bactéries AsIII-oxydantes à porter plusieurs exemplaires de gène *aoxB* a déjà été montrée chez *Ancylobacter* sp. OL1 (Rhine *et al.*, 2007).

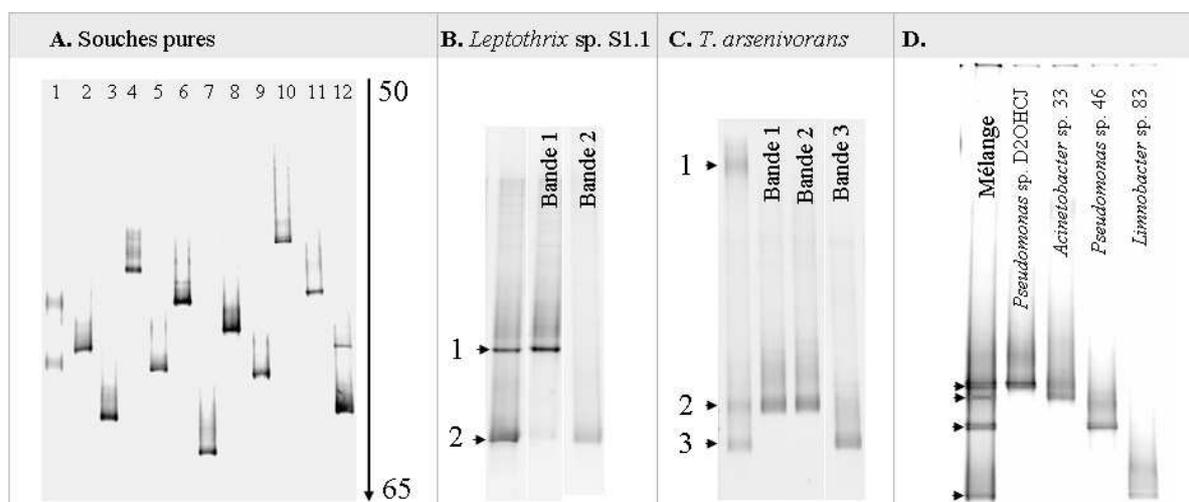


Figure 33 : DGGE des fragments *aoxB* amplifiés avec le couple d'amorces consensus m1-2F-ND/m2-1R-ND-GC. Pistes : *Thiomonas arsenivorans* (1), *Ralstonia* sp. 22 (2), *Acidovorax* sp. 75 (3), *Acinetobacter* sp. 33 (4), *Alcaligenes* sp. T12RB (5), *Burkholderia* sp. YI019A (6), *Aminobacter* sp. 86 (7), *Limnobacter* sp. 83 (8), *Thiomonas delicata* (9), *Pseudomonas* sp. D2OHCI (10), *Pseudomonas* sp. D2OHCI (11) et *Leptothrix* sp. S1.1 (12).

Les fragments *aoxB* amplifiés à partir de différentes souches pures appartenant à des genres, classes et phyla différents, migrent à des positions différentes et spécifiques au sein du gel (Figure 33). De même, différentes espèces d'un même genre, comme *Alcaligenes*,

Pseudomonas et *Thiomonas*, ont chacune un profil spécifique. Les souches d'une même espèce, e.g. *Alcaligenes* sp. T12RB et *Alcaligenes* sp. YI013H, ont également un profil de migration spécifique. Comme attendu, plus le pourcentage en bases G et C des séquences *aoxB* est élevé et par conséquent la température de fusion, plus leur migration est retardée en DGGE. Ainsi, toutes les souches testées peuvent être différenciées par DGGE. Ces résultats montrent que la région analysée du gène *aoxB* est appropriée pour étudier par DGGE la structure et la diversité de ces gènes dans des échantillons plus complexe.

Afin d'évaluer si les profils obtenus à partir de souches sont reproductibles dans une communauté complexe, les ADN de quatre souches ont été mélangés avec un ratio de 1 : 1 : 1 : 1 et les gènes *aoxB* ont été amplifiés avec les amorces DGGE à partir de ce mélange et séparés par DGGE. Le profil obtenu correspond à celui attendu et est composé de quatre bandes d'intensités égales, chacune ayant une position de migration identique à l'une des bandes obtenues pour chacune des souches. Ces amorces se sont également révélées être spécifiques sur les échantillons environnementaux testés (sols et eaux, voir chapitres 5 et 7).

III.5. PCR en temps réel

Le couple d'amorces m1-2F/m2-1R, ciblant les mêmes motifs qu'en DGGE, a été utilisé pour cibler les gènes *aoxB* dans les expériences de PCR en temps réel. Les tests d'optimisation de la PCR en temps réel ont montré que des concentrations d'amorces de 0,5 μ M et une température d'hybridation de 56°C permettent d'obtenir le meilleur rapport intensité/spécificité et de limiter la formation de dimères d'amorces.

Quatre droites standard de quantification des gènes *aoxB* ont été créées à partir de dilutions décimales en série de quatre plasmides linéarisés contenant un fragment *aoxB* appartenant à des genres ou classes différentes (Figure 34). Ces fragments, amplifiés avec les amorces m1-2F/m3-2R, proviennent des échantillons environnementaux étudiés dans cette thèse, i.e. du sol industriel T12R et de l'eau YI025 (pT12RS-13, pYI025-5, pYI025-13, affilié aux β -*Proteobacteria* et pYI025-20 affilié aux α -*Proteobacteria*). Dans les expériences de PCR en temps réel, l'amorce m2-1R se fixera donc sur le motif m2 situé au centre des fragments standards ciblés.

Une réponse linéaire est observée sur huit ordres de magnitude, de 10^1 à 10^8 copies de gènes *aoxB*, pour les dilutions des plasmides pT12RS-13 et pYI025-5 (Figure 34). Tandis qu'une réponse linéaire est observée pour six ordres de magnitude, de 10^3 à 10^8 copies, pour les dilutions des plasmides pYI025-5 et pYI025-20. Le coefficient de corrélation (R^2) est supérieur à 0,99 pour toutes les droites standards et témoigne d'une bonne reproductibilité de la technique. Des données comparables ont été rapportées pour d'autres gènes fonctionnels, tels que ceux impliqués dans la dénitrification (Henry *et al.*, 2004) ou la réduction du nitrate (Lopez-Gutierrez *et al.*, 2004).

Les droites de calibration réalisées à partir des dilutions de plasmides pT12RS-13 et pYI025-5 sont les plus sensibles (linéarité et donc capacité de détection jusqu'à 10 copies de gènes *aoxB*) et présentent des Ct plus précoces que les deux autres pour une même quantité de gènes initialement ajoutés.

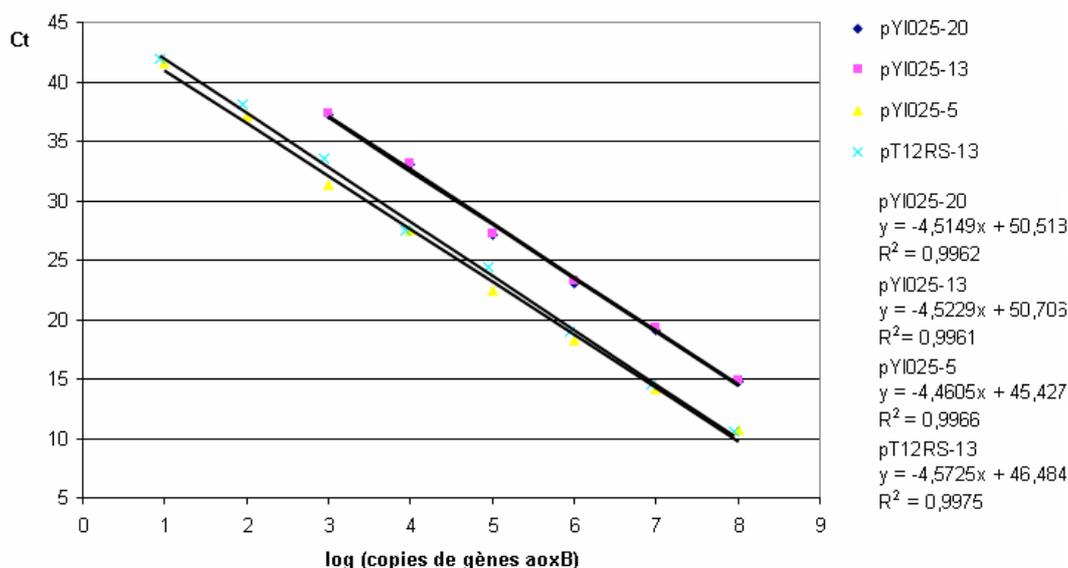


Figure 34 : Courbe de calibration réalisée à partir de dilutions décimales des plasmides pT12RS-13, pYI025-5, pYI025-13 et pYI025-20. Les valeurs de Ct sont exprimées en fonction du log du nombre de copies du plasmide standard.

La précision des résultats obtenus à partir de ces deux droites de calibration a été testée sur des quantités connues d'ADN génomiques de *H. arsenicoxydans* et *T. arsenivorans* (Tableau 26). La relation entre les valeurs de Ct et le logarithme du nombre de copies de gènes *aoxB* est linéaire. Cependant, la valeur expérimentale (nombre de copies mesurées) est en moyenne 12 fois plus faible que la valeur théorique (nombre de copies ajoutées), indiquant que la

méthode utilisée sous-estime le nombre de gènes *aoxB* présent sur ces génomes. Cette observation est probablement liée à la faible efficacité des amplifications PCR. En effet, la pente des droites est, en moyenne, de $-4,5 (\pm 3,9 \times 10^2)$, indiquant une efficacité de PCR faible (68% en moyenne), mais sensiblement identique pour les 4 fragments testés.

Souches	Nombre de copies <i>aoxB</i> ajouté	Nombre de copies <i>aoxB</i> mesuré
<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	$2,9 \times 10^7$	$1,4 \times 10^6$
	$2,9 \times 10^6$	$1,6 \times 10^5$
	$2,9 \times 10^5$	$1,1 \times 10^4$
	$2,9 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$
	$2,9 \times 10^3$	$1,3 \times 10^2$
<i>Thiomonas arsenivorans</i>	$1,7 \times 10^5$	$1,7 \times 10^4$
	$1,7 \times 10^4$	$2,5 \times 10^3$
	$1,7 \times 10^3$	$2,6 \times 10^2$

Tableau 26 : Nombre de copies de gènes *aoxB* de *H. arsenicoxydans* et *T. arsenivorans* ajoutés dans les réactions et nombre de copies mesuré par PCR en temps réel. Suite aux résultats de DGGE sur les gènes *aoxB*, deux copies de gènes *aoxB* chez *T. arsenivorans* ont été prises en compte dans les calculs.

L'analyse des courbes de dissociation des produits d'amplification obtenus durant ces réactions confirme l'amplification d'un seul produit spécifique (Figure 35) pour les standards ainsi que pour *H. arsenicoxydans* et de deux pour *T. arsenivorans*. Comme attendu, les T_m de ces produits correspondent à leurs pourcentages en GC. Pour de faibles quantités d'ADN cibles (*i.e.* 10^1 copies de gènes *aoxB*), un pic secondaire est obtenu avec une T_m inférieure à 80°C , correspondant à des dimères d'amorces (Figure 35). Puisque la détection de ce faible nombre de copies intervient après 40 cycles, au-delà desquels des amplifications non spécifiques peuvent survenir, la sensibilité de détection a été limitée à 10^2 copies de gènes *aoxB*. Enfin, les valeurs obtenues et mesurées à partir de trois réactions différentes sont du même ordre de grandeur, montrant la bonne reproductibilité de ces tests.

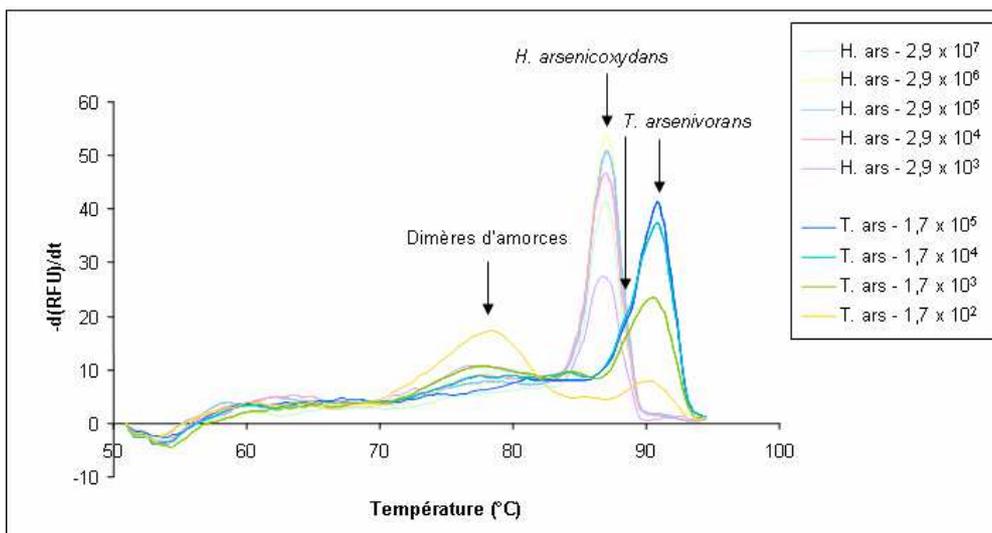


Figure 35 : Courbes de fusions obtenues pour les produits PCR amplifiés à partir de différentes quantités d'ADN génomiques de *H. arsenicoxydans* et *T. arsenivorans*.

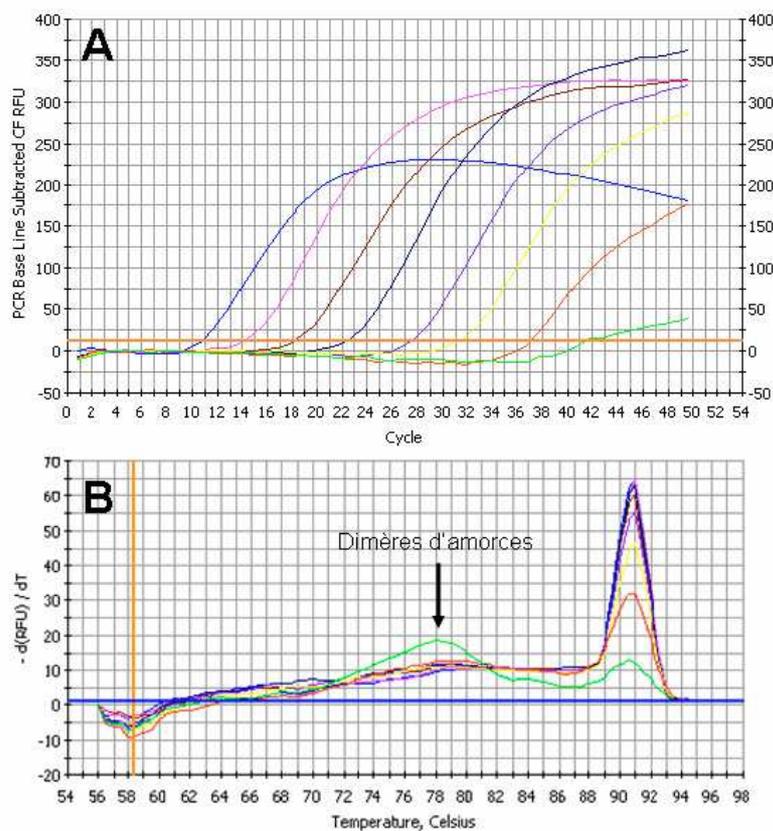


Figure 36 : Exemple de courbe d'amplification par PCR en temps réel (A) et courbes de fusion (B) obtenues à partir d'une dilution décimale de plasmide avec le couple d'amorces m1-2F/m2-1R. Cas du plasmide pYI025-5.

L'efficacité de ces réactions n'atteint que 68%, alors que dans la littérature, les efficacités d'amplification sur d'autres gènes atteignent en général plus de 80%. L'étape d'élongation peut être un facteur limitant de la réaction de PCR. En effet, plus le fragment est long, plus le risque d'erreur et d'arrêt de la polymérisation est élevé et donc les mesures de fluorescence biaisées. Une taille de 550 pb pour un fragment amplifié en PCR en temps réel peut donc être contraignante. Nous avons testé cette technique sur un fragment *aoxB* plus court amplifié avec l'amorce anti-sens m2-1R couplée à l'une ou l'autre des amorces sens (m4-1F ou m4-2F) dessinées à partir du motif FDHGGXGGGC en amont du motif m2 (c.f. alignement présenté Figure 39). Des amplifications spécifiques de 110 pb environ sont obtenues pour chacune des souches pures. Les meilleurs résultats en termes d'intensité/spécificité sont obtenus avec l'amorce m4-1F, une concentration d'amorces de 0.5 μM et une température d'hybridation égale à 57.5°C. Cependant, malgré une bonne efficacité (85,8%) avec le couple m4-1F/m2-1R, des dimères d'amorces apparaissent à partir de 10^3 copies de plasmide pYI025-5 (Figure 37), et le nombre de copies mesuré est sous-estimé pour les souches *H. arsenicoxydans* et *T. arsenivorans* (environ 10 fois plus faible).

L'ensemble de ces résultats nous a amené à choisir le couple d'amorce m1-2F/m2-1R générant un fragment de 550 pb pour les expériences suivantes de PCR en réel.

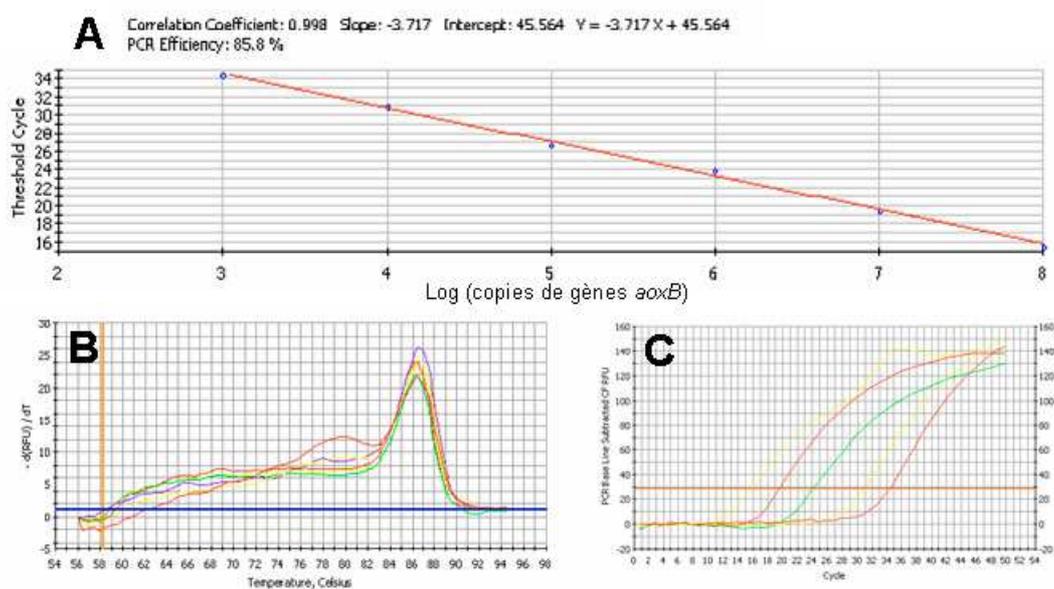


Figure 37 : Courbe de calibration (A) et courbes de fusion (B) obtenues à partir d'une dilution décimale du plasmide pYI025-5 amplifié à l'aide du couple d'amorces m4-1F/m2-1R.

III.6. Conclusion

Au cours de cette étude, différents outils moléculaires dépendant de la PCR et ciblant les gènes *aoxB* ont été développés et validés pour analyser qualitativement et quantitativement les communautés AsIII-oxydantes dans l'environnement.

Des amorces hybrides et consensus ciblant les gènes *aoxB* ont été dessinées et ont permis d'amplifier spécifiquement des fragments *aoxB* de 550 et 1100 pb environ à partir de 24 souches AsIII-oxydantes et phylogénétiquement diverses, ainsi qu'à partir d'eaux et de sols contaminés par de l'As. Aucune amplification n'a été obtenue à partir de souches n'oxydant pas l'AsIII. Ces amorces sont donc capables de détecter spécifiquement divers taxa du groupe bactérien aérobie AsIII-oxydant et le gène *aoxB* est donc marqueur fonctionnel de choix de ce groupe métabolique. Ainsi, l'utilisation de cette approche PCR permettra de détecter un potentiel d'oxydation de l'AsIII dans l'environnement.

L'application de la PCR-DGGE aux gènes *aoxB* permet de bien les différencier. A l'exception des profils de *Leptothrix* sp. S1.1 et de *T. arsenivorans*, les profils DGGE des souches AsIII-oxydantes sont composés d'une seule bande. La PCR-DGGE est donc une méthode d'empreinte moléculaire prometteuse pour suivre l'évolution de la structure des communautés AsIII-oxydantes dans l'environnement.

La PCR en temps réel développée sur les gènes *aoxB* est une méthode sensible et reproductible pour quantifier les gènes *aoxB*. Elle sera donc un outil de choix pour comparer l'abondance des communautés AsIII-oxydantes dans différents écosystèmes pollués par l'As.

L'ensemble de ces nouvelles méthodes a donc été appliqué à des environnements contrastés en terme de nature (sols et eaux) et de teneurs et spéciation en As. Ces travaux sont décrits dans les chapitres suivants.

IV. Analyse et évolution des gènes *aoxB*

IV.1. Contexte

A ce jour, plus de 50 séquences du gène *aoxB* sont connues chez diverses souches des domaines *Bacteria* et *Archaea*. Notre travail a fortement contribué à enrichir les banques de séquences *aoxB* issues de diverses souches capables d'oxyder l'AsIII. De plus, le séquençage de génomes a également permis de mettre en évidence des gènes *aoxA* et *aoxB* chez des souches où, pour la plupart, la faculté à oxyder l'AsIII n'a pas été testée ; en effet, parmi elles, seules *H. arsenicoxydans* et *C. auranticus* sont connues pour oxyder l'AsIII.

Dans ce chapitre, nous évaluons l'information phylogénétique portée par les différentes séquences nucléiques *aoxB* et protéiques AoxB de souches AsIII-oxydantes phylogénétiquement diverses, afin d'apprécier la pertinence de l'utilisation du gène *aoxB* comme marqueur phylogénétique des bactéries AsIII-oxydantes. La conservation de domaines fonctionnels et structuraux au sein des séquences protéiques a également été recherchée.

IV.2. Analyse des séquences *aoxB* et AoxB

Le maximum d'information génétique disponible à partir des souches AsIII-oxydantes a été utilisé, afin de réaliser une étude significative des variations rencontrées le long du gène *aoxB*. La région encadrée par les amorces m1-2F/m3-2R a donc été sélectionnée. Se basant sur plus de 1000 nucléotides, nous avons donc dans un premier temps exclu les séquences plus courtes (~ 500 pb) disponibles (Inskip *et al.*, 2007 ; Fan *et al.*, 2008 ; les séquences issues des études DGGE). Les séquences de données de génome complet ont également été exclues car aucune évidence expérimentale n'a prouvé leur capacité à oxyder l'AsIII.

Ces analyses comparatives ont été conduites sur 30 séquences nucléotidiques *aoxB* et protéiques AoxB appartenant à des souches AsIII-oxydantes phylogénétiquement diverses. Le degré de conservation de ces séquences a été évalué à l'aide de matrices d'identités calculées à partir des séquences nucléotidiques ou d'acides aminés déduites des séquences nucléotidiques (Tableau 27).

Souches bactériennes	% d'identité* :																																
	<i>Betaproteobacteria</i>																<i>Gammaproteobacteria</i>							<i>Alphaproteobacteria</i>					Autres phyla				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	
<i>Betaproteobacteria</i>																																	
1. <i>Acidovorax</i> sp. 75		68,5	66,2	66,8	69,4	69,1	79,7	79,7	66,2	66,5	66,0	65,1	66,5	67,7	66,5	81,4	68,8	67,4	62,8	68,2	62,0	62,5	61,7	50,0	51,1	51,7	50,5	51,7	51,1	51,1	46,0	39,4	
2. <i>Alcaligenes faecalis</i>	68,2		80,2	80,5	75,7	73,1	69,7	69,1	80,0	68,0	68,2	66,2	68,5	68,0	68,5	70,2	71,7	71,1	66,5	71,1	64,5	68,5	64,0	47,7	48,0	49,4	48,5	48,5	48,8	48,0	48,2	43,1	
3. <i>Alcaligenes</i> sp. T12RB	67,8	72,7		96,8	74,8	70,2	69,4	66,5	93,7	65,1	66,0	65,1	66,8	67,4	66,8	68,8	72,8	71,1	64,5	71,7	64,2	66,0	63,7	48,2	49,1	50,0	48,8	49,7	49,1	49,4	47,1	40,8	
4. <i>Alcaligenes</i> sp. Y113H	67,9	72,8	92,3		75,1	71,4	69,4	67,4	94,5	65,1	66,0	65,1	66,8	67,1	66,8	69,4	72,2	70,8	64,0	71,1	64,2	65,4	63,7	48,2	48,5	49,4	48,5	49,4	48,8	49,1	46,5	40,5	
5. <i>Burkholderia</i> sp. Y1019A	68,3	69,5	69,6	69,8		73,4	70,2	69,1	75,1	66,0	65,7	65,4	66,8	66,0	66,5	72,5	73,7	72,0	65,1	72,5	64,2	66,0	63,7	50,0	48,8	49,4	49,1	50,0	51,4	49,7	46,8	41,7	
6. <i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	66,2	65,8	66,1	66,6	66,1		67,4	67,1	70,8	70,8	71,1	69,4	71,7	70,8	72,2	71,1	69,4	67,4	63,1	69,7	64,2	64,8	63,7	48,2	46,2	47,7	46,5	46,8	48,2	46,2	46,5	41,1	
7. <i>Leptothrix</i> sp. S1.1	77,9	68,6	71,0	70,7	70,1	65,7		82,0	68,5	66,5	66,0	66,8	66,5	68,5	66,5	87,4	73,1	70,2	63,4	72,0	60,8	64,0	60,2	50,2	50,5	50,2	49,4	50,8	51,1	50,5	48,0	38,0	
8. <i>Limobacter</i> sp. 83	75,3	68,1	66,4	66,6	68,0	63,7	78,0		66,2	66,0	64,5	64,5	65,7	67,7	65,7	78,8	70,0	68,2	64,5	69,4	60,5	64,8	60,2	48,8	49,7	51,4	51,1	51,7	50,5	51,4	47,7	40,0	
9. <i>Ralstonia</i> sp. 22	66,7	72,0	84,0	83,9	69,5	65,9	70,0	65,6		65,7	66,5	65,7	67,4	67,7	67,4	68,5	72,2	70,0	63,4	71,4	63,1	64,8	62,5	48,0	48,0	48,5	46,8	49,1	48,2	48,8	46,5	39,7	
10. <i>Thiomonas arsenivorans</i>	68,3	66,6	69,1	67,9	66,8	66,7	72,3	68,5	67,0		86,5	92,2	87,1	88,8	87,1	66,5	66,0	65,7	61,7	66,5	61,4	61,4	61,1	50,0	49,7	48,8	48,5	49,4	50,5	48,5	48,8	42,2	
11. <i>Thiomonas cuprina</i>	68,0	66,9	68,1	67,8	67,0	66,1	70,7	67,5	66,5	83,2		86,2	97,1	84,0	97,4	65,7	67,1	66,8	62,2	67,7	61,1	60,8	60,8	48,8	48,0	48,2	48,8	48,5	49,7	48,0	47,7	41,4	
12. <i>Thiomonas delicata</i>	68,5	66,4	69,5	68,3	66,6	66,4	71,3	67,3	67,9	89,6	83,3		86,8	89,1	87,4	66,2	65,4	64,2	59,7	66,0	59,7	60,0	59,4	50,0	49,4	48,2	48,5	49,1	50,2	48,2	48,2	40,5	
13. <i>Thiomonas</i> sp. N115	67,5	66,6	68,0	67,1	66,7	66,0	69,7	68,1	66,8	82,3	94,0	83,0		84,2	97,7	66,2	68,2	68,0	62,2	68,2	61,7	61,1	61,4	49,1	48,0	48,2	49,4	49,1	50,0	48,5	47,7	41,1	
14. <i>Thiomonas</i> sp. WJ68	67,5	66,7	68,5	67,7	65,7	68,3	70,8	68,5	66,8	83,1	78,9	83,1	78,3		85,1	67,7	67,1	65,4	62,0	68,2	62,0	61,7	61,7	50,5	50,0	50,5	48,8	51,1	51,4	50,2	49,4	41,7	
15. <i>Thiomonas</i> sp. 3As	67,9	66,5	68,0	67,9	66,8	66,5	70,6	69,4	67,1	82,9	92,3	83,4	94,2	79,7		66,0	68,5	68,0	62,2	69,1	62,0	60,8	61,7	50,2	48,2	48,5	49,7	48,8	51,1	48,2	48,0	41,4	
16. <i>Variovorax</i> sp. 4-2	76,2	69,5	70,5	69,7	68,9	65,6	84,1	75,3	69,9	71,8	69,3	70,5	68,0	70,2	68,1		74,8	71,1	63,1	73,1	61,4	63,7	60,8	49,4	51,4	51,1	49,7	50,8	50,2	50,5	46,2	38,2	
<i>Gammaproteobacteria</i>																																	
17. <i>Acinetobacter</i> sp. 33	68,1	69,1	68,1	68,4	68,	65,2	70,4	68,9	67,6	67,3	68,1	68,3	68,2	66,9	68,2	71,0			91,4	66,2	95,1	64,2	65,4	63,7	48,5	48,8	49,7	49,1	48,8	48,8	48,2	49,4	42,2
18. <i>Pseudomonas</i> sp. D2OHCJ	68,2	68,1	67,4	67,1	69,2	65,2	69,7	68,1	66,9	67,5	66,9	67,3	67,0	66,6	67,4	70,7	85,5		65,7	90,5	64,8	64,8	64,2	48,8	48,2	49,1	48,5	48,5	48,2	48,0	48,5	43,1	
19. <i>Pseudomonas</i> sp. 1	63,9	62,5	63,6	63,7	62,0	61,2	62,7	63,6	61,9	61,4	61,7	59,6	60,7	61,6	61,2	63,8	65,4	64,0		66,2	73,4	91,4	72,8	49,1	49,7	48,0	47,1	48,5	50,0	48,0	46,5	40,2	
20. <i>Pseudomonas</i> sp. 46	68,9	68,4	67,8	68,3	69,2	65,2	70,6	67,9	68,0	67,2	68,9	68,1	68,1	66,9	68,3	70,1	91,7	85,3	64,2		64,5	65,1	64,0	49,7	48,8	49,1	48,8	48,5	49,4	48,0	50,5	42,8	
21. <i>Pseudomonas</i> sp. 72	64,0	62,1	62,5	63,5	62,7	61,8	62,3	62,4	62,2	62,0	64,2	61,8	63,9	62,3	63,6	62,3	63,4	64,3	70,1	64,9		74,2	99,4	48,2	46,8	47,7	47,4	47,4	48,2	47,1	47,4	42,2	
22. <i>Pseudomonas</i> sp. 73	61,4	63,0	62,3	62,1	62,1	62,6	61,9	62,5	62,3	59,5	60,3	59,9	59,9	59,8	59,6	62,3	62,7	62,8	80,3	62,5	69,4		73,7	48,5	49,4	48,0	48,0	47,7	48,8	47,1	46,0	40,0	
23. <i>Pseudomonas</i> sp. 89	63,6	61,7	62,3	63,4	62,6	61,1	62,2	62,2	62,1	62,1	64,1	61,7	63,8	62,3	63,5	62,3	63,0	64,0	69,8	64,9	99,2	69,3		48,2	46,8	47,7	47,4	47,4	48,2	47,1	47,4	42,2	
<i>Alphaproteobacteria</i>																																	
24. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	59,5	56,5	57,4	57,3	59,5	55,7	61,1	57,8	56,0	60,8	59,4	61,4	58,7	59,4	58,6	59,3	56,2	55,8	56,3	56,8	55,0	55,0	55,2		80,8	75,4	74,2	75,7	94,2	75,7	46,2	42,0	
25. <i>Aminobacter</i> sp. 86	60,2	57,6	60,1	59,6	59,4	53,1	63,3	59,7	58,2	60,8	59,7	61,3	58,4	60,1	59,3	62,3	56,2	57,2	57,8	56,5	55,5	57,2	55,5	77,0		74,8	73,4	75,1	80,8	74,8	46,2	39,4	
26. <i>Ancylobacter</i> sp. OL1	60,1	57,4	56,9	57,7	58,2	54,8	62,8	60,4	57,6	60,3	58,0	60,0	57,8	58,6	57,9	59,4	55,0	56,9	54,5	55,0	55,0	54,3	55,4	74,5	75,3		74,8	94,5	75,1	94,2	46,8	41,7	
27. <i>Bosea</i> sp. WAO	58,8	55,7	57,4	57,7	56,8	53,9	60,8	59,0	56,7	58,9	58,2	59,6	57,9	57,5	58,5	59,0	56,0	55,9	54,6	56,1	55,4	55,0	55,9	72,8	74,4	74,2		73,4	74,5	73,7	47,1	40,0	
28. <i>Hydrogenophaga</i> sp. CL3	59,6	56,3	57,6	57,8	58,6	53,8	63,2	59,4	57,2	60,8	58,2	60,8	56,7	58,3	57,8	60,9	55,4	56,5	55,1	55,1	56,0	54,0	56,3	74,4	76,2	87,2	74,5		75,7	99,1	46,2	42,2	
29. <i>Rhizobium</i> sp. NT-26	57,9	56,5	57,6	55,9	59,2	53,5	61,4	59,2	56,2	61,3	58,0	61,3	58,2	61,0	58,6	59,7	55,5	55,9	55,8	56,2	54,6	54,6	55,0	86,4	77,5	73,8	72,3	74,2		75,7	46,5	42,2	
30. <i>Thiobacillus</i> sp. S1	59,1	55,8	57,0	57,0	58,4	54,2	62,7	58,8	56,6	60,3	58,4	60,2	57,7	58,5	58,0	60,5	55,3	56,3	56,4	55,0	56,1	53,9	56,5	74,6	75,9	88,0	74,5	95,7	74,0		46,2	41,7	
Autres phyla																																	
31. <i>Chloroflexus aurantiacus</i>	53,2	53,7	53,9	54,3	52,6	52,3	56,8	54,0	52,4	55,6	55,0	56,2	55,2	56,7	55,3	54,0	53,7	53,3	51,8	54,3	52,1	50,2	52,1	53,9	55,6	54,0	55,0	54,2	53,7	55,0		49,4	
32. <i>Thermus thermophilus</i>	55,0	54,4	53,3	53,5	53,9	48,8	56,3	54,0	52,3	57,9	56,5	56,3	55,0	54,5	56,1	54,4	53,5	54,1	49,7	54,0	50,6	49,4	50,7	53,5	56,0	54,5	54,5	56,7	54,9	55,7	55,6		

* Valeurs calculées à partir des séquences nucléiques (à gauche de la diagonale principale) et des séquences protéiques traduites à partir des premières (à droite de la diagonale principale)

Tableau 27 : Matrice d'identité des séquences *aoxB* et AoxB partielles (comprises entre les motifs m1 et m3) de souches bactériennes AsIII-oxydantes

Les niveaux de conservation sont variables et compris entre 48,8% et 95,7% pour les séquences nucléotidiques et entre 38,0 et 99,1% pour les séquences protéiques. Ces données sont comparables à celles obtenues pour d'autres gènes fonctionnels, notamment ceux impliqués dans l'oxydation du soufre, la réduction de l'oxyde nitreux et la réduction du sulfite (Petri *et al.*, 2001, Scala *et al.*, 1999, Wagner *et al.*, 1998).

L'examen de l'alignement des 30 séquences nucléotidiques révèle une forte proportion de sites variables (82%), parmi lesquels 74% sont informatifs (position pour laquelle on trouve au moins 2 nucléotides différents et que l'on retrouve chacun dans au moins deux séquences). La deuxième position des codons est clairement la mieux conservée. La troisième position est la plus variable (99% de variabilité), et les analyses de saturation montrent qu'une saturation est effective à cette position (Figure 38). Le nombre de sites substitués est plus élevé entre des souches phylogénétiquement distantes qu'entre des souches apparentées au niveau de l'ARNr 16S. Les substitutions causant des substitutions d'acides aminés sont plus fréquentes que des substitutions synonymes, lesquelles comptent pour seulement 23,7% des substitutions totales.

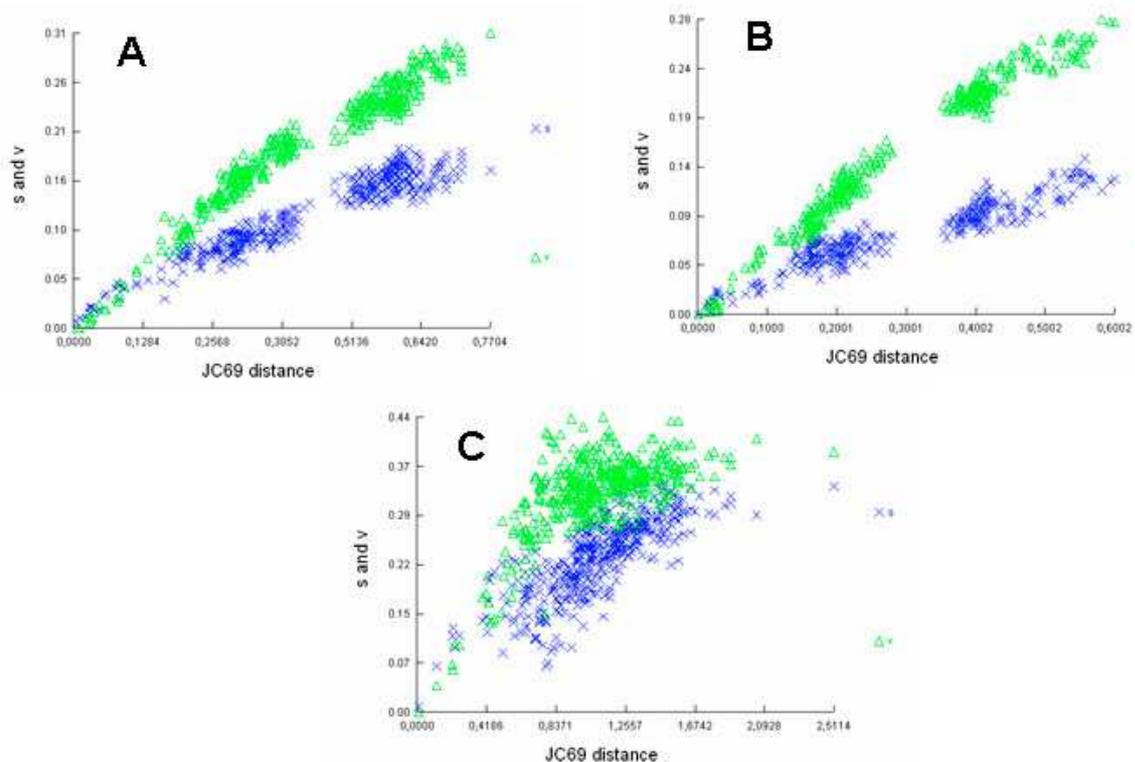


Figure 38 : Evolution du nombre de transitions (\times et s) et de transversions (Δ et v) au sein des séquences *aoxB* en fonction de la distance génétique calculée selon Jukes et Cantor (1969). Les positions 1 (A), 2 (B) et 3 (C) des codons ont été analysées successivement. Les transitions sont les changements de nucléotides suivants $T \leftrightarrow C$ et $A \leftrightarrow G$, et les transversions sont les changements de nucléotides suivants : $T \leftrightarrow A$, $T \leftrightarrow G$, $C \leftrightarrow A$, or $C \leftrightarrow G$.

Les 15 séquences protéiques AoxB alignées et présentées Figure 39 montrent 22% d'identité entre elles sur 372 acides aminés. Trois des quatre domaines de la sous-unité catalytique AoxB décrit chez *Alcaligenes faecalis* (Ellis *et al.*, 2001) sont retrouvés dans la région alignée. Le quatrième domaine s'étend en dehors de la région présentée ici. Le domaine I s'étend du résidu 21 au résidu 119 (dans la séquence protéique de *A. faecalis*); il fixe la petite sous-unité Rieske et le groupement [3Fe-4S] coordonné par le motif C₂₁-X₂-C₂₄-X₃-C₂₈-X₇₀-S₉₉. A l'exception des acides aminés présents dans la région X₇₀, ce domaine est bien conservé, en particulier entre les résidus 21 et 31 et entre les résidus 86 et 103. Une seconde région fortement conservée située entre les résidus 166-261 s'étend sur les domaines II (résidus 120 à 195) and III (résidus 196 à 394) et contient plusieurs motifs structuraux, comme des hélices alpha, ainsi que deux résidus très conservés, H195 et E203, impliqués dans le site de fixation de l'AsIII de l'enzyme. Le motif HNRPAYNSE, compris entre ces deux derniers résidus d'acides aminés, est également parfaitement conservé chez les souches du domaine *Bacteria*.

Toutes les séquences contiennent les résidus conservés prédits par Ellis *et al.* (2001) comme étant essentiels pour l'activité de l'AsIII-oxydase d'*A. faecalis*, en particulier, les résidus de sérine (S99), d'histidine (H195), d'alanine (A196) et de glutamine (Q203). Les résidus de sérine et d'alanine sont importants dans la démarcation de la sous unité catalytique de l'AsIII-oxydase des autres enzymes à molybdène de la famille des DMSO réductases. Le résidu d'alanine conduit à l'absence de liaison covalente entre la protéine et l'atome Mo, un trait significatif des AsIII-oxydases, et le résidu sérine est localisé à la position terminale et stratégique du motif de fixation du groupement [3Fe-4S] CysX₂CysX₃CysX₇₀Ser (la première partie de ce motif étant le site de fixation de l'amorce m1-2F). Pour information, ce résidu remplace un résidu cystéine des autres enzymes à molybdène de la famille des DMSO réductase.

Une conservation plus faible des acides aminés est observée sur les autres parties de la protéine, bien que la présence de multiples substitutions conservatrices suggère que les propriétés physico-chimiques de ces acides aminés jouent un rôle dans la structure ou le fonctionnement de l'AsIII-oxydase. Finalement, les régions qui ne contiennent pas d'éléments structuraux sont faiblement conservées. Par exemple, la séquence de *C. aurantiacus* présente six acides aminés additionnels entre les résidus 329 et 330. De plus, les séquences des trois *α-Proteobacteria*, *A. tumefaciens*, *Rhizobium* sp. NT-26 et *Aminobacter* sp. 86, possèdent 24 acides aminés additionnels dans cette région. Des analyses supplémentaires ont été effectuées

en ajoutant les séquences d'*Archaea*. En admettant que les séquences d'*Archaea* sont les plus anciennes, de nombreuses délétions ont eues lieu dans les séquences des *Bacteria* plus courtes (de 50 à 100 résidus environ) que celles des *Archaea*.

Généralement, les valeurs d'identités des séquences nucléotidiques *aoxB* ou protéiques AoxB sont significativement plus élevées pour les souches phylogénétiquement proches au niveau de l'ARNr 16S (Tableau 27). Les séquences protéiques AoxB d'espèces d'un même genre sont généralement plus conservées que les séquences nucléotidiques. Par exemple, les espèces du genre *Alcaligenes* montrent des identités de séquences de 80,2 à 96,8% au niveau protéique, mais seulement de 72,7 à 92,3% au niveau nucléotidique. De la même manière, des valeurs d'identités élevées comprises entre 78,3% et 94,2% au niveau nucléotidique et entre 84,0% et 97,7% au niveau protéique sont obtenues entre les espèces du genre *Thiomonas*. Des valeurs d'identités élevées sont également observées entre des séquences AoxB d'espèces appartenant à une même classe du phylum des *Proteobacteria* (α -, β -, ou γ -*Proteobacteria*), *e.g.* entre 73,4% et 94,2% pour les *Alphaproteobacteria*, et même entre des séquences d'espèces appartenant aux β - et γ -*Proteobacteria*. Par contre, au sein des espèces éloignées au niveau de l'ARNr 16S, les séquences nucléotidiques sont mieux conservées que les séquences protéiques. En effet, les plus fortes divergences sont observées entre les séquences protéiques AoxB des lignées bactériennes plus éloignées, *i.e.* *Proteobacteria* vs. *Thermus* et *Chloroflexus* (entre 38% et 50,5% d'identité), et α -*Proteobacteria* (exceptée *Hydrogenophaga* sp. CL3 – c.f. paragraphe suivant) vs. β -/ γ -*Proteobacteria* (entre 46,2 et 51,7% d'identité).

Des observations similaires ont été rapportées pour d'autres gènes fonctionnels, *e.g.* ceux impliqués dans la dénitrification et l'oxydation du soufre (Braker *et al.*, 2000, Petri *et al.*, 2001). Dans le cas des gènes *aoxB*, ces observations peuvent être expliquées par la saturation de la troisième position des codons pour la comparaison de souches distantes. Les divergences observées suggèrent que le gène *aoxB* ait eu une longue histoire évolutive et supportent l'hypothèse d'un ancêtre commun éloigné (Lebrun *et al.*, 2003).

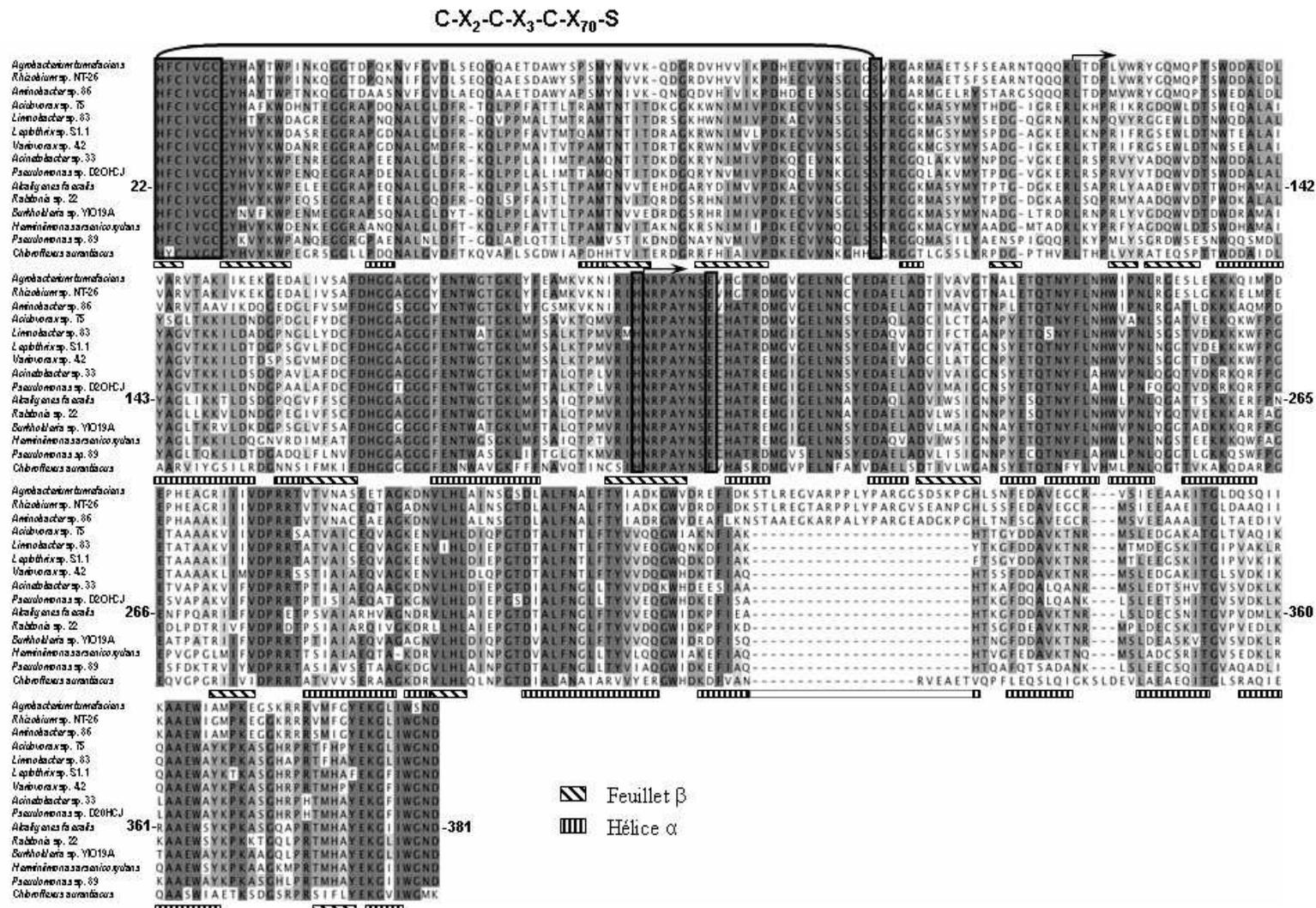


Figure 39 : Alignement de 15 séquences protéiques AoxB et structure secondaire putative des AsIII-oxydases.

IV.3. Phylogénie des séquences *aoxB* et AoxB de souches connues

Quelle que soit la méthode utilisée, distances ou parcimonie, la topologie des arbres est très proche malgré de légères modifications, indiquant que les relations entre les séquences *aoxB* ou AoxB des bactéries AsIII-oxydantes du domaine *Bacteria* sont particulièrement fiables. En conséquence, seuls les arbres construits à l'aide de la méthode des distances Neighbor-Joining sont présentés dans le reste de l'étude.

Une comparaison des arbres construits à partir des séquences nucléotidiques et protéiques est présentée Figure 40. Les topologies de ces deux arbres présentent de nombreuses similitudes. Notamment, la séquence de *Chloroflexus aurantiacus* est clairement séparée des séquences de *Proteobacteria* (avec une valeur de bootstrap de 100%, dans les deux cas), les séquences d' α -*Proteobacteria* sont séparées des séquences de γ -/ β -*Proteobacteria* (avec une valeur de bootstrap de 97% ou 100%) et de nombreuses branches à l'intérieur de ces groupes sont communes aux deux arbres. Les séquences de souches d'un même genre (*e.g. Alcaligenes*, *Pseudomonas* et *Thiomonas*) forment des groupes définis dans les deux arbres. Rhine *et al.* (2007) ont rapporté que les gènes *aoxB* des souches chimioautotrophes forment un groupe distinct de ceux des souches chimiohétérotrophes, à l'exception d'*Agrobacterium tumefaciens*, et suggèrent que ces deux groupes aient évolué séparément à partir d'un ancêtre commun. Cependant, notre étude contredit cette observation car les gènes *aoxB* de la souche chimioautotrophe *Thiomonas arsenivorans* sont affiliés à ceux de souches chimiohétérotrophes et non à ceux de souches chimioautotrophes des α -*Proteobacteria*. Plus de données sur les gènes *aoxB* de souches pures oxydant l'AsIII en condition chimioautotrophe et chimiohétérotrophe sont nécessaires pour élucider l'évolution de ce gène.

Des différences sont également mises en évidence, notamment au niveau des embranchements d'*H. arsenicoxydans*, des γ -*Proteobacteria* (*Acinetobacter* et *Pseudomonas* spp.) et des souches du genre *Thiomonas*. En effet, les souches du genre *Thiomonas* forment une branche séparée des autres β -*Proteobacteria* sur l'arbre *aoxB*, alors qu'elles sont sur la même branche qu'*H. arsenicoxydans* dans l'arbre AoxB. Les séquences nucléotidiques *aoxB* de γ -*Proteobacteria* se retrouvent affiliées à celles de souches du genre *Alcaligenes*, alors que les séquences protéiques sont plus clairement séparées des β -*Proteobacteria* dans l'arbre AoxB.

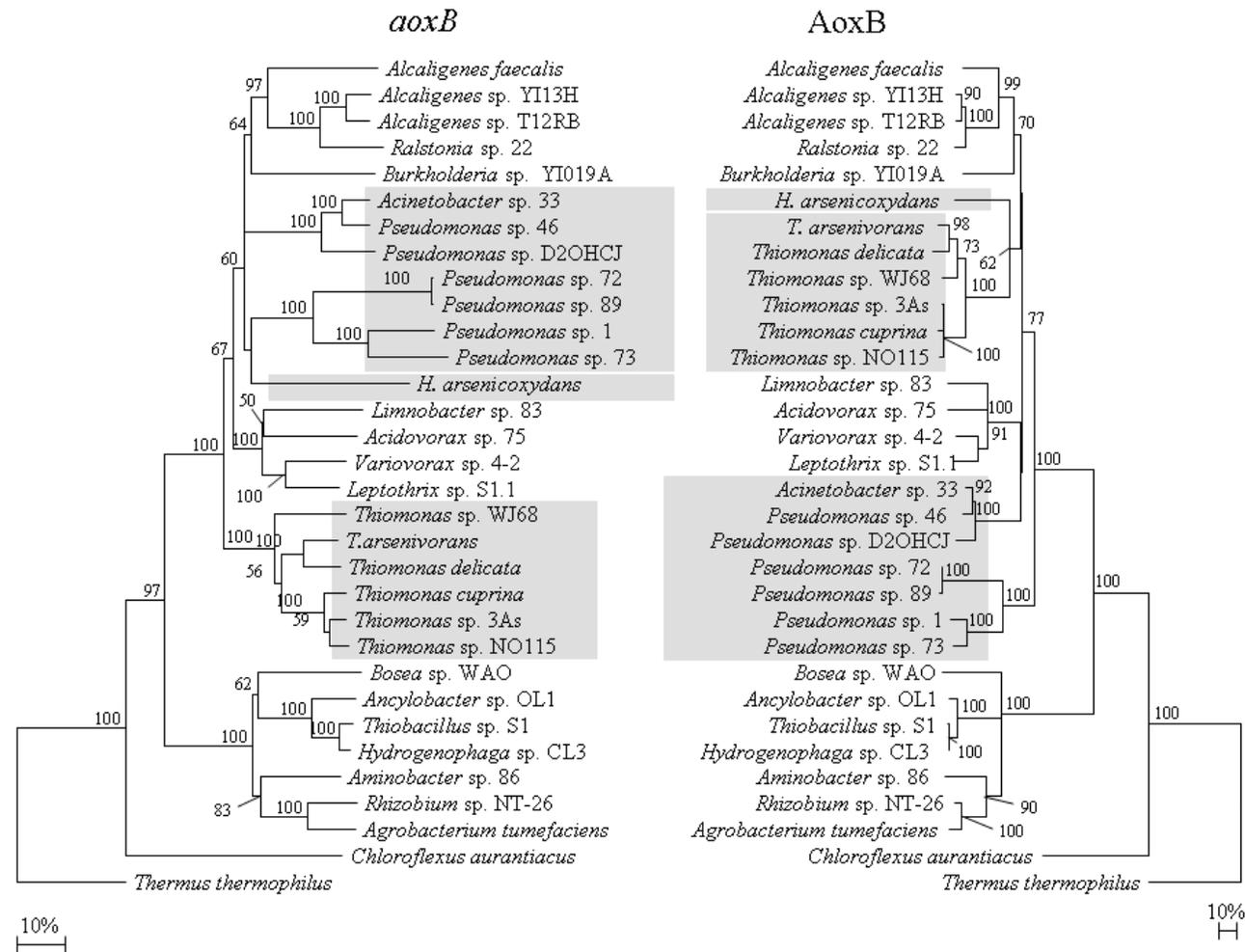


Figure 40 : Comparaison des arbres phylogénétiques Neighbor-Joining construits à partir de 32 séquences partielles nucléotidiques *aoxB* (1069 nucléotides) ou protéiques *AoxB* (350 acides aminés) de bactéries AsIII-oxydantes. Les valeurs de bootstrap supérieures à 50% (sur un total de 100 répliqués) sont indiquées.

Les séquences protéiques sont généralement utilisées pour reconstruire la phylogénie de gènes codant des protéines (Scala *et al.*, 1999 ; Case *et al.*, 2007). Elles permettent de distinguer des espèces plus divergentes et d'éliminer les « bruits » créés par de multiples substitutions, lesquelles sont à l'origine d'artefact de reconstruction (Yamamoto and Harayama, 1996). L'utilisation de séquences nucléiques est plus adéquat pour les analyses plus fines (au niveau espèces ou sous-espèces) (Rotthauwe *et al.*, 1997). Puisque les séquences protéiques apparaissent plus résolutive et moins biaisées que les séquences nucléotidiques pour des analyses de séquences moins conservées, les reconstructions phylogénétiques suivantes ont été réalisées sur des séquences protéiques AoxB.

Les phylogénies basées sur les séquences protéiques AoxB de 350 et de 163 résidus d'acides aminés (dédites à partir de ~1000 et ~500 pb, obtenues à l'aide des amorces m1-2F/m2-1R et m1-2F/m3-2R respectivement) ont été également comparées (Figure 41). Les topologies obtenues avec ces séquences de tailles différentes sont similaires. En effet, seulement deux branchements diffèrent : (i) la séquence AoxB de *Thiomonas* sp. WJ-68 est clairement séparée de celle des autres souches de *Thiomonas* dans l'arbre basée sur 163 résidus, alors qu'elle est affiliée à *T. arsenivorans* dans l'arbre basé sur 350 résidus, (ii) les séquences de γ -*Proteobacteria* (*Acinetobacter* et *Pseudomonas* spp.) sont clairement séparées de celles des γ -/ β -*Proteobacteria* dans l'arbre basé sur 163 résidus.

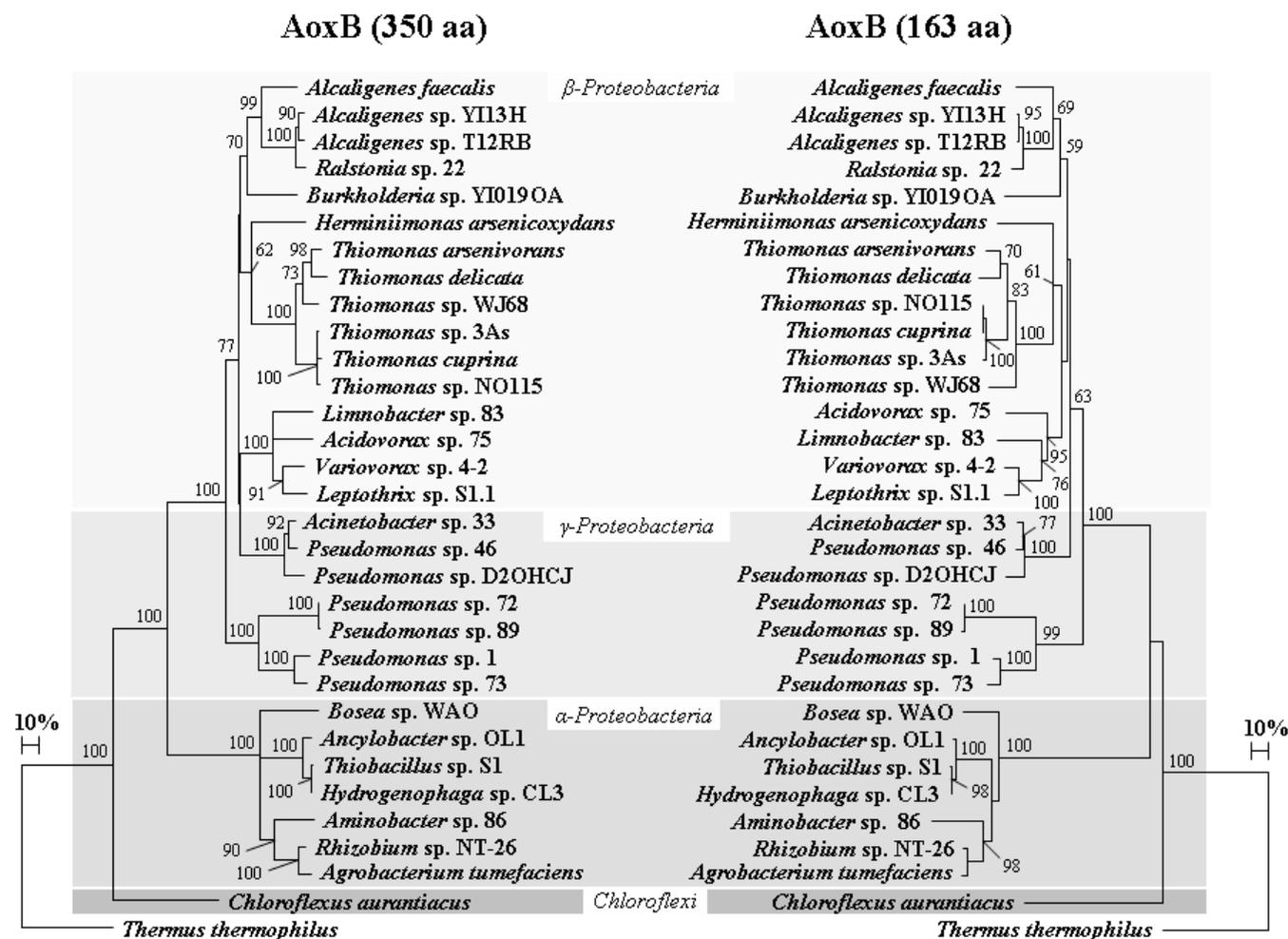


Figure 41 : Comparaison des arbres phylogénétiques Neighbor-Joining construits à partir de 32 séquences protéiques AoxB partielles (350 acides aminés) et des séquences protéiques AoxB partielles (163 acides aminés) des bactéries AsIII-oxydantes. Les valeurs de « bootstrap » supérieures à 50% (sur un total de 100 répliques) sont indiquées.

De nombreuses autres séquences *aoxB* plus courtes (~ 500 pb) sont disponibles dans les banques ou ont été obtenues lors des essais par DGGE (celles de *T. arsenivorans* et *Leptothrix* sp. S1.1), mais elles n'ont pas été prises en compte dans les analyses décrites ci-dessus. Pourtant, elles représentent une même région du gène *aoxB*, celle approximativement encadrée par le couple d'amorce m1-2F/m2-1R. Une analyse phylogénétique AoxB sur 163 résidus a donc été réalisée en prenant en compte toutes ces séquences (Figure 42). Les séquences de souches d'un même genre sont groupées ensemble. Par exemple, la séquence AoxB de *Variovorax* sp. 4-2 présente 94% d'identité avec celle de *Variovorax* sp. RM1. Celles des trois souches du genre *Achromobacter* présentent plus de 96% d'identité entre elles et celles des quatre souches du genre *Agrobacterium* présente entre 93 et 99% d'identité entre elles. Par contre, les deux séquences AoxB de *T. arsenivorans* présente 53,1% d'identité en entre elles. L'une est correctement positionnée au sein de celles du groupe *Thiomonas* spp., tandis que l'autre séquence AoxB obtenue à partir de la bande 2 du profil DGGE présente 91,7% avec celle de *Pseudomonas* sp. 72. Les deux séquences de *Leptothrix* sp. S1.1 présente également un faible pourcentage d'identité entre elles (40%). Et la seconde séquence obtenue à partir de la bande 1 du profil DGGE de *Leptothrix* sp. S1.1 présente 91,7% d'identité avec celle de *Bosea* sp. WAO. Ces résultats indiquent l'occurrence probable de transferts horizontaux de gènes *aoxB* (c.f. paragraphe suivant).

La souche AsIII-oxydante, *Ancylobacter* sp. OL1 (Rhine *et al.*, 2007), possède également deux gènes *aoxB*, mais ces derniers partagent un pourcentage d'identité élevé. La présence de plusieurs copies de gènes de fonction par cellule a également été montrée pour d'autres groupes bactériens fonctionnels, tels que ceux impliqués dans l'oxydation de l'ammonium *via* les gènes *amo* (Norton *et al.*, 1996, Klots *et al.*, 1997), l'oxydation des alcanes *via* les gènes *alk* (Whyte *et al.*, 2002), et en particulier dans la réduction de l'AsV *via* le gène *arsC* retrouvé en quatre exemplaire chez *H. arsenicoxydans* (Muller *et al.*, 2007). Ces résultats suggèrent donc la présence de plusieurs opérons dans les cellules de *T. arsenivorans* et *Leptothrix* S1.1, avec différents types de régulation.

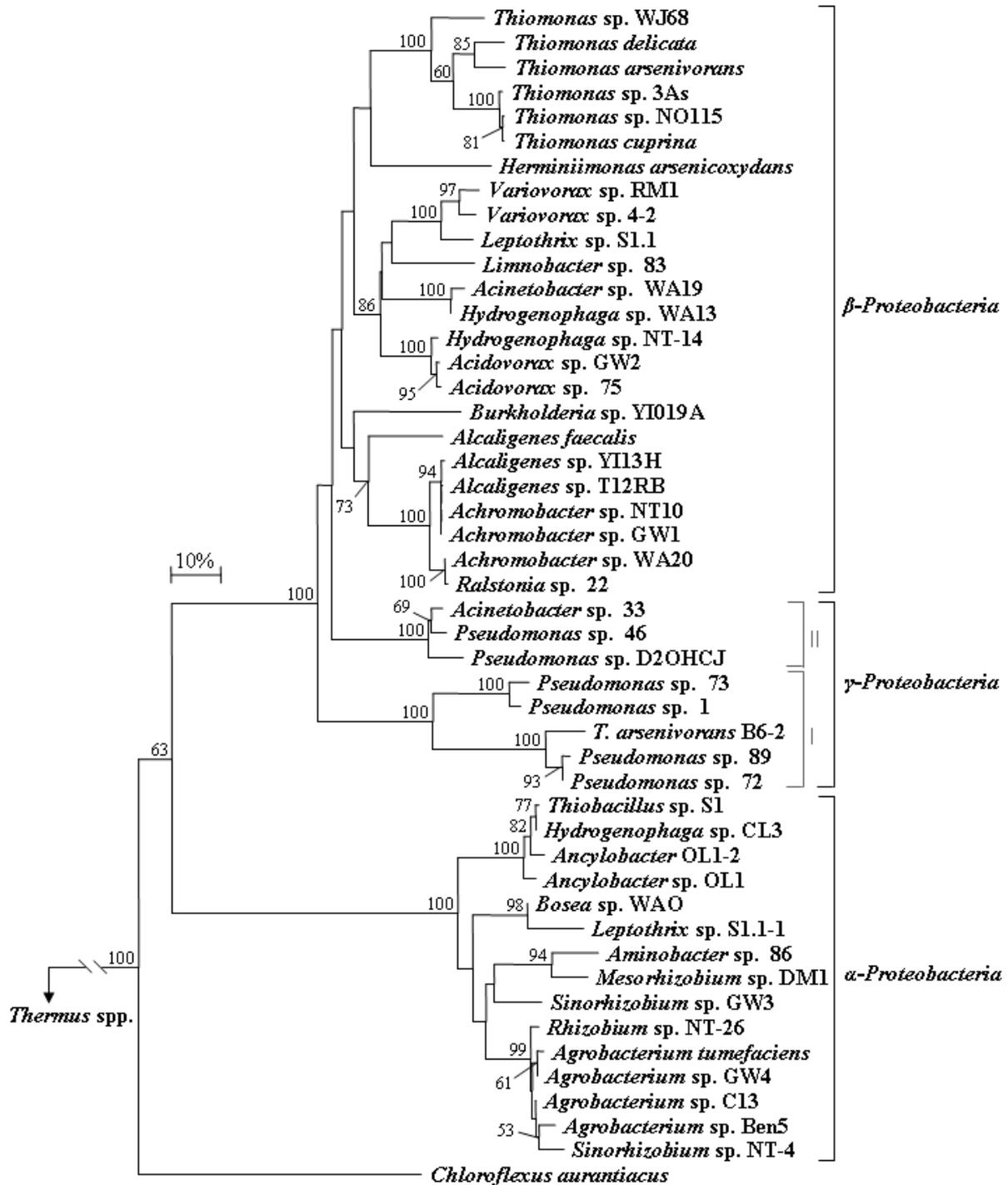


Figure 42 : Arbre phylogénétique Neighbor-Joining construit à partir de 50 séquences protéiques AoxB (145 acides aminés) de 47 bactéries AsIII-oxydantes. Les valeurs de « bootstrap » supérieures à 50% (sur un total de 100 répliquions) sont indiquées.

IV.4. Phylogénies des séquences AoxB et de l'ARNr 16S

Le gène codant l'ARNr 16S est considéré comme le gène de référence pour reconstruire la phylogénie du monde bactérien (Ludwig et Schleifer, 1994 ; Olsen *et al.*, 1994). La phylogénie basée sur les séquences protéiques AoxB a donc été comparée à celle basée sur les séquences d'ARNr 16S afin de déterminer sa justesse, sa résolution, ainsi que d'éventuels événements de transfert des gènes *aoxB*.

La topologie de l'arbre AoxB est similaire à celle basée sur l'ARNr 16S (Figure 43). En effet, la phylogénie AoxB sépare les niveaux taxonomiques majeurs définis par la phylogénie de l'ARNr 16S, *i.e.* phylum (*Chloroflexi* et *Proteobacteria*), classe (α -, β -, et γ -*Proteobacteria*) et genre. De nombreuses branches à l'intérieur de ces groupes sont communes aux deux arbres.

Cependant, une comparaison détaillée des deux arbres révèle quelques différences (Figure 43). Par exemple, les séquences AoxB des souches de l'ordre Pseudomonadales sont divisées en deux groupes : le groupe I forme une branche phylogénétique distincte, supportée par une valeur de bootstrap de 100%, tandis que le groupe II forme une branche séparée à l'intérieur des β -*Proteobacteria* (Figure 42). Les séquences AoxB des souches appartenant aux genres *Thiomonas* sont associées à celle d'*H. arsenicoxydans*, et celle de *Limnobacter* sp. 83 est affiliée à celle d'*Acidovorax* sp. 75.

La divergence la plus importante est le positionnement de la séquence AoxB de la β -Protéobactérie *Hydrogenophaga* sp. CL3 au sein de celles appartenant aux α -*Proteobacteria* (Figure 43), suggérant que des transferts latéraux aient probablement eu lieu. Cependant, deux souches appartenant au genre *Hydrogenophaga* sont correctement positionnées dans l'arbre construit avec des séquences plus courtes (Figure 42, Inskip *et al.*, 2007). Une collection de séquences *aoxB* plus importante permettra de montrer si les transferts de gènes sont des événements fréquents chez les souches du genre *Hydrogenophaga* et chez les bactéries AsIII-oxydantes en général. Les deux séquences AoxB de *T. arsenivorans* et de *Leptothrix* S1.1 présentent 53,1 et 40% d'identités entre elles, respectivement (Figure 42). Le gène *aoxB* est porté par un plasmide chez *Thermus thermophilus* HB8 et sur des ilots génomiques chez *A. faecalis* (Silver et Phung, 2005) et *H. arsenicoxydans* (Muller *et al.*, 2007), indiquant que des transferts latéraux peuvent avoir lieu. Ces événements ont été démontrés chez de nombreux autres gènes fonctionnels et en particulier pour *arsC*, un gène impliqué dans le cycle de l'As

et codant l'AsV-réductase cytoplasmique (Jackson et Dugas, 2003). En conséquence, les séquences AoxB doivent être utilisées avec précaution pour donner des informations phylogénétique concernant les séquences environnementales *aoxB*.

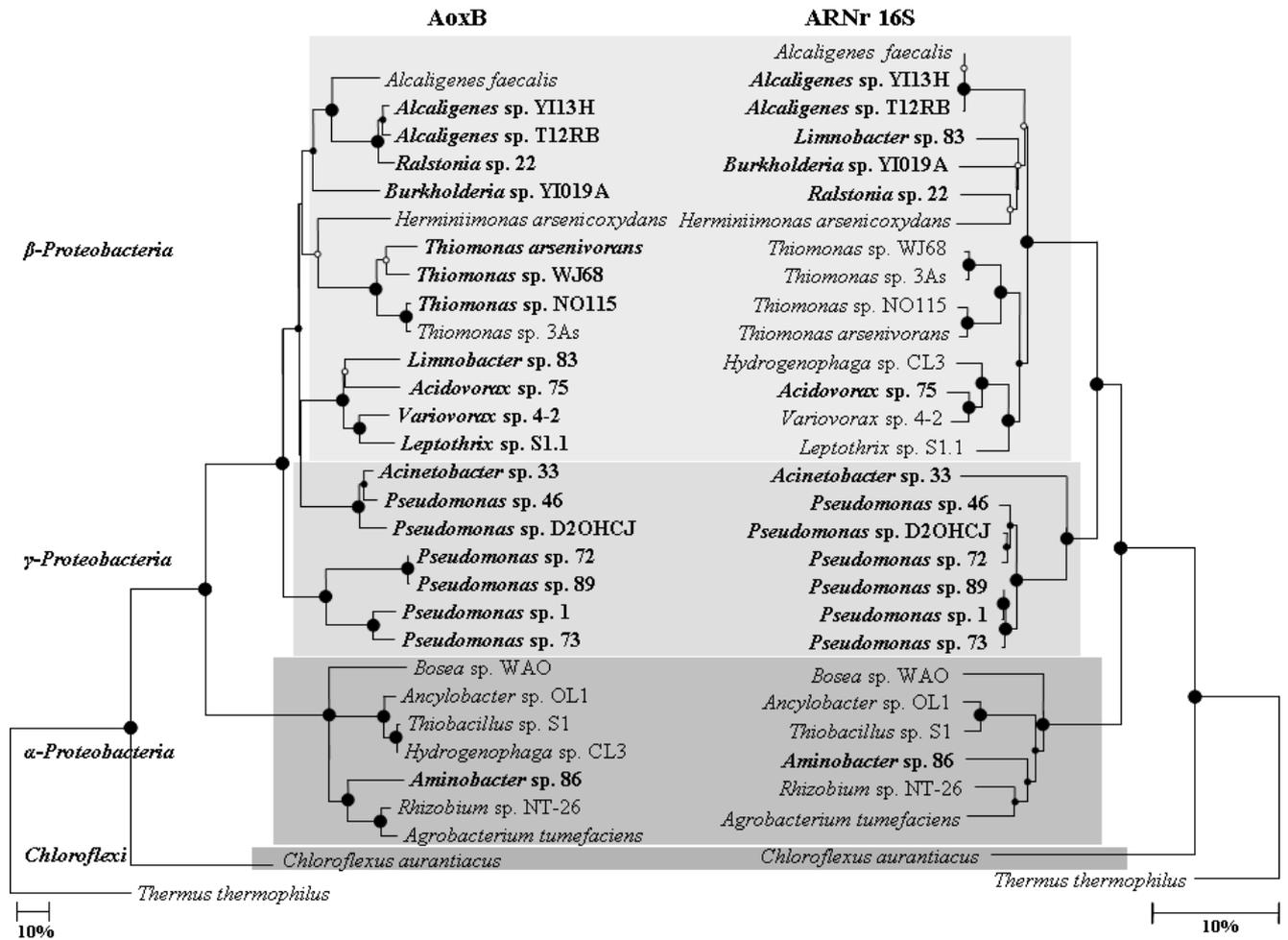


Figure 43 : Comparaison des arbres phylogénétiques Neighbor-Joining construits à partir de séquences protéiques AoxB partielles (351 résidus d'acides aminés) et de séquences des gènes codant l'ARNr 16S (1139 nucléotides) de bactéries AsIII-oxydantes. La séquence AoxB de *Thermus thermophilus* a été utilisée en racine. Les cercles aux nœuds de l'arbre sont les valeurs de bootstrap obtenues sur 100 répliques: grand cercle noir = 95-100%; petit cercle noir = 75-95% ; cercle blanc = 50-75%.

IV.5. Conclusion

Les séquences protéiques AoxB apparaissent plus résolutive et moins biaisées que les séquences nucléotidiques *aoxB* pour des analyses de séquences à grande échelle (niveau phylum). Les reconstructions phylogénétiques réalisées dans les études suivantes seront donc seulement basées sur des séquences protéiques AoxB. Les lignées phylogénétiques majeures sont bien discriminées par la phylogénie AoxB. La séquence AoxB de *Chloroflexus aurantiacus* est clairement séparée de celle des *Proteobacteria*. Les séquences AoxB d' α - et β -/ γ -*Proteobacteria* forment des branches distinctes et les séquences d'espèces étroitement apparentées au niveau de l'ARNr 16S sont groupées ensemble.

Dans l'ensemble, la phylogénie AoxB est comparable à celle de l'ARNr 16S. Cependant, des divergences importantes sont remarquées au niveau de trois souches. La séquence AoxB de la β -Protéobactérie *Hydrogenophaga* sp. CL3 est positionnée parmi celles des α -*Proteobacteria*. *Leptothrix* sp. S1.1 et *T. arsenivorans* possèdent deux gènes *aoxB* bien distincts. Une de leurs séquences AoxB est correctement positionnée chez les β -*Proteobacteria*, tandis que l'autre se retrouve parmi les γ -*Proteobacteria* (séquence AoxB-2 de *T. arsenivorans*) ou les α -*Proteobacteria* (séquence AoxB-1 de *Leptothrix* sp. S1.1). Ces divergences montrent que des événements de transferts latéraux de gènes *aoxB* ont probablement eu lieu. En conséquence, les séquences AoxB doivent être utilisées avec précaution pour donner des informations phylogénétiques à partir de séquences issues de l'environnement.

Des résidus cruciaux sont conservés dans toutes les séquences AoxB retrouvées dans cette étude, suggérant qu'elles produisent des enzymes fonctionnelles. De plus, la bonne conservation de plusieurs domaines fonctionnels et structuraux dans la région étudiée suggère qu'ils aient un rôle important dans l'activité de l'AsIII-oxydase.

L'acquisition de nouvelles séquences *aoxB* issues de souches AsIII-oxydantes et la variation génétique de la région étudiée nous a permis d'obtenir une phylogénie significative des séquences protéiques AoxB. Elle fournit une base essentielle à une meilleure interprétation de la diversité des gènes *aoxB* dans l'environnement.

V. La structure et la quantité des gènes *aoxB* sont-elles liées aux concentrations et spéciations d'arsenic ?

V.1. Contexte

La partie amont du bassin versant de l'Isle renferme le district minier de St Yrieix, caractérisé par une dizaine d'anciennes mines d'or. Dans cette zone, les eaux superficielles (ruisseaux, rivières) et les eaux souterraines sont fortement interconnectées. Les concentrations élevées en As dissous et particulaire (matières en suspension) mesurées dans la rivière sont essentiellement dues aux anciennes activités minières (dépôts As/Au, déchets) (Schäfer et Blanc, 2002 ; Bodéan *et al.*, 2004). Les sols de la région, développés sur les anomalies géochimiques, pourraient également constituer une part significative de l'As présent, la concentration moyenne de l'As dans les sols étant de 120 mg.kg⁻¹ (Chéry et Gateau, 1998). En effet, les sédiments retrouvés dans les lits des cours d'eau proviennent de l'érosion des sols et des déchets miniers.

Selon les saisons hydrogéologiques, les eaux du bassin montrent différents niveaux d'As dissous, les concentrations d'As minimales et maximales étant observées en hiver et en été, respectivement. En effet, les concentrations d'As dissous diminuent clairement avec l'augmentation hivernale du débit de l'eau (Masson *et al.*, 2007). Les apports d'As, principalement liés aux eaux d'exhaures de mines et souterraines, étant plus concentrés en été, car moins dilués. Cependant, Masson *et al.* (2007) ont observé des fortes concentrations durant un hiver où de forts débits avaient été mesurés. Ils ont alors montré que l'augmentation des concentrations d'As dissous est étroitement liée à la température de l'eau (15°C en moyenne), plus élevée durant les saisons printemps/été, indépendamment du débit. Néanmoins, aucune relation entre le pH et les concentrations en As dissous n'a pu être mise en évidence, suggérant que ce facteur n'explique pas les variations saisonnières d'As dans la rivière. Au contraire, la réduction de l'AsV en AsIII plus soluble, et/ou la dissolution des phases solides porteuses d'As par des micro-organismes pourraient expliquer cette observation. Les auteurs suggèrent que des processus biogéochimiques dépendant de la température jouent un rôle important dans le contrôle de la partition et de la spéciation de l'As dans ce système fluvial.

Dans ce chapitre, nous nous sommes focalisés sur l'analyse des bactéries AsIII-oxydantes. Elles ont été étudiées spécifiquement à l'aide de méthodes moléculaires. Les deux approches de DGGE et de PCR en temps réel sur les gènes *aoxB* (c.f. chapitre 3) ont été combinées pour analyser la variabilité spatiale qualitative et quantitative des communautés dotées des gènes *aoxB* dans les eaux du bassin de l'Isle présentant différents niveaux de pollution par l'As.

V.2. Comparaison des profils DGGE des gènes *aoxB*

Des profils DGGE plus ou moins complexes avec des bandes d'intensité variable et migrant à différentes positions ont été obtenus à partir des eaux (Figure 44), indiquant une variation de la structure de la communauté bactérienne AsIII-oxydante dans les eaux du bassin. L'eau de surface peu polluée par l'As, YI009, présente le profil le plus complexe avec 22 bandes visibles, tandis que l'eau souterraine et fortement polluée par l'As principalement sous forme d'AsIII, PZR10, présente le profil le plus simple avec 12 bandes visibles, indiquant une plus faible diversité des gènes *aoxB* dans cet échantillon. Les profils DGGE d'un même échantillon mais issus de différentes PCR sont identiques en terme d'intensité et position de migration des bandes, montrant la reproductibilité de cette approche.

Les similarités entre les profils DGGE, obtenues par une analyse statistique UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) prenant en compte l'ensemble des bandes détectées sur le gel, sont présentées sur le dendrogramme Figure 44. La plus forte divergence est obtenue entre l'échantillon d'eau souterraine anoxique PZR10, correspondant à un puits d'aération de la mine de Cheni et servant actuellement de point d'exhaure, et les échantillons d'eaux de surface (seulement 7% de similarité). En effet, la plupart des bandes visibles dans cette eau ne sont pas détectables dans les eaux de surface oxiques. Cet échantillon présente une forte concentration d'As (environ 2 mg.l⁻¹), cependant toutes les bactéries AsIII-oxydantes isolées à ce jour sont capables d'oxyder une telle concentration. La faible concentration d'oxygène dissous dans PZR10 est donc probablement à l'origine de la divergence de structure au sein de ce groupe bactérien aérobie AsIII-oxydant. Le profil de l'eau de surface YI025, correspondant aux rejets de la mine Mas Vieux, diverge aussi du profil des autres eaux de surface (20% de similarité), malgré des concentrations d'oxygène dissous et d'As total similaires. La divergence des empreintes moléculaires des communautés YI025 et PZR10 peut être due à la présence d'AsIII et/ou au fait qu'elles soient issues d'eaux

de mines. En outre, ces deux eaux ont une signature chimique très particulière, avec des teneurs élevées en Fe et Mn, l'absence de nitrates, et environ 100 mg.l⁻¹ d'ions HCO₃⁻ contre 35 en moyenne pour les autres eaux. Les profils des eaux de surface YI009 et YI016 présentent 58% de similarité entre eux, malgré leur distance géographique, suggérant que la faible quantité d'As dans ces échantillons soit à l'origine de cette similitude. Les profils des eaux de surface YI011, YI019, AB001 et YI020, obtenus à différentes localisations (affluents et rivière) et ayant des concentrations et spéciations similaires d'As ont de nombreuses bandes en commun ; la plus forte similitude (69%) est retrouvée pour les échantillons YI019 et YI020, lesquels sont proches des profils de l'échantillon AB001 (56% de similarité) et de l'échantillon YI011 (39%).

Des différences notables de structure des communautés bactériennes dotées de gènes *aoxB* associées aux changements de la qualité des eaux sont donc mises en évidence. Le long du bassin, la variation d'autres facteurs, tels que le carbone organique et inorganique, divers éléments chimiques ou encore le débit des différents affluents, a probablement contribué à la sélection de bactéries phylogénétiquement et physiologiquement distinctes. Cependant, de nettes corrélations sont observables entre la structure des communautés bactériennes dotées de gènes *aoxB* et la spéciation et concentration de l'As dans ces eaux. En effet, leur structure varie clairement en fonction des différents niveaux de pollution : faible, modérée ou élevée, suggérant qu'elle soit indicatrice de la concentration et spéciation de l'As, ainsi que de sa biodisponibilité dans le milieu.

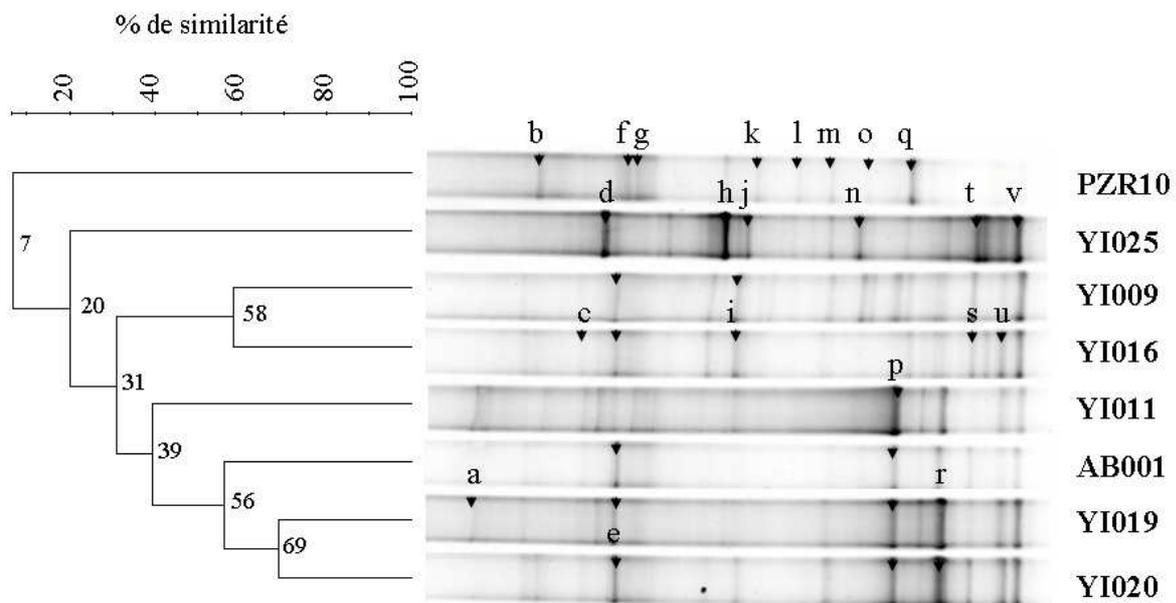


Figure 44 : Dendrogramme de similarité et profils DGGE des gènes *aoxB* amplifiés à partir des eaux du bassin de l'Isle. Les flèches indiquent les bandes séquencées.

V.3. Diversité des gènes *aoxB*

La plupart des bandes dominantes de chaque profil et indiquées par une flèche sur la Figure 44 a été excisée et séquencée afin d'identifier les gènes *aoxB* présents dans ces eaux. La plupart des bandes dominantes de chaque profil et indiquées par une flèche sur la Figure 44 ont été excisées et séquencées afin d'identifier les gènes *aoxB* présents dans ces eaux. La comparaison des séquences nucléotidiques (544 pb) avec celles disponibles dans Genbank montre que toutes les séquences sont apparentées à des séquences de gènes *aoxB*, confirmant la spécificité de l'approche DGGE développée dans ce travail. De plus, les bandes qui migrent à une même position dans différents profils ont des séquences identiques à 99-100% au niveau nucléique et sont 100% identiques au niveau protéique.

Les relations phylogénétiques entre les séquences protéiques AoxB issues de cette étude et celles disponibles dans Genbank sont présentées Figure 45. Une importante diversité est retrouvée dans les eaux du bassin étudié. En effet, ces séquences présentent de 32% (bande g/bande i) à 100% d'identité entre elles et entre 67,2% (*Acinetobacter* sp. 33/Bande i) et 99,3% (*Pseudomonas* sp. ULP72/Bande b) avec les séquences de souches connues pour oxyder l'As^{III}. Ces séquences se répartissent au sein de celles appartenant aux α -, β - et γ -*Proteobacteria*. L'affiliation exclusive aux *Proteobacteria* est attribuée à la mésophilie de l'environnement étudié (c.f. chapitre 6). La majorité des séquences est associée à celle de β -*Proteobacteria*, dont 67% à *Hydrogenophaga* spp. Parmi les séquences associées aux α -*Proteobacteria*, 57% sont affiliées à celle du genre *Aminobacter*. Enfin, seulement trois séquences sont associées à celle de γ -*Proteobacteria*.

La bande e montre seulement 78,7% d'identité avec celle d'une souche de *Mesorhizobium* isolée d'une colonne de sol exposé à 27 μ M d'As^{III} (Inskeep *et al.*, 2007). Elle est omniprésente dans l'ensemble des profils DGGE des eaux de surface, qu'elles soient faiblement ou moyennement polluées par l'As^V ou l'As^{III} (YI025), montrant l'ubiquité de ce gène le long du bassin. La bande i est également présente dans ces eaux, excepté dans l'eau YI019, et la séquence correspondante est divergente des séquences AoxB connues puisqu'elle ne présente que 67,2% d'identité avec celle d'*Acinetobacter* sp. 33, isolée d'une mine d'or (Salsigne, France).

Les séquences des bandes p et r sont affiliées respectivement à celles d'*Acidovorax* spp. (97,1% d'identité) isolées de la mine d'or de Salsigne (France) et de sédiments chinois et à

celles *Ancylobacter* sp. OL1 (82,2-82,7%) oxydant l'AsIII en condition chimioautotrophe et isolée des sédiments d'un lac contaminé par l'As (Onondaga, NY, USA). Elles sont systématiquement présentes dans les profils DGGE des eaux de surface AB001, YI020, YI019, YI011 moyennement pollués par l'AsV (environ 45 et 100 $\mu\text{g.l}^{-1}$ d'AsV) ; elles sont majoritaires dans les eaux YI020, YI019 et YI011. La bande p est de plus présente dans l'échantillon YI009 peu pollué, mais clairement absente de l'eau YI016 non polluée. Ces bandes p et r ne sont plus visibles en présence d'AsIII (absentes des profils YI025 et PZR10).

Les bandes r, s, t, u, v qui migrent dans la partie basse des profils DGGE de certaines eaux de surface sont absentes du profil de l'eau souterraine anoxique PZR10 polluée par de l'AsIII, suggérant qu'elles représentent des organismes spécifiques de la zone oxic. Les séquences de ces bandes sont associées à celles de *Hydrogenophaga* spp. (à l'exception d'*Hydrogenophaga* sp. CL3, c.f. chapitre 4) (81,9% à 89,4% d'identité), isolées de sédiments pollués par l'As en Australie et en Chine (Inskeep *et al.*, 2007 ; Fan *et al.*, 2008). A noter que les bandes s, u et v sont absentes de l'eau YI025 polluée par l'AsIII et la bande s est également absente de l'eau YI011.

L'eau de surface YI025, également polluée majoritairement par de l'AsIII, ne partage avec l'eau PZR10 que les bandes m et q, alors qu'elle présente des similitudes importantes avec les autres eaux de surface. La bande m diverge des séquences connues avec seulement 73,6% d'identité avec celle d'*H. arsenicoxydans*, tandis que la bande q est apparentée à celle de *Hydrogenophaga* spp. (81,2% à 85,7% d'identité). Les deux bandes les plus intenses du profil YI025, d et h affiliées respectivement à *Aminobacter* sp. 86 (81%) et *Hydrogenophaga* spp. (82,7-92,4%), lui sont spécifiques et pourraient représenter des souches autochtones à ce site.

La bande a montre une forte identité (98,1 % d'identité) avec celle de la γ -Protéobactérie, *Pseudomonas* sp. D2OHCJ isolée dans cette étude du sol industriel D2 contaminé par l'As (Pays-Bas, EU). Elle n'est présente que dans les eaux de surface YI019 et YI011 collectées dans les affluents de l'Isle, mais est absente de celles de la rivière AB001 et YI020, suggérant que la bactérie correspondante ne se maintienne pas le long de l'Isle.

La séquence représentant la bande b, présente uniquement dans l'eau PZR10, est apparentée à celle de *Pseudomonas* sp. 72, isolée d'une mine d'or (Salsigne, France) avec 99,3 % d'identité.

Des séquences AoxB identiques ou similaires sont retrouvées à différents points du bassin de l'Isle. Elles sont également proches d'OTU retrouvés à partir de sites variés, au travers

d'autres études (chapitre 2, Fan *et al.*, 2008, Inskeep *et al.*, 2007) (Annexe 4). La séquence de la bande a issue de l'eau de surface YI019 partage 97,3% d'identité avec l'OTU T12RSOL13 issu du sol industriel T12R du bassin de la Meuse (c.f. chapitre 6) et 91% d'identité avec l'OTU AM-1 issu d'un sol agricole traité par de l'As (Montana, Etats-Unis, Inskeep *et al.*, 2007). La séquence de la bande d, dominante et présente exclusivement dans l'eau de surface YI025 partage 94% d'identité avec l'OTU T12RSOL2 issu du sol T12R. La séquence de la bande p représentée dans toutes les eaux polluées par l'AsV, partage 94% d'identité avec celles des clones *aoxB-2* et *aoxB-7*, affiliées à celles d'*Acidovorax* sp. GW2, issus de sédiments pollués par l'As (Province Shanxi, Chine, Fan *et al.*, 2008) et 99% d'identité avec celle de l'OTU LYB3 issu de sédiments d'un lac contaminé par des déchets industriels (Yangebog, Australie, Inskeep *et al.*, 2007).

La phylogénie des gènes *aoxB* dans les échantillons YI025 et PZR10 a également été étudiée par construction d'une banque de clones avec les amorces m1-2F/m3-2R. A partir de l'échantillon d'eau de surface YI025, 13 profils distincts ont été obtenus après analyses de restriction de 17 inserts issus de clones sélectionnés au hasard. Les clones présentant plus de 90% d'identité entre eux ont été considérés comme appartenant à un seul OTU. Les OTU YI025-8 et YI025-23, représentent chacun 35% de la librairie et les autres moins de 6% chacun. A partir de l'eau souterraine PZR10, l'analyse de restriction de 12 inserts issus de clones pris au hasard a montré 10 profils de restriction distincts. Les OTU PZR10-13 et PZR10-2 représentent respectivement 50% et 16,7% de la librairie.

Les relations phylogénétiques entre ces séquences et celles de bactéries AsIII-oxydantes connues sont présentées Figure 45. Les séquences AoxB issues de ces deux échantillons sont diverses (entre 99% et 45% d'identité au sein d'un même échantillon) et se répartissent au sein des α - et β -*Proteobacteria*. Cinq séquences sont associées aux β -*Proteobacteria*. La séquence YI025-18 présente 74,6% d'identité avec celle de *H. arsenicoxydans*. Trois séquences sont associées à celle d'*Acidovorax* sp. 75 (80,3% à 86,3% d'identité). Les huit séquences associées aux α -*Proteobacteria* sont largement diversifiées (de 67,5% à 99% d'identité entre elles). La séquence PZR10-18 présente 85,7% d'identité avec celle d'*Aminobacter* sp. 86. Quatre séquences (PZR10-5, PZR10-14, PZR10-2 et YI025-1) présentent des identités comprises entre 74,8% et 76,3% avec celles d'*Ancylobacter* sp. OL1. Enfin, trois séquences (PZR10-25, YI025-8 et YI025-20) forment un groupe divergent

présentant seulement entre 61,5% et 70,1% d'identité avec les autres séquences d' α -*Proteobacteria*.

De nombreuses similarités sont mises en évidence par comparaison des séquences obtenues à l'aide des deux approches moléculaires (bibliothèques de gènes et DGGE) à partir des deux eaux polluées par l'AsIII, YI025 et PZR10 (Figure 45). En effet, les séquences des deux bandes dominantes d et h du profil YI025 montrent de fortes similitudes (98,4% d'identité) avec celles des OTU YI025-1 et YI025-23, respectivement. La séquence de la bande t est identique (100%) à celle du clone YI025-13. La bande l du profil PZR10 présente 92,3% d'identité avec celle de l'OTU PZR10-2, tandis que la bande o présente 92,2% d'identité avec l'OTU dominant PZR10-13. Cependant, seules des séquences affiliées aux α - et β -*Proteobacteria* ont été retrouvées à partir des banques de gènes. La même constatation peut être faite à partir de séquences issues de sédiments contaminés par l'As (Province Shanxi, Chine, Fan *et al.*, 2008). Dans notre cas, cette absence de séquence affiliée à des γ -*Proteobacteria*, pourtant retrouvée à l'aide de l'approche DGGE, est sans doute liée au faible nombre de clones séquencés à partir des bibliothèques construites.

A noter qu'aucune des séquences issues de l'approche DGGE ou du clonage n'est proche de celles des β -*Proteobacteria* AsIII-oxydantes isolées des eaux YI019 (*Burkholderia* sp. YI019A) et YI025 (*Alcaligenes* sp. YI013H).

Nos résultats révèlent une grande diversité environnementale de la microflore AsIII-oxydante en mettant en évidence des gènes *aoxB* originaux et divergents de ceux issus de *Proteobacteria* AsIII-oxydantes connues à ce jour. A l'inverse, certains gènes sont très proches de ceux issus de genres et espèces AsIII-oxydants connus. Toutes ces bactéries ont été isolées sur des milieux de culture présentant des concentrations élevées de ce metalloïde, et sont donc capables de résister aisément à 2 mg.l⁻¹ d'AsIII (concentration maximale retrouvée dans ces eaux). A ce jour, aucune étude n'a été menée sur la capacité de souches à oxyder des teneurs en As de l'ordre de celles retrouvées dans ces eaux. Il est donc à présent difficile de corrélérer la présence d'un gène *aoxB* appartenant à un genre spécifique de bactéries AsIII-oxydantes avec une concentration d'As retrouvée dans ces eaux. Néanmoins, cette étude révèle que des bactéries présentes dans les eaux non polluées portent les mêmes gènes *aoxB*

que celles présentes dans les eaux modérément polluées et sont donc susceptibles de répondre à des changements de conditions environnementales et donc à une augmentation de l'As dans l'eau.

L'occurrence de séquences AoxB similaires dans différents compartiments environnementaux (*i.e.* eaux, sols et sédiments) pollués par l'As à travers le monde, montre donc que certaines espèces bactériennes potentiellement AsIII-oxydantes sont ubiquistes des écosystèmes pollués par l'As en se répartissant dans des zones géographiquement larges. Ainsi, des espèces du genre *Hydrogenophaga* ont été retrouvées aussi bien dans des fluides géothermaux (USA, Salmassi *et al.*, 2006) que dans des mines d'or (Australie, Santini *et al.*, 2002) ou dans des sédiments de lacs (Venezuela, Rhine *et al.*, 2005). Des bactéries AsIII-oxydantes du genre *Thiomonas* (et présentant plus de 99% d'identité au niveau de l'ARNr 16S) ont également été isolées de bassins miniers éloignés par plusieurs milliers de kilomètres (Carnoulès, France, Bruneel *et al.*, 2003; Chéni, France, Battaglia-Brunet *et al.* 2006 ; sud-ouest des Cornouailles, Angleterre, Johnson et Hallberg, 2005 ; Norvège, Johnson *et al.*, 2001, Battaglia-Brunet *et al.* 2006).

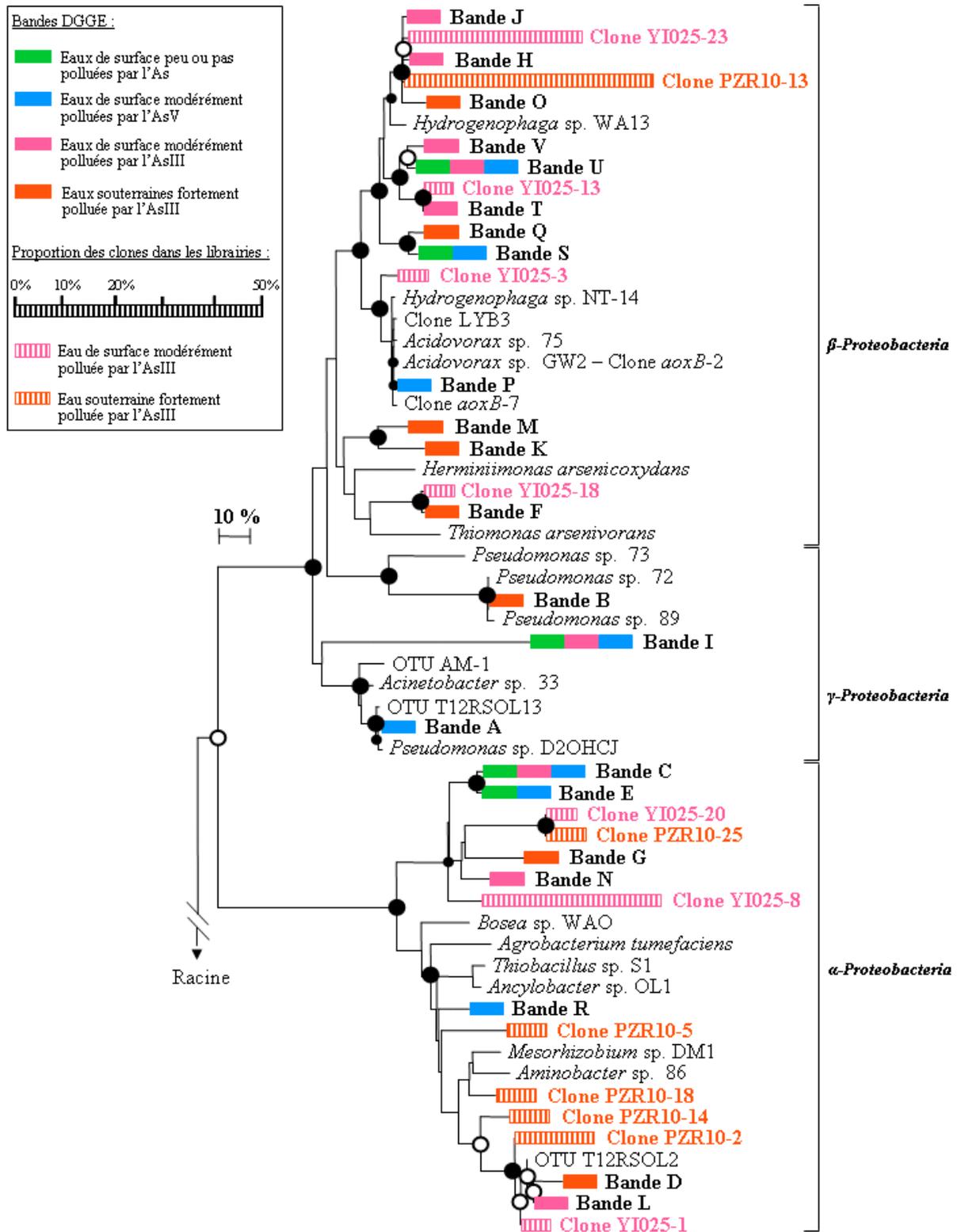


Figure 45 : Arbre phylogénétique Neighbor-Joining des séquences protéiques AoxB issues des eaux du bassin de l'Isle. Les séquences obtenues à partir des profils DGGE sont indiquées en gras et représentées par des barres de différentes couleurs selon le niveau de pollution des eaux. Les séquences AoxB des souches AsIII-oxydantes *Chloroflexus aurantiacus* et *Thermus* spp. ont été utilisées en racine. Les cercles situés aux nœuds des branches représentent les valeurs de bootstrap sur 100 répliques: grand cercles noirs = 95-100%; petits cercles noirs = 75-95%; cercles blancs = 50-75%. L'échelle correspond à 10 mutations sur 100 résidus.

V.4. Abondance des gènes *aoxB*

Une absence de substances inhibitrices dans ces eaux a été montrée par l'obtention, en moyenne, de $2,9 \times 10^6$ ($\pm 6,5 \times 10^5$) copies de gènes *aoxB* contre $1,1 \times 10^6$ ($\pm 1,1 \times 10^6$) copies attendues, dans une réaction contenant 10^6 copies du plasmide standard pYI025-5 en plus de l'ADN environnemental. Des résultats similaires ont également été obtenus à partir de 20 ng ou 0.2 ng d'ADN cible. Par contre, les tests de PCR en temps réel avec les mêmes concentrations d'ADN cible en présence de 10^7 copies du plasmide standard du gène codant d'ARNr 16S ont montré des pourcentages d'inhibition variable selon les échantillons : 0 (YI009 et YI020) ; 2,8 (YI025) ; 4,6 (YI019) ; 12 (PZR10) ; 36,1 (YI011) ; 39,1 (YI016) ; 50 (AB001). Par conséquent, les quantités de gènes codant l'ARNr 16S obtenues dans ces eaux et indiquées dans le Tableau 28 ont été corrigées avant d'être comparées à celles des gènes *aoxB*.

Dans les huit eaux, le nombre de copies de gènes *aoxB* varie entre $8,1 \times 10^3$ ($\pm 1,1 \times 10^3$) et $1,6 \times 10^5$ ($\pm 3,6 \times 10^4$) par ng d'ADN (Tableau 28). Au sein de l'échantillon d'eau souterraine et fortement polluée par l'As, les communautés bactériennes dotées de gènes *aoxB* sont peu représentées. La communauté AsIII-oxydante ciblée est aérobie et son développement dans l'eau souterraine est certainement freiné par la faible concentration en oxygène dissous. Les communautés dotées de gènes *aoxB* sont en effet plus denses dans les eaux de surface oxiques. Les valeurs les plus élevées sont obtenues pour les eaux oxiques les plus polluées en As : YI011 (polluée par l'AsV) et YI025 (polluée par l'AsIII). Aucune corrélation claire n'est cependant mise en évidence entre la spéciation de l'As et le nombre de copies de gènes *aoxB*.

Afin d'évaluer la représentativité de ce groupe fonctionnel au sein de la communauté bactérienne totale, l'abondance des gènes *aoxB* a été rapportée à celle des gènes codant l'ARNr 16S. Le nombre de copies de gènes codant l'ARNr 16S est similaire dans l'ensemble des eaux et varie entre $4,8 \times 10^5$ ($\pm 4,8 \times 10^3$) et $1,2 \times 10^6$ ($\pm 4,9 \times 10^4$) ng d'ADN. Comme observé pour les gènes *aoxB*, le plus faible ratio est obtenu dans l'échantillon d'eau anoxique PZR10 et le plus fort dans les eaux YI011 (polluée par l'AsV) et YI025 (polluée par l'AsIII) où il représente respectivement 13,5 et 11,5% de la population totale (Tableau 28). Cependant, ces pourcentages ne sont que des estimations. En effet, si le nombre de gènes

aoxB par cellule est proche de celui obtenu par PCR en temps réel (en présumant que les bactéries AsIII-oxydantes possèdent 1 à 2 copies de ce gène, c. f. chapitre 3), le nombre de copies de gènes codant l'ARNr 16S, quant à lui, ne peut être directement corrélé au nombre de cellules, car il varie entre 1 et 15 copies par cellule bactérienne (Fogel *et al.*, 1999 ; Klappenbach *et al.*, 2000). Néanmoins, Salmassi *et al.* (2006) ont montré, *via* la méthode du MPN (most probable number), que les bactéries AsIII-oxydantes représentaient 6 à 56% des membres cultivables d'une communauté de biofilm d'un affluent de la rivière Owen (CA, USA), le Hot Creek, fortement pollué par l'As. Les proportions de bactéries AsIII-oxydantes retrouvées dans les eaux du bassin de l'Isle semblent donc raisonnables.

Eaux	Nb. copies de gènes <i>aoxB</i> /ng d'ADN	Nb. copies de 16S / ng d'ADN	Ratio <i>aoxB</i> /16S (%)
YI009	1,8 x 10 ⁴ (± 9,0 x 10 ²)	6,5 x 10 ⁵ (± 4,9 x 10 ⁴)	2,8
YI011	1,6 x 10 ⁵ (± 3,6 x 10 ⁴)	1,1 x 10 ⁶ (± 4,9 x 10 ⁴)	13,5
YI016	2,9 x 10 ⁴ (± 4,2 x 10 ³)	5,9 x 10 ⁵ (± 2,7 x 10 ⁴)	4,9
YI019	6,1 x 10 ⁴ (± 1,3 x 10 ⁴)	8,3 x 10 ⁵ (± 3,9 x 10 ⁴)	7,3
YI020	3,4 x 10 ⁴ (± 7,3 x 10 ³)	4,8 x 10 ⁵ (± 4,8 x 10 ³)	7,1
YI025	7,5 x 10 ⁴ (± 4,1 x 10 ³)	6,5 x 10 ⁵ (± 4,8 x 10 ⁴)	11,5
AB001	2,1 x 10 ⁴ (± 4,9 x 10 ³)	1,2 x 10 ⁶ (± 4,9 x 10 ⁴)	1,8
PZR10	8,1 x 10 ³ (± 1,1 x 10 ³)	8,4 x 10 ⁵ (± 9,8x 10 ⁴)	1,0

Tableau 28 : Nombre de copies de gènes *aoxB* et de gènes codant l'ARNr 16S dans les échantillons d'eau du bassin de l'Isle. Les mesures de PCR en temps réel sur les huit échantillons d'eaux ont été réalisées sur trois réplicats. La courbe de calibration des gènes *aoxB* a été développée à partir de dilutions du plasmide pYI025-5 (c.f. chapitre 1). La courbe de calibration générée pour quantifier les gènes codant l'ARNr 16S est indiquée Figure 27.

V.5. Conclusion

Les approches de DGGE et de PCR en temps réel appliquées aux gènes *aoxB* sont pratiques et fiables pour évaluer rapidement les variations de communautés AsIII-oxydantes associées à différents niveaux de pollutions et de spéciation de l'As dans les eaux du bassin de l'Isle. Il est cependant difficile d'estimer précisément la richesse de cette communauté dans un écosystème à partir d'un profil DGGE puisque nous avons montré que plusieurs gènes *aoxB* ayant des séquences différentes sont présents chez certaines souches AsIII-oxydantes (c.f. chapitre 3). Cependant, car nous montrons dans cette étude qu'une même séquence protéique

AoxB correspond à une position de migration unique, nous pouvons conclure que la diversité des gènes *aoxB* déduite à partir des profils DGGE n'est pas surestimée. La spécificité des méthodes dans les eaux étudiées a été confirmée par l'obtention exclusive de gène *aoxB*. Malgré les biais possibles introduits par ces deux approches PCR dépendantes, ces eaux ont pu être comparées aisément entre elles car les mêmes conditions expérimentales ont été appliquées simultanément à l'ensemble des échantillons et les résultats obtenus sont reproductibles.

Des différences notables de structure des communautés bactériennes AsIII-oxydantes ont été mises en évidence selon les différents niveaux de pollution (faible, modérée ou élevée) et de spéciation de l'As dans les eaux du bassin, suggérant qu'elle soit indicatrice de la biodisponibilité de l'As dans le milieu. Les communautés dotées de gènes *aoxB* sont plus denses dans les eaux de surface oxygènes et les quantités les plus élevées sont obtenues pour les eaux YI011 polluée par de l'AsV et YI025 polluée par de l'AsIII. Aucune corrélation claire n'a pu cependant être mise en évidence entre la spéciation de l'As et le nombre de copies de gènes *aoxB*. La faible concentration d'oxygène dissous dans l'eau souterraine PZR10 est probablement à l'origine de la divergence de structure de la communauté ciblée et de la faible quantité de gènes *aoxB* retrouvée.

Une importante diversité de gènes *aoxB*, affiliés à ceux des α -, β - et γ -*Proteobacteria*, est retrouvée dans les eaux du bassin. Des gènes *aoxB* similaires sont retrouvés à différents points du bassin, présentant des concentrations et spéciations similaires en As. Certaines séquences sont également proches d'OTU retrouvés dans différents compartiments environnementaux pollués par l'As à travers le monde, indiquant leur ubiquité, ainsi qu'une large répartition géographique. La présence d'une diversité et d'une quantité importante de gènes *aoxB* dans les eaux non polluées du bassin suggère la présence de diverses espèces AsIII-oxydantes présentant probablement des capacités physiologiques variées et susceptibles de répondre rapidement à une augmentation de la quantité d'As dans l'eau.

Cette étude apporte pour la première fois des informations sur l'abondance des gènes *aoxB* dans les environnements pollués par l'As et montre également que ces gènes sont présents de façon non négligeable dans les environnements non pollués par ce métalloïde. L'abondance des communautés AsIII-oxydantes et AsV-réductrices cultivables a été étudiée dans des environnements pollués ou non par l'As (Salmassi *et al.*, 2006 ; Kuai *et al.*, 2001 ; Jackson *et al.*, 2005 ; Mandal *et al.*, 2007). Une seule étude a rapporté l'utilisation de la PCR en temps

réel pour quantifier des gènes impliqués dans la biotransformation de l'As, les gènes *arsC*, responsable de la réduction de l'AsV (Sun *et al.*, 2003).

Ces outils sont donc puissants pour identifier et suivre la dynamique des bactéries AsIII-oxydantes dans l'environnement et semblent prometteurs pour étudier le potentiel de bio-oxydation de l'AsIII et la réduction de la biodisponibilité de l'As dans un écosystème donné. Contrairement aux mesures physico-chimiques qui renseignent sur la qualité des eaux à un temps donné, la réponse des communautés bactériennes peut être, grâce à l'acquisition de mécanisme de tolérance, observable précocement ou au contraire après l'événement de pollution.

Un lien entre la structure des communautés AsIII-oxydantes et les concentrations d'As dans ces eaux a été mis en évidence. Ces résultats seront à confirmer à plus grande échelle en intégrant un plus grand nombre d'échantillons, situation plus contrastée en termes de concentrations en As. Une telle étude plus large est également nécessaire pour démontrer, ou non, une relation entre l'abondance des gènes *aoxB* et les variations des conditions environnementales.

VI. Coexistence des communautés bactériennes AsIII-oxydantes et respirant l'AsV dans des sols industriels pollués

VI.1. Contexte

De nombreuses souches bactériennes AsIII-oxydantes et AsV-réductrices ont été isolées d'environnements pollués par l'As. La transformation de l'As par ces bactéries a des implications environnementales importantes car l'AsV et l'AsIII présentent des propriétés toxicologiques et de sorption différentes. En effet, l'AsIII est considéré comme plus mobile et plus toxique que l'AsV, qui tend à se fixer sur les phases porteuses des sols et sédiments. Ainsi, la mobilité de l'As peut varier en fonction du développement de certaines bactéries et des conditions redox du milieu.

Dans ce chapitre, les mécanismes de transformation de l'As qui peuvent potentiellement se développer selon les conditions redox dans les sols industriels pollués par l'As du bassin de la Meuse ont été évalués en couplant des méthodes de cultures d'enrichissement à des approches moléculaires PCR dépendantes. La pertinence des outils moléculaires développés jusqu'à présent pour détecter les bactéries et leur activité potentielle de transformation de l'As inorganique dans l'environnement a été évaluée.

VI.2. Oxydation et réduction potentielles de l'As par les bactéries indigènes

En aérobiose, les sols D2, D3, T5R et T12R, enrichis en condition chimioautotrophe ou chimiohétérotrophe, sont capables de totalement oxyder 1 mM d'AsIII. En anaérobiose, les sols sont capables de réduire 3,5 mM d'AsV comme seuls accepteurs d'électrons ajoutés, en condition chimioautotrophe ou chimiohétérotrophe. Comme attendu, ces réactions sont réalisées plus rapidement en condition chimiohétérotrophe qu'en condition chimioautotrophe

(Figure 46). Aucune oxydation de l'AsIII ni de réduction de l'AsV n'a été mesurée dans les contrôles stériles, confirmant que l'oxydation ou la réduction observée est d'origine microbienne.

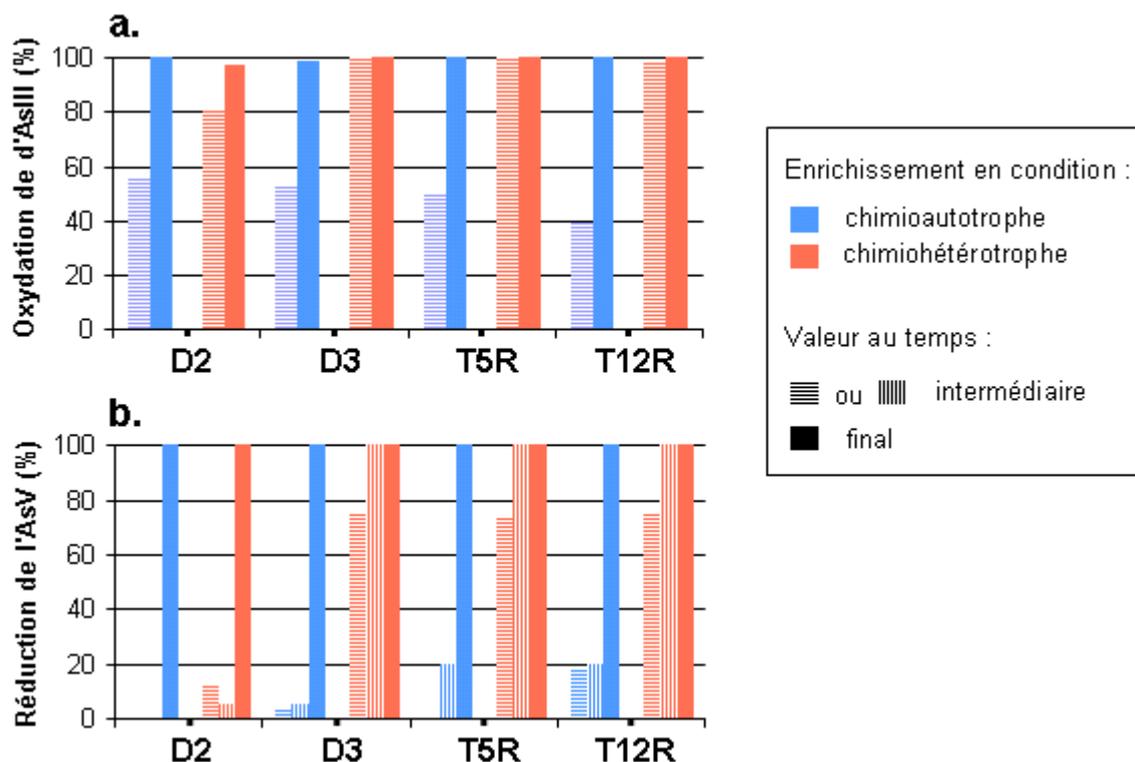


Figure 46 : Taux d'oxydation d'1mM d'AsIII (a) ou réduction de 3,5 mM d'AsV (b) dans les enrichissements des sols D2, D3, T5R ou T12R en condition chimioautotrophe ou chimiohétérotrophe. Pour les enrichissements en condition AsIII-oxydantes, les mesures intermédiaires et finales ont été effectuées après 11 et 25 jours, respectivement. Pour les enrichissements en condition AsV-réductrices, les mesures intermédiaires ont été effectuées après 17, puis 34 jours, et les mesures finales au 76^{ème} jour d'incubation.

A partir des sols originaux, un profil CE-SSCP complexe de la communauté bactérienne totale est obtenu. Cette communauté se simplifie dans les enrichissements, où une quinzaine de pics sont détectés en condition aérobie (et avec ajout d'AsIII) et en condition anaérobie (et ajout d'AsV). Comme attendu, les conditions redox, ainsi que la présence de sources de carbone et d'énergie exogènes et les fortes concentrations d'As ont orienté la sélection de certaines bactéries du sol.

Des amplifications spécifiques (d'environ 550 pb ou 1100 pb) ont été obtenues avec les deux couples d'amorces m1-2F/m2-1R et m1-2F/m3-2R ciblant les gènes *aoxB* à partir des enrichissements AsIII-oxydants, ainsi qu'à partir des sols originaux. Certaines bactéries indigènes de ces sols possèdent donc le système *aox* nécessaire à l'oxydation de l'AsIII.

Une amplification spécifique d'environ 200 pb a été obtenue à partir des enrichissements réduisant l'AsV, à l'aide du couple d'amorces ArrAfwd/ArrArev (Malasarn *et al.*, 2004). La détection de gènes *arrA* dans ces enrichissements montre que le mécanisme de respiration est à l'origine, du moins en partie, de la réduction de l'AsV. Néanmoins, aucun produit PCR n'a été obtenu à partir des sols originaux à l'aide cette méthode de détection. De plus, le couple d'amorces ArrPJ0100F/ArrPJ2100R (Perez-Jimenez *et al.*, 2005) n'a pas permis d'amplifier spécifiquement les gènes *arrA* dans les sols testés. En effet, de nombreuses bandes ont été obtenues à partir des cultures d'enrichissements et deux bandes ont été détectées à partir de la souche *B. selenitireducens* (utilisée comme contrôle positif).

La majorité des bactéries décrites dans la littérature pour leur capacité à respirer l'AsV a été enrichie/isolée avec de l'acétate et/ou du lactate comme sources de carbone et de l'AsV comme seul accepteur d'électrons. Les conditions d'enrichissements utilisées dans notre étude sont donc propices à la respiration bactérienne de l'AsV. Cependant, l'ajout d'extrait de levure dans nos enrichissements, pour accélérer la croissance bactérienne, a également pu servir de substrat aux bactéries fermentaires capable de réduire l'AsV. En effet, Jones *et al.* (2000) ont démontré que des bactéries peuvent fermenter le glucose et réduire l'AsV dans un but de détoxification. Néanmoins, l'absence d'amplification de gènes *arsC*, permettant une réduction bactérienne de l'AsV *via* le système de détoxification et recherchés dans ces enrichissements à l'aide des amorces développées par Sun *et al.* (2004), supporte l'hypothèse de l'implication de bactéries respirant l'AsV dans la réduction de ce métalloïde dans ces incubations.

Les gène *arsC* ont toutefois été détectés dans les enrichissements AsIII-oxydants et les sols originaux, à l'aide des amorces amlt-42-f/amlt-376-r (Sun *et al.*, 2004). En revanche, aucune amplification n'a été obtenue avec le couple d'amorces smrc-42-f/smrc-376-r ciblant ces gènes.

Des doutes peuvent être émis quant à la capacité des amorces développées par Sun *et al.* (2004) à cibler une large diversité de gènes *arsC*. Comme dans notre étude, ils n'ont pas été retrouvés à l'aide de ces amorces dans des sédiments pollués par l'As où une respiration de l'AsV a été démontrée (Lear *et al.*, 2007). Ces gènes sont pourtant largement retrouvés au

sein de bactéries indigènes des environnements pollués par l'As. Ils sont également présents chez des bactéries respirant AsV comme *Shewanella* sp. ANA-3 (Saltikov *et al.*, 2003).

L'ensemble de ces résultats montre que certaines bactéries indigènes aux sols étudiés sont capables d'oxyder l'AsIII ou de respirer l'AsV, selon les conditions redox du milieu, et qu'elles possèdent les gènes *aoxB* ou *arrA*, permettant de réaliser ces réactions. Afin de visualiser leur diversité, les populations bactériennes impliquées dans ces processus ont été identifiées au sein du sol T12R, qui présente la plus forte concentration en As.

VI.3. Diversité des bactéries AsIII-oxydantes dans le sol T12R

La diversité des gènes *aoxB* a été étudiée par construction de banques de gènes avec les amorces m1-2F/m3-2R à partir : (i) du sol T12R, (ii) de l'enrichissement de ce sol en condition AsIII-oxydante chimiohétérotrophe (T12ROH), (iii) de l'enrichissement de ce sol en condition AsIII-oxydante chimioautotrophe (T12ROA).

Sur un total de 133 clones criblés par une analyse de restriction (*RsaI/HaeIII*), 62 ont finalement été groupés en 27 OTU (Operational Taxonomic Unit) sur la base d'une identité de séquence de 90%. L'obtention exclusive de gènes *aoxB* à partir du sol T12R et des deux enrichissements a permis de réduire la stringence des conditions d'hybridation, favorisant une plus grande sensibilité. Toutes les séquences protéiques AoxB, déduites à partir des séquences nucléiques, contiennent des résidus prédits par Ellis *et al.* (2001) pour être essentiels à l'activité d'oxydation de l'AsIII chez *A. faecalis*, suggérant que des enzymes fonctionnelles soient produites à partir des gènes détectés. Ces gènes sont affiliés à ceux de souches AsIII-oxydantes appartenant aux α -, β -, et γ -*Proteobacteria* (Figure 47).

Une grande diversité de séquences AoxB réparties en 18 OTU et affiliées aux trois classes des *Proteobacteria* a été retrouvée à partir du sol T12R. La librairie est dominée (58%) par des séquences affiliées à celles d' α -*Proteobacteria*, parmi lesquelles 19% sont affiliées à *Bosea* sp. WAO (77.5%-84.3% d'identité). Cinq OTU forment des branches séparées des séquences d' α -*Proteobacteria* connues. Les OTU affiliés aux β -*Proteobacteria* (17% de la librairie) sont principalement affiliés à *Acidovorax* sp. 75 (14% de la librairie, 77,1-82,1% d'identité).

Tandis que les OTU affiliés aux γ -*Proteobacteria* (25% de la librairie) sont principalement représentés par le groupe II des Pseudomonads.

L'incubation de ce sol en condition AsIII-oxydante chimiohétérotrophe a entraîné une diminution de la diversité avec une forte majorité (88%) de séquences affiliées aux β -*Proteobacteria* du genre *Alcaligenes* (82,5-98,7% d'identité) et regroupées dans deux OTU (T12ROH1 et T12ROH2). Un OTU est groupé avec *Burkholderia* sp. YI019A (91,8% d'identité) et seulement un OTU montre une étroite relation avec la γ -Protéobactérie *Pseudomonas* sp. 46 (96,5% d'identité). Curieusement, aucune séquence affiliée aux α -*Proteobacteria* n'a été retrouvée, bien que ce type de séquences soit détecté majoritairement dans le sol non enrichi.

Quand le sol est incubé en condition AsIII-oxydante chimioautotrophe, des séquences affiliées à celles d' α - et β -*Proteobacteria* AsIII-oxydantes chimioautotrophes sont retrouvées. Deux OTU apparentés aux séquences des β -*Proteobacteria* AsIII-oxydantes du genre *Thiomonas* dont certaines espèces sont chimioautotrophes (55% de la librairie, 83,4-98,8% d'identité) et *Burkholderia* sp. YI019A (17% de la librairie, 91% d'identité) dominent la librairie. Les trois OTU groupés aux séquences des α -*Proteobacteria* (32% de la librairie) sont affiliés à *Ancylobacter* sp. OL1 (23% de la librairie, 84% d'identité), *Aminobacter* sp. 86 (4,5% de la librairie, 82,5% d'identité) et *Bosea* sp. WAO (4,5% de la librairie, 80,6% d'identité). À ce jour, la majorité des α -*Proteobacteria* AsIII-oxydantes sont chimioautotrophes, suggérant la prédominance de ce métabolisme parmi elles (Rhine *et al.*, 2007). Contrairement à l'enrichissement en hétérotrophie, aucune séquence affiliée à celles des γ -*Proteobacteria* ni à celles des β -*Proteobacteria* *Alcaligenes* spp. (pourtant majoritaires dans ce dernier enrichissement) n'a été retrouvée.

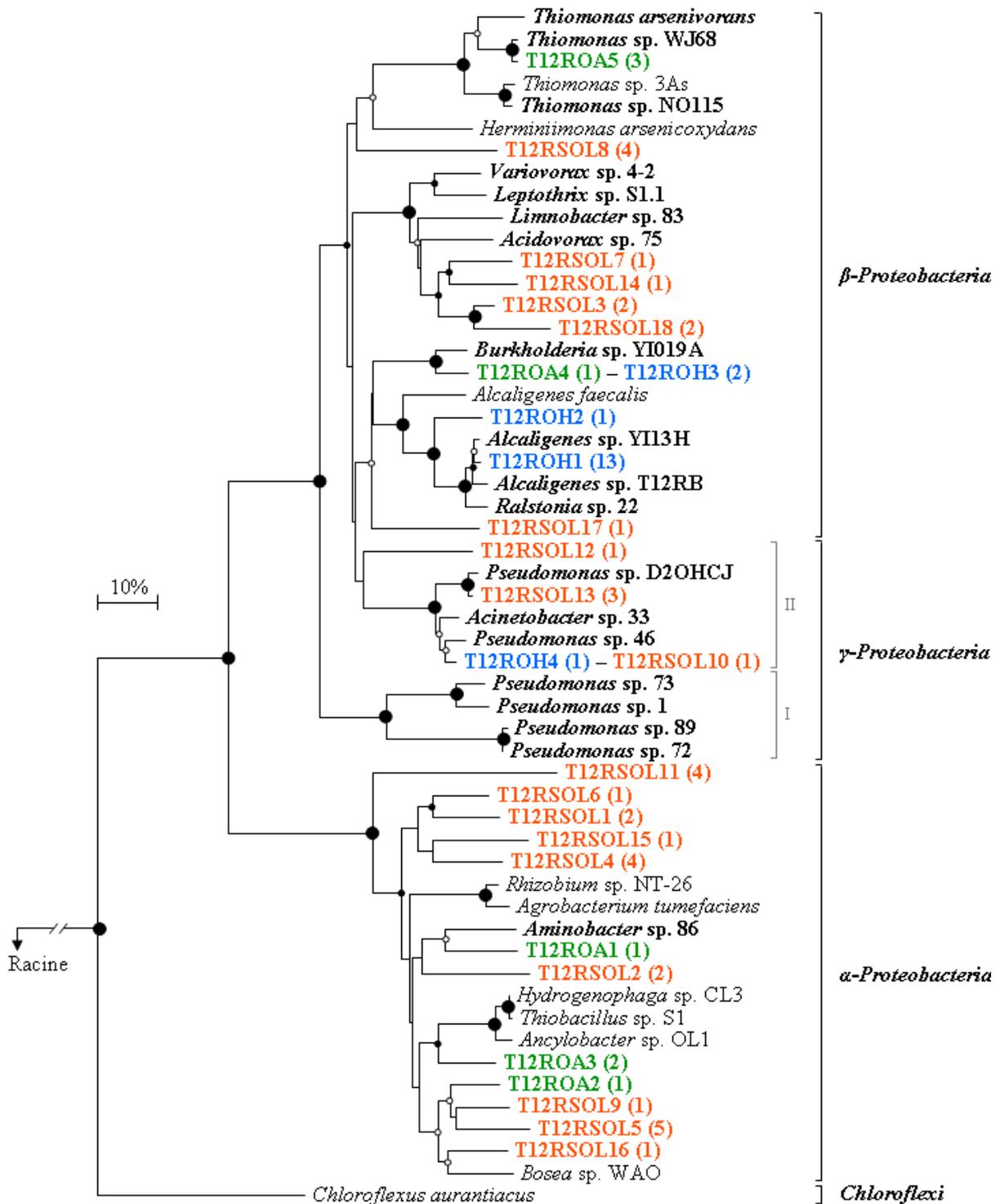


Figure 47 : Arbre phylogénétique Neighbor-Joining des séquences protéiques AoxB. En rouge: séquences T12RSOL issue du sol T12R pollué par l'As; En vert: séquences T12ROA issues de l'enrichissement du sol T12R en condition AsIII-oxydante chimioautotrophe ; En bleu: séquences T12ROH issues de l'enrichissement du sol T12R en condition AsIII-oxydante chimiohétérotrophe. Les séquences d'isolats obtenues durant cette thèse sont indiquées en gras. La séquence AoxB de la souche AsIII-oxydante *Thermus thermophilus* a été utilisée en racine. Les cercles situés aux nœuds des branches représentent les valeurs de bootstrap sur 100 réplacas: grand cercles noirs = 95-100%; petits cercles noirs = 75-95%; cercles blancs = 50-75%. L'échelle correspond à 10 mutations sur 100 résidus.

La détection exclusive de séquences AoxB environnementales appartenant au phylum des *Proteobacteria* est probablement due au fait que nous étudions un environnement mésophile. En effet, à l'exception de deux souches, toutes les bactéries AsIII-oxydantes isolées de sites mésophiles appartiennent à ce phylum. De plus, Inskeep *et al.* (2007) ont montré que 98% des séquences AoxB retrouvées à partir de tels environnements sont affiliées à celle de *Proteobacteria*. Les deux études montrant la capacité de bactéries gram positives à oxyder l'AsIII concernent *Microbacterium lactum* (Mokashi et Paknikar, 2002) et *Bacillus arsenoxydans* (Green, 1918). Cependant, la capacité de *Microbacterium lacticum* à oxyder l'AsIII n'a pas été confirmée lors d'expériences ultérieures (communication personnelle, D. Muller) et la physiologie générale de *Bacillus arsenoxydans* est très similaire à celle de la β -Protéobactérie *A. faecalis* (Phillips et Taylor, 1979). Les bactéries AsIII-oxydantes appartenant à d'autres phyla, tels que *Deinococcus-Thermus* (Gihring *et al.*, 2001), *Chlorofexi* (Lebrun *et al.*, 2003) et *Aquificae* (Donahoe-Christiansen *et al.*, 2004), ont été isolées de sites géothermaux. A noter que les *Proteobacteria* AsIII-oxydantes sont également capables de coloniser les sites géothermaux (Jackson *et al.*, 2001 ; Salmassi *et al.*, 2006).

Certains OTU sont proches de ceux retrouvés à partir de sols et de sédiments de sites variés (Fan *et al.*, 2008, Inskeep *et al.*, 2007). Les séquences issues de ces études ne sont pas présentées Figure 47 car elles sont plus courtes (seulement 500 bases) que celles issues de notre étude (environ 1000 bases). Une matrice d'identité a cependant été construite avec l'ensemble de ces séquences et les pourcentages d'identités sont donnés en Annexe 5. T12ROH1 et T12ROH2 présentent 98,7 et 90,3 % d'identité avec la séquence du clone *aoxB-1*, affiliée à celle d'*Achromobacter* sp. GW1 et issue de sédiments pollués par l'As (Province Shanxi, Chine, Fan *et al.*, 2008). D'autres clones issus de ces sédiments partagent également plus de 80% d'identité avec les OTU T12ROA-1 et -2, et T12RSOL-3, -5, -7, -9, -11, ce dernier étant plus divergent des séquences de bactéries AsIII-oxydantes connues. T12ROH4 et T12RSOL13 présentent 91,6 et 90,3 % d'identité, respectivement, avec l'OTU AM-1 issu d'un sol agricole traité par de l'As (Montana, Etats-Unis, Inskeep *et al.*, 2007). T12RSOL3 présente 94,8% d'identité avec l'OTU LYC4, issu de sédiments de lac pollués par l'As (Australie, Inskeep *et al.*, 2007). Ces résultats indiquent la présence de bactéries similaires à celles retrouvées dans le sol T12R dans divers compartiments géographiquement distant. Cette remarque est développée dans le chapitre suivant.

La biodiversité bactérienne totale présente dans l'enrichissement en condition AsIII-oxydante chimiohétérotrophe (T12ROH) a également été étudiée et l'affiliation des séquences d'ARNr 16S, représentant les espèces dominantes visualisées à partir du profil CE-SSCP, est indiquée dans le Tableau 29. Deux séquences d'ARNr 16S (T12ROHB11 et T12ROHB15) sont proches de celles de β -*Proteobacteria* des genres *Alcaligenes* et *Pseudomonas* connus pour oxyder l'AsIII en hétérotrophie (c.f. Chapitre 3). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenues par l'analyse phylogénétique des gènes *aoxB* et supporte l'implication de ces deux souches dans l'oxydation de l'AsIII. D'autres espèces des genres *Bacillus*, *Shingobacterium*, *Luteifibra*, *Terrimonas* (phylum des *Bacteroidetes/Chlorobi*) et *Spartobacteria* (phylum des *Chlamydiae/Verrucomicrobia*) non décrites dans la littérature pour leur capacité à oxyder l'AsIII (à l'exception du genre *Bacillus*, c.f. paragraphe précédent) ont été décelées. Le gène codant l'ARNr 16S est présent dans l'ensemble des bactéries, ainsi son étude ne permet pas de renseigner sur la fonction spécifique d'une espèce et en particulier sur sa capacité à oxyder l'AsIII. Ces autres espèces bactériennes, non identifiées *via* les gènes *aoxB*, se sont donc probablement développées sur des substrats amenés par l'inoculum de sol ou sur des produits du métabolisme d'autres bactéries. Néanmoins, il se peut aussi qu'elles puissent oxyder l'AsIII et que les amorces utilisées ne puissent pas cibler leurs gènes *aoxB*.

Clones sélectionnés	Taille du fragment (pb)	Espèces bactériennes les plus similaires [n° d'accension Genbank]	% d'identité (taille du fragment comparé)	Taxonomie
T12ROHB1	1 394	<i>Luteifibra arvensicola</i> [AM237312]	97 % (1 386 pb)	<i>Bacteroidetes/Chlorobi</i>
T12ROHB3	1 345	<i>Sphingomonas terrae</i> [D13727]	96 % (1 343 pb)	α - <i>Proteobacteria</i>
T12ROHB5	1 383	<i>Stenotrophomonas</i> sp. R3 [AJ002807]	99 % (1 383 pb)	γ - <i>Proteobacteria</i>
T12ROHB6	1 384	<i>Sphingobacterium faecium</i> [AJ438176]	89 % (501 pb)	<i>Bacteroidetes / Chlorobi</i>
T12ROHB9	1 390	<i>Terrimonas lutea</i> [AB192292]	96 % (1 395 pb)	<i>Bacteroidetes / Chlorobi</i>
T12ROHB11	1 383	<i>Alcaligenes</i> sp. R-21939 [AJ786800]	97 % (1 367 pb)	β - <i>Proteobacteria</i>
T12ROHB12	1 410	<i>Bacillus cereus</i> G8639 [AY13827]	99 % (1 409 pb)	<i>Firmicutes (Bacilli)</i>
T12ROHB14	1 384	<i>Spartobacteria bacterium</i> Gsoil 144 [AB245342]	93 % (776 pb)	<i>Chlamydiae/Verrucomicrobia</i>
T12ROHB15	1 395	<i>Pseudomonas</i> sp. KBOS 04 [AY65322]	99 % (1 395 pb)	γ - <i>Proteobacteria</i>

Tableau 29: Identification des séquences du gène codant l'ARNr 16S des clones sélectionnés à partir du profil CE-SSCP de l'enrichissement T12ROH.

VI.4. Diversité des bactéries respirant l'AsV dans le sol T12R

La diversité des gènes *arrA* a été étudiée à partir de la culture d'enrichissement AsV-réductrice chimiohétérotrophe du sol T12R. Les séquences ArrA obtenues sont très semblables entre elles (entre 89% et 100%) et sont affiliées à celles issues du séquençage des génomes de deux souches de *Desulfotobacterium hafniense* (Figure 48). Elles présentent entre 94,4 et 100% d'identité avec la séquence de *D. hafniense* Y15, annotée dans Genbank comme étant une déshydrogénase anaérobie putative, et entre 80,5 et 86,1% d'identité avec celle de *D. hafniense* DCB-2, annotée comme étant une protéine putative impliquée dans des voies de transduction du signal Tat (Twin arginine transport). Cette dernière souche est connue pour respirer l'AsV (Niggemeyer *et al.*, 2001), tandis que *D. hafniense* Y51 a été isolée d'un site contaminé pour sa capacité à déchlorer le PCE (Suyama *et al.*, 2001).

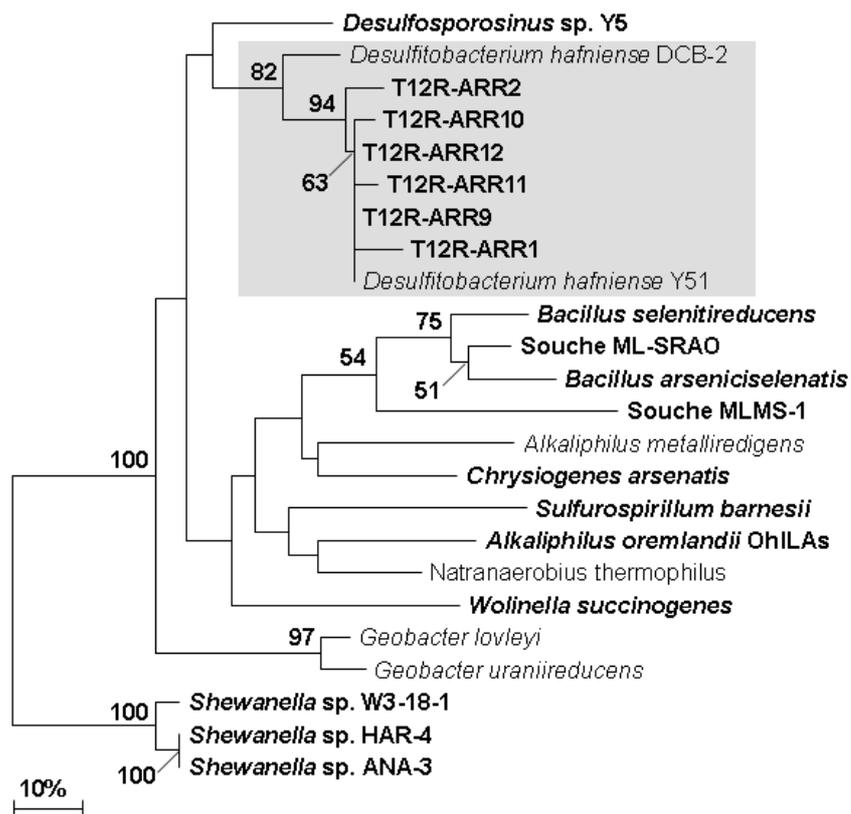


Figure 48 : Arbre phylogénétique Neighbor-Joining des séquences protéiques ArrA de l'enrichissement du sol T12R en condition chimiohétérotrophe AsV-réductrice. Les séquences ArrA des souches respirant l'AsV du genre *Shewanella* ont été utilisées en racine. Les valeurs de bootstrap indiquées aux nœuds des branches ont été obtenues sur 100 répliques. L'échelle correspond à 10 mutations sur 100 résidus.

Les séquences *ArrA* issues de l'enrichissement du sol T12R sont divergentes des séquences obtenues à partir d'autres environnements : sédiments d'un réservoir d'eau (50 % d'identité en moyenne, Haiwee, CA, USA ; Malasarn *et al.*, 2004), eaux ou sédiments de lacs hypersalés (Mono Lake et Searles Lake, CA, USA ; Hollibaugh *et al.*, 2006 ; Kulp *et al.*, 2006 ; Kulp *et al.*, 2007), sédiment d'un aquifère (Kean Svay district, Cambodge ; Lear *et al.*, 2007).

La biodiversité bactérienne totale présente dans l'enrichissement a également été étudiée. Le Tableau 30 liste les séquences du gène codant l'ARNr 16S des espèces les plus proches des clones sélectionnés. Ces séquences sont proches d'espèces appartenant aux genres *Clostridium*, *Desulfitobacterium* et *Desulfotomaculum* (Tableau 30) du phylum des Firmicutes. Ces résultats supportent l'hypothèse d'une réduction de l'AsV réalisée par les bactéries dans un but de respiration dans ces échantillons, car les bactéries de ces genres sont connues pour respirer l'AsV et non pour le réduire dans un but de détoxification. Ces données sont également cohérentes avec celles obtenues par l'analyse phylogénétique des gènes *arrA* et supporte l'implication d'une souche appartenant au genre *Desulfitobacterium* dans la respiration de l'AsV. Trois souches du genre *Desulfitobacterium* (*Desulfitobacterium* sp. GBFH, *Desulfitobacterium hafniense* DCB-2, *Desulfitobacterium hafniense* PCP-1, anciennement *frappieri* PCP-1) sont connues pour leur capacité à respirer l'AsV (Niggemeyer, 2001). Ce genre bactérien, surtout connu pour déchlurer une grande variété de substrats (Smidt et de Vos, 2004), est également capable d'utiliser d'autres accepteurs d'électrons, notamment les ions FeIII et MnIV, dont la réduction joue également un rôle important dans le cycle de l'As (Niggemeyer *et al.*, 2001 ; Nonaka *et al.*, 2006).

Cependant, la détection exclusive de gènes *arrA* affiliés à ceux de bactéries du genre *Desulfitobacterium* suggère que ces bactéries soient les seules à être impliquées dans la respiration de l'AsV. Pourtant, des bactéries apparentées au genre *Clostridium*, dont deux souches sont connues pour leur capacité à respirer l'AsV (Rhine *et al.*, 2005), ont été détectées à partir du gène codant l'ARNr 16S (Tableau 30). À noter qu'aucune séquence de gènes *arrA* de *Clostridium* n'est disponible dans les banques de séquences. Il se pourrait donc que les amorces utilisées dans notre étude ne ciblent pas les gènes *arrA* de ce groupe. Il a d'ailleurs été montré que ces amorces ne ciblent pas le gène *arrA* de l'espèce *Desulfosporosinus auripigmenti*, également capable de respirer l'AsV (Malasarn *et al.*, 2004). Il est donc possible que les souches du genre *Clostridium* présentes dans cet enrichissement portent les gènes *arrA* et soient impliquées dans la respiration de l'AsV.

Clones	Taille du fragment (pb)	Espèces bactériennes les plus similaires [n° d'accension NCBI]	% d'identité	Taxonomie (famille)
T12RRH100B1	1 370	<i>Clostridium felsineum</i> [X77851]	97 %	<i>Clostridiaceae</i>
T12RRH100B2	1 355	<i>Clostridium</i> sp. 25 [AF191250]	98 %	<i>Clostridiaceae</i>
T12RRH100B3	1 363	Uncultured bacterium clone TANB101 [AY667266]	97 %	<i>Clostridiaceae</i>
		<i>Clostridium novyi</i> [AB045606]	96 %	
T12RRH100B4	1 361	<i>Sedimentibacter</i> sp. C7 [AY766466]	95 %	<i>Clostridiaceae</i>
		<i>Clostridium</i> sp. LTR1 [AF427155]	93 %	
T12RRH100B5	1 376	<i>Clostridium litorale</i> [X77845]	95 %	<i>Clostridiaceae</i>
T12RRH100B6	1 537	<i>Desulfitobacterium hafniense</i> Y51 [AP008230]	99 %	<i>Peptococcaceae</i>
T12RRH100B11	1 388	<i>Anaerobic bacterium</i> sp. prop8 [AY538172]	93 %	<i>Peptococcaceae</i>
		<i>Desulfotomaculum aeronauticum</i> [AY703032]	89 %	
T12RRH100B12	1 467	<i>Desulfitobacterium dichloroeliminans</i> [AJ565938]	97 %	<i>Peptococcaceae</i>

Tableau 30: Identification des séquences du gène codant l'ARNr 16S des clones issus de l'enrichissement du sol T12R en condition chimiohétérotrophe AsV-réductrice.

VI.5. Conclusion

Des populations bactériennes capables d'oxyder ou de réduire l'As inorganique coexistent dans un même sol. En fonction des conditions redox, elles peuvent influencer l'état d'oxydation de l'As et donc sa mobilité. En condition aérobie, les bactéries AsIII-oxydantes peuvent diminuer la biodisponibilité de l'As, en transformant l'AsIII, plus mobile, en AsV, qui tend à se fixer sur les phases porteuses du sol. En revanche, en condition anaérobie, les bactéries respirant l'AsV peuvent libérer l'As dans la phase aqueuse et augmenter sa biodisponibilité. Différentes études ont également montré la coexistence de ces activités bactériennes dans un même compartiment environnemental *via* des méthodes culturelles. Des bactéries distinctes capables soit d'oxyder l'AsIII soit de respirer l'AsV ont pu être isolées d'un même écosystème (Oremland *et al.*, 2005 ; Rhine *et al.*, 2005). Un cycle de l'As inorganique dépendant des conditions redox a pu être mis en évidence dans plusieurs lacs des Etats-Unis, tels que le lac Mono, le lac Searles ou encore le lac Onondaga (Oremland *et al.*, 2005 ; Rhine *et al.*, 2005). D'autres études ont montré la coexistence de bactéries AsIII-oxydantes et AsV-réductrices dans un sol insaturé (Macur *et al.*, 2004) ou dans la couche supérieure de sédiments (Fan *et al.*, 2008).

Les amorces développées dans cette thèse ont permis d'accéder à une grande diversité de gènes *aoxB* dans le sol T12R. Des bactéries AsIII-oxydantes appartenant aux α -, β - et γ -*Proteobacteria* sont représentées, confirmant leur prédominance dans les environnements mésophiles. Une réduction notable de la diversité de ces communautés a été observée dans les enrichissements par rapport au sol original, démontrant une limitation liée aux méthodes culturales. De plus, la diversité des bactéries totales, ciblées *via* les gènes codant l'ARNr 16S, dans l'enrichissement AsIII-oxydant ne reflète pas celle des bactéries potentiellement impliquées dans l'activité d'oxydation, ciblées *via* les gènes *aoxB*. Les études de diversité *via* le gène codant l'ARNr 16S, présent dans l'ensemble des bactéries, ne donnent pas d'informations directes sur les capacités métaboliques des bactéries détectées. De plus, les bactéries AsIII-oxydantes forment un groupe polyphylétique avec des organismes étroitement apparentés à d'autres incapables d'oxyder l'AsIII. La capacité à détecter et identifier spécifiquement ce groupe métabolique dans l'environnement par des approches basées sur l'ARNr 16S est donc réduite. Ces résultats soulignent l'utilité de l'emploi du marqueur fonctionnel *aoxB* dans les études de diversité des bactéries AsIII-oxydantes pour détecter directement leur fonction à partir d'un environnement sans l'étape de culture.

En revanche, les méthodes de cultures ont permis de détecter dans ce sol un potentiel de respiration de l'AsV, non décelé à l'aide de méthodes PCR dépendantes à partir des sols originaux. L'association des méthodes culturales et moléculaires a permis d'identifier des bactéries respirant l'AsV (porteuses du gène *arrA*) et appartenant au genre *Desulfitobacterium*. L'analyse de la population totale de l'enrichissement réduisant l'AsV indique la présence du genre *Clostridium*, dont certaines espèces sont également connues pour respirer l'AsV. Cependant, des bactéries phylogénétiquement apparentées peuvent avoir des phénotypes différents et l'analyse des séquences d'ARNr 16S n'est donc pas suffisante pour prédire les capacités de transformation de populations bactériennes spécifiques. A ce jour, il existe peu de séquences *arrA* disponibles dans les banques de séquences et notamment aucune issue du genre *Clostridium*. Par conséquent, il est nécessaire que des séquences *arrA* de souches phylogénétiquement diverses soient disponibles pour permettre un dessin d'amorces plus sensibles et d'accéder à un plus large éventail de bactéries capables de respirer l'AsV dans des environnements variées.

VII. Dynamique de la mobilité de l'arsenic et des communautés bactériennes indigènes d'un sol industriel

VII.1. Contexte

La pollution des sols industriels par les métaux lourds et l'As peut conduire à des changements des communautés microbiennes. Différentes études ont montré que les métaux lourds et métalloïdes, dont l'As, affectent les activités biochimiques des microorganismes, conduisant à une diminution de leur biomasse et de leur diversité. Ainsi, la structure des communautés bactériennes indigènes semble être affectée par la présence d'As et des groupes de bactéries résistantes à ce métalloïde sont communément retrouvés (Avidano *et al.*, 2005 ; Turpeinen *et al.*, 2004). D'autre part, différentes études menées en laboratoire ont montré que les bactéries indigènes influencent la mobilité de l'As dans les sols, en condition aérobies et anaérobie (Turpeinen *et al.*, 1999 ; Chatain *et al.*, 2005 ; Park *et al.*, 2006).

Le bassin de la Meuse compte de nombreux sites industriels pollués par les métaux lourds et l'As. En effet, les activités métallurgiques, telles que les cokeries, ont fortement contribué à la libération de l'As, comme produit secondaire, dans les milieux environnants.

Récemment, une étude visant à caractériser les facteurs prépondérants influençant la mobilité de métaux lourds et métalloïdes, notamment l'As, a été menée sur différents sols pollués de ce bassin, dans le cadre de la thèse de Joubert (2008), réalisée au sein de l'unité d'Ecotechnologies du BRGM et du LIMOS du CNRS et de l'UHP (Nancy I). Au cours de ce travail, des incubations de sols ont été réalisées selon le plan expérimental présenté en Annexe 6 et intégrant les variables suivantes : température, teneur en oxygène, pH et activité microbienne.

Quatre sols incubés en condition biotique, stimulée par la présence d'acétate et l'augmentation de la température, ont libéré des concentrations significatives d'As en solution (Annexe 6). Dans les incubations des sols D2 et D3, une solubilisation significative a été obtenue dans des conditions biotiques «aérobie en équilibre avec l'atmosphère» et «sous azote», alors qu'elle n'a été observée que «sous azote» dans les sols T5R et T12R (Joubert, 2008). Joubert (2008) a montré que le comportement de l'As n'est pas significativement

corrélé à la nature intrinsèque des échantillons de sol mais à la variation des facteurs environnementaux tels que l'augmentation de la température et la diminution de la teneur en oxygène. Dans la suite du texte et afin de simplifier les propos, les conditions menées «sous azote» ont été nommées «conditions anaérobies» et les conditions «aérobie en équilibre avec l'atmosphère» ont été appelées «conditions aérobies».

Ces facteurs régulent les activités microbiennes impliquées dans les processus de solubilisation de l'As, tels que la réduction de l'AsV et la réduction dissolutive des oxyhydroxydes de Fe, nommés HFO. Une corrélation positive et significative a également été déterminée entre les concentrations totales d'As et de Fe dans les conditions biotiques. Il est donc pertinent de penser que la rétention de l'As dans ces sols est principalement gouvernée par les HFO amorphes (Joubert, 2008).

En lien avec ces travaux, l'étude menée ici a consisté à rechercher les populations et mécanismes bactériens spécifiquement impliqués dans la transformation de l'As inorganique et susceptibles d'avoir influencé les cinétiques de solubilisation de l'As obtenues dans ces différentes incubations.

L'évolution des communautés bactériennes totales, ainsi que celle des communautés spécifiquement impliquées dans la transformation de l'As, ont été suivies en parallèle des cinétiques de libération d'As et de Fe. Puisque les HFO semblent gouverner la solubilité de l'As dans ces sols, les activités bactériennes favorisant la solubilisation de l'As à partir de ce support minéral ont également été évaluées et les communautés impliquées identifiées.

VII.2. Dynamique des communautés bactériennes dans des sols remobilisant l'As (études préliminaires)

Cette étude préliminaire a donc été menée sur les incubations des sols D2, D3, T5R et T12R mises en place par Joubert (2008). Pour un sol donné, les profils CE-SSCP des communautés bactériennes totales présentes en conditions aérobie et anaérobie (correspondant respectivement aux conditions 6 et 8 du plan d'expérience présenté Annexe 6) étaient initialement semblables, mais significativement différents après 14 jours d'incubation. La présence ou l'absence d'oxygène a logiquement influencé la structure de la communauté

bactérienne de départ, et explique probablement les différentes cinétiques de libération de l'As observées pour ces deux conditions.

Dans une même condition (aérobie ou anaérobie) et pour un sol donné, une modification de la structure de la communauté bactérienne totale a également été observée entre T0 et T14. En général, la composition de la population s'est stabilisée à partir de T14, excepté pour celle du sol D2 en condition anaérobie (condition 8). Les analyses statistiques des profils de ce sol confirment que la structure de la communauté bactérienne à T0 est significativement différente de celle à T14. Elle varie encore entre T14 et T20 et se stabilise jusqu'à T35 (Figure 49A et 49C). Ces changements sont corrélés aux modifications de cinétiques de solubilisation observées dans l'incubation du sol D2 menée en condition anaérobie (condition 8) (Figure 49B).

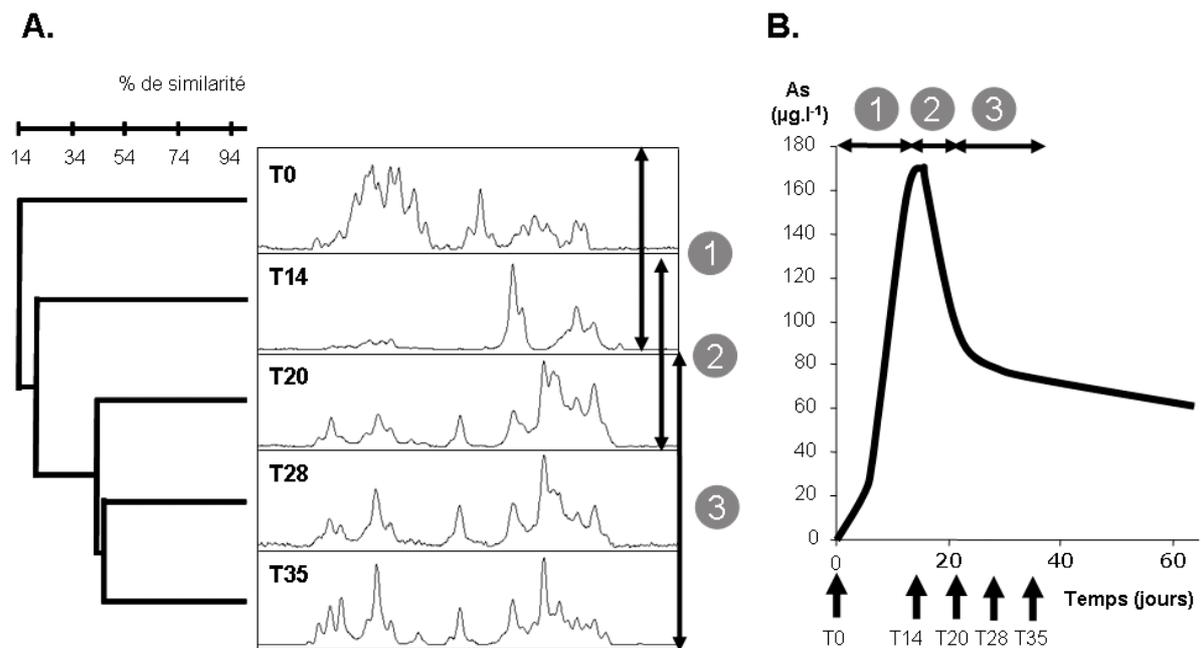


Figure 49 : Dynamique de la communauté bactérienne totale du sol D2 en condition anaérobie (condition 8) en fonction du temps (A), comparée à celle de la libération de l'As (B). Le dendrogramme issu des profils CE-SSCP montre le degré de similarité des communautés bactériennes. Un pic du profil CE-SSCP est considéré comme représentant une espèce bactérienne et les noeuds du dendrogramme montrent le pourcentage de similarité entre deux communautés bactériennes totales.

Les gènes *arrA*, requis pour la réduction directe de l'AsV piégé sur des HFO ont donc été recherchés dans les incubations des quatre sols menées en condition anaérobie, plus favorable à la respiration de l'AsV. Aucune amplification n'a été obtenue dans ces incubations, à l'aide de la méthode de détection proposée par Malasarn *et al.* (2004), contrairement aux résultats obtenus à partir des enrichissements en condition de réduction de ces sols (c.f. chapitre 6). L'absence de gènes *arrA* dans ces incubations suggère donc que la microflore respirant l'AsV et capable de libérer directement l'AsV piégé sur les HFO ne se soit pas développée. Puisque de fortes concentrations de Fe ont également été détectées dans cette condition (Joubert, 2008), la solubilisation d'As pourrait donc être due à l'action indirecte de bactéries FeIII-réductrices stimulées par la présence d'acétate et capables de dissoudre les HFO piégeant l'As. D'autre part, la détection des gènes *arsC* dans ces incubations indique la présence de bactéries capables de réduire l'AsV soluble en AsIII et peut donc expliquer la présence d'AsIII, forme majoritairement retrouvée en solution à la fin des incubations.

Ces gènes ainsi que les gènes *aoxB* ont été détectés dans les incubations aérobie et anaérobie de ces quatre sols. Ces résultats montrent la coexistence des activités d'oxydation de l'AsIII et de réduction de l'AsV dans un but de détoxification, et donc la possibilité d'une biotransformation réversible de l'As inorganique par la microflore indigène du sol.

Le sol T12R, le plus contaminé en As, a présenté une cinétique contrastée entre la condition aérobie et anaérobie (Joubert, 2008). En effet, une forte solubilisation est observée en condition anaérobie (condition 8), tandis que de très faibles concentrations d'As sont détectées en condition aérobie (condition 6) (Annexe 6). La suite de ce travail a donc été focalisée sur la compréhension des processus impliqués dans la mobilité de l'As dans ce sol.

En transformant l'AsIII, forme plus mobile, en AsV, qui tend à s'adsorber plus fortement sur les HFO dans la gamme de pH considérée, les bactéries AsIII-oxydantes, présentes dans les suspensions de sol en condition aérobie, ont pu favoriser indirectement l'immobilisation de l'As. La diversité des gènes *aoxB* en condition aérobie (condition 6), a été étudiée par construction d'une banque de clones avec les amorces m1-2F/m3-2R développées durant cette thèse. Huit profils distincts ont été obtenus après analyses de restriction de 12 inserts de clones sélectionnés au hasard. Les séquences représentant ces profils ont ensuite été groupées en 5 OTU sur la base d'une identité de séquence protéique de 90%. L'arbre phylogénétique, présenté Figure 50, montre que ces OTU sont affiliés aux séquences d' α -, β - et γ -

Proteobacteria. Les OTU affiliés aux α -*Proteobacteria* (T12R14-6-6 et T12R14-6-9) et γ -*Proteobacteria* (T12R14-6-5) sont éloignés des séquences de souches connues. Cependant, T12R14-6-9 présente 97,2 % d'identité avec l'OTU T12RSOL4 issu du sol original. Parmi les OTU affiliés aux β -*Proteobacteria*, T12R14-6-3 est proche de *Burkholderia* sp. YI019A (85,7% d'identité) et de l'OTU T12ROH3 (84% d'identité), tandis que l'OTU T12R14-6-1 présente 98,9% d'identité avec T12RSOL17. Ces résultats indiquent que la majorité des OTU retrouvés étaient initialement bien représentés dans le sol original. Les analyses de spéciation menées sur ce sol ont montré que l'AsV est exclusivement retrouvé dans la phase solide, suggérant que ces bactéries AsIII-oxydantes favorisent l'adsorption ou la coprécipitation de l'AsV avec les HFO présents dans le sol.

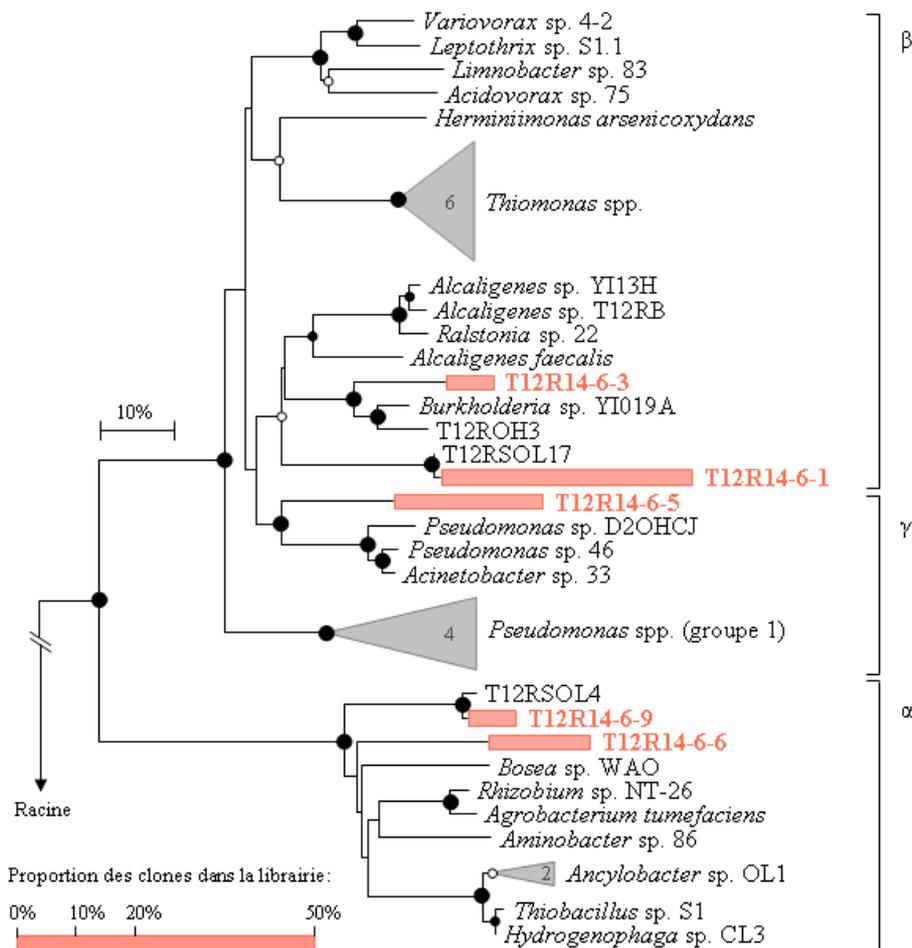


Figure 50 : Arbre phylogénétique Neighbor-Joining des séquences AoxB (330 acides aminés) issues du sol T12R incubé en condition aérobie (condition 6) au temps T14 (en rouge). Les séquences T12ROH3, T12RSOL17 et T12RSOL4 proviennent des clones issus du sol original (T12RSOL) et d'un enrichissement AsIII-oxydant en condition hétérotrophe (T12ROH). Le nombre de séquences d'un même genre est indiqué dans les triangles. Les séquences AoxB des souches AsIII-oxydantes *Thermus thermophilus* et *Chloroflexus aurantiacus* ont été utilisées en racine. Les cercles situés aux nœuds des branches représentent les valeurs de bootstrap sur 100 répliques: grand cercles noirs = 95-100%; petits cercles noirs = 75-95%; cercles blancs = 50-75%. L'échelle correspond à 10 mutations sur 100 résidus.

VII.3. Processus biogéochimiques impliqués dans la mobilité de l'As

Après cette étude préliminaire, de nouvelles incubations du sol T12R ont été menées dans cette thèse pour suivre plus finement le lien entre la spéciation et la mobilité de l'As, la stabilité des phases porteuses de type HFO, l'activité des communautés bactérienne présentes, et les principales caractéristiques du milieu (pH, Eh). Parallèlement au suivi du comportement de l'As initialement présent dans le sol, l'évolution de l'AsIII adsorbé à des HFO a été étudiée en condition aérobie plus propice à une oxydation de l'AsIII en AsV, tandis que l'évolution de l'AsV adsorbé à des HFO a été suivie en condition anaérobie plus propice à une réduction de l'AsV. Cette étude a permis non seulement de mieux comprendre l'effet de la microflore indigène sur le comportement de l'As initialement présent, mais également d'évaluer sa réponse à une accumulation d'As dans son milieu. La spéciation et les concentrations totales d'As en solution obtenues à la fin de ces incubations sont indiquées Figure 51. Les cinétiques de solubilisation de l'As sont présentées Annexe 7.

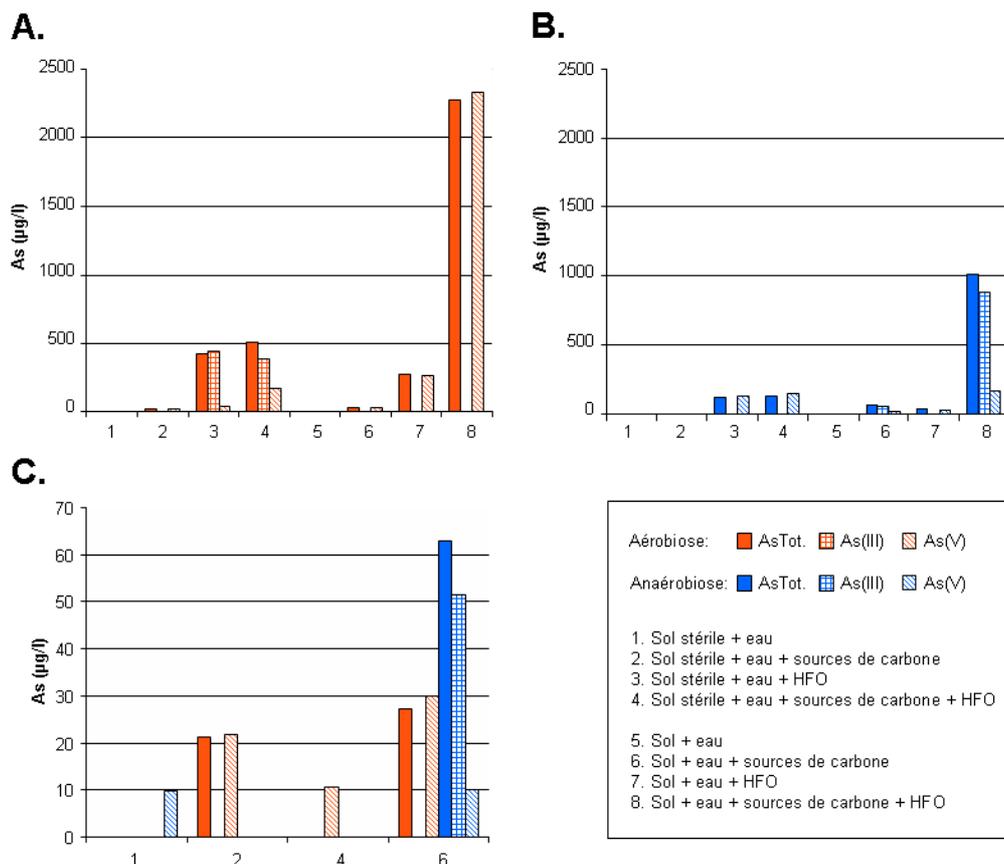


Figure 51 : Concentrations en As total, AsIII et AsV après 28 jours d'incubation du sol T12R en condition aérobie (A) et anaérobie (B). Les faibles concentrations obtenues en absence d'HFO sont indiquées en C, pour plus de précision.

VII.3.1. Influence de conditions oxydantes

Les concentrations initiales et finales d'As et de Fe, ainsi que les valeurs de pH dans la phase aqueuse des incubations en condition aérobie sont présentées Tableau 31.

Condition d'incubation	Test	pH		As ($\mu\text{g.l}^{-1}$)		Fe ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	
		T0	T28	T0	T28	T0	T28
Abiotique	1	6	7,2	<10*	<10*	51	66
	2	6,6	8,5	<10*	21	38	480
	3	6,4	7,7	278	420	8	14
	4	6,3	8,1	398	507	16	77
Biotique	5	6	7,8	<10*	<10*	192	129
	6	6,7	8,6	<10*	27	30	1880
	7	6,3	7,7	176	267	<5*	100
	8	7,3	8,5	231	2274	<5*	930

* Limite de détection

Tableau 31 : Principales caractéristiques de la phase aqueuse des incubations du sol T12R en condition aérobie aux temps initial (T0) et final (T28).

En absence d'HFO-AsIII (tests 1, 2, 5 et 6), aucune différence significative de libération d'As n'a été observée entre la condition biotique (tests 5 et 6) et abiotique (tests 1 et 2). Seulement une faible libération d'AsV, la forme initialement présente dans le sol, est observée dans les tests 2 et 6 (contenant des sources de carbone exogène) après 14 jours d'incubation (Figure 51C, Tableau 31 et Annexe 7). L'augmentation du pH observée dans les incubations et particulièrement dans celles contenant des sources de carbone exogène (Figure 52), peut expliquer la désorption de l'AsV à partir des phases solides du sol. Comme initialement, l'AsV est finalement détecté dans la phase solide en condition biotique et abiotique.

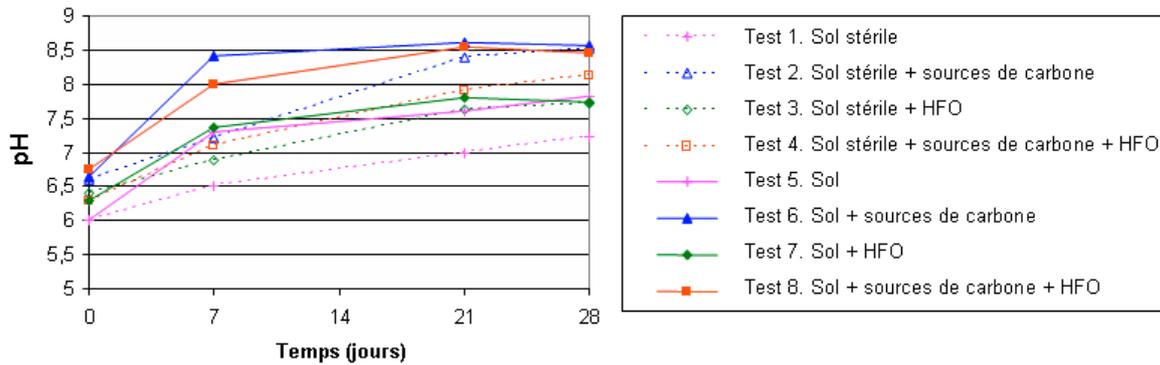


Figure 52 : Evolution du pH dans les tests aérobie du sol T12R.

En présence d'HFO-AsIII (tests 3, 4, 7 et 8), une libération d'As a été initialement observée dans tous les essais (Tableau 31). Elle correspond à une mise en équilibre de l'As entre la phase solide et la phase liquide. Elle est deux fois plus importante dans les tests abiotiques ($278 \mu\text{g.l}^{-1}$ pour le test 3 et $398 \mu\text{g.l}^{-1}$ pour le test 4) que dans les tests biotiques ($176 \mu\text{g.l}^{-1}$ pour le test 7 et $231 \mu\text{g.l}^{-1}$ pour le test 8).

Dans les tests abiotiques (tests 3 et 4), la vitesse moyenne de libération est similaire avec ou sans carbone exogène ($0,2 \mu\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ pour le test 3 et $0,4 \mu\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ pour le test 4). Comme initialement, l'As en solution est principalement retrouvé sous la forme d'AsIII (90%) après 28 jours d'incubation (Figure 51A), indiquant l'absence d'oxydation abiotique de l'AsIII. De même, comme au début des expériences, une majorité d'AsIII a finalement été retrouvé dans la phase solide de ces tests abiotiques.

Dans le test biotique 7 (sans ajout de sources de carbone exogène), la vitesse moyenne de libération est similaire à celle observée dans les tests abiotiques ($0,2 \mu\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Cependant, contrairement aux tests abiotiques dans lesquels de l'AsIII est majoritairement détecté, l'AsV est exclusivement retrouvé dans ce test après 28 jours d'incubation (Figure 51A). C'est également le cas dans le test biotique 8 (avec ajout de source de carbone exogène), où $2334 \mu\text{g.l}^{-1}$ d'AsV sont finalement détectés en solution (Figure 51A). Après 7 jours d'incubation, 85% de l'As solubilisé était sous la forme AsIII dans le test 7, alors que cette forme ne représentait que 57% de l'As libéré dans le test 8. Après 14 jours d'incubation, l'AsV a été exclusivement détecté dans ces deux tests et sa concentration a atteint $1250 \mu\text{g.l}^{-1}$ dans le test 8 et seulement $146 \mu\text{g.l}^{-1}$ dans le test 7 (Annexe 7). De plus, la vitesse moyenne de libération de l'As dans le test 8 ($4 \mu\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$), est 10 fois plus élevée que celle mesurée dans le test 4, son homologue abiotique ($0,4 \mu\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) et 20 fois plus élevée que celle mesurée dans le test 7 (sans ajout de sources de carbone exogène). Dans les deux tests biotiques 7 et 8, l'AsV est finalement majoritairement retrouvé (80%) dans la phase solide, contrairement aux tests

abiotiques 3 et 4, indiquant que l'AsIII initialement adsorbé sur les HFO était biodisponible pour être oxydé en AsV et que l'AsV soluble s'est ensuite réassocié avec les phases solides dans les conditions du milieu.

Ces résultats mettent clairement en évidence une bio-oxydation de l'AsIII provenant des HFO. Cette oxydation est plus rapide et importante en présence (test 8) qu'en absence (test 7) de carbone exogène, montrant que la communauté AsIII-oxydante est favorisée par une plus forte disponibilité des sources de carbone. Ces résultats suggèrent également une oxydation directe de l'AsIII adsorbé aux HFO, suivi de la libération de l'AsV dans le milieu. A ce jour, ce mécanisme de bio-oxydation direct de l'As piégé sur des phases porteuses minérales n'a pas encore été clairement prouvé. Toutefois, Rhine *et al.* (2008) ont montré que la souche *Bosea* sp. WAO, une bactérie autotrophe AsIII- et sulfo-oxydante, est capable d'améliorer la mobilisation d'As à partir de l'arsénopyrite (FeAsS), en oxydant totalement l'As et le soufre en AsV et sulfate et en colonisant préférentiellement la pyrite sur la surface de l'As piégé.

Une solubilisation significative de Fe a été observée dans les tests biotiques contenant des sources de carbone exogène (1880 $\mu\text{g.l}^{-1}$ et 930 $\mu\text{g.l}^{-1}$ dans les tests 6 et 8, respectivement) (Figure 53). Curieusement, une solubilisation plus élevée de Fe est observée dans le test 6, donc en absence d'HFO, où de très faibles concentrations en As ont été mesurées. Par contre, des valeurs généralement inférieures à 100 $\mu\text{g.l}^{-1}$ sont détectées dans les tests biotiques sans ajout de sources de carbone (tests 5 et 6) aussi bien que dans tous les tests abiotiques (tests 1, 2, 3 et 4) (Tableau 31), indiquant que la solubilisation de Fe est due à la microflore indigène et hétérotrophe du sol. Par ailleurs, les deux tests 6 et 8 présentent également les valeurs de pH les plus élevées tout au long du suivi, suggérant que l'activité microbienne ait contribué à l'augmentation du pH (Figure 52). Park *et al.* (2006) et Lee *et al.* (2005) ont également remarqué une élévation du pH dans des incubations de sédiments pollués par l'As menées en condition biotique et aérobie en présence de sources de carbone exogène. Park *et al.* (2006) ont attribué cette augmentation de pH à la sécrétion de produits du métabolisme bactérien. Cependant, si ces études ont mis en évidence une solubilisation de l'As et une bio-oxydation de l'AsV, elles n'ont pas montré de variation significative du Fe au cours du temps. En effet, le pH influence fortement l'adsorption de l'AsIII et de l'AsV sur les HFO et son augmentation cause la désorption de l'AsV et parfois de l'AsIII des HFO, mais celle-ci n'est pas concomitante à la dissolution des phases porteuses HFO (Jain *et al.*, 1999). L'importante

dissolution du Fe dans les tests 6 et 8 résulte donc probablement de l'activité de bactéries FeIII-réductrices.

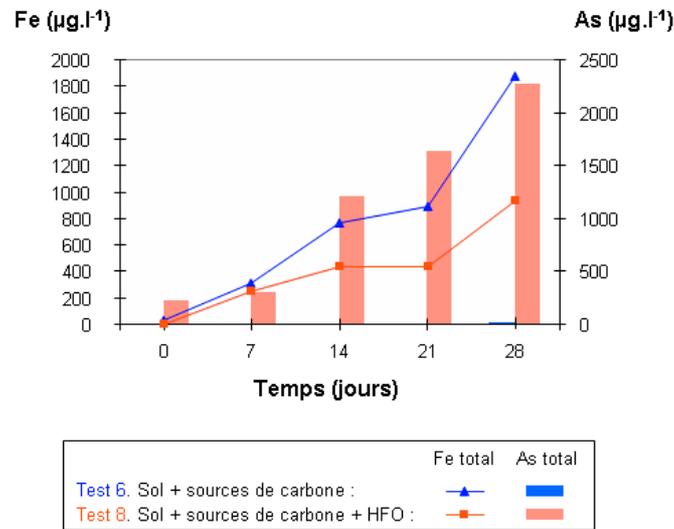


Figure 53 : Dynamiques des concentrations de Fe et d'As totales en solution dans les tests 6 et 8 du sol T12R en condition aérobie.

Plusieurs études ont montré que le Fe constitutif de phases porteuses minérales peut être solubilisé par les bactéries en condition aérobie. La bactérie aérobie obligatoire *Pseudomonas mendocina* est capable de solubiliser le Fe des oxy-hydroxydes, telles que l'hématite, la goethite, la ferrihydrite (Hersman *et al.*, 2001). Contrairement aux organismes anaérobies qui respirent les ions FeIII, cette bactérie ne peut pas utiliser ces ions comme accepteurs finaux d'électrons, mais ils restent des composés essentiels du processus métabolique. Comme beaucoup de microorganismes, *P. mendocina* produit des sidérophores pour fixer le Fe lors de période de carence (Hersman *et al.*, 1996), et ces sidérophores améliorent la dissolution des oxyhydroxydes de FeIII (Hersman *et al.*, 1995). De façon intéressante, des bactéries appartenant à l'espèce *P. mendocina* ont été récemment décrites pour leur capacité à résister et à oxyder de très fortes concentrations d'AsIII (Krumova *et al.*, 2008). De plus, Drewniak *et al.* (2008) ont récemment montré que des bactéries hétérotrophes AsV-résistantes sont capables de produire des sidérophores qui les aident à obtenir le FeIII des minéraux, tels que la scorodite, libérant ainsi l'AsV dans le milieu.

Bien que ces expériences aient été menées en condition aérobie, des conditions réductrices ont pu également se développer dans des microenvironnements, tels qu'au sein de biofilms bactériens. En effet, une des caractéristiques remarquable d'un biofilm est le développement de gradients à l'intérieur de celui-ci, comme ceux du pH et du Eh (Lee et Beveridge, 2001 ;

Costerton *et al.*, 1995). La combinaison d'un milieu liquide et solide contenant des microorganismes, au sein des incubations, a vraisemblablement favorisé cette organisation. Dans ce cas, un potentiel redox suffisamment faible a pu se former à l'intérieur d'un biofilm formé à la surface des phases minérales et favoriser le développement de bactéries anaérobies capable de dissoudre les oxy-hydroxydes de Fe. Néanmoins, l'ensemble de ces hypothèses doit être pris avec précaution et reste à vérifier.

L'évolution des communautés bactériennes totales a été suivie dans les tests 6 et 8 (Figure 54), où des solubilisations significatives d'As et de Fe ont été observées. Comme attendu, la mise en culture a modifié la structure des communautés bactériennes totales entre T0 et T7. Composées d'un pic majoritaire, les populations restent ensuite stables jusqu'à la fin du suivi. De manière surprenante, aucune différence significative n'a été observée en présence d'HFO-AsIII (test 8), donc en présence d'environ 10 fois plus d'As. Par conséquent, ces résultats limitent la distinction de bactéries spécifiquement impliquées dans la mobilité de l'As. Pourtant, l'analyse des communautés totales par CE-SSCP *via* le gène codant l'ARNr 16S semble être adaptée au criblage de similarités et de différences entre des populations bactériennes au cours du temps (Duthoit *et al.*, 2003) et en fonction de conditions données (Delbès *et al.*, 2001 ; Dassonville *et al.*, 2004). Toutefois, Loisel *et al.* (2006) ont montré que le nombre de pics d'un profil n'est pas représentatif du nombre d'espèces présentes dans l'écosystème considéré s'il est complexe. En effet, une saturation du nombre de pics aux environs de 35 est observée pour les profils obtenus à partir de milieux riches, ne reflétant donc pas la diversité présente. Cette saturation pourrait donc masquer une différence entre les communautés bactériennes totales des deux tests.

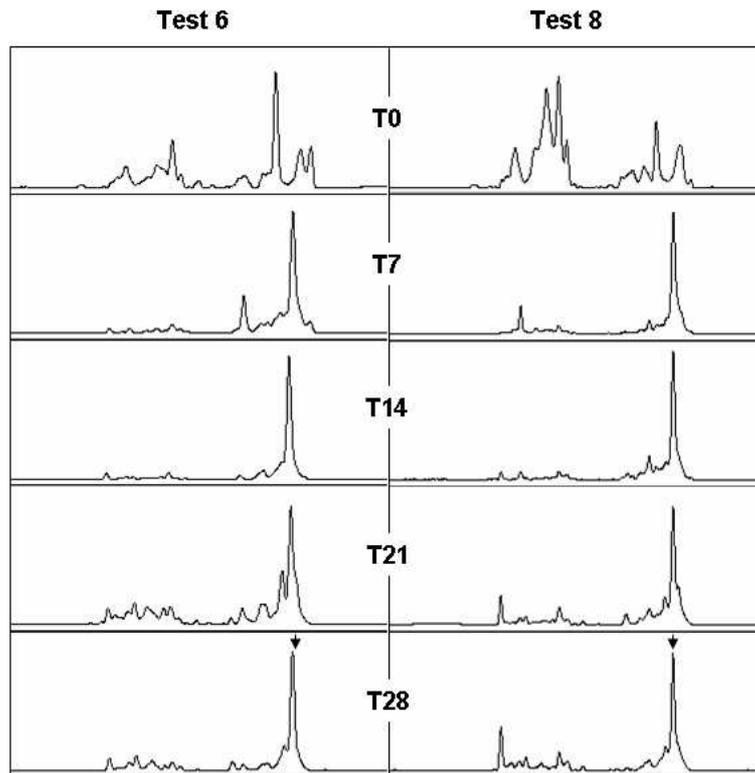


Figure 54 : Structures des communautés bactériennes totales des tests 6 et 8 du sol T12R menées en condition aérobie. Un pic est considéré comme représentant une espèce bactérienne.

Les communautés directement impliquées dans la bio-oxydation de l'AsIII ont ensuite été spécifiquement étudiées. Les gènes *aoxB* ont été préalablement détectés à partir des suspensions de sols des tests 6 et 8, indiquant que l'oxydation de l'AsIII initialement adsorbé sur les HFO dans le test 8 et le maintien de la forme AsV dans le test 6, peuvent résulter de l'activité du système enzymatique AoxAB. La Figure 55 présente l'évolution des communautés bactériennes dotées de gènes *aoxB* dans ces deux tests. Durant toute l'expérience, des profils DGGE complexes sont obtenus, indiquant le développement de diverses bactéries AsIII-oxydantes. A T7, les profils des communautés des deux tests présentent de nombreuses similitudes. Cependant, deux bandes dominent le profil du test 6, tandis que 3 prédominent dans le test 8. Après 21 jours d'incubation, des différences significatives sont remarquées entre la structure de ces deux communautés. Contrairement à la structure de la communauté du test 8, celle du test 6 n'a pas présenté de stabilisation à la fin du suivi. Les profils des communautés bactériennes AsIII-oxydantes des tests 6 et 8 sont finalement nettement différents (Figure 55). Contrairement à la structure des communautés bactériennes totales, leur structure varie donc clairement en fonction de la présence ou non d'HFO-AsIII et explique probablement les différences de cinétiques de l'As observées entre ces deux tests.

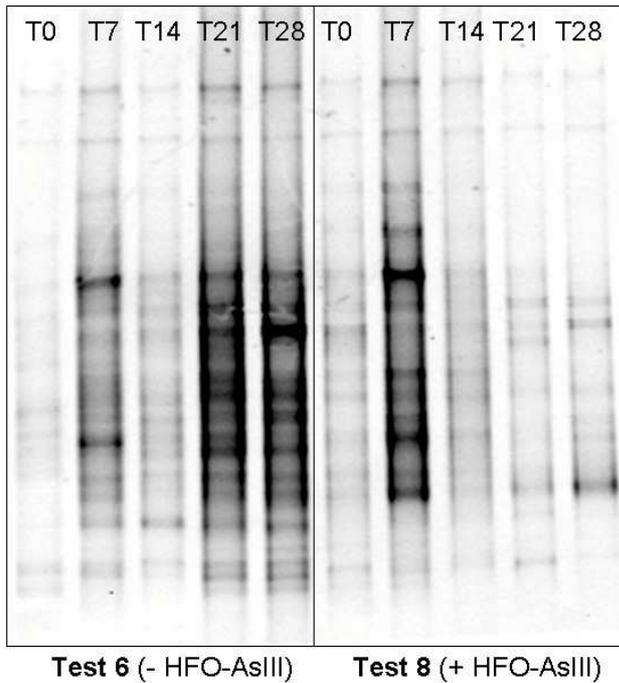


Figure 55 : Dynamique de la communauté bactérienne AsIII-oxydante des tests 6 et 8 du sol T12R en condition aérobie.

Les bactéries potentiellement impliquées dans l'oxydation de l'AsIII initialement adsorbé aux HFO dans le test 8 ont été identifiées par l'analyse d'une librairie de clones *aoxB*. Les 21 clones sélectionnés au hasard ont conduit à 19 profils distincts après analyse de restriction. Ces derniers ont ensuite été groupés en 13 OTU sur la base d'une identité de séquence de 90%. Seules des séquences apparentées à celle de gènes *aoxB* ont été retrouvées.

Ces OTU sont affiliés à des séquences d' α - et β -*Proteobacteria* (Figure 56). Parmi les β -*Proteobacteria*, l'OTU T12RA8-15 est affilié aux séquences de *Variovorax* spp. (96,5% d'identité). L'OTU T12RA8-8 présente 96,5 % d'identité avec la séquence de *Leptothrix* sp. S1.1 et 88,9 % d'identité avec *Bosea* sp. WAO, capable d'améliorer la mobilisation d'As à partir de l'arsénopyrite (FeAsS) et supposée être directement impliquée dans l'oxydation de l'As à partir des phases minérales porteuses (Rhine *et al.*, 2008). Trois OTU présentent de fortes similitudes avec ceux du sol T12R original (c.f. chapitre 3) : T12RA8-7 est affilié à l'OTU T12RSOL3, T12RA8-17 présente 91,8% d'identité avec l'OTU T12RSOL15 et T12RA8-20, pourtant éloigné des séquences *AoxB* des α -*Proteobacteria* AsIII-oxydantes connues, est affilié avec l'OTU T12RSOL5 (91,1% d'identité). Les OTU T12RA8-7 et T12RA8-16 partagent également une forte identité avec des clones environnementaux, respectivement LYC4 (91,7%) et LYC3 (90,6%), issus de sédiments d'un lac contaminé par des déchets industriels (Yangebog, Australie, Inskeep *et al.*, 2007), indiquant, encore une fois, l'ubiquité de certaines espèces bactériennes AsIII-oxydantes et la largesse de leur répartition

géographique. Les autres séquences présentent des pourcentages d'identités inférieurs à 90% avec des séquences de souches AsIII-oxydantes connues ou de clones environnementaux (Annexe 8).

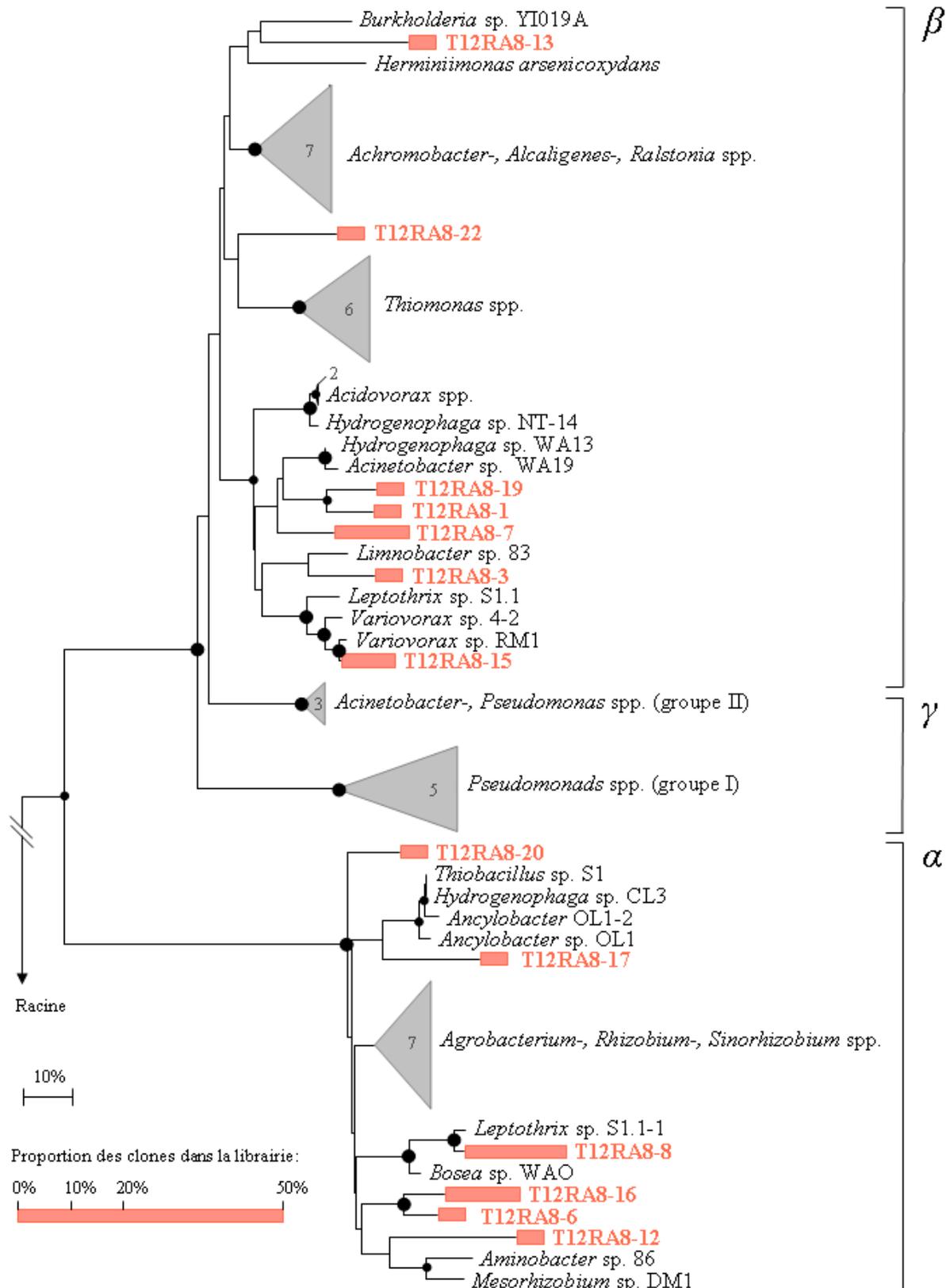


Figure 56 : Arbre phylogénétique Neighbor-Joining des séquences protéiques AoxB dans le test 8 du sol T12R en condition aérobie après 28 jours d'incubation. Le nombre de séquences d'un même genre est indiqué dans les triangles. Les séquences AoxB des souches AsIII-oxydantes *Chloroflexus aurantiacus* et *Thermus* spp. ont été utilisées en racine. Les cercles situés aux nœuds des branches représentent les valeurs de bootstrap sur 100 répliquas: grand cercles noirs = 95-100%; petits cercles noirs = 75-95%; cercles blancs = 50-75%. L'échelle correspond à 10 mutations sur 100 résidus.

En résumé de ces résultats en condition oxydante, une faible libération d'As a été observée à partir des incubations du sol T12R non dopé en As menées en condition aérobie, en accord avec les résultats obtenus durant la thèse d'A. Joubert (2008). Par contre, une libération et une oxydation significative d'AsIII a été menée par la microflore indigène dans les suspensions de sol dopé en HFO-AsIII. Les différentes cinétiques de solubilisation de l'As dans ces incubations aérobies sont concomitantes à un changement de communauté AsIII-oxydante, suggérant le développement d'une communauté spécifiquement impliquée dans l'oxydation de l'AsIII à partir des HFO.

VII.3.2. Influence de conditions réductrices

Les concentrations initiales et finales d'As et de Fe, ainsi que les valeurs de pH et de Eh dans la phase aqueuse des incubations en condition anaérobie sont présentées Tableau 32.

Condition d'incubation	Test	pH		Eh (mV)		As ($\mu\text{g.l}^{-1}$)		Fe ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	
		T0	T28	T0	T28	T0	T28	T0	T28
Abiotique	1	7,6	7,9	131	101	<10*	<10*	58	97
	2	7,5	8,1	127	64	<10*	<10*	22	38
	3	7,7	7,9	121	88	37	119	44	32
	4	7,7	7,7	69	103	38	123	26	18
Biotique	5	8,4	8,0	105	73	<10*	<10*	80	74
	6	8,2	7,6	175	-203	<10*	63	17	980
	7	8,4	7,8	121	20	8	33	60	27
	8	8,1	7,5	152	-200	12	1019	15	1700

* Limite de détection

Tableau 32 : Principales caractéristiques de la phase aqueuse des incubations du sol T12R en condition anaérobie aux temps initial (T0) et final (T28).

En absence d'HFO-AsV (tests 1, 2, 5 et 6), une solubilisation d'As a été observée dès 7 jours dans le test biotique 6 (en présence de carbone exogène). Après 28 jours d'incubation, 63 $\mu\text{g.l}^{-1}$ d'As ont été détectés en solution, principalement sous forme d'AsIII (82%) (Figure 51C). Cette concentration d'As total est 2,5 fois plus élevée que celle obtenue en condition aérobie, où l'AsV avait finalement été exclusivement retrouvé, indiquant que la condition anaérobie a favorisé la solubilisation de l'As. Aucune libération d'As n'a été observée dans le test biotique 5 (sans sources de carbone exogène), ni dans les tests abiotiques 1 et 2, indiquant une

réduction microbienne de l'AsV initialement présent dans le sol, stimulée par l'ajout d'une source de carbone exogène.

En présence d'HFO-AsV (tests 3, 4, 7 et 8), une légère libération d'As a initialement été observée dans tous les tests (Tableau 32). Elle est plus importante en condition abiotique qu'en condition biotique, qui présente les valeurs de pH les plus élevées, indiquant un effet marqué de la stérilisation par la chaleur (autoclavage).

Dans les tests abiotiques (tests 3 et 4), la vitesse moyenne de libération n'a pas été affectée par l'ajout de source de carbone exogène ($0,1 \mu\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ pour les tests 3 et 4), et environ $120 \mu\text{g.l}^{-1}$ d'As ont finalement été retrouvés (Tableau 32 et Figure 51B). De plus, l'AsV a exclusivement été détectée en solution (Annexe 7), montrant une absence de réduction de l'AsV en AsIII en absence de microorganismes.

Dans le test biotique 7 (en présence d'HFO-AsV, mais sans source de carbone exogène), une lente et faible libération d'As a eu lieu au cours de l'expérience ($0,02 \mu\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$), puisque seulement $33 \mu\text{g.l}^{-1}$ d'As, uniquement sous forme AsV, sont finalement retrouvés en solution, indiquant une absence de réduction de l'AsV dans ces conditions (Figure 51B). Au contraire, l'addition de source de carbone exogène (test 8) a permis de multiplier par 60 la vitesse moyenne de libération ($1,37 \mu\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) et de solubiliser $1019 \mu\text{g.l}^{-1}$ d'As, essentiellement sous forme AsIII (85%), à la fin de l'expérience (Tableau 32 et Figure 51B). La détection exclusive de l'AsIII en solution dans les tests biotiques 6 et 8 contenant des sources de carbone exogènes, ainsi que l'absence de réduction de l'AsV dans les tests abiotiques, indiquent que la microflore du sol est capable de réduire l'AsV en AsIII en condition hétérotrophe.

L'AsV, exclusivement détecté dans la phase solide en début d'expérience (c.f. chapitre 2, paragraphes II.1 et II.3) reste majoritairement détecté dans cette phase en condition abiotique (80%) et en condition biotique sans ajout de carbone exogène (60%) après 28 jours d'incubation. Par contre, l'AsIII prédomine dans la phase solide (60%) des tests biotiques en présence de carbone exogène (tests 6 et 8), indiquant que la majorité de l'AsV initialement présent était biodisponible pour la réduction de l'AsV en AsIII et que l'AsIII soluble s'est ensuite réassocié aux phases porteuses présentes dans l'incubation. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Campbell *et al.* (2006) à partir d'incubations biotiques de sédiments du réservoir Haiwee (Californie) en présence d'HFO-AsV exogène. En effet, ces auteurs ont également montré une prédominance de l'AsIII non seulement dans la phase aqueuse, mais également dans la phase solide. Par contre, Burnol *et al.* (2007) ont mis en

évidence une prédominance de l'AsIII dans la phase aqueuse coexistant avec une prépondérance d'AsV dans la phase solide, dans des incubations biotiques en présence d'HFO-AsV identiques à ceux ajoutés dans nos expériences. Il est important de noter que ces auteurs avaient incubé ces HFO-AsV en présence d'une communauté obtenue d'un enrichissement de bactéries FeIII-réductrices. Ce groupe métabolique est donc probablement plus abondant que les bactéries AsV-réductrices dans cette communauté. A noter que les gènes *arrA* (marqueur des bactéries respirant l'AsV) n'ont pas été détectés à partir de cette communauté. Par contre, comme la microflore indigène au sol du réservoir d'Haiwee, connue pour contenir des bactéries respirant l'AsV (Malasarn *et al.*, 2004), la microflore indigène du sol T12R présente également des bactéries capables de respirer l'AsV (voir paragraphes suivants). Ces résultats mettent donc en évidence l'importance du rôle des communautés bactériennes présentes, dans la spéciation et la mobilité de l'As dans les sols et sédiments.

Par ailleurs, les plus fortes variations de pH et d'Eh ont été remarquées dans les tests 6 et 8, donc en présence de carbone exogène, dans lesquels une libération significative d'AsIII a été observée. Dans ces tests, les valeurs de pH ont diminué d'une unité entre T0 et T7, puis ont augmenté jusqu'à T14 et se sont finalement stabilisées jusqu'à la fin du suivi (Figure 57). Dans ces mêmes tests, une diminution significative du Eh a également été observée entre T0 et T7, atteignant -124 mV et -167 mV dans les tests 6 et 8, respectivement. Après 14 jours, des valeurs stables et inférieures à -200 mV en moyenne ont été détectées (Figure 57). Dans les tests biotiques 5 et 7 sans sources de carbone exogène, une diminution linéaire est observée entre T0 et T21 (atteignant -92 mV dans le test 5 et -170 mV dans le test 7), mais est suivie d'une augmentation de T21 à T28 (Figure 57). Dans ces derniers tests, une évolution du pH similaire à celles des tests 6 et 8, mais moins marquée, a été observée. Aucune variation significative n'a été remarquée dans les tests abiotiques, indiquant que les bactéries indigènes influencent significativement l'évolution du pH et du Eh. Comme attendu, l'addition de source de carbone exogène a stimulé leur activité et a conduit à une accélération de la diminution du Eh des suspensions de sol. Ces conditions réductrices ont donc favorisé la bio-réduction de l'AsV. Chatain *et al.* (2005) ont également montré que la microflore indigène du sol d'une ancienne mine d'or, stimulée par l'addition de sources de carbone, conduisait à une nette diminution du potentiel redox concomitante à une solubilisation significative d'As, principalement sous forme AsIII à la fin des incubations menées en condition anaérobie.

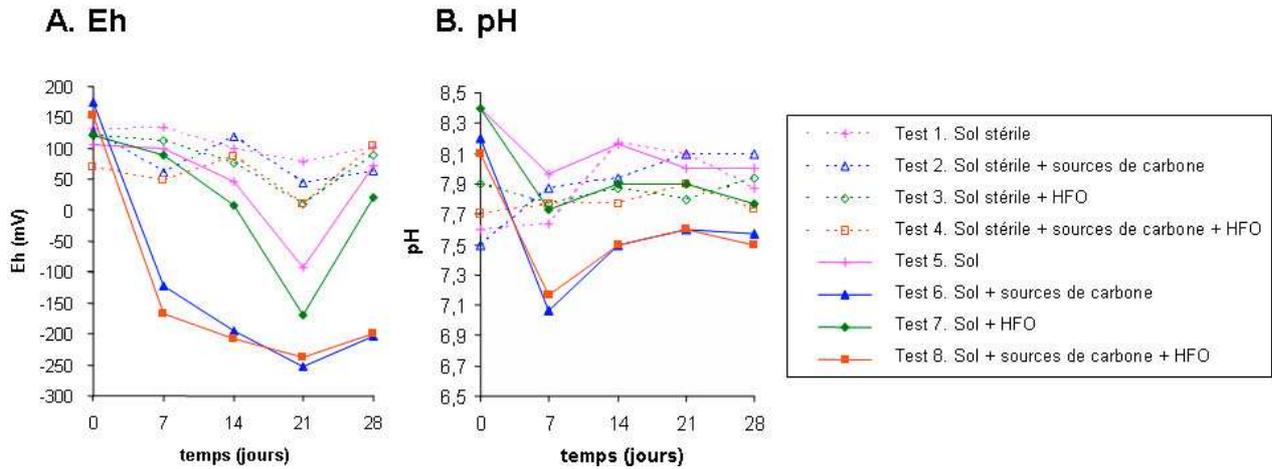


Figure 57 : Evolution du pH et du Eh dans les tests anaérobies du sol T12R.

Une solubilisation significative de Fe a également été observée dans les tests biotiques 6 et 8 contenant des sources de carbone exogène (Figure 58). Cette forte solubilisation est finalement deux fois plus élevée en présence d'HFO-AsV ($1700 \mu\text{g.l}^{-1}$ dans le test 8) qu'en son absence ($980 \mu\text{g.l}^{-1}$ dans le test 6), et est étroitement liée à la solubilisation de l'As (Figure 58). Dans le test 6, donc en absence d'HFO-AsV exogène, elle est 15 fois plus importante que celle de l'As (Tableau 32), suggérant (i) une dissolution d'HFO (ou autres oxy-hydroxydes de Fe) non porteurs d'As par l'activité de bactéries FeIII-réductrices, (ii) une dissolution d'HFO-AsV, présentant un faible ratio molaire As/Fe, par des bactéries FeIII-réductrices et/ou AsV-réductrices. Dans le test 8, les concentrations de Fe et d'As exclusivement solubilisées à partir des HFO-AsV ($[\text{Fe ou As}]_{\text{HFO-AsV}} = [\text{Fe ou As}]_{\text{Test8}} - [\text{Fe ou As}]_{\text{Test6}}$) sont généralement similaires au cours de l'expérience ($318 \mu\text{g.l}^{-1}$ et $333 \mu\text{g.l}^{-1}$ d'As et de Fe à T7, respectivement, puis $956 \mu\text{g.l}^{-1}$ et $720 \mu\text{g.l}^{-1}$ à T28). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Burnol *et al.* (2007) à partir d'incubations des mêmes HFO-AsV avec une communauté principalement constituée de bactéries FeIII-réductrices et d'au moins une souche respirant l'AsV. En effet, ces auteurs ont montré que la proportion d'As libéré est très similaire à celle du Fe solubilisé après 28 jours d'incubation, indiquant le rôle non négligeable que peuvent jouer les bactéries FeIII-réductrices dans la libération de l'As dans nos incubations.

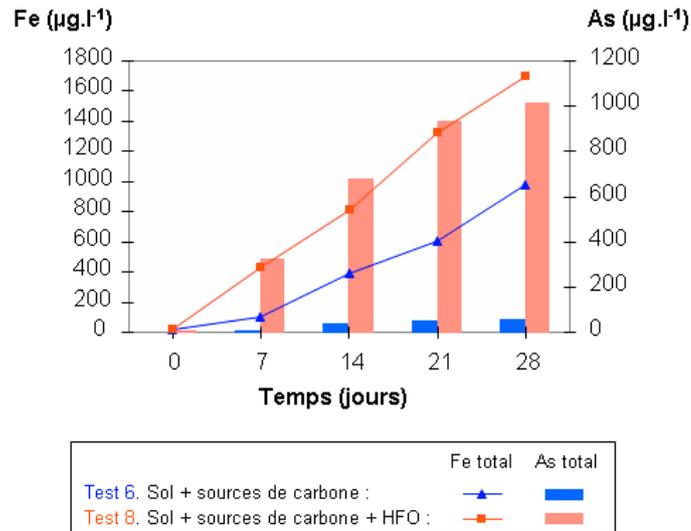


Figure 58 : Dynamiques des concentrations de Fe et d'As totales en solution dans les tests 6 et 8 du sol T12R en condition anaérobie.

Par conséquent, les solubilisations significatives d'As, essentiellement retrouvé sous forme AsIII, dans les tests 6 et 8 peuvent résulter de : (i) la libération indirecte de l'AsV sur les HFO par des bactéries respirant les ions FeIII, suivie par une réduction de l'AsV libéré par des bactéries respirant l'AsV, (ii) l'activité de bactéries qui respirent l'AsV adsorbé sur les HFO, ou le réduisant dans une but de détoxification, ou (iii) par une combinaison des deux (Figure 59).

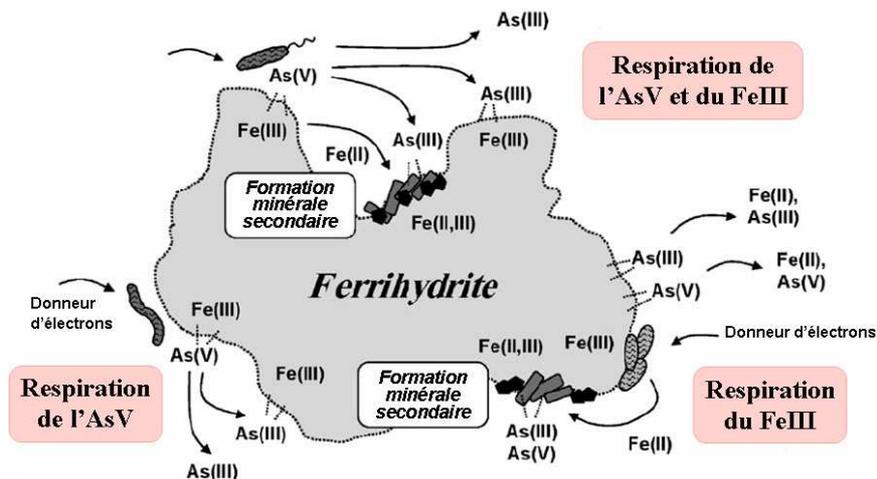


Figure 59 : Effet des processus bactériens anaérobies sur la mobilité de l'As dans des systèmes d'oxy-hydroxydes de Fe (d'après Herbel et Fendorf, 2006). La libération d'As est initialement réalisée par réduction de l'AsV et du FeIII, ensuite la réadsorption et la séquestration de l'As par les minéraux de FeII réduit et la matière organique peuvent affecter les processus de transfert. La désorption compétitive domine la libération de l'As en condition abiotique ou quand la réduction du FeIII n'est pas réalisée.

La dynamique des communautés bactériennes totales a été suivie dans les tests 6 et 8 (Figure 60), où une libération significative d'As et de Fe a été observée. Comme observé dans les études préliminaires, l'absence d'oxygène a rapidement orienté le développement de communautés bactériennes différentes de celles retrouvées en condition aérobie (c.f. Figure 54) et explique probablement les différentes cinétiques d'As et de Fe. La structure de la communauté obtenue en condition anaérobie est plus complexe que celle observée en condition aérobie. Deux pics (2 et 3) deviennent plus significatifs au cours du temps pour dominer à la fin de l'expérimentation (Figure 60). Comme observé en condition aérobie, la communauté bactérienne totale du test 8 est similaire à celle du test 6 (Figure 60) et visiblement, seul le pic 1 est absent du profil du test 8, indiquant que la présence de 10 fois plus d'As dans son milieu n'ait altéré que faiblement sa structure. Par ailleurs, l'intensité des pics 4 et 5 a nettement diminué au cours du temps dans le test 6 (Figure 60). L'évolution de ces communautés totales est certainement dépendante de nombreux paramètres et n'est sûrement pas seulement liée au développement de bactéries impliquées dans la transformation de l'As. Il est donc difficile de corréliser une modification de la structure des communautés bactériennes totales du sol aux cinétiques de libération de l'As.

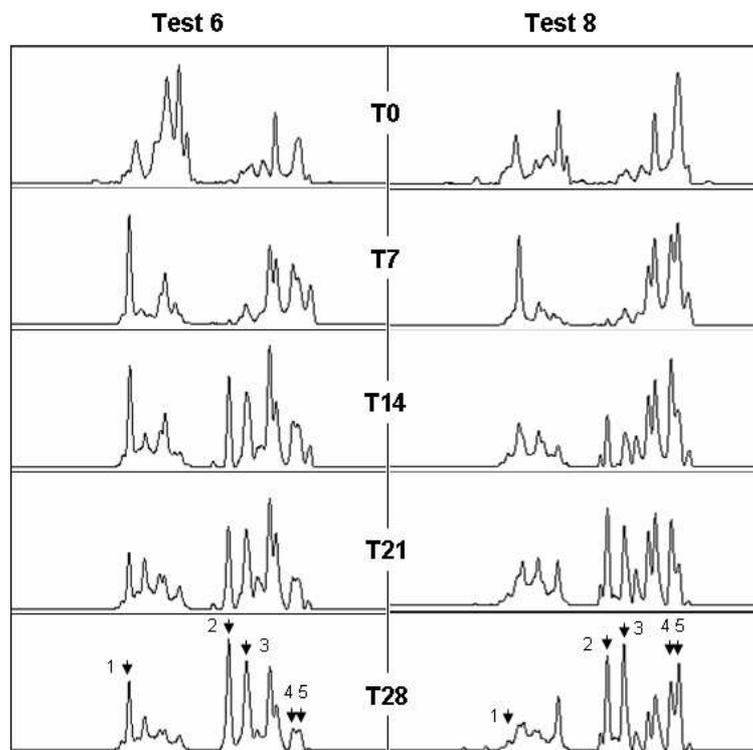


Figure 60 : Structures des communautés bactériennes totales des tests 6 et 8 du sol T12R en condition anaérobie. Un pic est considéré comme représentant une espèce bactérienne.

Les gènes spécifiquement impliqués dans la réduction bactérienne de l'AsV ont donc été également recherchés dans les tests 6 et 8.

Comme dans les expériences préliminaires, aucune amplification des gènes *arrA* n'a été obtenue avec le couple d'amorces ArrAfwd/ArrArev développé par Malasarn *et al.* (2004). Par contre, des fragments spécifiques de taille attendue (environ 500 pb) ont été détectés à partir des tests 6 et 8, à l'aide des amorces HAarrA-D1F/HAarrAG2R (Kulp *et al.*, 2006). Bien que les gènes *arrA* n'aient pas été détectés initialement dans les sols (à l'aide de ces deux couples d'amorces) et dans les suspensions de sol au début des expériences, des bactéries capables de respirer l'AsV sont bien indigènes à ce sol et se sont développées en anaérobiose. De plus, aucune amplification des gènes *arsC* n'a été obtenue dans ces incubations anaérobies, suggérant que la solubilisation de l'As est ici aussi essentiellement due à la respiration de l'AsV *via* le système ArrAB, bien que la méthode de détection des gènes *arsC* puisse être remise en cause (c.f. paragraphe VI.2).

Deux bibliothèques de gènes *arrA* ont été construites pour identifier un potentiel changement de la composition des communautés respirant l'AsV lié à la présence d'HFO-As : l'une à partir des fragments obtenus du test 6 (sans HFO) et l'autre à partir de ceux issus du test 8 (avec HFO), à la fin des expérimentations (T28). A partir du test 6, trois profils distincts ont été obtenus après analyses de restriction de 21 inserts issus de clones sélectionnés au hasard. Le clone T12RANA6-3 domine la bibliothèque (81%) et les autres clones T12RANA6-7 et T12RANA6-5 représentent moins de 10% chacun. A partir du test 8, l'analyse de restriction de 20 inserts issus de clones pris au hasard a produit 2 profils de restriction distincts. Les clones T12RANA8-9 et T12RANA8-2 représentent 70% et 30% de la bibliothèque, respectivement ; cependant, la séquence de l'insert du clone T12RANA8-9 n'est pas apparentée aux gènes *arrA*.

La séquence T12RANA6-3, dominant la bibliothèque du test 6 (sans HFO), présente 76% d'identité avec celle de *Desulfosporosinus* sp. Y5 (Figure 61). Les séquences T12RANA6-5 et T12RANA6-7 sont éloignées des séquences de souches connues pour respirer l'AsV (57% et 58% d'identité en moyenne, respectivement) (Annexe 9). La séquence T12RANA8-2, issue du test 8 (avec HFO), partage seulement 66% d'identité avec la δ -Protéobactérie MLMS-1. L'ensemble des séquences retrouvées dans ces incubations sont éloignées de celles rencontrées dans d'autres environnements (Kulp *et al.*, 2006, Lear *et al.*, 2007).

Ces résultats montrent que des communautés distinctes respirant l'AsV se sont développées dans les incubations 6 et 8. Elles sont également différentes de celles rencontrées dans l'enrichissement du même sol (c.f. chapitre 7), indiquant qu'une grande diversité de ce groupe

métabolique est présente dans le sol T12R, et que certaines espèces plutôt que d'autres vont se développer selon les conditions du milieu.

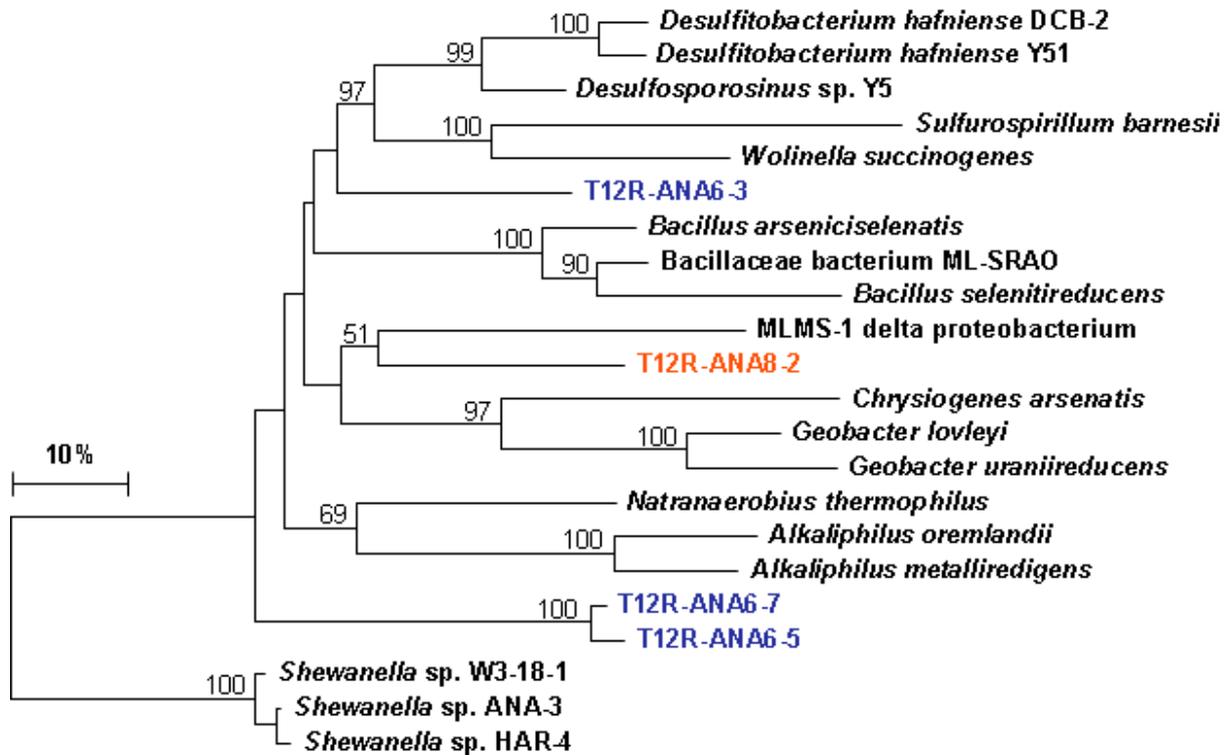


Figure 61 : Arbre phylogénétique Neighbor-Joining des séquences protéiques ArrA des tests 6 et 8 du sol T12R en condition anaérobie après 28 jours d'incubation. Les séquences ArrA des souches respirant l'AsV du genre *Shewanella* ont été utilisées en racine. Les valeurs de bootstrap indiquées aux nœuds des branches ont été obtenues sur 100 répliques. L'échelle correspond à 10 mutations sur 100 résidus.

VII.4. Conclusion

La microflore indigène des sols industriels étudiés joue un rôle important dans les processus de mobilisation ou d'immobilisation de l'As présent. Celle du sol T12R, stimulée par l'ajout de source de carbone, est capable de solubiliser significativement l'As et le Fe initialement présent, aussi bien que ceux des HFO-As exogènes, selon les conditions redox du milieu.

En accord avec les résultats précédemment obtenus durant la thèse de Joubert (2008), les conditions anaérobies ont favorisé la solubilisation de l'As initialement présent dans le sol T12R, en stimulant la réduction microbienne de l'AsV en AsIII et la réduction dissolutive microbienne des oxy-hydroxydes de Fe piégeant l'As. Des résultats similaires ont également

été obtenus par Park *et al.* (2006) à partir d'incubations de sédiments (contenant 25 mg.kg⁻¹ d'As) conduites en conditions aérobie et anaérobie. Les différentes études montrant le rôle important de la microflore indigène sur la solubilisation de l'As en condition anaérobie ont indiqué l'implication de bactéries FeIII-réductrices et/ou de bactéries respirant l'AsV. L'activité de celles-ci peut entraîner la solubilisation de l'As après la libération de Fe (Islam *et al.*, 2004), de façon simultanée à celle du Fe (Park *et al.*, 2005, Anawar *et al.*, 2006) et/ou avant celle du Fe (Campbell *et al.* 2006). Dans nos expériences menées en présence ou en absence d'HFO-AsV, l'importante libération de Fe concomitante à celle de l'AsIII indique une relation étroite entre la solubilisation de ces deux éléments et donc l'implication de bactéries FeIII-réductrices. Pourtant, la présence de bactéries respirant l'AsV, identifiées *via* les gènes *arrA*, vraisemblablement à l'origine de la bioréduction de l'AsIII en AsV, laisse envisager une libération directe de l'As. De plus, deux communautés distinctes et respirant potentiellement l'AsV ont été mises en évidence (*via* les gènes *arrA*) à partir des incubations de sols amendés ou non par des HFO-AsV, suggérant qu'elles jouent un rôle important et spécifique sur les différents profils de solubilisation de l'AsIII observés.

La microflore indigène du sol T12R est également capable de solubiliser et d'oxyder significativement l'AsIII adsorbé sur des HFO, indiquant le développement d'une communauté AsIII-oxydante. Suivie *via* les gènes *aoxB*, cette communauté bactérienne est nettement modifiée par la présence d'HFO-AsIII, suggérant l'implication d'une communauté spécifique capable d'oxyder l'AsIII initialement adsorbé aux HFO. Cette dernière communauté est notamment représentée par des gènes *aoxB* proches de celui de l' α -Protéobactérie *Bosea* sp. WAO, capable d'améliorer la mobilisation d'As à partir de l'arsénopyrite (FeAsS) et supposée être directement impliquée dans l'oxydation de l'As à partir de phases minérales porteuses (Rhine *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent donc une biooxydation directe de l'AsIII adsorbé aux HFO, suivie de la libération de l'AsV dans le milieu.

L'ensemble de ces travaux montre que les activités d'oxydation de l'AsIII et de réduction de l'AsV observées dans ces incubations résultent du développement de différentes communautés indigènes du sol. Le suivi des communautés bactériennes totales présentes dans ces incubations n'a pas permis de mettre en évidence de perturbations notables liées à la présence d'HFO-As dans leur milieu. A l'inverse, une nette variation de la composition des communautés AsIII-oxydantes ou respirant l'AsV a été observée en présence d'HFO-As,

suggérant un effet spécifique sur les différentes cinétiques de libération de l'As. L'utilisation des gènes fonctionnels *aoxB* et *arrA* s'est révélée être appropriée pour suivre ces communautés et évaluer les transformations potentielles de l'As inorganique. Ces gènes (et ces communautés) sont donc des bioindicateurs pertinents de la biodisponibilité de l'As dans l'environnement.

VIII. Réponse des communautés bactériennes indigènes de sols agricoles (faiblement pollués) à une accumulation d'As

VIII.1. Contexte

Le bassin aval du Gallego (Aragon, Espagne) est caractérisé par d'importantes activités agricoles et l'aménagement de canaux d'irrigation, à proximité des activités industrielles de la ville de Saragosse. L'épandage des boues et sous-produits urbains et industriels, ainsi que les retombées atmosphériques des fumées industrielles inhérentes aux activités de cette ville peuvent considérablement accroître les concentrations de métaux et d'As dans les sols agricoles et induire un risque de contamination des eaux et des cultures.

Néanmoins, les trois sols agricoles G04, G05 et G07, prélevés à différents endroits de ce bassin, sont peu pollués en As, contrairement à ceux du site industriel de Flémalle du bassin de la Meuse (c.f. chapitre 2). Leurs teneurs en As sont représentatives de celles généralement retrouvées au sein des sols de l'Aragon, 12 mg.kg^{-1} en moyenne (Navas et Machin, 2002). Cependant, la concentration en As des sols n'est pas forcément indicatrice de l'As libéré dans la phase aqueuse (Joubert, 2008). Lors d'événements pluvieux ou d'irrigation de plus ou moins forte intensité, les sols de surfaces du bassin du Gallego peuvent retenir l'eau pendant plusieurs jours et entretenir des conditions saturées, sous une température modérée typique d'un climat méditerranéen, favorisant la libération d'As piégé sur des phases porteuses.

Dans le cadre de cette étude, il s'agissait d'évaluer l'effet de l'activité microbienne indigène des sols peu pollués, donc à priori de microorganismes moins adaptés à la présence d'As, sur le devenir de ce métalloïde lors d'une pollution graduelle d'As piégé sur une phase porteuse. Une approche similaire à celle décrite dans le chapitre 7 a été mise en place. L'évolution de l'As^{III} adsorbé à des HFO a été étudiée en condition aérobie propice à une oxydation de l'As^{III} en As^V, tandis que l'évolution de l'As^V adsorbé à des HFO a été suivie en condition anaérobie propice à une réduction de l'As^V. Par contre dans cette étude, ces sols ont été amendés par trois concentrations d'As : 50 mg.kg^{-1} (**condition c1**), 500 mg.kg^{-1} (**condition c2**) et 1000 mg.kg^{-1} (**condition c3**) (c.f. chapitre 2). Les cinétiques de libération de l'As, ainsi

que la présence des gènes impliqués dans sa mobilité, ont été recherchées dans les incubations.

VIII.2. Potentiel de sols agricoles à oxyder et réduire l'As

Dans un premier temps, la capacité de bio-transformation de l'As des trois sols du bassin du Gallego a été évaluée en microcosmes. Les concentrations initiales et finales d'As, ainsi que les valeurs de pH et de Eh dans la phase aqueuse des incubations aérobies et anaérobies sont présentées Annexe 10.

Aucune différence des trois paramètres analysés (pH, Eh et As total) n'a été observé entre les incubations biotiques et abiotique, en début d'expérience (Figure 62 et Annexe 10). Comme pour les incubations du sol T12R (c.f. chapitre 7), une libération initiale d'As provenant des HFO-AsIII et correspondant à une mise en équilibre de l'As entre la phase solide et la phase liquide, a été observée dans toutes les incubations en condition aérobie. Les teneurs d'As en solution varient en fonction des teneurs en HFO-AsIII initialement ajoutés. Elles sont plus faibles dans la condition c1 et deux fois plus élevées dans les conditions c2 et c3. Cependant, les valeurs similaires obtenues dans ces deux dernières conditions suggèrent l'apparition d'un maximum de dissolution de l'AsIII piégé. Cette dernière observation est beaucoup moins évidente pour les HFO-AsV incubés en condition anaérobie, pour lesquels une plus faible libération initiale est de plus observée (comme pour les incubations du sol T12R menées en condition anaérobie, c.f. chapitre 7).

Une faible libération d'As a été observée en condition abiotique aérobie et anaérobie (Figure 63). De plus, la prépondérance d'AsIII (84%) en condition aérobie et la détection exclusive d'AsV en condition anaérobie démontrent l'absence d'oxydation de l'AsIII ou de réduction de l'AsV en condition abiotique.

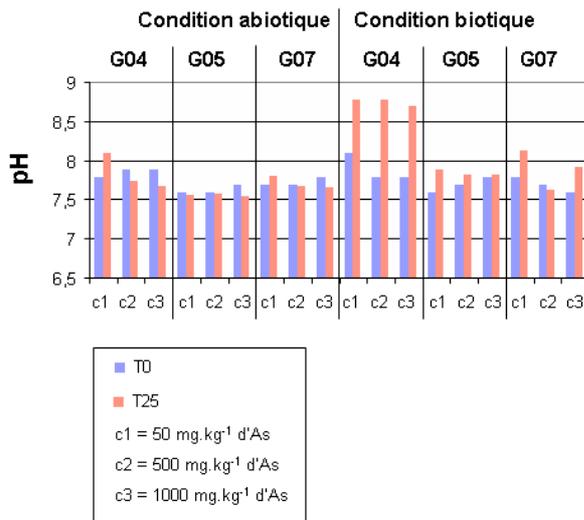
En condition biotique aérobie, une solubilisation importante d'As ainsi qu'une augmentation de pH (8,8 à T28, contre 7,9 à T0, en moyenne) ont été observées dans les incubations du sol G04, notamment dans les conditions c2 et c3, indiquant que la microflore aérobie et indigène de ce sol a favorisé la désorption de l'AsIII et également l'élévation du pH (Figures 62 et 63). Jain et Loeppert (2000) ont montré que l'adsorption de l'AsIII augmente avec le pH,

atteignant un maximum à pH 8-9. Les conditions de pH rencontrées ici sont donc favorables à une forte adsorption de l'As aux HFO, notamment dans les incubations du sol G04. La libération d'As mesurée dans cette expérience ainsi que la détection exclusive d'AsV en fin d'expérience suggèrent donc une oxydation directe de l'AsIII fortement adsorbé sur les HFO par une microflore indigène AsIII-oxydante (Figure 63). Lee *et al.* (2005) ont également montré que les bactéries indigènes de sédiments d'une mine abandonnée d'Au et d'Ag (Myoungbond, Corée du Sud) améliorent l'extraction de l'As principalement associé à des HFO ainsi que la vitesse d'oxydation de l'AsIII par rapport aux processus abiotiques, après 22 jours d'incubation en condition aérobie et en présence de lactate et d'acétate. De façon intéressante, ces auteurs ont également remarqué une augmentation du pH au cours des incubations, comme dans l'incubation biotique du sol G04.

Les sols G05 et G07 se comportent différemment. Des concentrations similaires à celles retrouvées en condition abiotique ont finalement été libérées, indiquant que la microflore de ces sols ne favorise pas la désorption de l'AsIII (Figure 63) ; les pH finaux sont de plus similaires aux pH initiaux (Figure 62). Seule la microflore indigène du sol G07 est capable d'oxyder entièrement l'AsIII libéré, alors qu'une faible activité AsIII-oxydante a été détectée dans les incubations du sol G05 où une majorité d'AsIII a été retrouvée en fin d'expérience.

En condition biotique anaérobie, les plus fortes teneurs d'As en solution ont été mesurées dans les incubations du sol G07, présentant des valeurs de pH stables (Figures 62 et 63). Tandis que les plus faibles ont été obtenues dans les incubations du sol G04 et sont concomitantes à une diminution d'une unité pH (Figures 62 et 63). La microflore aérobie du sol G04 avait pourtant permis une forte désorption d'As, contrairement à celle du sol G07. Ces résultats montrent que ces sols gouvernent différemment le devenir de l'As selon la disponibilité en O₂, probablement à cause d'une composition différente de leur microflore indigène. Néanmoins, toutes les microflores ont favorisé le développement de conditions réductrices (-214 mV en moyenne) et l'augmentation significative d'AsIII en solution (Figure 63), indiquant des activités microbiennes libérant et réduisant l'AsV des HFO.

A. Aérobie



B. Anaérobie

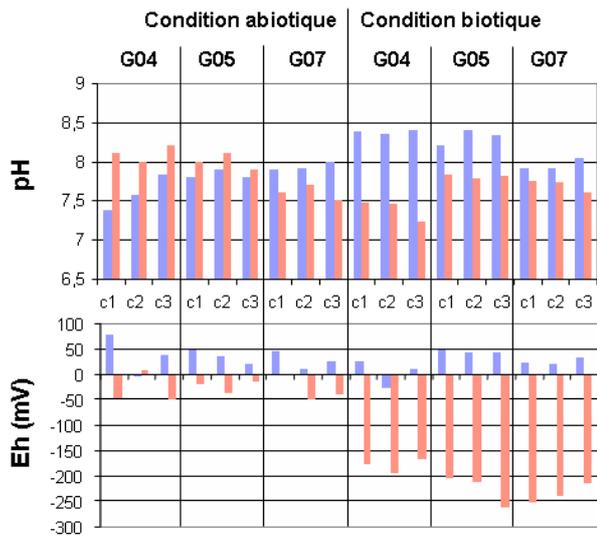


Figure 62 : Valeurs initiales (T0) et finales (T28) des pH et Eh dans les incubations biotiques et abiotiques des sols G04, G05 et G07 en condition aérobie (A) et anaérobie (B). Le Eh n'a pas été suivi en condition aérobie.

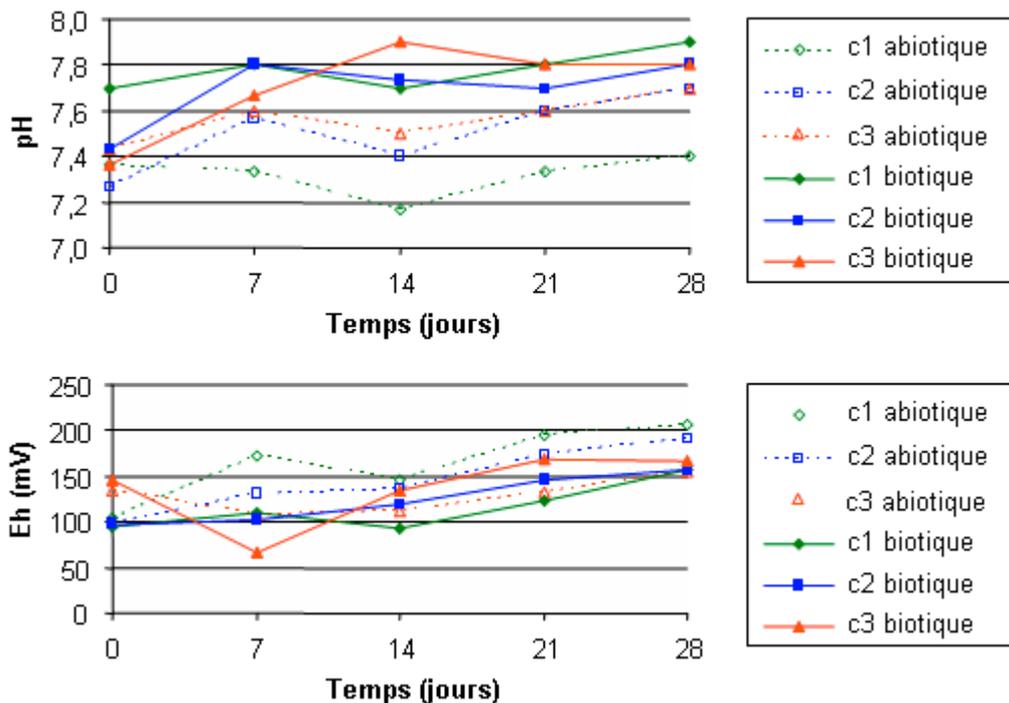


Figure 63 : Concentrations finales en As total, AsIII et AsV dans les incubations biotiques et abiotiques des sols G04, G05 et G07 en condition aérobie (A) et anaérobie (B).

L'ensemble de ces résultats montre qu'en condition anaérobie la microflore du sol G07 a solubilisé les plus fortes concentrations d'As, tandis que celle du sol G04 s'est révélé être la plus « offensive » vis-à-vis de l'As en condition aérobie. La microflore indigène du sol G04 présente une activité similaire à celle du sol industriel T12R vis-à-vis de l'As adsorbé aux

HFO (c.f. chapitre 7), dans le sens où elle est capable de (i) désorber et oxyder l'As^{III} des HFO en condition aérobie et de, (ii) désorber et réduire l'As^V des HFO en condition anaérobie. Par contre, le sol G05 est composé d'une microflore différente incapable de transformer réversiblement l'As. Si sa microflore anaérobie désorbe et réduit l'As^V des HFO, sa microflore aérobie ne désorbe ni n'oxyde l'As^{III} des HFO. Enfin, la microflore indigène du sol G07 est capable, comme celles des deux autres sols, de désorber et de réduire l'As^V en condition anaérobie. Elle peut réaliser une biotransformation réversible de l'As car elle oxyde l'As^{III} libéré abiotiquement des HFO. Par contre, elle ne peut le désorber.

Au vu de ces résultats, le sol G07 a été choisi pour suivre au cours du temps l'effet de la microflore indigène sur les HFO-As et sa réponse vis-à-vis d'une accumulation d'As dans son milieu.

VIII.3. Effet des activités microbiennes du sol G07 sur une accumulation d'As^{III} en aérobiose

Les concentrations initiales et finales d'As et de Fe, ainsi que les valeurs de pH et de Eh dans la phase aqueuse des incubations du sol G07 en aérobiose sont présentées Tableau 33.

Condition d'incubation		pH		Eh (mV)		As ($\mu\text{g.l}^{-1}$)		Fe ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	
		T0	T28	T0	T28	T0	T28	T0	T28
Abiotique	c1	7,4	7,4	105	206	167	178	<5*	<5*
	c2	7,3	7,7	99	191	426	280	<5*	<5*
	c3	7,4	7,7	134	156	412	566	9	<5*
Biotique	c1	7,7	7,9	94	158	154	244	8	<5*
	c2	7,4	7,8	96	157	376	408	<5*	<5*
	c3	7,4	7,8	146	167	418	279	<5*	<5*

* Limite de détection

Tableau 33 : Principales caractéristiques de la phase aqueuse des incubations du sol G07 en condition aérobie aux temps initial (T0) et final (T28).

VIII.3.1. Evolution de l'As et du fer

Au début des expériences, les teneurs d'As en solution, principalement sous forme d'AsIII (91 à 100%), sont similaires dans les conditions biotiques et abiotiques (161 $\mu\text{g.l}^{-1}$, 401 $\mu\text{g.l}^{-1}$ et 415 $\mu\text{g.l}^{-1}$, en moyenne, pour les conditions c1, c2 et c3, respectivement) (Tableau 33).

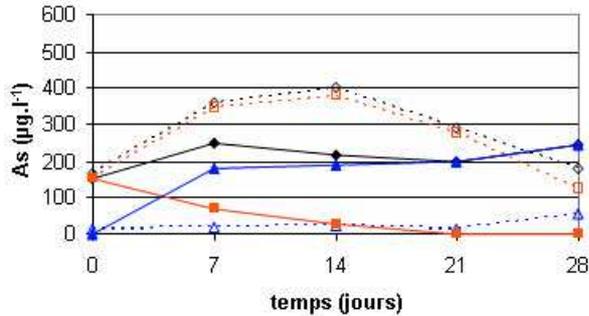
L'évolution de l'As total en solution dans les tests biotiques est différente de celle observée dans leurs homologues abiotiques (Figure 64). Dans ces dernières, on observe une légère libération d'As dans les trois conditions, avec une ré-adsorption en conditions c1 et c3. Alors qu'en condition biotique, l'As total est stable en c1 et on observe une légère diminution suivie d'une augmentation en c2 et c3. Cependant, ces variations sont très faibles et similaires en conditions biotique et abiotique (en moyenne : 164 $\mu\text{g.l}^{-1}$, 262 $\mu\text{g.l}^{-1}$ et 200 $\mu\text{g.l}^{-1}$) par rapport aux quantités d'AsIII initialement présentes dans les incubations (50 mg.kg^{-1} , 500 mg.kg^{-1} et 1000 mg.kg^{-1}), confirmant que la microflore indigène aérobie du sol G07 ne favorise pas la désorption de l'AsIII. De plus, les concentrations de Fe total en solution sont négligeables tout au long de l'expérience (elles atteignent un maximum de 13 $\mu\text{g.l}^{-1}$ en condition c2), indiquant que la solubilisation de l'As n'est pas liée à une dissolution des HFO et que la microflore indigène du sol G07 n'affecte pas la stabilité des HFO en condition aérobie.

Les profils de spéciation de l'As des tests biotiques ont nettement divergé de ceux des tests abiotiques (Figure 64). Les tests abiotiques présentent un profil de solubilisation de l'AsIII similaire à celui de l'As total, indiquant l'absence ou la faible oxydation abiotique de l'AsIII, qui représente 70 à 94% de l'As total à la fin des expérimentations. Par contre, les tests biotiques sont caractérisés par une diminution significative de l'AsIII en solution, concomitante à une augmentation de l'AsV. Après 21 jours d'incubation, l'AsIII a été totalement oxydé en AsV, indiquant une l'activité AsIII-oxydante d'origine microbienne. La présence de bactéries AsIII-oxydantes au sein des communautés étudiées a été confirmée par la détection des gènes *aoxB* dans les trois conditions. La bio-oxydation de l'AsIII observée dans ces conditions est donc réalisée *via* le système AoxAB. Les gènes *arsC* n'ont pas été détectés dans ces conditions, où d'ailleurs aucune activité de bio-réduction de l'AsV en AsIII n'a été détectée.

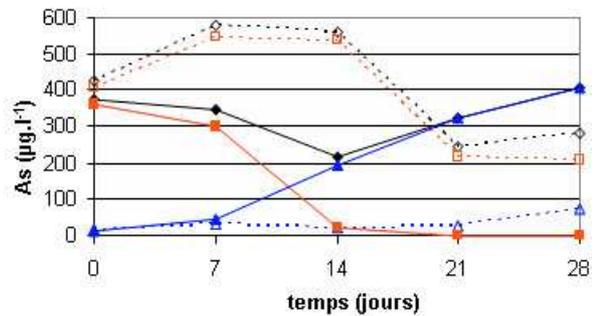
Les valeurs de pH dans les incubations sont restées stables durant l'expérience ($\pm 0,5$ unité pH), tandis que les valeurs d'Eh ont augmenté dans toutes incubations (Tableau 33 et Figure

65). Pour une concentration donnée, les variations observées sont négligeables entre les conditions biotiques et abiotiques à la fin de l'expérience, indiquant que ces deux paramètres n'ont pas influencés la variation de la spéciation de l'As observée dans ces incubations.

A. Condition c1



B. Condition c2



C. Condition c3

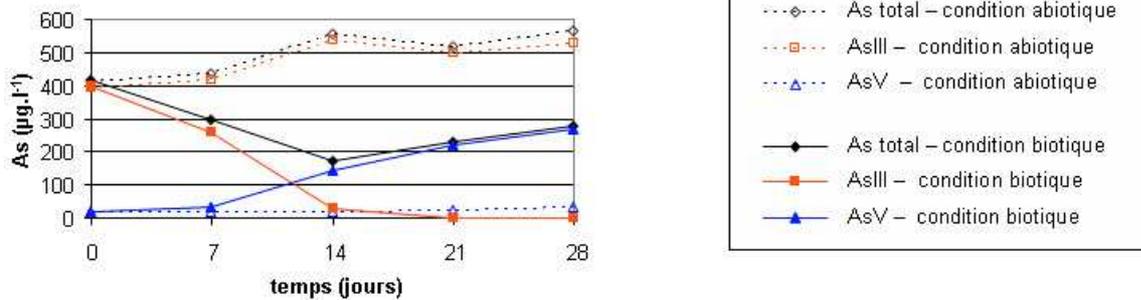


Figure 64 : Cinétiques des concentrations en As total, AsIII et AsV dans les incubations en condition aérobie du sol G07 en condition 1 (A), condition 2 (B) et condition 3 (C).

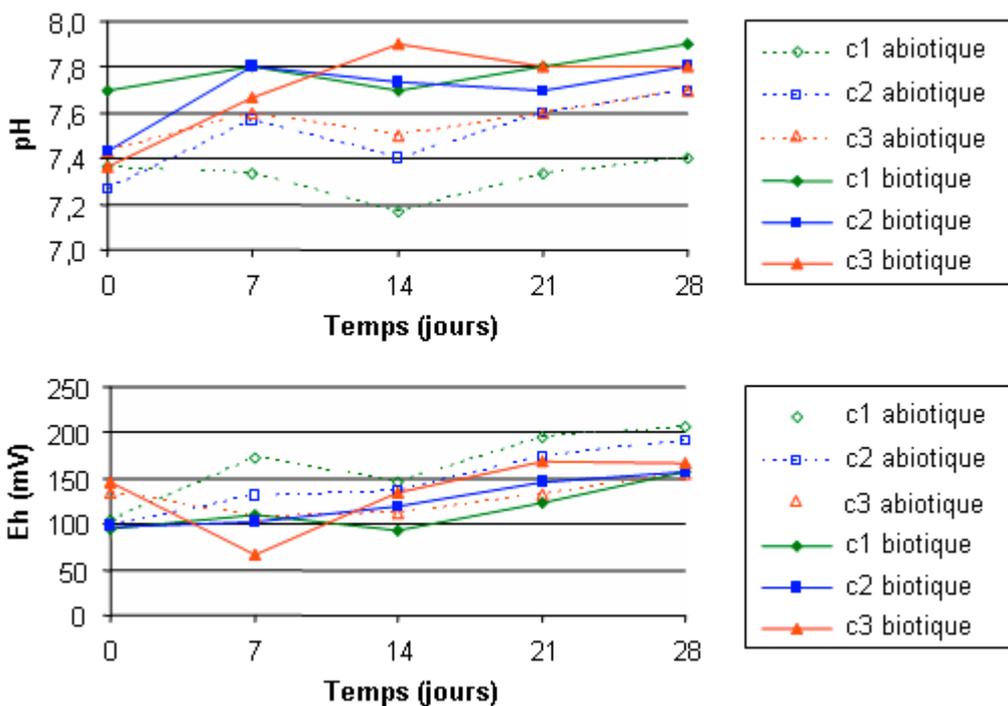


Figure 65 : Evolution du pH et du Eh dans les incubations du sol G07 en condition aérobie.

VIII.3.2. Communautés bactériennes totales

Au début de l'expérience, les communautés bactériennes totales des sols incubés sont complexes et similaires. Une réduction significative de leur richesse, inhérente à l'étape de culture, est remarquée après 7 jours d'incubation (Figure 66). Les mêmes espèces se sont développées au cours du temps dans les trois conditions, probablement à cause des teneurs en As similaires en solution et donc biodisponibles. Néanmoins, la communauté bactérienne totale de la condition c1 a évolué plus rapidement vers la structure retrouvée en fin d'incubation. En effet, certaines espèces (représentées dans la partie droite des profils) se sont développées après 14 jours dans cette condition, alors qu'elles ne sont détectables dans les conditions c2 et c3 qu'après 21 jours. Ces résultats permettent d'envisager un impact de la spéciation et de la concentration d'As biodisponible sur le développement des communautés bactériennes totales.

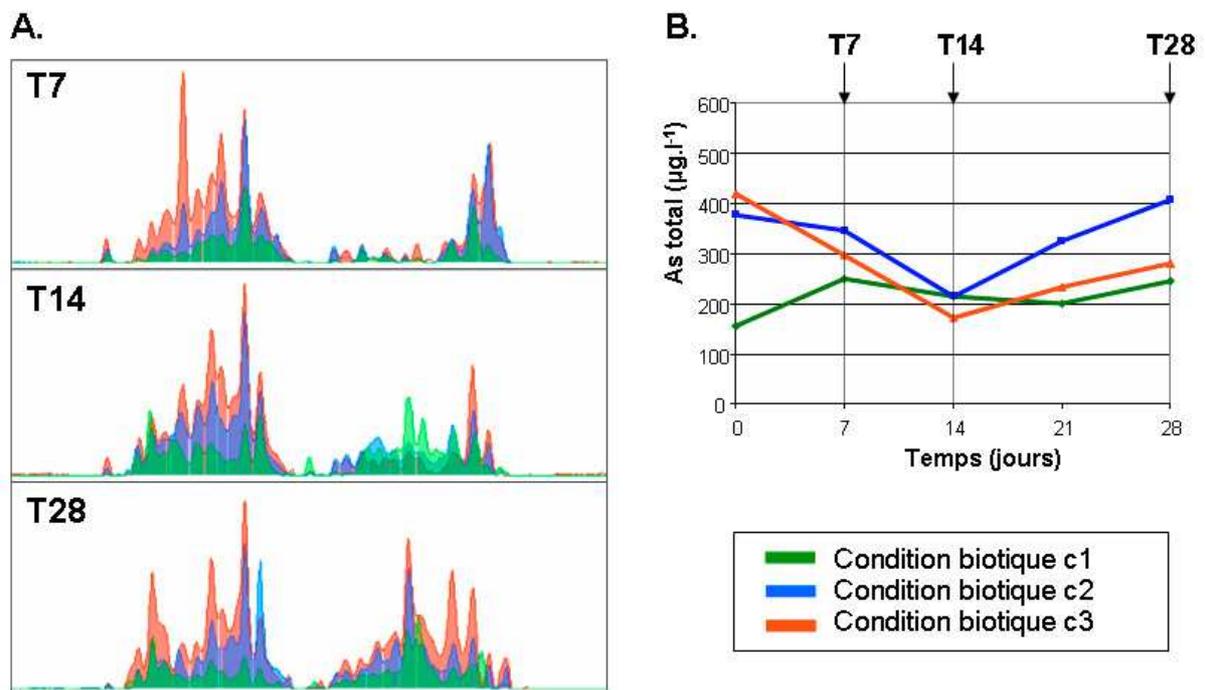


Figure 66 : Dynamique de la communauté bactérienne totale des suspensions de sol G07 en condition biotique et aérobie c1, c2 et c3 (A), comparée à celle de la solubilisation de l'As (B). Un pic est considéré comme représentant une espèce bactérienne.

VIII.4. Effet des communautés microbiennes du sol G07 sur une accumulation d'AsV en anaérobiose

Les concentrations initiales et finales d'As et de Fe, et les valeurs de pH et de Eh dans la phase aqueuse des incubations du sol G07 en anaérobiose sont présentées Tableau 34.

Condition d'incubation		pH		Eh (mV)		As ($\mu\text{g.l}^{-1}$)		Fe ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	
		T0	T28	T0	T28	T0	T28	T0	T28
Abiotique	c1	7,5	7,4	49	91	107	251	<5 ¹	<5 ¹
	c2	7,3	7,5	95	81	39	147	<5 ¹	<5 ¹
	c3	7,3	7,4	95	94	30	91	<5 ¹	<5 ¹
Biotique	c1	7,7	7,4	120	-420	60	408	<5 ¹	n.d. ²
	c2	7,4	7,8	115	-381	34	24894	<5 ¹	438
	c3	7,3	7,8	94	-378	31	30626	<5 ¹	235

¹ Limite de détection

² Non déterminé

Tableau 34 : Principales caractéristiques de la phase aqueuse des incubations du sol G07 en condition anaérobie aux temps initial (T0) et final (T28).

VIII.4.1. Evolution de l'As et du fer

Les concentrations d'As initialement libérées en solution sont similaires en condition biotique et abiotique, et ont exclusivement été retrouvées sous forme d'AsV (forme initialement adsorbé sur les HFO) (Tableau 34). Curieusement, elles sont plus élevées que celles obtenues dans les expériences précédentes menées sur le même sol. Dans ces dernières, les HFO-AsV avaient été préalablement stérilisés par autoclavage, alors qu'ils ont été stérilisés par rayons γ pour cette expérience, suggérant que l'autoclavage stabilise l'adsorption de l'AsV sur les HFO. Aucune libération de Fe n'a initialement été détectée.

Les suspensions biotiques ont clairement changé de couleur après 14 jours d'incubations. De jaunes orangées, elles ont viré à noires (Figure 67A), tandis qu'aucune variation n'a été remarquée ni en condition abiotique anaérobie, ni en condition aérobie (Figure 67B). Ces suspensions dégageaient également une odeur nauséabonde, ressemblant à celle des « œufs pourris » et caractéristique du sulfure d'hydrogène (H_2S).

Une diminution significative des valeurs d'Eh, atteignant -393 mV en moyenne après 28 jours d'incubation, a été observée dans les conditions biotiques. Le développement de conditions fortement réductrices (Figure 68) a favorisé le développement d'une microflore sulfato-réductrice détectées *via* les gènes *dsrAB*, codant une enzyme clé de la réduction du sulfate et de la production de sulfures. Ces gènes ont été détectés dès T14 alors qu'ils étaient absent à T0 et T7, montrant que des bactéries sulfato-réductrices se sont développées en cours d'incubation et donc que des sulfures ont été produits. Néanmoins, la présence de sulfures dans le milieu n'a pas été vérifiée. Le sol G07 a été prélevé à proximité de cultures de maïs, nécessitant généralement des amendements soufrés (tels que le sulfate d'ammonium), suggérant que de fortes concentrations en sulfate sont présentes dans ce sol, et donc que les conditions fortement réductrices et le développement de bactéries sulfato-réductrices ont favorisé leur réduction en sulfures.

Les valeurs de pH ont également montré un profil plus variable dans les conditions biotiques ($\pm 0,6$ unité pH). Les plus fortes variations de ces deux paramètres ont été observées pour la condition biotique c1 (Figure 68). Dans les conditions abiotiques, les valeurs de pH et d'Eh sont restées stables.

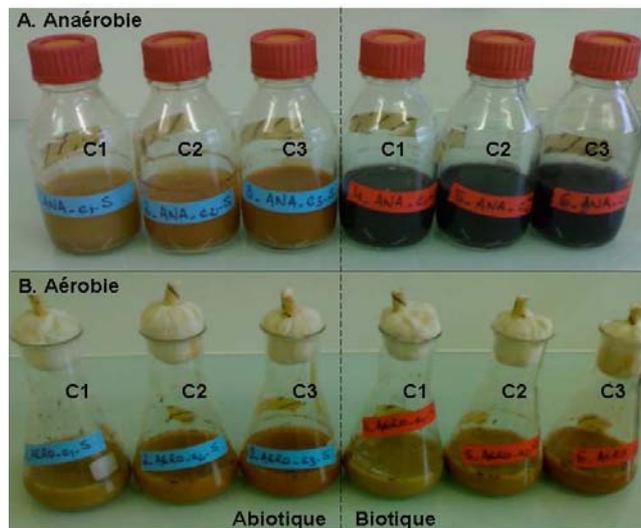


Figure 67 : Aspect des suspensions de sols G07 incubées en conditions anaérobies (A) et aérobies (B).

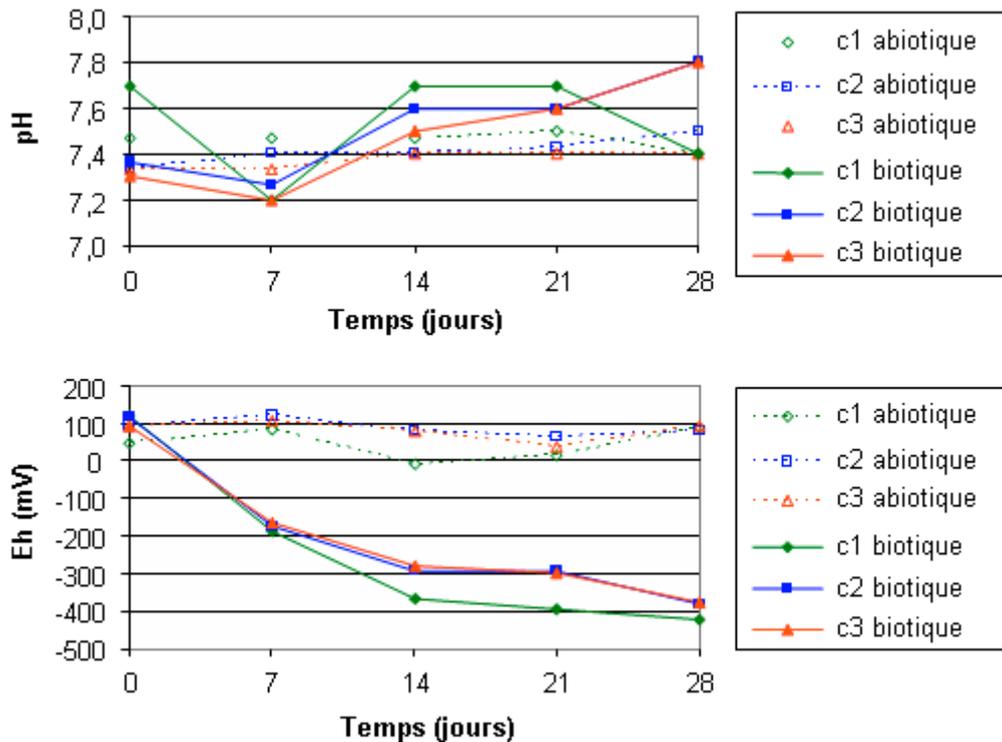


Figure 68 : Evolution du pH et du Eh dans les incubations du sol G07 en condition anaérobie.

Une solubilisation significative de Fe a également été observée dans les conditions biotiques après 14 jours d'incubation (Figure 69), indiquant une réduction microbienne dissolutive des HFO piégeant l'As et vraisemblablement la présence de bactéries FeIII-réductrices. La plus forte concentration a été détectée dans la condition biotique c3 ($7395 \mu\text{g.l}^{-1}$) et la plus faible dans la condition biotique c1 ($119 \mu\text{g.l}^{-1}$). Toutefois, une diminution significative a été constatée à la fin du suivi (Figure 69 et Tableau 34), indiquant une précipitation de Fe, qui serait à l'origine de la couleur noire des suspensions. En effet, les ions FeII et/ou FeIII, libérés en solution, ont pu réagir fortement avec des ions sulfures probablement produits dans ces conditions pour former du sulfure de Fe (FeS), selon les réactions suivantes :



Le sulfure de Fe reste précipité dans l'eau sous forme de très fines particules. En laboratoire, une eau contenant ce précipité est noire et reste noire après plusieurs jours, voir semaines, sans qu'aucune phase plus claire ne se forme. A noter que le Fe est resté indétectable en condition abiotique, durant les 28 jours d'incubation (Figure 69 et Tableau 34).

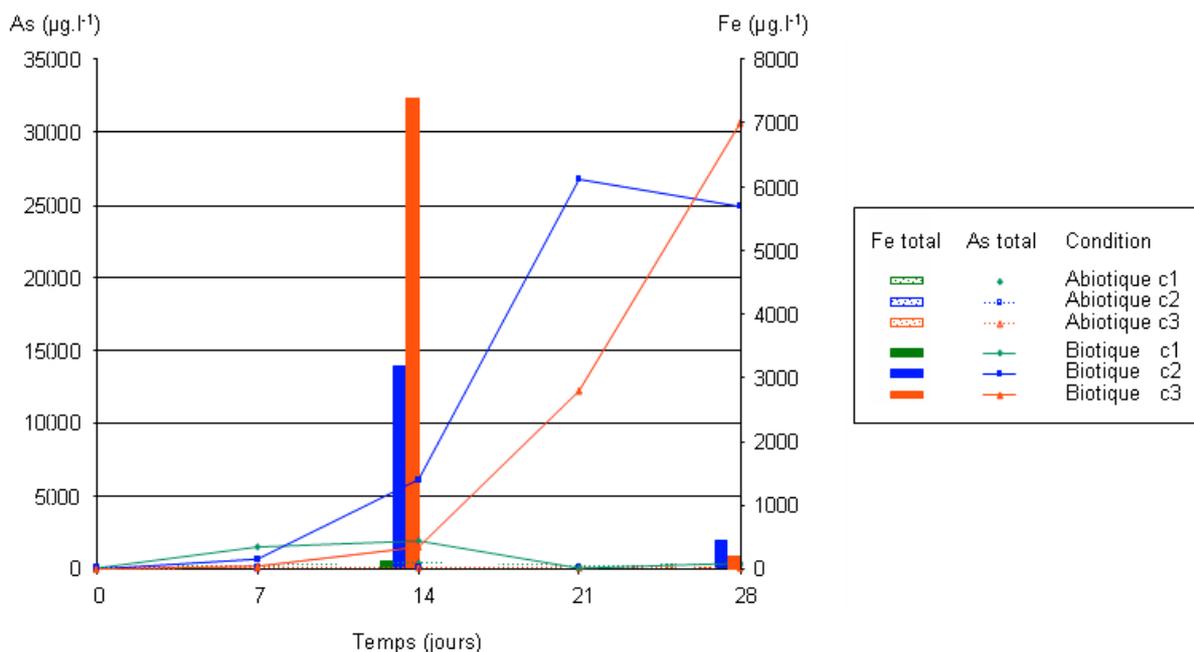


Figure 69 : Dynamiques des concentrations de Fe et d'As total dans les incubations du sol G07 en condition anaérobie. Le Fe total en solution a été mesuré uniquement aux temps 0, 14 et 28.

Une augmentation significative d'As a été observée dans les trois conditions biotiques après 7 jours d'incubation (Figures 69 et 70). Elle est concomitante à la hausse significative de Fe en solution observée à T14, indiquant une étroite relation entre la solubilisation de ces deux éléments (Figure 69). Par ailleurs, contrairement aux conditions abiotiques présentant exclusivement de l'AsV en solution, les conditions biotiques présentent plus de 75% d'AsIII après 7 jours d'incubation (Figure 70). L'activité microbienne a donc favorisé la désorption de l'AsV puis sa réduction en AsIII. Le développement de bactéries capables de respirer l'AsV, *via* le système ArrAB, a été confirmé par l'amplification des gènes *arrA* dans les trois conditions. Ces bactéries sont probablement à l'origine de la réduction de l'AsV en AsIII et laisse envisager une désorption directe de l'AsV à partir des HFO.

Malgré une concentration initiale plus importante en HFO-AsV (1000 mg.kg^{-1}), la condition c3 a présenté une plus lente solubilisation d'As que les conditions c1 et c2. A T7, la plus forte concentration d'As a été retrouvée dans la condition c1 ($1,5 \text{ mg.l}^{-1}$). Elle a ensuite été détectée dans la condition c2 à T14 ($6,2 \text{ mg.l}^{-1}$), ainsi qu'à T21 ($26,7 \text{ mg.l}^{-1}$). Et ce n'est qu'à la fin du suivi que la condition c3 a présenté la plus forte teneur en As soluble ($30,6 \text{ mg.l}^{-1}$), principalement sous forme d'AsIII (88%) (Figures 69 et 70). Toutefois, contrairement aux conditions c1 et c2, l'As en solution dans la condition c3 n'a cessé d'augmenter jusqu'à la fin des incubations (Figure 70C). En effet, une légère diminution de l'As soluble,

majoritairement sous forme AsIII (85%), a été mesurée dans la condition c2 à la fin du suivi (T28) (Figure 70B). Dans la condition c1, il ne reste quasiment plus d'As en solution à T21 (Figure 70A) ; ici, l'AsIII n'a curieusement plus été détecté dès T14 et, à ce stade du suivi, la concentration en As soluble était d'ailleurs similaire à celle retrouvée à T7.

Remarquablement et contrairement aux conditions c2 et c3, les valeurs d'As total mesurées dans la condition c1, dès T14, étaient bien supérieures à la somme des valeurs d'AsIII et d'AsV (Figure 70A). Cette différence est probablement due à la présence d'autres espèces d'As dans la condition c1 et leur rétention sur la résine échangeuse d'anions utilisée pour séparer et distinguer l'AsIII, non chargé à un pH proche de la neutralité, de l'AsV, négativement chargé et adsorbé sur la résine (Ficklin, 1983). En effet, la présence dans le milieu d'ions sulfures produits par une microflore sulfato-réductrice a pu favoriser la formation de thioarsénites (thio-AsIII). Cette microflore est détectée *via* les gènes *dsrAB* à partir de T14. Les thio-As peuvent être produits par une réaction de l'As avec les ions sulfures dans les systèmes aquatiques anoxiques. Ils dominent la spéciation de l'As à des concentrations de sulfures de 0.1 à 1 mM à pH neutre (Wilkin *et al.*, 2003). Hollibaugh *et al.* (2005) ont montré que les thio-As représentent une fraction majoritaire de l'As réduit dans la zone anoxique du lac Mono (CA, USA). D'ailleurs, l'augmentation des concentrations d'AsIII et thio-AsIII en solution a été concomitante à la respiration de l'AsV dans des incubations de sédiments de ce lac et les concentrations en thio-AsIII étaient finalement plus élevées que celle d'AsIII (Kulp *et al.*, 2006). Par contre une majorité d'AsIII a été retrouvé à partir d'incubations de sédiments du lac Searles, présentant une plus faible abondance de sulfures (Kulp *et al.*, 2006). Selon la formule donnée par Kulp *et al.* (2006), $[\text{thio-AsTotal}] = [\text{AsTotal}] - [\text{AsIII} + \text{AsV}]$, 1849 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de thio-As ont pu se former en condition c1 après 14 jours d'incubation. Jay *et al.* (2004) ont montré que les thio-AsIII, chargés négativement, se fixent sur la résine échangeuse d'anions identique à celle utilisée dans nos analyses. Comme dans notre étude, une récupération incomplète a été obtenue en réalisant une étape d'élution considérée suffisante pour libérer l'AsV. Une élution plus longue avec une solution d'HCl plus concentrée (6N durant 7 heures) aurait pu permettre d'obtenir une récupération complète d'As (Jay *et al.*, 2004).

La diminution d'As total en solution observée à T21 dans la condition c1 (Figure 70A) indique une précipitation et/ou une re-adsorption d'As. Une précipitation d'As a pu se produire après prélèvement. Généralement et comme dans cette étude, les espèces d'As

inorganique (AsIII et AsV) sont conservées en condition acide avant analyse (Ficklin, 1983), sans regarder préalablement la présence de sulfures dans le milieu. Cependant, lorsque qu'une eau présentant de fortes concentrations en sulfures et As est placée en condition acide, il en résulte une précipitation instantanée d'orpiment amorphe, $As_2S_3(am)$, diminuant donc les concentrations d'As total détectées (Smieja et Wilkin, 2003 ; Jay *et al.* 2004 et Samanta et Clifford, 2006). Une précipitation d'As a également pu se produire au sein de l'incubation c1 *via* des processus biogéochimiques. En effet, la conversion de l'espèce AsIII neutre, en espèces thio-AsIII anioniques peut réguler le transport et le comportement de l'As dans les environnements sulfato-réducteurs en gouvernant les réactions de sorption et de précipitations minérales (Wilkin *et al.*, 2003). Les thio-AsIII ont donc pu précipiter sous forme de sulfures d'As. De plus, il est connu que l' As_2S_3 peut être bio-formé suite à la respiration bactérienne d'AsV et d'ions sulfate (Newman *et al.*, 1997). Si les teneurs en ions sulfates et/ou sulfures n'ont pas été suivies dans cette incubation, la détection dès 14 jours d'incubation d'une microflore sulfato-réductrice soutient ces hypothèses. Enfin, une adsorption d'As notamment sur les HFO *via* des processus géochimiques a également pu se produire.

La présence de sulfures dans le milieu semble avoir joué un rôle particulièrement important dans les incubations anaérobies du sol G07. En général, les concentrations de sulfures dissous dans la phase aqueuse sont contrôlées par le niveau de sulfato-réduction bactérienne et par l'abondance de Fe dans la phase solide. Les concentrations de sulfures dissous sont typiquement faibles lorsque du Fe réactif (oxy-hydroxydes de Fe) est abondant dans le milieu. Ces concentrations augmentent seulement lorsque les réserves en Fe réactif sont épuisées *via* des processus de dissolution réductrice et la précipitation de FeS. En d'autres termes, la présence de Fe réactif exclut généralement la formation de thio-AsIII dans les systèmes sulfato-réducteurs en maintenant de faibles concentrations en sulfures dissous. Par contre, les milieux dans lesquels l'abondance de Fe réactif est limitée favorise l'accumulation de sulfures et la formation de thio-AsIII (Wilkin *et al.*, 2003). Cela expliquerait le rôle plus important d'ions sulfures dans la condition c1 qui contient moins de HFO-AsV, donc de Fe réactif que les conditions c2 et c3.

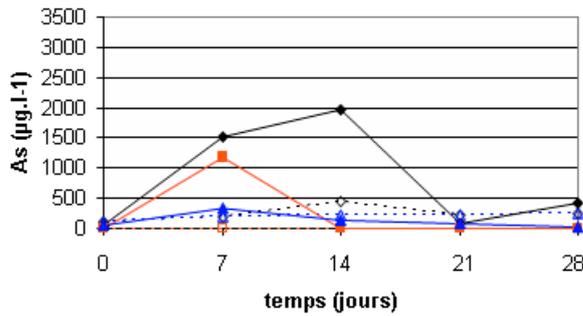
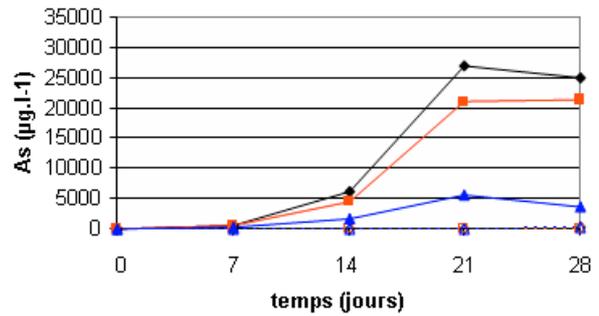
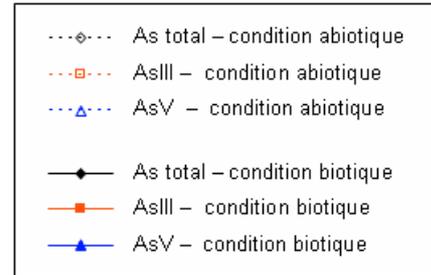
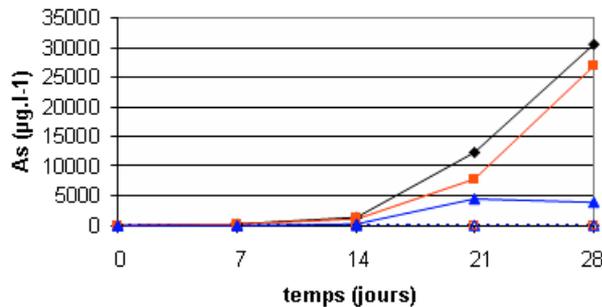
A. Condition c1**B. Condition c2****C. Condition c3**

Figure 70 : Dynamiques des concentrations en As total, AsIII et AsV dans les incubations en condition anaérobie du sol G07 en condition 1 (A), condition 2 (B) et condition 3 (C).

VIII.4.2. Communautés bactériennes totales

La composition des communautés bactériennes totales de la condition c1 a évolué différemment de celles des conditions c2 et c3. Ces résultats sont corrélés avec les profils divergents de solubilisation de l'As dans ces trois conditions. A la fin de l'incubation, de nombreuses espèces relativement abondantes dans les conditions c2 et c3, sont absentes ou faiblement représentées dans la condition c1. Par exemple, les trois espèces représentées à l'extrême droite des profils des conditions c2 et c3, sont faiblement représentées dans la condition c1 (Figure 71).

Ces résultats indiquent que des espèces bactériennes du sol G07 peuvent se développer en présence de concentrations élevées d'As dans le milieu. Des espèces identiques se sont développées dans les conditions où une forte solubilisation de l'As a été observée, suggérant leur implication dans la mobilité de l'As. Enfin, ces résultats montrent que la communauté totale de ce sol est affectée par le gradient d'As dans son milieu.

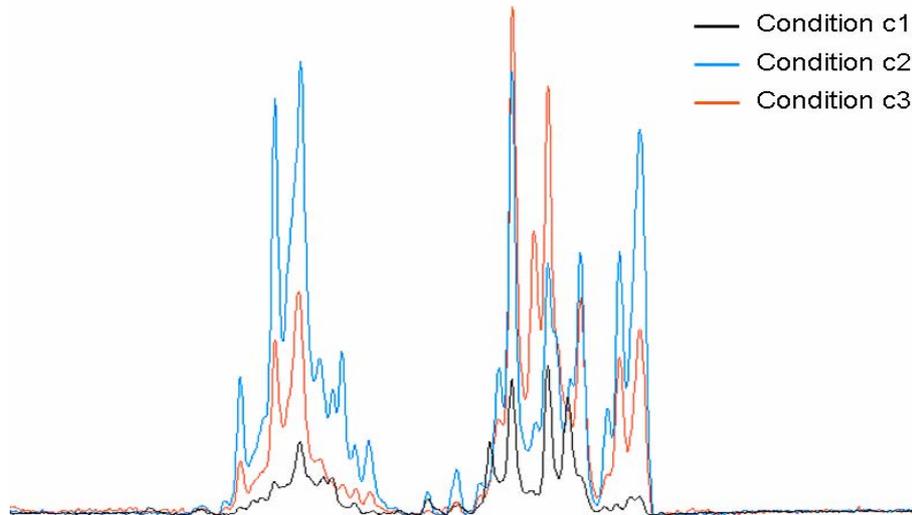


Figure 71: Structures des communautés bactériennes totales du sol G07 des incubations anaérobies en condition c1, c2 et c3, après 28 jours d'incubations. Un pic est considéré comme représentant une espèce bactérienne.

VIII.5. Conclusion

Les communautés microbiennes des sols G04, G05 et G07 réagissent différemment à l'accumulation d'As-HFO dans leur milieu. D'une part, les communautés microbiennes aérobies indigènes aux sols G05 et G07 ne favorise pas la désorption de l'AsIII adsorbé aux HFO, contrairement à celle du sol G04. D'autre part, celles des sols G04 et G07 sont capables d'oxyder l'AsIII en AsV, contrairement à celle du sol G05. Par contre, les communautés microbiennes anaérobies des trois sols sont toutes capables de désorber et de réduire l'AsV provenant des HFO. La microflore du sol G07 favorise la libération de plus fortes concentratins d'AsIII, plus toxique, dans les environnements anaérobies. Par contre, elle contribue à réduire la biodisponibilité de l'As en condition aérobie, en ne favorisant pas sa libération et en l'oxydant en AsV, moins mobile et toxique

Les incubations aérobies biotiques et abiotiques du sol G07 dopé en HFO-AsIII ont présenté des concentrations en As dissous similaires, confirmant l'incapacité de la microflore indigène au sol G07 à désorber l'AsIII. Aucune augmentation de pH n'a été mesurée dans les incubations du sol G07, contrairement aux sols G04 et T12R (c.f. chapitre 5) où une solubilisation significative de l'AsIII adsorbé sur les HFO avait été mise en évidence. De plus, aucune libération de Fe n'a été observée, contrairement aux incubations aérobies du sol T12R (c.f. chapitre 5), indiquant un lien probable entre la solubilisation d'As et de Fe dans le sol

industriel T12R. Néanmoins, les bactéries As^{III}-oxydantes indigène au sol G07 et détectée *via* les gènes *aoxB*, ont été capables d'oxyder significativement l'As^{III} libéré. Les faibles différences de concentration en As dissous (ou bio-disponible) dans des incubations présentant pourtant des teneurs en HFO-As contrastées, sont probablement à l'origine de la similarité de structure de la communauté bactérienne totale.

La microflore indigène du sol G07, contenant des bactéries respirant l'As^V détectée *via* les gènes *arrA*, a significativement réduit et libéré l'As des HFO-As^V. Durant la première phase de l'expérimentation, cette libération était concomitante à celle du Fe, indiquant un lien étroit entre la solubilisation de ces deux éléments. La solubilisation de ces deux éléments est certainement également le fait de l'activité de bactéries Fe^{III}-réductrices. Par contre, dans une seconde phase de l'expérience, l'As^{III} en solution a continué d'augmenter en condition c2 et c3, contrairement au Fe qui a nettement diminué. Le développement de bactéries sulfato-réductrice détectées *via* les gènes *dsrAB*, a favorisé la production de sulfures dans ces incubations et ainsi vraisemblablement contribué à la formation de sulfures de Fe, à l'origine de la couleur noire des suspensions de sols. La bio-production de sulfures dans ces incubations a vraisemblablement compliqué la solubilisation de l'As dans la condition c1, où une précipitation d'As a été observée durant la seconde phase de l'expérimentation. Dans cette condition, il est possible que des thio-As^{III} puis des précipités de sulfures d'As se soient formés, la plus faible teneur en HFO de cette incubation étant compatible avec une plus forte affinité pour les sulfures. Enfin, la structure de la communauté bactérienne totale de cette condition diffère de celle des conditions c2 et c3, où de plus fortes teneurs en HFO ont été introduites.

L'ensemble de ces résultats indique que la composante biotique des sols agricoles du bassin du Gallego peut jouer un rôle majeur dans la mobilisation/immobilisation de l'As. En effet, elle est composée des acteurs principaux du cycle de l'As. Le contrôle du développement de ces différents membres peut être effectué *via* les outils moléculaires utilisés ici et permet de prédire les réactions susceptibles de se produire lors d'un déversement ponctuel d'As sur ces sols.

Conclusions et Perspectives

Ce travail de thèse a permis d'améliorer nos connaissances sur la biodiversité de bactéries impliquées dans la mobilité de l'As dans différents sites européens. Des avancées techniques permettant d'accéder à la diversité, la structure et l'abondance des communautés d'intérêt dans l'environnement ont été réalisées. Les conditions de développement de ces bactéries, leur impact sur le devenir de l'As et les mécanismes utilisés ont été examinés. Cette partie vise à évaluer l'utilisation potentielle des résultats obtenus durant cette thèse en tant que bioindicateurs de la mobilité de l'As dans l'environnement et à déterminer les améliorations à effectuer pour utiliser ces outils biologiques dans le cadre de la surveillance et la gestion de sites pollués par l'As.

De nouveaux outils moléculaires ont été développés et validés pour analyser qualitativement et quantitativement les communautés AsIII-oxydantes dans l'environnement.

Des amorces dégénérées et consensus ont été dessinées et ont permis d'amplifier spécifiquement les gènes *aoxB*, codant la sous-unité catalytique de l'AsIII-oxydase, à partir de bactéries AsIII-oxydantes phylogénétiquement et physiologiquement diverses, ainsi que d'échantillons environnementaux (sols du bassin de la Meuse et du Gallego ; eaux du bassin de l'Isle) (chapitre 3). Les gènes *aoxB* ont été exclusivement détectés chez les bactéries AsIII-oxydantes montrant que ce gène est un marqueur fonctionnel pertinent de ces bactéries. Le développement de la base de données de séquences *aoxB* représentatives de divers taxa et la variation génétique des régions étudiées ont permis d'établir une phylogénie généralement cohérente (chapitre 4, Quéméneur *et al.*, 2008). L'utilisation des séquences protéiques s'est révélée plus fiable que celle des séquences nucléotidiques pour l'analyse de gènes *aoxB* divergents présents dans des communautés complexes. La phylogénie AoxB est globalement comparable à celle de l'ARNr 16S (phylogénie de référence). Les lignées phylogénétiques majeures sont bien discriminées et les séquences d'espèces étroitement apparentées au niveau de l'ARNr 16S sont groupées ensemble. Cependant, des divergences existent et suggèrent l'occurrence d'événements de transferts latéraux de gènes *aoxB*. Par conséquent, les séquences AoxB doivent donc être utilisées avec précaution pour établir la phylogénie de clones environnementaux. Néanmoins, ce travail a fourni une base essentielle à une meilleure

interprétation de la diversité des bactéries AsIII-oxydantes. Les gènes *aoxB* se révèlent être de puissants indicateurs de la composition de cette communauté dans l'environnement.

Une grande diversité de gènes *aoxB* a été retrouvée dans le sol industriel T12R du bassin de la Meuse (chapitre 6) et dans les eaux du bassin de l'Isle (chapitre 5). L'usage d'outils moléculaires ciblant les gènes *aoxB* a permis de s'affranchir des biais liés aux méthodes de cultures, qui contribuent à réduire significativement notre vision de la diversité des bactéries AsIII-oxydantes (chapitre 6, Quémeneur *et al.*, 2008). Les séquences obtenues sont affiliées à celles d' α -, β - et γ -*Proteobacteria*, confirmant leur prédominance dans les environnements mésophiles ainsi que les résultats obtenus dans d'autres études (Inskip *et al.*, 2007 ; Fan *et al.*, 2008). Différents groupes de séquences ont été identifiés, mais nombreux sont ceux qui n'ont pu être associés à des séquences d'organismes cultivés. Des gènes *aoxB* similaires ont été retrouvés à différents points du bassin de l'Isle présentant des concentrations et spéciations similaires en As. Certaines séquences sont également proches d'OTU retrouvés dans différents compartiments environnementaux pollués par l'As à travers le monde, indiquant leur ubiquité, ainsi qu'une large répartition géographique. De plus, la présence d'une diversité et d'une quantité importante de gènes *aoxB* dans les eaux non polluées du bassin de l'Isle suggère que la microflore indigène pourra réagir rapidement à une augmentation de la quantité d'As dans son milieu. L'omniprésence des gènes *aoxB* dans les environnements étudiés indique un potentiel fort de biooxydation de l'AsIII et donc d'une possible atténuation naturelle par réduction de la biodisponibilité de l'As dans l'environnement.

Des outils moléculaires de suivi qualitatifs et quantitatifs des communautés porteuses de gènes *aoxB* ont été développés et validés sur les eaux du bassin de l'Isle (chapitres 3 et 5). La méthode d'empreinte moléculaire DGGE, mise au point dans cette étude pour les gènes *aoxB*, a permis de différencier de manière reproductible les gènes *aoxB* des différentes souches AsIII-oxydantes. Les profils DGGE de ces souches sont composés d'une seule bande, à l'exception de *Leptothrix* sp. S1.1 et de *Thiomonas arsenivorans*. Le suivi des communautés porteuses de ces gènes dans les eaux du bassin de l'Isle a montré une variation significative de leur structure en fonction des spéciations et concentrations (faibles, modérées ou élevées) en As, suggérant que cette structure soit indicatrice de la biodisponibilité de l'As dans le milieu. Une méthode sensible et reproductible de PCR en temps réel a également été développée sur les gènes *aoxB*. Cet outil de quantification a permis de détecter des communautés porteuses de gènes *aoxB* plus denses dans les eaux de surface oxiques les plus polluées en As du bassin

de l'Isle. Néanmoins aucune corrélation claire n'a pu être mise en évidence entre la spéciation de l'As et le nombre de copies de gènes *aoxB*. Cette étude a toutefois donné pour la première fois des informations sur l'abondance des gènes *aoxB* dans l'environnement et a montré que la structure des communautés porteuses de ces gènes est sensible aux variations d'As. L'utilisation de des communautés AsIII-oxydantes comme bioindicateurs d'une accumulation d'As biodisponible dans leur milieu est donc prometteuse. Cependant, la complexité du système naturel entraîne des difficultés pour contrôler les paramètres environnementaux influents sur l'évolution des communautés bactériennes ciblées. Cette étude nécessite d'être confirmée à plus grande échelle en intégrant un plus grand nombre d'échantillons et de situations contrastées en termes de spéciations et de concentrations en As. Une telle étude est également nécessaire pour démontrer, ou non, une relation entre l'abondance des gènes *aoxB* et les variations des conditions environnementales. Il est également impératif d'améliorer la méthode de quantification des gènes *aoxB*, en testant des amorces non dégénérées. Les gènes *aoxB* plus conservés de groupes spécifiques de bactéries, comme les α -, β - ou γ -*Proteobacteria*, pourrait être de bons bioindicateurs de la biodisponibilité de l'As. Des approches DGGE analysant la structure de ces différents groupes peuvent se révéler être un indicateur fiable de la biodiversité des bactéries AsIII-oxydantes et donc de l'accessibilité de l'AsIII. Les banques de séquences de gènes *aoxB* sont en perpétuel développement depuis le début de cette thèse ; en effet d'une dizaine de séquences, elles en contiennent maintenant plus d'une centaine, principalement des séquences issues de sols et sédiments. Les séquences *aoxB* des nombreuses bactéries AsIII-oxydantes récemment isolées restent à obtenir. L'intégration de l'ensemble de ces données permettra d'améliorer et de confirmer la fiabilité de la phylogénie des gènes *aoxB* et de perfectionner la sensibilité de détection des amorces.

L'impact de la microflore indigène de sols industriels et agricoles sur la mobilité de l'As a été étudié en systèmes fermés (batch) et les groupes bactériens clés impliqués ont été recherchés, afin de mieux comprendre les mécanismes de transfert de l'As à travers les compartiments environnementaux (chapitre 7 et 8).

Dans les sols industriels pollués par l'As du bassin de la Meuse, la rétention de l'As est principalement gouvernée par des phases minérales de type oxy-hydroxydes de fer (HFO). Le rôle des communautés bactériennes indigènes dans la spéciation/mobilité de l'As initialement présent et leur réponse vis-à-vis d'un apport d'As adsorbé sur des HFO dans leur milieu ont été étudiés. Diverses bactéries AsIII-oxydantes et AsV-réductrices coexistent dans ces sols et

la microflore indigène est donc capable d'influencer l'état d'oxydation de l'As et sa mobilité, selon les conditions redox du milieu (chapitre 6).

Le développement de conditions anaérobies et l'apport de matière organique exogène a conduit à une solubilisation significative de l'AsV initialement présent dans le sol T12R et à sa réduction en AsIII, plus mobile. Dans le cadre de la gestion des sites pollués par l'As, le développement de telles conditions est donc à surveiller. Ainsi, il semble judicieux de favoriser l'aération des sols et de limiter l'apport de matière organique stimulant le développement de communautés bactériennes libérant l'As présent dans le sol.

Le développement de bactéries respirant l'AsV, identifiées *via* les gènes *arrA*, est vraisemblablement à l'origine de la bioréduction de l'AsV en AsIII à partir des phases porteuses du sol et des HFO exogènes. Ces résultats laissent envisager une libération directe de l'As piégé sur les HFO. Néanmoins, l'importante libération d'AsIII dans ces microcosmes est intimement liée à celle du Fe, indiquant également l'implication de bactéries FeIII-réductrices capable de dissoudre les phases porteuses et de libérer indirectement l'AsV. Des activités bactériennes anaérobies (respiration de FeIII et/ou d'AsV) détectées dans d'autres écosystèmes peuvent donc se développer dans les sols du bassin de la Meuse.

Les conditions aérobies n'ont pas favorisé la libération de l'AsV initialement présent. En revanche, elles ont favorisé le développement d'une microflore capable de solubiliser et d'oxyder l'AsIII fortement adsorbé aux HFO exogènes (à pH 7-8). Dans ces conditions, la solubilisation de l'As peut résulter d'une biooxydation directe de l'AsIII initialement adsorbé aux HFO, par des bactéries AsIII-oxydantes détectées *via* les gènes *aoxB*. Cette réaction a récemment été envisagée par Rhine *et al.* (2008) à partir de l'arsénopyrite par la bactérie AsIII- et sulfo-oxydante *Bosea* sp. WAO. La solubilisation de l'As peut également résulter d'un processus bactérien indirect. Dans notre étude, la désorption de l'As est également couplée à celle du Fe. Les bactéries pourraient alors produire des sidérophores qui les aideraient à obtenir le FeIII des oxydes de Fe (Hersman *et al.*, 2001) et à solubiliser l'AsIII dans le milieu. L'AsIII serait ensuite biooxydé en AsV par les bactéries AsIII-oxydantes.

Les activités d'oxydation de l'AsIII et de réduction de l'AsV résultent du développement de différentes communautés indigènes du sol. Les conditions aérobie et anaérobie ont induit une modification significative de la structure des communautés bactériennes totales (ciblée *via* le gène codant l'ARNr 16S). Néanmoins, aucune perturbation notable de leur structure liée à l'ajout d'HFO-As dans leur milieu n'a été constatée, indiquant que les communautés

bactériennes totales sont sous le contrôle de nombreux autres facteurs environnementaux et ne sont pas un bioindicateur sensible de l'accumulation d'As dans le milieu. A l'inverse, une variation significative de la structure/diversité des communautés AsIII-oxydantes ou respirant l'AsV a été observée en présence d'HFO-As, suggérant un effet spécifique de leur activité sur les différentes cinétiques de libération de l'As. A noter que des méthodes de suivi de la dynamique des communautés respirant l'AsV (méthodes d'empreinte moléculaire, PCR quantitative) sont également à développer sur les gènes *arrA*. L'utilisation des gènes fonctionnels *aoxB* et *arrA* s'est révélée être appropriée pour suivre ces communautés et évaluer les transformations potentielles de l'As inorganique dans ces études de laboratoire. Ces gènes (et ces communautés) peuvent donc constituer, à terme, des bioindicateurs pertinents de la biodisponibilité de l'As dans l'environnement.

Dans les sols agricoles faiblement pollués par l'As du bassin du Gallego, la microflore indigène a réagi différemment à une accumulation d'As dans le milieu (chapitre 8). Les microflores anaérobies de chacun des sols sont toutes capables de désorber et de réduire significativement l'AsV piégé sur des HFO. Par contre, les microflores aérobies montrent des capacités différentes vis-à-vis de l'AsIII adsorbé au HFO : (i) celle du sol G05 n'est capable ni de désorber l'AsIII ni de l'oxyder, (ii) celle du sol G07 n'est pas capable de désorber l'AsIII, mais peut l'oxyder et (iii) celle du sol G04 est capable de le désorber et de l'oxyder, comme celle du sol industriel T12R du bassin de la Meuse. Par ailleurs, la biodésorption de l'AsIII est liée à une augmentation de pH dans les sols. L'apport de matière organique a pu favoriser le développement de groupes bactériens capables d'alcaliniser le milieu.

Malgré l'apport de teneurs croissantes d'HFO-AsIII exogènes dans le sol G07 incubé en condition aérobie, des concentrations faibles et similaires d'As en solution, ainsi que des communautés bactériennes totales de structure semblable ont été détectées durant l'expérience. Les bactéries AsIII-oxydantes, détectées *via* les gènes *aoxB*, sont probablement à l'origine de l'oxydation complète de l'AsIII libéré en AsV. Par contre, la microflore aérobie indigène de ce sol n'accélère pas la mobilisation de l'As.

En revanche, la microflore anaérobie du sol G07 a contribué au développement de conditions fortement réductrices et à une forte libération d'AsIII et de Fe à partir des HFO durant la première phase des expériences. Comme dans les incubations du sol industriel T12R, la réduction de l'AsV adsorbé aux HFO est probablement liée au développement de bactéries respirant l'AsV, détectées *via* les gènes *arrA*, et sa libération est également liée à l'activité de bactéries FeIII-réductrices. Une précipitation de Fe a été observée durant la seconde phase des

expériences. En présence de faibles teneurs en HFO-AsV, l'As libéré a également été précipité durant cette seconde phase. Ce phénomène peut s'expliquer par le développement de bactéries sulfato-réductrices favorisant la formation de précipités de sulfures d'As et de sulfures de Fe. Néanmoins, en présence de teneurs 10 à 20 fois supérieures en HFO-AsV, la libération d'AsIII s'est poursuivie. Il ne peut être exclu que la précipitation conjointe de l'As et du Fe, en présence de faibles teneurs en HFO-AsV, soit liée à des équilibres géochimiques. Néanmoins, il peut être envisagé que les plus fortes concentrations d'HFO disponibles ont probablement piégé les sulfures en solution et favorisé la libération d'As. Ce travail souligne l'importance des processus bactériens affectant indirectement la mobilité de l'As dans les sols. De nombreux autres gènes doivent être ciblés en routine pour évaluer la mobilité de l'As. En effet, nous nous sommes focalisés dans cette thèse sur les gènes *aoxB* et *arrA*, mais il serait également très intéressant d'étendre la méthodologie aux gènes *dsrAB* marqueurs des bactéries sulfato-réductrices (Wagner *et al.*, 1998 ; Klein *et al.*, 2001), ou des gènes codant l'ARNr 16S de bactéries FeIII-réductrices, telles que celles des genres *Geobacter* et *Shewanella* (Cummings *et al.*, 2003 ; Todorova et Costello, 2006 ; Amos *et al.*, 2007).

L'ensemble des ces travaux de thèse ont permis de mettre en évidence le rôle important de la microflore indigène sur la mobilité de l'As dans les sols étudiés. La Figure 72 présente les principaux groupes bactériens impliqués directement ou indirectement dans la mobilité de l'As dans ces sols. Ces groupes bactériens se sont révélés être des bioindicateurs pertinents de la mobilisation/immobilisation de l'As dans les sols.

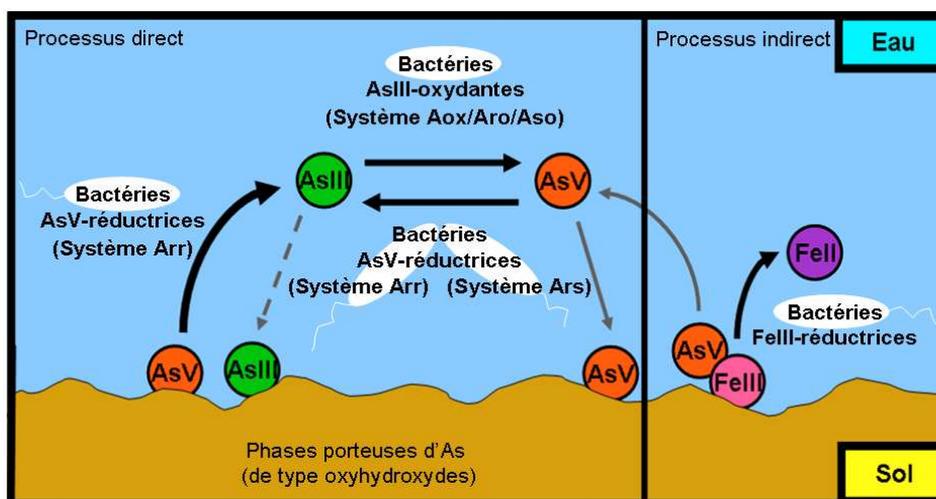


Figure 72 : Mécanismes bactériens impliqués dans la mobilité de l'As dans les sols étudiés

Une perspective directe de ce travail de thèse sera d'analyser les bactéries actives *in situ* et impliquées directement et/ou indirectement dans la mobilité de l'As, *via* l'expression des gènes d'intérêt. L'analyse des ARNm est particulièrement attractive car ils fournissent un lien direct entre les gènes et la production de protéine, donc l'activité d'une cellule. Ce sont des indicateurs pertinents puisqu'ils peuvent être extraits directement à partir des échantillons environnementaux et leur production est généralement réprimée dans des conditions défavorables. La comparaison de l'ensemble des gènes et des transcrits d'une même communauté par des techniques d'empreinte moléculaire permet de distinguer les membres actifs de la communauté de ceux simplement présents, de déterminer les espèces réellement impliquées dans la mobilité de l'As et d'évaluer les facteurs influençant leurs activités. L'élaboration de profils d'expression des gènes impliqués dans la mobilité de l'As dans des situations contrastées permettra d'apprécier leur capacité bioindicateur de la biodisponibilité de l'As. Néanmoins, pour comprendre les facteurs influençant l'expression des gènes impliqués dans l'oxydation ou la respiration de l'As dans des écosystèmes complexes, il est nécessaire d'évaluer préalablement la régulation de ces gènes au sein de diverses bactéries. L'impact de paramètres environnementaux, tels que le pH, la disponibilité en oxygène et les concentrations d'As seuil ou d'autres métalloïdes capables de faire varier l'expression de l'opéron bactérien d'intérêt, doit être évalué dans différentes souches bactériennes. Peu d'études renseignent sur la régulation des gènes impliqués dans l'oxydo-réduction de l'As. De plus, la régulation de gènes dans des conditions environnementales est en elle-même un objectif de travail intéressant, car ces conditions sont vraiment différentes des optima de croissance déterminés et utilisés en laboratoire. Une telle étude pourrait être appliquée à l'optimisation/robustesse des procédés de biorémédiation.

Prédire le comportement de l'As dans les écosystèmes est un véritable challenge. Les processus de transfert de l'As sont complexes. Ils dépendent non seulement de nombreux paramètres biologiques, mais également de facteurs abiotiques liés aux caractéristiques hydrodynamiques, minéralogiques, géochimiques de l'écosystème étudié. L'étude des processus impliqués nécessite des approches multidisciplinaires ciblées sur des sites expérimentaux adaptés, *i.e.* avec des sources de pollution bien localisées et bien identifiées (Baranger *et al.*, 2003). Dans ce cadre, une approche intégrée du système a été menée par le BRGM sur le site de Chéni, situé à proximité d'une ancienne mine (Limousin, France). Des analyses minéralogiques et un suivi hydrogéochimique approfondi ont été menés. Le facteur

microbiologique a été évalué *via* l'isolement et l'identification de deux populations bactériennes capables d'oxyder et de réduire l'As (populations CAsO1 et CAsR1, respectivement). La population CAsO1 s'est d'ailleurs révélée prometteuse pour le développement de bioprocédés de traitement d'eaux polluées par l'As (Battaglia-Brunet *et al.*, 2002). Des modèles ont été établis *via* l'intégration de l'ensemble des données hydrogéochimiques et ont permis de mieux comprendre le transfert de l'As à l'échelle d'un site. Ils peuvent être utilisés en tant qu'outil d'aide à l'évaluation du risque environnemental lié à la présence d'As (Baranger *et al.*, 2003). Néanmoins, ils nécessitent d'être améliorés notamment au niveau de l'intégration du facteur microbiologique. Les approches moléculaires développées et/ou appliquées durant cette thèse ont permis d'accéder à la diversité des communautés bactériennes présentes dans les écosystèmes étudiés et ont permis de mettre en évidence des relations pertinentes entre ces bactéries, les principales caractéristiques du milieu et le devenir de l'As. L'utilisation de ces outils dans des études intégrées telles que celle menée sur le site de Chéni, ainsi que leur perfectionnement, ne feront qu'accroître nos connaissances sur les conditions favorisant le développement de certains groupes bactériens et par conséquent sur le devenir de l'As dans l'environnement. A terme, ces résultats permettront de mieux prendre en compte les mécanismes et les processus bactériens dans les modèles « biogéochimiques ». Ces modèles sont utiles à la prédiction à long terme du comportement de l'As dans l'environnement, comme cela a pu déjà être développé (Burnol *et al.*, 2007). Par ailleurs, l'exploitation de ces résultats en tant que bioindicateurs peut aussi tout à fait être pertinente comme outil d'aide à la gestion/décision des sites pollués par l'As.

Une solution alternative aux systèmes naturels, « difficiles à interpréter » car très complexes, et aux systèmes batch, réalisés durant cette thèse « moins réalistes » car très simplifiés, pour mieux comprendre les processus de transfert impliqués dans la mobilité de polluants est la mise en œuvre de systèmes dynamiques, *e.g.* des expérimentations en colonne ou en lysimètres. Une colonne expérimentale du sol industriel T12R du bassin de la Meuse et remanié a été mise en œuvre au BRGM. Dans ce système, un grand nombre de facteurs externes tels que la température, le taux et la composition de précipitations météoriques, est contrôlé et facilite l'interprétation des données. Par contre, les conditions ou l'organisation des communautés microbiennes sur les agrégats de sols sont plus proches des conditions réelles d'un sol. Un tel dispositif permet de caractériser sur du long terme, dans des conditions hydrodynamiques plus proches de celles d'un sol naturel, la distribution et la composition de

la microflore bactérienne à différentes profondeurs, en fonction de contraintes environnementales contrôlées (température, fréquence et composition de la pluie artificielle...). Un suivi du «profil chimique» de la solution de sol effectué en parallèle permet de rechercher l'existence ou non d'une éventuelle corrélation avec le «profil biologique». Cette étape constitue une extrapolation des études de laboratoire vers le site, dans le but de rechercher et de tester l'utilisation des gènes de fonctions bactériennes comme bioindicateurs dynamiques de la mobilité de l'As du sol vers les eaux.

La détection de bioindicateurs de la mobilité de l'As à l'aide d'outils moléculaires sur des échantillons représentatifs du compartiment environnemental étudié permettra de surveiller et de connaître l'impact du biota sur des sites présentant des teneurs en As contrastés. Dans le cadre de la prévention de la pollution des sols et la gestion des sites et sols pollués, ces outils biologiques permettront de mieux appréhender les risques de pollutions liées à l'As. Des approches similaires peuvent être envisagées pour l'étude du transfert d'autres métaux lourds, tels que le chrome (Cr) et le mercure (Hg), et metalloïdes, tels que l'antimoine (Sb) et le sélénium (Se).

Valorisation du travail

Publications

Quéméneur M., Heinrich-Salmeron A., Muller D., Lièvreumont D., Jauzein M., Bertin P., Garrido F., et Jouliau C. 2008. Diversity surveys and evolutionary relationships of *aoxB* genes in aerobic arsenite-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:4567-73.

Communications

Quéméneur M., Battaglia-Brunet F., Garrido F., Jauzein M. et Jouliau C. 2008. Is the structure of As(III)-oxidizing bacterial communities linked to As concentration and speciation along the Isle River? 2nd International Congress Arsenic in the Environment, Valencia (Spain), May 21-23. Communication orale.

Quéméneur M., Garrido F., Jauzein M. et Jouliau C. 2007. Analyses de communautés bactériennes As-III oxydantes *via* le gène *aoxB*. Séminaire de l'école doctorale RP2E, Université de Nancy, 17 janvier. Affiche.

Quéméneur M., Garrido F., Jauzein M. et Jouliau C. 2007. Analyses de communautés bactériennes As-III oxydantes *via* le gène *aoxB*. Colloque d'Ecologie Microbienne, La Grande-Motte, 15-18 octobre. Affiche.

Quéméneur M., Garrido F., Billard P., Leyval C., Jauzein M. et Jouliau C. 2007. Bactéries et spéciation de l'arsenic dans les sols. Deuxième réunion d'avancement Programme National ADEME Bioindicateur de qualité des sols, Angers, 3 juillet. Communication orale.

Quéméneur M., Garrido F., Jauzein M. et Jouliau C. 2007. *aoxB* gene as molecular marker of arsenite-oxidizing bacteria. 9th Symposium on BACTERIAL GENETIC ECOLOGY (BAGECO), Wernigerode (Germany), June 23-27. Affiche.

Quéméneur M., Joubert A., Garrido F., Jauzein M. et Jouliau C. 2007. Bacterial community dynamic and potential arsenic biotransformation in industrial contaminated soil leachates. AquaTerra BIOGEOCHEM Subproject Meeting, Tübingen (Germany), March 15-16. Affiche.

Quéméneur M., Garrido F., Jauzein M. et Jouliau C. 2006. Mobilité de l'arsenic dans les sols : des communautés bactériennes aux gènes *arr* et *aox*. Colloque Biodépollution et environnement : Savoir et savoir-faire, Institut Pasteur, Paris, 12-13 septembre. Affiche.

Références

A

Aakra, Å., M. Hesselsøe and L.R. Bakken (2000) - Surface attachment of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Microbial Ecol.* **39**, p. 222–235.

Abdrashitova, S.A., Mynbaeva B.N., and A.N. Ilaletdinov (1981) - Arsenic oxidation by the heterotrophic bacteria *Pseudomonas putida* and *Alcaligenes eutrophus*. *Mikrobiologiya*. **50**, p. 41–45.

Abdullah, M.I., Z. Shiyu and K. Mosgren (1995) - Arsenic and selenium species in the oxic and anoxic waters of the Oslofjord, Norway, *Mar. Pollut. Bull.* **31**, p. 116–126.

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

Ahmann, D., L.R. Krumholz, H.F. Hemond, D.R. Lovley and F.M.M. Morel (1997) - Microbial mobilization of arsenic from sediments of the Aberjona watershed, *Environ Sci Technol* **31**, p. 2923–2930.

Akai, J., K. Izumi, H. Fukuhara, H. Masuda, S. Nakano, T. Yoshimura, H. Ohfuji, H.M. Anawar and K. Akai. (2004) - Mineralogical and geomicrobiological investigations on groundwater arsenic enrichment in Bangladesh, *Appl. Geochem.* **19**, p. 215–230.

Amann, R.I., W. Ludwig and K.-H. Schleifer (1995) - Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiol. Rev.* **59**, p.143–169.

Amos, B.K., Y. Sung, K.E. Fletcher, T.J. Gentry, W.-M. Wu, C.S. Criddle, J. Zhou, and F.E. Löffler (2007) - Detection and quantification of *Geobacter lovleyi* strain SZ: Implications for bioremediation at tetrachloroethene- (PCE-) and uranium-impacted sites. *Appl Environ Microbiol.* **73**, p. 6898-6904.

Anawar, H. M. , J. Akai, T. Yoshioka, E. Konohira, J. Y. Lee, H. Fukuhara, M. Tari Kul Alam and A. Garcia-Sanchez (2006) - Mobilization of arsenic in groundwater of Bangladesh: evidence from an incubation study. *Environ Geochem Health.* **28**, p. 553-565

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

Anderson, G. L., M. Love, and B. K. Zeider. (2003) - Metabolic energy from arsenite oxidation in *Alcaligenes faecalis*. *J. Phys.* **107**, p. 49-52

Anderson, M.A., J.F. Ferguson, and J. Gavis (1976) - Arsenate adsorption on amorphous aluminum hydroxide. *J. Colloid Interface Sci.* **54**, p. 391–399.

Anderson, C.R., and G.M. Cook (2004) - Isolation and characterization of arsenate-reducing bacteria from arsenic-contaminated sites in New Zealand. *Curr Microbiol.* **48**, p. 341–347.

Antman, K. H. (2001) - The history of arsenic trioxide in cancer therapy. Introduction to a supplement to *The Oncologist.* **6**, p. 1-2.

Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Meyers, and D. J. Lipman. (1990) - Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, p. 403-410

Avidano, L., E. Gamalero G. Paolo Cossa, and E. Carraro (2005) - Characterization of soil health in an Italian polluted site by using microorganisms as bioindicators. *Applied Soil Ecol.* **30**, p. 21-33.

Azcue, J.M., and J.O. Nriagu (1995) - Impact of abandoned mine tailings on the arsenic concentrations in Moira Lake, Ontario, *J. Geochem. Explor.* **52**, p. 81–89.

B

- Baar, C., M. Eppinger, G. Raddatz, J. Simon, C. Lanz, O. Klimmek, R. Nandakumar, R. Gross, A. Rosinus, H. Keller, P. Jagtap, B. Linke, F. Meyer, H. Lederer, and S.C. Schuster** (2003) - Complete genome sequence and analysis of *Wolinella succinogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, p. 11690-11695.
- Barra, C.M., and M. M. Correia dos Santos** (2001) - Speciation of inorganic Arsenic in natural waters by square-wave cathodic stripping voltammetry *Electroanalysis* 13, p. 1098-1104.
- Barbier, J.** (2001) – Occurrences naturelles de l'arsenic en France : roches, sols, milieux associés. Les techniques de l'Industrie Minières. n°11, septembre 2001, p. 51-66.
- Battaglia-Brunet, F., C. Joulain, F. Garrido, M.C. Dictor, D. Morin, K. Coupland, D. Barrie Johnson, K. B. Hallberg, and P. Baranger** (2006a) - Oxidation of arsenite by *Thiomonas* strains and characterization of *Thiomonas arsenivorans* sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 89, p. 99-108.
- Battaglia-Brunet, F., Y. Itard, F. Garrido, F. Delorme, C. Crouzet, C. Greffié, and C. Joulain** (2006b) - A simple biogeochemical process removing arsenic from a mine drainage water. *Geomicrob. J.* 23, p. 1-11.
- Battaglia-Brunet, F., M. C. Dictor, F. Garrido, C. Crouzet, D. Morin, K. Dekeyser, M. Clarens, and P. Baranger** (2002) - An As(III)-oxidizing bacterial population: selection, characterization, and performance in reactors. *J. Appl. Microbiol.* 93, p. 656-667
- Baeyens, W., A. de Brauwere, N. Brion, M. De Gieter and M. Leermakers** (2007) - Arsenic speciation in the River Zenne, Belgium. *Sci Total Environ* 384, p. 409-419.
- Bavykin, S.G., Y.P. Lysov, V. Zakhariyev, J.J. Kelly, J. Jackman, D.A. Stahl, and A. Cherni** (2004) - Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and *gyrB* Gene Sequence Analysis To Determine Phylogenetic Relationships of *Bacillus cereus* Group Microorganisms *J. Clin. Microbiol.* 42, p. 3711-3730.
- Bodénan, F., P. Baranger, P. Piantone, A. Lassin, M. Azaroual, E. Gaucher, and G. Braibant** (2004) - Arsenic behaviour in gold-ore mill tailings, Massif Central, France: hydrogeochemical study and investigation of in situ redox signatures, *Appl Geochem* 19, p. 1785-1800.
- Boyle, R.W., and I.R. Johanson** (1973) - The geochemistry of arsenic and its use as an indicator element for geochemical prospecting. *J. Geochem. Explor.* 2, p. 252-296.
- Braker, G., J. Zhou, L. Wu, A. H. Devol, and J. M. Tiedje** (2000) - Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific northwest marine sediment communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, p. 2096-2104.
- Bhumba, D.K., and Keefer, R.F.** (1994) - Arsenic mobilization and bioavailability in soils. In: Nriagu, J.O., Editor. *Arsenic in the environment. Part I: cycling and characterization*, John Wiley & Son, New York, p. 51-81.
- Bentley, R., and T.G. Chasteen** (2002) - Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony, and bismuth, *Microbiol Mol Biol Rev* 66, p. 250-271.
- Bissen, M., and F.H. Frimmel** (2003) - Arsenic—a review. Part II: oxidation of arsenic and its removal in water treatment, *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 31, p. 97-107.
- Blum, J.S., A.B. Bindi, J. Buzzelli, J.F. Stolz, and R.S. Oremland** (1998) - *Bacillus arsenicoselenatis* *Bacillus arsenicoselenatis*, sp. nov., and *Bacillus selenitireducens* *Bacillus selenitireducens*, sp. nov., two haloalkaliphiles from Mono Lake, California, that respire oxyanions of selenium and arsenic. *Arch. Microbiol.* 171, p. 19-30.
- Bowell, R.J.** (1994) - Sorption of arsenic by iron oxides and oxyhydroxides in soils. *Appl. Geochem.* 9, p. 279-286.

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, p. 492–499.

Buchholz-Cleven, B.E.E., B. Rattunde, and K.L. Straub (1997) - Screening for genetic diversity of isolates of anaerobic Fe(II)-oxidizing bacteria using DGGE and whole cell hybridization, *Systematic Applied Microbiology* 20, p. 301–309.

Burgmann, H., F. Widmer, W.V. Sigler, and J. Zeyer (2003) - mRNA Extraction and Reverse Transcription-PCR Protocol for Detection of *nifH* Gene Expression by *Azotobacter vinelandii* in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, p. 1928-1935.

Burnol, A., F. Garrido, P. Baranger, C. Jouliau, M.C. Dictor, F. Bodéan, G. Morin, and L. Charlet (2007) - Decoupling of arsenic and iron release from ferrihydrite suspension under reducing conditions: a biogeochemical model. *Geochem Trans.* 8, p. 12.

C

Cáceres, L., E. Gruttner and R. Contreras (1992) - Water recycling in arid regions - Chilean case, *Ambio* 21, p. 138–144.

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

Campbell, K.M., D. Malasarn, C.W. Saltikov, D.K. Newman, and J.G. Hering (2006) - Simultaneous Microbial Reduction of Iron(III) and Arsenic(V) in Suspensions of Hydrous Ferric Oxide. *Environ. Sci. Technol.* 40, p. 5950–5955.

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, p. 981–986.

Case, R. J., Y. Boucher, I. Dahllöf, C. Holmström, W. F. Doolittle, and S. Kjelleberg (2007) - Use of 16S rRNA and *rpoB* Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, p. 278-288.

Casiot, C., V. Pedron, O. Bruneel, R. Duran, J.C. Personne, G. Grapin, C. Drakides, and F. Elbaz-Poulichet (2006) - A new bacterial strain mediating As oxidation in the Fe-rich biofilm naturally growing in a groundwater Fe treatment pilot unit. *Chemosphere.* 64, p. 492–496.

Caussy, D. (2003) Case studies of the impact of understanding bioavailability: arsenic. *Ecotoxicol Environ Saf* 56, p.164–173

Cébron, A., M.P. Norini, T. Beguiristain, and C. Leyval (2008) - Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD α) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *J Microbiol Methods.* 73, p. 148-59.

Cébron, A., T. Berthe, and J. Garnier (2003) - Nitrification and nitrifying bacteria in the lower Seine River and estuary (France), *Appl. Environ. Microbiol.* 69, p. 7091-7100.

Cervantes, C., G. Ji, J.L. Ramírez and S. Silver (1994) - Resistance to arsenic compounds in microorganisms, *FEMS Microbiol. Rev.* 15, p. 355–367.

Chang, J.S., I.H. Yoon, and K.W. Kim (2007) - Isolation and ars detoxification of arsenite-oxidizing bacteria from abandoned arsenic-contaminated mines. *J. Microbiol Biotechnol.* 17, p. 812-21.

Chang, S., J. Puryear and J. Cairney (1993) - A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11, p. 113–116.

Chatain, V., R. Bayard, F. Sanchez, P. Moszkowicz, and R. Gourdon (2005) - Effect of indigenous bacterial activity on arsenic mobilization under anaerobic conditions. *Environ Int.* 31, p. 221-226.

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.* 26, p. 15030-8.

Chéry, L., and C. Gateau (1998) - Mise à disposition de l'inventaire géochimique sur le territoire national (pour identifier les zones à risques de teneurs naturelles élevées en métaux lourds dans les eaux destinées à l'AEP. BRGM/RR-40207-FR.

Clement, B.G., L.E. Kehl, K.L. DeBord, and C.L. Kitts (1998) - Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. *J. Microbiol. Meth.* 31, p. 135-142.

Copeland, A., S. Lucas, A. Lapidus, K. Barry, C. Detter, T. Glavina, N. Hammon, S. Israni, S. Pitluck, and P. Richardson (2002) - Sequencing of the draft genome and assembly of *Desulfitobacterium hafniense* DCB-2, CONSRTM US DOE Joint Genome Institute (JGI-PGF).

Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, and H. M. Lappin-Scott (1995) - Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, p. 711-745.

Coupland, K., F. Battaglia-Brunet, K. B. Hallberg, M. C. Dictor, F. Garrido, and D. B. Johnson (2004) - Oxidation of iron, sulfur and arsenic in mine waters and mine wastes, an important role for novel *Thiomonas* spp. Biohydrometallurgy; a sustainable technology in evolution. p. 639-646.

Cullen, W.R., and K.J. Reimer (1989) - Arsenic Speciation in the Environment. *Chem. Rev.* 89, p. 713-764.

Cullen, D.W., and P.R. Hirsch (1998) - Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. *Soil Biol. Biochem.* 30, p. 983-993.

Cummings, D. E., O. L. Snoeyenbos-West, D. T. Newby, A. M. Niggemyer, D. R. Lovley, L. A. Achenbach, and R. F. Rosenzweig (2003) - Diversity of *Geobacteraceae* species inhabiting metal-polluted freshwater lake sediments ascertained by 16S rDNA analyses. *Microb. Ecol.* 46, p. 257-269.

D

Dabert, P., J.P. Delgenes, and J.-J. Godon (2005) - Monitoring the impact of bioaugmentation on the start up of biological phosphorus removal in a laboratory scale activated sludge ecosystem, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, p. 575-588.

Dahllof, I., H. Baillie, and S. Kjelleberg (2000) - *rpoB*-based microbial community analysis avoids limitations inherent in the 16 rRNA gene intraspecies heterogeneity, *Appl. Environ. Microbiol.* 40, p. 1333-1338.

Dassonville, F., J.J. Godon, P. Renault, A. Richaume, and P. Cambier (2004) - Microbial dynamics in an anaerobic soil slurry amended with glucose, and their dependence on geochemical processes. *Soil Biol. Biochem.* 36, p. 1417-1430.

Davis, C.C., W.R. Knocke and M. Edwards (2001) - Implications of aqueous silica sorption to iron hydroxide: mobilization of iron colloids and interference with sorption of arsenate and humic substances, *Environ. Sci. Technol.* 35, p. 3158-3162.

Delbès, C., M. Leclerc, E. Zumstein, J.J. Godon, and R. Moletta (2001) - A molecular method to study population and activity dynamics in anaerobic digestors. *Water Sci Technol.* 43, p. 51-57.

Delbès, C., R. Moletta, and J.J. Godon (2000) - Monitoring of activity dynamics of an anaerobic digester bacterial community using 16S rRNA polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis, *Environ. Microbiol.* 2, p. 506-515.

Delbès, C., J.-J. Godon, and R. Moletta (1998) - 16S rDNA sequence diversity of a culture-accessible part of an anaerobic digester bacterial community. *Environ. Microbiol.* 4, p. 267-275.

- de Liphay, J.R., C. Enzinger, K. Johnsen, J. Aamand, and S.J. Sørensen** (2004) - Impact of DNA extraction method on bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Biol Biochem* 36, p. 1607–1614
- Dewhurst, F.E., Z. Shen, M.S. Scimeca, L.N. Stokes, T. Boumenna, T. Chen, B.J. Paster, and J.G. Fox** (2005) - Discordant 16S and 23S rRNA Gene Phylogenies for the Genus *Helicobacter*: Implications for Phylogenetic Inference and Systematics. *J. Bacteriol.* 187, p. 6106-6118
- Dey S, D. Dou, L.S. Tisa, and B.P. Rosen** (1994) - Interaction of the catalytic and the membrane subunits of an oxanion-translocating ATPase. *Arch Biochem Biophys* 311, p. 418–424
- Dhar, R. K., B. K. Biswas, G. Samanta, B. K. Mandal, D. Chakraborti, S. Roy, A. Jafar, A. Islam, G. Ara, S. Kabir, A.W. Khan, S.A. Ahmed, and S. A. Hadi** (1997) - Groundwater arsenic calamity in Bangladesh. *Curr Sci.* 73, p. 48–59.
- D'Imperio, S., C.R. Lehr, M. Breary, and T.R. McDermott** (2007) - Autecology of an Arsenite Chemolithotroph: Sulfide Constraints on Function and Distribution in a Geothermal Spring. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, p. 7067-7074
- Dobson, S.L., and D. Franzmann** (1996) - Unification of the genera *Deleya* (Barman *et al.* 1983), *Halomonas* (Vreeland *et al.* 1980), and *Halovibrio* (Fendrich 1988) and the species *Paracoccus halodenitrificans* (Robinson and Gibbons 1952) into a single genus, *Halomonas*, and placement of the genus *Zymobacter* in the family *Halomonadaceae*. *Int J Syst Bacteriol* 46, p. 550–558.
- Donahoe-Christiansen, J., S. D'Imperio, C. R. Jackson, W. P. Inskeep, and T. R. McDermott** (2004) - Arsenite-oxidizing *Hydrogenobaculum* strain isolated from an acid-sulfate-chloride geothermal spring in Yellowstone National Park. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, p. 1865-1868
- Dopp, E.** (2008) - Cellular uptake, subcellular distribution and toxicity of arsenic compound. In: *2nd International Congress Arsenic in the Environment – Arsenic from nature to humans, 21.-23.05.2008, Valencia (Spain)*. p. 437-8.
- Dopp, E., L.M. Hartmann, A.M. Florea, A.W. Rettenmeier, and A.V. Hirner** (2004) - Environmental distribution, analysis and toxicity of organometal(loid) compounds. *Crit Rev Toxicol.* 34, p. 1-33.
- Dove, P.M. and J.A. Rimstidt** (1985) - The solubility and stability of scorodite, $\text{FeAsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. *Am. Mineral.* 70, p.838–844.
- Dzombak, D.A., and F.M.M. Morel** (1990) - Surface complexation modeling-Hydrous ferric oxide: New York, John Wiley & Sons, p.393.
- Dixit, S., and J.G. Hering** (2003) - Comparison of arsenic(V) and arsenic(III) sorption onto iron oxide minerals: implications for arsenic mobility, *Environ Sci Technol* 37, P. 4182-4189.
- Drewniak, L., A. Styczek, M. Majder-Lopatka, and A. Sklodowska** (2008) - Bacteria, hypertolerant to arsenic in the rocks of an ancient gold mine, and their potential role in dissemination of arsenic pollution. *Environ Pollut.* Sous presse.
- Drewniak, L. and A. Sklodowska** (2007) - Isolation and characterization of a psychrotolerant arsenite-oxidizing bacterium from a gold mine in Zloty Stok, Poland. *Adv. Mater. Res.* 20-21, p. 575.
- Drobna, Z., V. Devesa, D.J. Thomas, and M. Styblo** (2008) - Mecanism of arsenic in human liver, In: *2nd International Congress Arsenic in the Environment – Arsenic from nature to humans, 21.-23.05.2008, Valencia (Spain)*. p. 431-2.
- Duan, M., Z. Xie, Y. Wang, and X. Xie** (2008) - Microcosm studies on iron and arsenic mobilization from aquifer sediments under different conditions of microbial activity and carbon source. *Environ. Geol.* DOI 10.1007/s00254-008-1384-z.

Duquesne, K., A. Lieutaud, J. Ratouchniak, A. Yarzabal, and V. Bonnefoy (2007) - Mechanisms of arsenite elimination by *Thiomonas* sp. isolated from Carnoulès acid mine drainage. *Eur. J. Soil Biol.* 43, p. 351-355.

Duquesne, K., A. Lieutaud, J. Ratouchniak, D. Muller, M.-C. Lett, and V. Bonnefoy (2007) - Arsenite oxidation by a chemoautotrophic moderately acidophilic *Thiomonas* sp.: from the strain isolation to the gene study. *Environ. Microbiol.* 10, p. 228-237.

Duthoit, F., J.J. Godon, and M.C. Montel (2003) - Bacterial Community Dynamics during Production of Registered Designation of Origin Salers Cheese as Evaluated by 16S rRNA Gene Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, p. 3840-3848.

E

Eardly, B. D., F. S. Wang, and P. Vanberkum (1996) - Corresponding 16S rRNA gene segments in *Rhizobiaceae* and *Aeromonas* yield discordant phylogenies. *Plant Soil* 186, p. 69-74.

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.* 9, p. 125-132.

F

Fan H., C. Su, Y. Wang, J. Yao, K. Zhao, Y. Wang and G. Wang (2008) - Sedimentary arsenite-oxidizing and arsenate-reducing bacteria associated with high arsenic groundwater from Shanyin, Northwestern China. *J. Appl. Microbiol.* 105, p. 529-539.

Felsenstein, J. (1989) - PHYLIP-phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics* 5, p. 164-166.

Felsenstein, J. (1985) - Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, p. 783-791.

Ficklin, W.H. (1983) - Separation of arsenic(III) and arsenic(V) in ground waters by ion-exchange, *Talanta* 30, p. 371-373.

Felske, A., A.D.L. Akkermans and W.M. De Vos (1998) - Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints, *Applied and Environmental Microbiology* 64, p. 4581-4587.

Felske, A., B. Engelen, U. Nübel, and H. Backhaus (1996) - Direct ribosome isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, p. 4162-4167.

Fisher, J.C., and J.T. Hollibaugh (2008) Selenate-Dependent Anaerobic Arsenite Oxidation by a Bacterium from Mono Lake, California. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, p. 2588-2594.

Fisher, E., A. M. Dawson, G. Polshyna, J. Lisak, B. Crable, E. Perera, M. Ranganathan, M. Thangavelu, P. Basu, and J. F. Stolz. (2008) - Transformation of inorganic and organic arsenic by *Alkaliphilus oremlandii* sp. nov. strain OhILAs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1125, p. 230-41.

Fleming, J.T., W.-H. Yao, and G.S. Sayler (1998) - Optimization of differential display of prokaryotic mRNA: application to pure culture and soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, p. 3698-3706.

Fogel, G. B., C. R. Collins, J. Li, and C. F. Brunk (1999) - Prokaryotic genome size and SSU rDNA copy number: estimation of microbial relative abundance from a mixed population. *Microb. Ecol.* 38, p. 93-113.

Fox, G.E., Wisotzkey J.D., and Jr. P. Jurtshuk (1992) - How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, p. 166-170.

Friedrich, M.W. (2002) - Phylogenetic analysis reveals multiple lateral transfers of adenosine-5'-phosphosulfate reductase genes among sulfate-reducing microorganisms. *J. Bacteriol.* 184, p. 278-289.

Frost, R.R., and R.A. Griffin (1977) - Effect of pH on adsorption of arsenic and selenium from landfill leachate by clay minerals. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 41, p. 53–57.

Fuller, C.C., J.A. Davis, and G.A. Waychunas (1993) - Surface chemistry of ferrihydrite: Part 2. Kinetics of arsenate adsorption and coprecipitation. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 57, p. 2271-2282.

G

Garbarino, J.R., A.J. Bednar, D.W. Rutherford, R.S. Beyer, and R.L. Wershaw (2003) - Environmental fate of roxarsone in poultry litter. I. Degradation of roxarsone during composting. *Environ Sci Technol* 37, p. 1509-1514.

Garcia-Manyes, S., G. Jimenez, A. Padro, R. Rubio, and G. Rauret (2002) - Arsenic speciation in contaminated soils, *Talanta* 58, p. 97–109.

Garcia-Martinez, J., S.G. Acinas, A.I. Anton, and F. Rodriguez-Valera (1999) - Use of the 16S–23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *J. Microbiol. Methods* 36, p. 55–64.

Garrido, F., M.C. Dictor, F. Bodéan, G. Morin, and P. Baranger (2002) - Influence du facteur biogéochimique sur la stabilité des pièges minéralogiques de type oxy-hydroxydes de fer. BRGM/RP-51730-FR, non publié.

Geets, J., M. de Cooman, L. Wittebolle, K. Heylen, B. Vanparrys, P. De Vos, W. Verstraete, and N. Boon (2007) - Real-time PCR assay for the simultaneous quantification of nitrifying and denitrifying bacteria in activated sludge. *Appl Microbiol Biotechnol* 75, p. 211–221.

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, p. 3857-3862.

Gihring, T. M., and J.F. Banfield (2001) - Arsenite oxidation and arsenate respiration by a new *Thermus* isolate. *FEMS Microbiol. Lett.* 204, p. 335-340.

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, p. 593-599.

Ghosh, A., A.E. Sáez, and W.P. Ela (2006) - Effect of pH, competitive anions and NOM on the leaching of arsenic from solid residuals. *Sci Total Environ.* 363, p. 46–59.

Giovannoni, S.J., T.B. Britschgi, C.L. Moyer and K.G. Field (1990) - Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton, *Nature* 345, p. 60–63.

Goh, K.-H., and T.-T. Lim (2004) - Geochemistry of inorganic arsenic and selenium in a tropical soil: Effect of reaction time, pH, and competitive anions on arsenic and selenium adsorption. *Chemosphere* 55, p. 849–859.

Goldberg, S., and R.A. Glaubig (1988) - Anion sorption on a calcareous, montmorillonitic soil—Arsenic. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 52, p. 1297–1300.

Gremion, F. (2003) - Analysis of microbial community structures and functions in heavy metal-contaminated soils using molecular methods. Thèse No. 2862, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, EPFL, p. 1-107.

Gupta, S.K., and K.Y. Chen (1978) - Arsenic removal by adsorption. *J. Water Pollution Control Fed.* 50, p. 493–506.

H

Hall, T. (1999) - BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp.* Ser. 41, p. 95-98.

Hallberg, K.B., and D.B. Johnson (2003) - Novel acidophiles isolated from moderately acidic mine drainage waters. *Hydrometallurgy.* 71, p.139-148.

- Hedges R.W. and Baumberg S.** (1973) - Resistance to arsenic compounds conferred by a plasmid transmissible between strains of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 115, p. 459-60.
- Henry, S., D. Bru, B. Stres, S. Hallet, and L. Philippot** (2006) - Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, p. 5181-5189.
- Henry, S., E. Baudoin, J.C. Lopez-Gutierrez, F. Martin-Laurent, A. Brauman, and L. Philippot** (2004) - Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR. *J. Microbiol. Methods* 59, p. 327-335.
- Herbel, M., and S. Fendorf** (2006) - Biogeochemical processes controlling the speciation and transport of arsenic within iron coated sands *Chem Geol* 228, p. 16-32.
- Herbel, M.J., J.S. Blum, S.E. Hoefft, S.M. Cohen, L.L. Arnold, J. Lisak, J.F. Stolz, and R.S. Oremland** (2002) - Dissimilatory arsenate reductase activity and arsenate-respiring bacteria in bovine rumen fluid, hamster feces, and the termite hindgut. *FEMS Microbiol. Ecol.* 41, p. 59-67.
- Hering, J.G., P.J. Chen, J.A. Wilkie, and M. Elimelech** (1997) - Arsenic removal from drinking water during coagulation, *J. Environ. Eng.* 8, p. 800-807.
- Hersman, L.E., J.H. Forsythe, L.O. Ticknor, and P.A. Maurice** (2001) - Growth of *Pseudomonas mendocina* on Fe(III) (hydr)oxides. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, p. 4448-4453.
- Hersman, L., P. Maurice, and G. Sposito** (1996) - Iron acquisition from hydrous Fe(III)-oxides by an aerobic *Pseudomonas* sp. *Chem. Geol.* 132, p. 25-31.
- Hersman, L., T. Lloyd, and G. Sposito** (1995) - Siderophore-promoted dissolution of hematite. *Geochim. Cosmochim. Acta* 59, p. 3327-3330.
- Hindmarsh, J.T., and R.F. McCurdy** (1986) - Clinical and environmental aspects of arsenic toxicity. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 23, p. 315-347.
- Hirano, S., Y. Kobayashi, T. Hayakawa, X. Cui, M. Yamamoto, S. Kanno, and A. Shraim** (2005) - Accumulation and toxicity of monophenyl arsenicals in rat endothelial cells. *Arch Toxicol.* 79, p. 54-61.
- Hoefft, S. E., J. S. Blum, J. F. Stolz, F. R. Tabita, B. Witte, G. M. King, J. M. Santini, and R. S. Oremland** (2007) - *Alkalilimnicola ehrlichii* sp. nov., a novel, arsenite-oxidizing haloalkaliphilic gammaproteobacterium capable of chemoautotrophic or heterotrophic growth with nitrate or oxygen as the electron acceptor. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, p. 504-12.
- Hoefft, 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, p. 2741-2747.
- Hollibaugh, J., S. Carini, H. Gürleyük, R. Jellison, S. Joye, G. LeClerc, C. Meile, L. Vasquez, and D. Wallschläger** (2005) - Distribution of arsenic species in alkaline, hypersaline, Mono Lake, California, and response to seasonal stratification and anoxia. *Geochim. Cosmochim. Acta* 69, p. 1925-1937.
- Hollibaugh, J.T., C. Budinoff, R.A. Hollibaugh, B. Ransom, and N. Bano** (2006) - Sulfide oxidation coupled to arsenate reduction by a diverse microbial community in a Soda Lake. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, p. 2043-2049.
- Holmes, D.E., K.P. Nevin, and D.R. Lovley** (2004) - Comparison of 16S rRNA, *nifD*, *recA*, *gyrB*, *rpoB* and *fusA* genes within the family *Geobacteraceae* fam. nov.. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, p. 1591-1599.
- Hong, H., A. Pruden, and K.F. Reardon** (2007) - Comparison of CE-SSCP and DGGE for monitoring a complex microbial community remediating mine drainage. *J. Microbiol. Meth.* 69, p. 52-64.

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

I

Imhoff, J.F., H.G. Truper, and N. Pfennig (1984) - Rearrangement of the species and genera of the phototrophic "purple nonsulfur bacteria". *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34, p. 340–343.

Inagaki, F., U. Tsunogai, M. Suzuki, A. Kosaka, H. Machiyama, K. Takai, T. Nunoura, K.H. Neelson, and K. Horikoshi (2004) - Characterization of C₁-metabolizing prokaryotic communities in methane seep habitats at the Kuroshima Knoll, southern Ryukyu Arc, by analyzing *pmoA*, *mmoX*, *mxoF*, *mcrA*, and 16 rRNA Genes. *Appl Environ Microbiol* 70, p. 7445–7455.

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

Ilietdinov, A.N., and S.A. Abdrashitova (1981) - Autotrophic arsenic oxidation by a *Pseudomonas arsenitoxidans* culture. *Mikrobiologiya.* 50, p. 197-204.

Islam, F., A. Gault, C. Boothman, D. Polya, J. Charnock, D. Chatterjee, and J. Lloyd (2004) - Role of metal-reducing bacteria in arsenic release from Bengal delta sediments. *Nature.* 430, p. 68-71

Itard, Y., S. Chevrel, J.J. Seguin, A. Bourguignon, F. Cottard, et P. Stollsteiner (2007) – Approche Régionale et Enjeux liés à la Déprise de l'Industrie Extractive (AREDIE). BRGM/RP-55740-FR. Non publié.

J

Jackson, C.R., K.G Harrison, and S.L. Dugas (2005) - Enumeration and characterization of culturable arsenate resistant bacteria in a large estuary. *Syst. Appl. Microbiol.* 28, p. 727-34.

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.* 23, p. 3-18.

Jackson, C.R., H.W. Langner, J. Donahoe-Christiansen, W.P. Inskeep, and T.R. McDermott (2001) - Molecular analysis of microbial community structure in an arsenite-oxidizing acidic thermal spring. *Environ. Microbiol.* 3, p. 532-542.

Jackson, B.P., and W.P. Miller (1999) - Soluble arsenic and selenium species in fly ash/organic waste-amended soils using ion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* 33, p.270-275.

Jain, A., and R.H. Loeppert (2000) - Effect of competing anions on the adsorption of arsenate and arsenite by ferrihydrite, *Journal of Environmental Quality* 29, p. 1422–1430.

Jain, A., K.P. Raven, and R.H. Loeppert (1999) - Arsenite and arsenate adsorption on ferrihydrite: surface charge reduction and net OH⁻ release stoichiometry. *Environ Sci Technol* 33, p. 1179–1184.

Jay, J.A., N.K. Blute, H.F. Hemond and J.L. Durant (2004) - Arsenic-sulfides confound anion-exchange resin speciation of aqueous arsenic, *Water Res.* 38, p. 1155–1158.

Johnson, D.B., and K.B. Hallberg (2005) - Biogeochemistry of the compost bioreactor components of a composite acid mine drainage passive remediation system. *Sci. Tot. Environ.* 338, p. 81-93.

Johnson, D.B., S. Rolfe, K.B. Hallberg, and E. Iversen (2001) - Isolation and phylogenetic characterization of acidophilic microorganisms indigenous to acidic drainage waters at an abandoned Norwegian copper mine. *Environ Microbiol* 3, p. 630-637.

Jones, C.A., H. Langner, K. Anderson, T.R. McDermott, and W. Inskeep (2000) - Rates of microbially mediated arsenate reduction and solubilization, *Soil Sci Soc Am J* 64, p. 600–608.

Joubert, A. (2008) - Etude de l'effet de facteurs environnementaux sur les processus biogéochimiques de mobilisation de Pb, Zn, Cd, As et Hg dans les sols - Modélisation empirique de la mobilité et phyto-disponibilité des ETM. Thèse de doctorat d'université - Laboratoire des Interactions Microorganismes-Minéraux-Matière Organique dans les Sols (LIMOS), UMR 7137 CNRS, Université Henri Poincaré de Nancy.

Joubert, A. V. P., L. Lucas, F. Garrido, C. Joulian, and M. Jauzein (2007) - Effect of temperature, gas phase composition, pH and microbial activity on As, Zn, Pb and Cd mobility in selected soils in the Ebro and Meuse Basins in the context of global change. *Environ. Poll.* 148, p. 749-748.

Junca, H., and D.H. Pieper (2004) - Functional gene diversity analysis in BTEX contaminated soils by means of PCR-SSCP DNA fingerprinting: comparative diversity assessment against bacterial isolates and PCR-DNA clone libraries, *Environ. Microbiol.* 6, p. 95-110.

Jukes, T.H., and C.R. Cantor (1969) - Evolution of protein molecules, p. 21-132. In H. N. Munro (ed.), Mammalian protein metabolism. Academic Press, New York, N.Y.

K

Kalendar, R. (2005) - FastPCR: a PCR primer design and repeat sequence searching programme with additional tools for the manipulation and analysis of DNA and protein.

Katayama, Y., Y. Uchino, A.P. Wood, and D.P. Kelly (2006) - Confirmation of *Thiomonas delicata* (formerly *Thiobacillus delicatus*) as a distinct species of the genus *Thiomonas* Moreira and Amils 1997 with comments on some species currently assigned to the genus. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, p. 2553-2557.

Kelly, D.P., and A.P. Wood (2000) - Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, p. 511-516.

Kim, M.J., J. Nriagu, and S. Haack (2000) - Carbonate ions and arsenic dissolution by groundwater. *Environ. Sci. Technol.* 34, p. 3094-3100.

Kimura, M. (1980) - A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. *J. Mol. Biol.* 16, p. 111-120.

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

Klappenbach, J.A., J.M. Dunbar, and T.M. Schmidt (2000) - rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, p. 1328-1333

Klein, M., M. Friedrich, A.J. Roger, P. Hugenholtz, S. Fishbain, H. Abicht, L.L. Blackall, D.A. Stahl, and M. Wagner (2001) - Multiple lateral transfers of dissimilatory sulfite reductase genes between major lineages of sulfate-reducing prokaryotes. *J. Bacteriol.* 183, p. 6028-6035.

Klotz, M.G., Alzerreca J., and J.M. Norton (1997) - A gene encoding a membrane protein exists upstream of the *amoA/amoB* genes in ammonia oxidizing bacteria: a third member of the amo operon? *FEMS Microbiol Lett* 150, p. 65-73.

Ko, I., J.-Y. Kim and K.-W. Kim (2004) - Arsenic speciation and sorption kinetics in the As-hematite-humic acid system, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects* 234, p. 43-50.

Kolker, A., Haack, S.K., Cannon, W.F., Westjohn, D.B., Kim, M.-J., Nriagu, J. and Woodruff, L.G. (2003) - Arsenic in southeastern Michigan. In: Welch, A.H. and Stollenwerk, K.G., Editors, 2003. *Arsenic in Ground Water*, Kluwer, Netherlands, p. 281-294.

Komar, K., L.Q. Ma, D.Rockwood, and A.A. Syed (1998) - Identification of arsenic tolerant and hyperaccumulating plants from arsenic contaminated soils in Florida, *Agron. Abstr.* 343.

Kozdrój, J., and J.D. van Elsas (2001) - Structural diversity of microbial communities in arable soils of a heavily industrialized area determined by PCR-DGGE fingerprinting and FAME profiling, *Appl. Soil Ecol.* 17, p. 31–42.

Krafft, K., and J.M. Macy (1998) - Purification and characterisation of the respiratory arsenate reductase of *Chrysiogenes arsenatis*. *Eur. J. Biochem.* 255, p. 647-653.

Krumova, K., M. Nikolovska, and V. Groudeva (2008) - Isolation and identification of arsenic-transforming bacteria from arsenic contaminated sites in Bulgaria. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 22, p. 721-728.

Kuai, L., A.A. Nair, and M.F. Polz (2001) - Rapid and simple method for the most-probable-number estimation of arsenic-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, p. 3168–3173

Kulp, T. R., S. Han, C.W. Saltikov, B.D Lanoil, K. Zargar, and R.S. Oremland (2007) - Effects of Imposed Salinity Gradients on Dissimilatory Arsenate Reduction, Sulfate Reduction, and Other Microbial Processes in Sediments from Two California Soda Lakes. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, p. 5130-5137

Kulp, T.R., S.E. Hoelt, L.G. Miller, C. Saltikov, J. Murphy, S. Han, B. Lanoil, and R.S. Oremland (2006) - Dissimilatory arsenate and sulfate reduction in sediments of two hypersaline, arsenic-rich soda lakes: Mono and Searles Lakes, California. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, p. 6514-6526.

L

Lan, R.T., and P.R. Reeves (1998) - Recombination between rRNA operons created most of the ribotype variation observed in the seventh pandemic clone of *Vibrio cholerae*. *Microbiology* 144, p. 1213-1221.

Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., Pace, N.R. (1985) - Rapid determination of 16S ribosomal sequences for phylogenetic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, p. 6955–6959.

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

Laverman, A.M., J.S. Blum, J.K. Schaefer, E.J.P. Phillips, D.R. Lovley and R.S. Oremland (1995) - Growth of strain SES-3 with arsenate and other diverse electron acceptors. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, p. 3556-3561.

Lear, G., B. Song, A.G. Gault, D.A. Polya, and J.R. Lloyd (2007) - Molecular Analysis of Arsenate-Reducing Bacteria within Cambodian Sediments following Amendment with Acetate. *Appl. Envir. Microbiol.* 73, p. 1041-1048

Lebrun, E., M. Brugna, F. Baymann, D. Muller, D. Lièvreumont, M. C. Lett, and W. Nitschke (2003) - Arsenite oxidase, an ancient bioenergetic enzyme? *Mol. Biol. Evol.* 20, p. 686-693.

Lee, J.U., S.W. Lee, K.W. Kim, and C.H. Yoon (2005) - The effects of different carbon sources on microbial mediation of arsenic in arsenic-contaminated sediment. *Environ Geochem Health* 27, p. 159–268.

Lee, J.-H., M.-G. Kim, B. Yoo, N.V. Myung, J. Maeng, T. Lee, A.C. Dohnalkova, J.K. Fredrickson, M.J. Sadowsky, and H.-G. Hur (2007) - Biogenic formation of photoactive arsenic-sulfide nanotubes by *Shewanella* sp. strain HN-41. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, p. 20410-20415

Lee, J.-U., and T.J. Beveridge (2001) - Interaction between iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms attached to Sepharose surfaces. *Chem. Geol.* 180, p. 67-80.

Lee, D.H., Y.G. Zo, and S.J. Kim (1996) - Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism, *Appl. Environ. Microbiol.* 62, p. 3112–3120.

Lehr, C.R., D.R. Kashyap, and T.R. McDermott, (2007) - New Insights into Microbial Oxidation of Antimony and Arsenic. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, p. 2386-2389

Li, Z., J. Xu, C. Tang, J. Wu, A. Muhammad, and H. Wang (2006) - Application of 16S rDNA-PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of shift in microbial community diversity in Cu-, Zn-, and Cd-contaminated paddy soils. *Chemosphere* 62, p. 1374-1380.

Liu, A., E. Garcia-Dominguez, E.D. Rhine, and L.Y. Young (2004) - A novel arsenate respiring isolate that can utilize aromatic substrates. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48, p. 323-332.

Liu, W.-T., T.L. Marsh, H. Cheng, and L. Forney (1997) - Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA, *Appl. Environ. Microbiol.* 63, p. 4516-4522.

Lin, S., W.R. Cullen, and D.J. Thomas (1999) - Methylarsenicals and arsinothiols are potent inhibitors of mouse liver thioredoxin reductase. *Chem Res Toxicol.* 12, p. 924-930.

Liu, W.-T., T.L. Marsh, H. Cheng, and L. Forney (1997) - Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA, *Appl. Environ. Microbiol.* 63, p. 4516-4522.

Loisel, P., J. Harmand, O. Zemb, E. Latrille, C. Lobry, J.P. Delgenes, and J.-J. Godon (2006) - Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environ. Microbiol.* 8, p. 720-731.

London, J. (1963) - *Thiobacillus intermedius* nov. sp., a novel type of facultative autotroph - *Arch Microbiol.* 46, p. 329-227.

López-García, P., and D. Moreira (2008) - Tracking microbial biodiversity through molecular and genomic ecology. *Res Microbiol.* 159, p. 67-73.

Lopez-Gutierrez, J.C., S. Henry, S. Hallet, F. Martin-Laurent, G. Catroux and L. Philippot (2004) Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR, *J. Microbiol. Methods* 57, p. 399-407.

Lovley, D.R., S.J. Giovannoni, D.C. White, J.E. Champine, E.J. Phillips, Y.A. Gorby, and S. Goodwin (1993) - *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. *Arch. Microbiol.*, 159, p. 336-344.

Ludwig, W., and K.H. Schleifer (1994) - Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 15, p. 155-173.

M

Ma, L.Q., K.M. Komar, C. Tu, W. Zhang, Y. Cai, and E.D. Kennelley, (2001) A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature* 409, p. 579.

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, p. 104-11.

Macy, J.M., J.M. Santini, B.V. Pauling, A.H. O'Neill, and L.I. Sly (2000) - Two new arsenate/sulfate-reducing bacteria, mechanisms of arsenate reduction. *Arch. Microbiol.* 173, p. 49-57.

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, p. 1153-1157.

Malasarn, D., J.R. Keeffe, and D.K. Newman (2008) - Characterization of the Arsenate Respiratory Reductase from *Shewanella* sp. Strain ANA-3. *J. Bacteriol.* 190, p. 135-142

- Malasarn, D., C.W. Saltikov, K.M. Campbell, J.M. Santini, J.G. Hering, and D.K. Newman** (2004) - *arrA* is a reliable marker for As(V) respiration. *Science*. 306, p. 455.
- Manning, B.A., and S. Goldberg** (1997) - Adsorption and stability of arsenic(III) at the clay mineral—Water interface. *Environ. Sci. Technol.* 31, p. 2005–2011.
- Manning, B.A., and S. Goldberg** (1996) - Modeling arsenate competitive adsorption on kaolinite, montmorillonite and illite. *Clays Clay Miner.* 44, p. 609–623.
- McLaren, S.J., and N.D. Kim** (1995) - Evidence for a seasonal fluctuation of arsenic in New Zealand's longest river and the effect of treatment on concentrations in drinking water, *Environ Pollut* 90, p. 67–73.
- McLean, J.E., R.R. Dupont, and D.L. Sorensen** (2006) - Iron and arsenic release from aquifer solids in response to biostimulation. *J Environ Qual* 35, p. 1193–1203
- Mandal, B.K., and K.T. Suzuki** (2002) - Arsenic round the world: a review, *Talanta* 58, p. 201–235.
- Manning, B.A., and S. Goldberg** (1996a) - Modeling competitive adsorption of arsenate with phosphate and molybdate on oxide minerals. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 60, p. 121–131
- Masscheleyn, P.H., R.D. Dlaune, and W.H. Jr. Patrick** (1991) - Effect of redox potential and pH on arsenic speciation and solubility in a contaminated soil. *Environ Sci Technol.* 25, p. 1414–1418.
- Masson, M., J. Schäfer, G. Blanc, and P. Anschutz** (2007) - Seasonal variations and annual fluxes of arsenic in the Garonne, Dordogne and Isle Rivers, France. *Sci. Tot. Environ.* 373, p. 196–207.
- Matschullat, J.** (2000) - Arsenic in the geosphere - A review. *Sci. Total Environ.* 249:297–312.
- McLean, J.E., R.R. Dupont, and D.L. Sorensen** (2006) Iron and arsenic release from aquifer solids in response to biostimulation. *J Environ Qual.* 35, p. 1193–1203.
- Messing, J., and J. Vieira** (1982) - The pUC plasmids, an M13mp-7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19, p. 259–268.
- Mokashi, S.A., and K.M. Paknikar** (2002) - Arsenic (III) oxidizing *Microbacterium lacticum* and its use in the treatment of arsenic contaminated groundwater. *Lett. Appl. Microbiol.* 34, p. 258–262.
- Moreira, D., and Amils R.** (1997) - Phylogeny of *Thiobacillus cuprinus* and other mixotrophic thiobacilli: proposal for *Thiomonas* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, p. 522–528.
- Martin-Laurent, F., L. Philippot, S. Hallet, R. Chaussod, J.C. Germon, G. Soulas, and G. Catroux** (2001) - DNA extraction from soils: Old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, p. 2354–2359
- Muller, D., D. Lièvreumont, D.D. Simeonova, J.C. Hubert, and M.C. Lett.** (2003) - Arsenite oxidase *aox* genes from a metal-resistant β -Proteobacterium. *J. Bacteriol.* 185, p. 135–141.
- Muller, D., C. Médigue, S. Koechler, V. Barbe, M. Barakat, E. Talla, V. Bonnefoy, E. Krin, F. Arsène-Ploetze, C. Carapito, M. Chandler, B. Cournoyer, S. Cruveiller, C. Dossat, S. Duval, M. Heymann, E. Leize, A. Lieutaud, D. Lièvreumont, Y. Makita, S. Manganot, W. Nitschke, P. Ortet, N. Perdrial, B. Schoepp, P. Siguier, D.D. Simeonova, Z. Rouy, B. Segurens, E. Turlin, D. Vallenet, A. Van Dorsseleer, S. Weiss, J. Weissenbach, M. C. Lett, A. Danchin, and P.N. Bertin** (2007) - A Tale of Two Oxidation States: Bacterial Colonization of Arsenic-Rich Environments. *PLoS Genet* 3(4): e53.
- Mukhopadhyay, R., B.P. Rosen, L. Phung, and S. Silver** (2002) - Microbial arsenic, from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, p. 311–325.
- Muyzer, G.** (1999) - DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, p. 317–322.
- Muyzer, G., and K. Smalla** (1998) - Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology, *Antonie Van Leeuwenhoek* 73, p. 127–141.

Muyzer, G., and N.B. Ramsing (1995) - Molecular methods to study the organization of microbial communities. *Water Sci. Technol.* 32, p. 1–9.

Muyzer, G., E.C. de Waal, and A.G. Uitterlinden (1993) - Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, p. 695–700.

N

Nakatsu, C. H. (2007) - Soil Microbial Community Analysis Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Soil Sci.* 71, p. 562-571

Navas, A., and J. Machin (2002) - Spatial distribution of heavy metals and arsenic in soils of Aragon (northeast Spain): controlling factors and environmental implications, *Appl. Geochem.* 17, p. 961–974.

Newman, D.K., T.J. Beveridge, and F.M.M. Morel (1997a) Precipitation of arsenic trisulfide by *Desulfotomaculum auripigmentum*, *Appl Environ Microbiol.* 63, p. 2022–2028.

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

Nicolaisen, M.H., and N.B. Ramsing (2002) - Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. *J Microbiol Methods* 50, p. 189–203.

Nicholas, D.R., S. Ramamoorthy, V. Palace, S. Spring, J.N. Moore, and F. Rosenzweig (2003) - Biogeochemical transformations of arsenic in circumneutral freshwater sediments, *Biodegradation* 14, p. 123–137.

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, p. 5568-5580.

Nimick, D.A., J.N. Moore, C.E. Dalby, and M.W. Savka (1998) - The fate of geothermal arsenic in the Madison and Missouri Rivers Montana and Wyoming, *Water Resour Res* 34, p. 3051–3067.

Nonaka, H., G. Keresztes, Y. Shinoda, Y. Ikenaga, M. Abe, K. Naito, K. Inatomi, K. Furukawa, M. Inui, and H. Yukawa (2006) - Complete genome sequence of the dehalorespiring bacterium *Desulfitobacterium hafniense* Y51 and comparison with *Dehalococcoides ethenogenes* 195. *J Bacteriol.* 188, p. 2262–2274.

Nordstrom, D., and D. Archer (2003) - Arsenic thermodynamic data and environmental geochemistry—an evaluation of thermodynamic data for modeling the aqueous environmental geochemistry of arsenic. In: A.H. Welch and K.G. Stollenwerk, Editors, *Arsenic in Ground Water: Geochemistry and Occurrence*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 1–26.

Normand, P., C. Ponsonnet, X. Nesme, M. Neyra, and P. Simonet (1996) - ITS analysis of prokaryotes. *Molecular Microbial Ecology Manual*. Vol. 3.4.5. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, p. 1–12.

Norton, J.M., J.M. Low, and G. Martin (1996) - The gene encoding ammonia monooxygenase subunit A exists in three nearly identical copies in *Nitrosospira* sp. NpAV. *FEMS Microbiol Lett* 139, p. 181–188.

Nübel, U., F. Garcia-Pichel, M. Kühl and G. Muyzer (1999) - Quantifying microbial diversity: morphotypes 16S rRNA genes and carotenoids of oxygenic phototrophs in microbial mats, *Appl. Environ. Microbiol.* 65, p. 422–430.

O

- Okano, Y., K.R. Hristova, C.M. Leutenegger, L.E. Jackson, R.F. Denison, B. Gebreyesus, D. Lebauer, and K.M. Scow** (2004) - Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, p. 1008-1016.
- Olsen, G.J., C.R. Woese, and R. Overbeek** (1994) - The winds of (evolutionary) change : breathing new life into microbiology. *J. Bacteriol.* 176, p. 1-6.
- OMS, Organisation Mondiale de la Santé** (2001) - *L'arsenic dans l'eau de boisson*. Aide-mémoire OMS No 210. 78, p. 1096.
- O'Neill, P.O.** (1990) - Arsenic. In: B.J. Alloway, Editor, *Heavy Metals in Soils*, Wiley, New York, p. 83-99.
- Oremland, R.S., and J.F. Stolz** (2005) - Arsenic, microbes, and contaminated aquifers. *Trends Microbiol.* 13, p. 45-49.
- Oremland, R. S., and J. F. Stolz** (2003) - The Ecology of Arsenic. *Science* 300, p. 939-944
- Oremland, R.S., J.S. Blum, C.W. Culbertson, P.T. Visscher, L.G. Miller, P.R. Dowdle, and F.E. Strohmaier** (1994) - Isolation, growth, and metabolism of an obligately anaerobic, selenate-respiring bacterium, strain SES-3. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, p. 3011-3019.
- Oremland, R.S., P.R. Dowdle, S. Hoefft, J.O. Sharp, J.K. Schaefer, L.G. Miller, J.S. Blum, R.L. Smith, N. S. Bloom, and D. Wallschlaeger** (2000) - Bacterial dissimilatory reduction of arsenate and sulfate in meromictic Mono Lake, California. *Geochim. Cosmochim. Acta* 64, p. 3073-3084.
- Oremland, R.S., S.E. Hoefft, 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, p. 4795-4802.
- Oremland, R.S., T.R. Kulp, J.S. Blum, S.E. Hoefft, S. Baesman, L.G. Miller, and J.F. Stolz** (2005) - A microbial arsenic cycle in a salt-saturated, extreme environment. *Science*. 308, p. 1305-1308.
- Osborne, F.H., and H.L. Ehrlich** (1976) - Oxidation of arsenite by a soil isolate of *Alcaligenes*. *J. Appl. Bacteriol.* 41, p. 295-305.
- Oscarson, D.W., P.M. Huang, C. Defosse, and A. Herbillon** (1981) - Oxidative power of Mn(IV) and Fe(III) oxides with respect to As(III) in terrestrial and aquatic environments. *Nature* 291, p. 50-51.
- Øvreås, L.** (2000) - Population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environments, *Ecol. Lett.* 3, p. 236-251.

P

- Pace, N.R.** (1996) - New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. *ASM News* 62, p. 463-470.
- Park, J.M., J.S. Lee, J.-U. Lee, H.T. Chon and M.C. Jung** (2006) - Microbial effects on geochemical behavior of arsenic in As-contaminated sediments. *J. Geochem. Explor.* 88, p.134-138.
- Parker, M.A.** (2001) - Case of localized recombination in 23S rRNA genes from divergent *Bradyrhizobium* lineages associated with neotropical legumes. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, p. 2076-2082.
- Perez-Jimenez J.R., C. Defraia, and L.Y. Young** (2005) - Arsenate respiratory reductase gene (*arrA*) for *Desulfosporosinus* sp. strain Y5. *Biochem Biophys Res Commun.* 338, p. 825-9.
- Petri, R., L. Podgorsek, and J.F. Imhoff** (2001) - Phylogeny and distribution of the *soxB* gene among thiosulfate-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 197, p. 171-178.

Peu, P., H. Brugere, A.M. Pourcher, M. Kerouredan, J.-J. Godon, J.P. Delgenes and P. Dabert (2006) - Dynamics of a pig slurry microbial community during anaerobic storage and management, *Appl. Environ. Microbiol.* 72, p. 3578–3585.

Phillips, S.E., and M.L. Taylor. (1976) - Oxidation of arsenite to arsenate by *Alcaligenes faecalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 32, p. 392-399.

Pierce, M.L., and C.B. Moore (1982) - Adsorption of arsenite and arsenate on amorphous iron hydroxide. *Water Res.* 16, p. 1247–1253.

Pierson, B.K., and R.W. Castenholz (1974) - A phototrophic gliding filamentous bacterium of hot springs, *Chloroflexus aurantiacus*, gen. and sp. nov. *Arch. Microbiol.* 100, p. 5-24.

Poitras, E., and A. Houde. (2002) - La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology (Canada)*. 2, p. 2-11.

Polizzotto, M.L., C.F. Harvey, G. Li, M. Newville, and S. Fendorf (2006) - Solid-phases and desorption processes of arsenic within Bangladesh sediments, *Chem. Geol.* 228, p. 97–111.

Primé, A., J.I.B. Sitaula, Å.K. Klemetsson, and L.R. Bakken. (1996) -Extraction of methane-oxidising bacteria from soil particles, *FEMS Microbiology Ecology* 21, p. 59–68.

Q

Quéméneur, M., A. Heinrich-Salmeron, D. Muller, D. Lièvreumont, M. Jauzein, P.N. Bertin, F. Garrido, and C. Joulian (2008) - Diversity surveys and evolutionary relationships of *aoxB* genes in aerobic arsenite-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, p. 4567-4573.

Qin, J., B.P. Rosen, Y. Zhang, G. Wang, S. Franke, and C. Rensing (2006) - Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103, p. 2075-80.

R

Ranjard, L., S. Nazaret, F. Gourbiere, J. Thioulouse, P. Linet and A. Richaume (2000) - A soil microscale study to reveal the heterogeneity of Hg(II) impact on indigenous bacteria by quantification of adapted phenotypes and analysis of community DNA fingerprints. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31, p. 107–115.

Rappé, M. S., and S.J. Giovannoni (2003) - The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol.* 57, p. 369-394.

Rotthauwe, J.H., K.P. Witzel, and W. Liesack (1997) - The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl Environ Microbiol* 63, p. 4704–4712

Redman, A.D., D.L. Macalady, and D. Ahmann (2002) - Natural organic matter affects arsenic speciation and sorption onto hematite, *Environ Sci Technol* 36, p. 2889–2896.

Rose, T.M., E.R. Schultz, J.G. Henikoff, S. Pietrovski, C.M. McCallum, and S. Henikoff (1998) - Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Res.* 26, p.1628-35.

Rozas, J., J.C. Sánchez-DelBarrio, X. Messeguer, and R. Rozas (2003) - DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19, p. 2496-2497.

Rhie, H. G., S. J. Lee, and H. S. Lee. (2004) - Characterization. of the *plasmid*-encoded *arsenic* salts *resistance* determinant from *Klebsiella oxytoca* D12. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14, p. 593-598.

Rhine E.D., K.M. Onesios, M.E. Serfes, J.R. Reinfelder, and L.Y. Young. (2008) - Arsenic transformation and mobilisation from minerals by the arsenite oxidizing strain WAO. *Environ. Sci. Technol.* 42, p. 1423-1429.

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

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

Rhine, E.D., Garcia-Dominguez E., Phelps C.D. and Young L.Y. (2005) - Environmental microbes can speciate and cycle arsenic. *Environ. Sci. Technol.* 39, p. 9569-73.

Rossman, T.G. (2003) - Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach, *Mutat. Res.* 533, p. 37-66.

Rouch, D.A., B.T.D. Lee, and A.P. Morby. (1995) - Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism choice in bacterial metal resistance. *J Indust Microbiol* 14, p.132-141

S

Saano, A., E. Tas, S. Pippola, K. Lindström and J.D. van Elsas (1995) - Extraction and analysis of microbial DNA from soil In: J.T. Trevors and J.D. van Elsas, Editors, *Nucleic Acids in the Environment*, Springer, Berlin, Germany, p. 49-67.

Saitou, N., and M. Nei (1987) - The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, p. 406-425

Sako, Y., N. Nomura, A. Uchida, Y. Ishida, H. Morii, Y. Koga, T. Hoaki, and T. Maruyama (1996) - *Aeropyrum pernix* gen. nov., sp. nov., a novel aerobic hyperthermophilic archaeon growing at temperatures up to 100 °C. *Int J Syst Bacteriol.* 46, p. 1070-1077.

Salmassi, T.M., J.J. Walker, D.K. Newman, J.R. Leadbetter, N.R. Pace, and J.G. Hering (2006) - Community and cultivation analysis of arsenite oxidizing biofilms at Hot Creek. *Environ. Microbiol.* 8, p. 50-9.

Salmassi, T.M., Venkateswaren K., Satomi M., Nealson K., Newman D.K. and Hering J.G. (2002) - Oxidation of arsenite by *Agrobacterium albertimagni*, AOL 15, sp nov., isolated from Hot Creek, California. *Geomicrobiol. J.* 19, p. 53-66.

Saltikov, C.W. and Newman D.K. (2003) - Genetic identification of a respiratory arsenate reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, p. 10983-10988.

Saltikov, C.W., R.A. Jr Wildman, and D.K. Newman (2005) - Expression dynamics of arsenic respiration and detoxification in *Shewanella* sp. strain ANA-3. *J. Bacteriol.* 187, p. 7390-6.

Saltikov, C.W., R.A. Wildman, and D.K. Newman (2005) - Expression Dynamics of Arsenic Respiration and Detoxification in *Shewanella* sp. Strain ANA-3. *J. Bacteriol.* 187, p. 7390-7396.

Samanta, G., and D.A. Clifford (2006) - Influence of sulfide (S²⁻) on preservation and speciation of inorganic arsenic in drinking water. *Chemosphere* 65, p. 847-853.

Sánchez-Rodas, D., J.L. Gómez-Ariza, I. Giráldez, A. Velasco and E. Morales. (2005) - Arsenic speciation in river and estuarine waters from southwest Spain, *Sci Total Environ* 345, p. 207-217.

Santini, J.M., and R.N. Vanden Hoven. (2004a). Molybdenum-containing arsenite oxidase of the chemolithoautotrophic arsenite oxidizer NT-26. *J. Bacteriol.* 186, p.1614-1619.

Santini, J.M., I.C. Streimann and R.N. Vanden Hoven (2004b) - *Bacillus macyae* sp. nov., an arsenate-respiring bacterium isolated from an Australian gold mine, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 54, p. 2241-2244.

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

- Santini, J. M., L.I. Sly, R.D. Schnagl, and J.M. Macy.** (2000) - A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, p. 92-97.
- Scala, D. J., and L. J. Kerkhof.** (1999) - Diversity of nitrous oxide reductase (*nosZ*) genes in continental shelf sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, p. 1681-1687.
- Schäfer, J., and G. Blanc** (2002) - Relationship between ore deposits in river catchments and geochemistry of suspended particulate matter from six rivers in southwest France. *Sci Total Environ* 298, p. 103–118.
- Schmalenberger, A., and C.C. Tebbe.** (2003) - Bacterial diversity in maize rhizospheres: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies, *Mol. Ecol.* 12, p. 251–262.
- Schouls, L.M., C.S. Schot, and J.A. Jacobs** (2003) - Horizontal transfer of segments of the 16S rRNA genes between species of the *Streptococcus anginosus* group. *J. Bacteriol.* 185, p. 7241-6.
- Sehlin, H.M., and E.B. Lindstrom** (1992) - Oxidation and reduction of arsenic by *Sulfolobus acidocaldarius* strain BC. *FEMS Microbiol. Lett.* 93, p. 87-92.
- Sekiguchi, H., N. Tomioka, T. Nakahara, and H. Uchiyama** (2001) - A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Biotechnol. Lett.* 23, p. 1205–1208.
- Sessitsch, A., A. Weilharter, M.H. Gerzabek, H. Kirchmann and E. Kandeler** (2001) - Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, p. 4215–4224.
- Seyler, P. and J.-M. Martin.** (1991) - Arsenic and selenium in a pristine river-estuarine system: the Krka, Yugoslavia, *Mar Chem* 34, p.137–151.
- Silver, S., and L.T. Phung.** (2005a) - Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, p. 599-608.
- Silver, S., and L.T. Phung** (2005b) - A bacterial view of the periodic table, genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32, p. 587-605.
- Simeonova, D.D., D. Lièvre, F. Lagarde, D.A. E. Muller, V.I. Groudeva, and M.C. Lett.** (2004) - Microplate screening assay for the detection of arsenite-oxidizing and arsenate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 237, p. 249–253.
- Smedley, P.L., W.M. Edmunds, and K.B. Pelig-Ba** (1996) - Mobility of arsenic in groundwater in the Obuasi area of Ghana. In: J.D. Appleton, R. Fuge and G.J.H. McCall, Editors, *Environmental Geochemistry and Health, Geol Soc Spec Publ.* 113, p. 163–181, Geological Society, London.
- Smedley, P.L., and D.G. Kinniburgh** (2002) - A review of the source, behavior and distribution of arsenic in natural waters, *Appl Geochem.* 17, p. 517–568.
- Smidt, H., and W.M. de Vos** (2004) - Anaerobic microbial dehalogenation. *Annu. Rev. Microbiol.* 58, p. 43–73.
- Smieja, J.A., and R.T. Wilkin** (2003) - Preservation of sulfidic waters containing dissolved As(III), *J. Environ. Monitor* 5, p. 913–916.
- Sneath, P. H.** (1993) - Evidence from *Aeromonas* for genetic crossing-over in ribosomal sequences. *Int J Syst Bacteriol.* 43, p. 626–629.
- Sørensen, S.J., J.R. de Liphay, A.K. Müller, T. Barkay, L.H. Hansen and L.D. Rasmussen** (2002) - Molecular methods for assessing and manipulating the diversity of microbial populations and processes In: R.G. Burns and R.P. Dick, Editors, *Enzymes in the Environment*, Marcel Dekker, New York, p. 363–389.
- Srivastava, M., Ma L.Q., and J.A.G. Santos** (2006) - Three new hyperaccumulating ferns. *Sci. Total. Environ.* 264, p. 24–31

Stach, J.E.M., S. Bathe, J.P. Clapp, and R.G. Burns. (2001) - PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36, p. 139–151.

Stolz, J.F., D.J. Ellis, J. Switzer Blum, D. Ahmann, D.R. Lovley, and R.S. Oremland (2002) - *Sulfurospirillum barnesii* sp. nov. and *Sulfurospirillum arsenophilum* sp. nov., new members of the *Sulfurospirillum* clade of the ϵ -Proteobacteria, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, p. 1177-1180.

Stolz, J.F., P. Basu, and R.S. Oremland (2002) - Microbial transformation of elements, the case of arsenic and selenium. *Int. Microbiol.* 5, p. 201-7.

Stolz J.F., E. Fisher, G. Polshnya, M. Berekaa, A. Garcia, M. Thangavelu, and P. Basu (2006) - Methods for detection of arsenic metabolizing bacteria. *Geological Society of America Abstracts with Programs.* 38, p. 29

Suttigarn, A., and Y.-T. Wang. (2005) - Arsenite Oxidation by *Alcaligenes faecalis* Strain O1201. *J. Envir. Engrg.* 131, p. 1293-1301.

Suyama, A., R. Iwakiri, K.Kai, T.Tokunaga, N.Sera, and K. Furukawa (2001) - Isolation and characterization of *Desulfotobacterium* sp. strain Y51 capable of efficient dehalogenation of tetrachloroethene and polychloroethanes. *Biosci Biotechnol Biochem* 65, p. 1474–1481.

Switzer Blum, J., A. Burns Bindi, J. Buzzelli, J.F. Stolz, and R.S. Oremland (2002) - *Bacillus arsenicoselenatis*, sp. nov., and *Bacillus selenitireducens*, sp. nov., two haloalkaliphiles from Mono Lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic, *Arch. Microbiol.* 171, p. 19-30.

Sun, Y., E.A. Polishchuk, U. Radoja and W.R. Cullen (2004) - Identification and quantification of *arsC* genes in environmental samples by using real-time PCR. *J. Microbiol. Methods.* 58, p. 335-49.

T

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

Takai, K., H. Kobayashi, K.H. Nealson, and K. Horikoshi (2003b) - *Sulfurihydrogenibium subterraneum* gen. nov., sp. nov., from a subsurface hot aquifer. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, p. 823-827.

Tamaki, S. and Jr. W. T. Frankenberger (1992) - Environmental biochemistry of arsenic. *Review of Environmental Contamination and Toxicology* 124, p. 79–110.

Theron, J., and T.E. Cloete (2000) - Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Crit. Rev. Microbiol.* 26, p. 37–57.

Thomas, D.J., M. Styblo, and S. Lin (2001) - The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol.* 176, p. 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. *Nucleic Acids Res.* 22, p. 4673-4680.

Todorova, S.G., and A.M. Costello (2006) - Design of *Shewanella*-specific 16S rRNA primers and application to analysis of *Shewanella* in a minerotrophic wetland. *Environ. Microbiol.* 8, p. 426–432.

Turner, A.W., and J.W.Legge (1954) - Bacterial oxidation of arsenite. II. Description of bacteria isolated from cattle-dipping fluids. *Aust. J. Biol. Sci.* 7, p. 452-478.

Turpeinen, R., T. Kairesalo, and M. Häggblom (2004) - Microbial community structure and activity in arsenic-, chromium- and copper-contaminated soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 47, p. 39-50.

Turpeinen, R., M. Pansar-Kallio, M. Häggblom, and T. Kairesalo (2002) - Role of microbes in controlling the speciation of arsenic and production of arsines in contaminated soils, *Sci Total Environ* 285, p. 133–145.

Turpeinen, R., M. Pansar-Kallio, M. Häggblom, and T. Kairesalo (1999) - Influence of microbes on the mobilization, toxicity and biomethylation of arsenic in soil. *Sci Total Environ.* 236, p. 173-180

U - V

Ueda, K., Seki, T., Kudo, T., Yoshida, T. and M. Kataoka (1999). Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. *J Bacteriol* 181, p. 78–82.

Vallaey, T., E. Topp, G. Muyzer, V. Macheret, G. Laguerre, A. Rigaud, and G. Soulas (1997) - Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiol. Ecol.* 24, p. 279–285.

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, p. 148-155.

Van de Peer, Y., and R. De Wachter. (1994) - TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Appl. Biosci.* 10, p. 569-570.

Villaescusa, I., and J.-C. Bollinger. (2008) - Arsenic in drinking water: sources, occurrence and health effects (a review). *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* DOI 10.1007/s11157-008-9138-7

von Wintzingerode, F., Göbel, U.B., and E. Stackebrandt (1997) - Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev.* 21, p. 213–229.

W

Wagner, R. (1994) - The regulation of ribosomal RNA synthesis and bacterial cell growth. *Arch. Microbiol.* 161, p.100-106.

Wagner, M., A.J. Roger, J.L. Flax, G.A. Brusseau, and D.A. Stahl (1998) - Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration. *J. Bacteriol.* 180, p. 2975-2982.

Wang, Y., and Z.S. Zhang (2000) - Comparative sequence analyses reveal frequent occurrence of short segments containing an abnormally high number of non-random base variations in bacterial rRNA genes. *Microbiology* 146, p. 2845-2854.

Waksman, S.A., and J.S. Joffe (1922) - Microorganisms concerned in the oxidation of sulphur in the soil. II. *Thiobacillus thiooxidans*, a new sulphur-oxidizing organism isolated from the soil. *J. Bacteriol.* 7, p. 239-256.

Wayne, L.G., D.J. Brenner, R.R. Colwell, P.A.D. Grimont, O. Kandler, M.I. Krichevsky, L.H. Moore, W.E.C. Moore, R.G.E. Murray, E. Stackebrandt, M.P. Starr, and H.G. Trüper, (1987) - Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37, p. 463–464.

Webster, J.G., and D.K. Nordstrom (2003) - Geothermal arsenic. In: A.H. Welch and K.G. Stollenwerk, Editors, *Arsenic in Ground Water: Geochemistry and Occurrence*, Kluwer Academic Publishers, Boston.

Weeger, W., D. Lievremont, 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, p.141-149.

Weisburg, W., S.M. Barns, D.A. Pelletier, and D.L. Lane (1991) - 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic studies. *J Bacteriol* 173, p. 697-703.

Whyte, L.G., T.H. Smits, D. Labbe, B. Witholt, C.W. Greer, and J.B. van Beilen (2002) - Gene cloning and characterization of multiple alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus* strains Q15 and NRRL B-16531. *Appl Environ Microbiol* 68, p. 5933–5942.

Wilkin, R.T., D. Wallschläger, and R.G. Ford (2003) - Speciation of arsenic in sulfidic waters, *Geochem. Trans.* 4, p. 1–7.

Witzig, R., H. Junca, H.-J. Hecht, and D.H. Pieper (2006) - Assessment of toluene/biphenyl dioxygenase gene diversity in benzene-polluted soils: links between benzene biodegradation and genes similar to those encoding isopropylbenzene dioxygenases. *Appl Environ Microbiol* 72, p. 3504–3514.

Woese, C., and G. Fox. (1977) - Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, p. 5088–90.

Woese, C.R. (1987) - Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, p. 221-271.

Woese, C.R., O. Kandler, and M.L. Wheelis (1990) - Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, p. 4576-4579.

X

Xia, X., and Z. Xie. (2001) - DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J. Heredity.* 92, p.371-373.

Xiong, J., W. Wang, H. Fan, L. Cai, and G. Wang (2006) - Arsenic resistant bacteria in mining wastes from Shangrao coal mine of China. *Environmental Science and Technology (I)*. In *Environmental Science and Technology (I)* ed. Lyon, W.G., Starrett, S.K. and Hong, J. p. 536–540. Cambridge, MA, USA: American Science Press.

Xu, C., T. Zhou, M. Kuroda, and B.P. Rosen (1998) - Metalloid resistance mechanisms in prokaryotes. *J. Biochem.* 123, p.16–23.

Xu, H., B. Allard, and A. Grimvall (1991) - Effects of acidification and natural organic materials on the mobility of arsenic in the environment, *Water Air Soil Pollut* 57–58, p. 269–270.

Y

Yamamoto, S., and S. Harayama (1996) - Phylogenetic analysis of *Acinetobacter* strains based on the nucleotide sequences of *gyrB* genes and on the amino acid sequences of their products. *Int J Syst Bacteriol.* 46, p. 506–511.

Yamamura, S., M. Ike, and M. Fujita (2003) - Dissimilatory arsenate reduction by a facultative anaerobe, *Bacillus* sp. strain SF-1. *J. Biosci. Bioeng.* 296, p. 454-60.

Yap, W. H., Z. Zhang, and Y. Wang (1999) - Distinct types of rRNA operons exist in the genome of the actinomycete *Thermomonospora chromogena* and evidence for horizontal transfer of an entire rRNA operon. *J Bacteriol* 181, p. 5201–5209.

Yeates, C., M.R. Gillings, A.D. Davison, N. Altavilla, and D.A. Veal. (1997) - PCR amplification of crude microbial DNA extracted from soil. *Lett. Appl. Microbiol.* 25, p. 303–307

Z

Zagury, G., R. Samson, and L. Deshênes (2003) - Occurrence of metals in soil and groundwater near chromated copper arsenate-treated utility poles. *J Environ Qual.* 32, p. 507–514.

Zhao, F.J., S.J. Dunham, and S.P. McGrath. (2002) - Arsenic hyperaccumulation by different fern species. *New Phytol.* 156, p.27–31

Zobrist, J., P.R. Dowdle, J.A. Davis, and R.S. Oremland (2000) - Mobilization of arsenite by dissimilatory reduction of adsorbed arsenate. *Environ. Sci. Technol.* 34, p. 4747-4753.

Zuckerkindl, E., and L. Pauling (1965) - Evolutionary divergence and convergence in proteins, pp. 97-166 in *Evolving Genes and Proteins*, edited by V. Bryson and H.J. Vogel. Academic Press, New York.

Zumstein, E., R. Moletta, and J.-J. Godon (2000) - Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environ. Microbiol.* 2, p. 69-78.

Annexes

Annexe 1 : Analyses physico-chimiques et minéralogie des sols

Annexe 2 : Analyses physico-chimiques et minéralogie des eaux du bassin de l'Isle

Annexe 3 : Solutions utilisées pour la préparation des milieux d'enrichissements

Annexe 4 : Matrices d'identités des séquences des bandes DGGE (chapitre 5)

Annexe 5 : Matrices d'identités des clones issus du sol T12R (chapitre 6)

Annexe 6 : Plan d'expérience et cinétiques de solubilisation de l'As dans les sols D2, D3, T5R et T12R (Joubert, 2008) (chapitre 7)

Annexe 7 : Cinétiques de solubilisation de l'As dans les incubations du sol T12R

Annexe 8 : Matrices d'identités des clones issus de l'incubation aérobie du sol T12R en condition 8 (chapitre 7)

Annexe 9 : Matrice d'identité des séquences ArrA des incubations du sol T12R (chapitre 7)

Annexe 10 : Principales caractéristiques de la phase aqueuse des incubations des sols du bassin du Gallego (chapitre 8)

Annexe 11 : Article rédigé à partir d'une partie de ces travaux de thèse et paru dans le journal *Applied and Environmental Microbiology*

Annexe 1 : Analyses physico-chimiques et minéralogie des sols (d'après Joubert, 2008)

Echantillons de sols		Bassin de la Meuse					Bassin du Gallego		
		D2	D3	T5R	T12R	T12R	G04	G05	G07
Perte de masse (40°C)	%	1,2	3	17,6	16,3	n.d.	22,4	11,2	10
Perte de poids (450°)	%	2,49	5,79	9	9	11,8	5,4	2,4	3,5
Perte au feu (1000°)	%	2,67	6,12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
As	mg.kg ⁻¹	10	13	44	43	64	19	10	13
Cd	mg.kg ⁻¹	2,4	9	38	26	< 2	2	2	2
Hg	mg.kg ⁻¹	0,4	0,3	5,1	15,9	n.d.	0,03	0,03	n.d.
Pb	mg.kg ⁻¹	72	117	1308	378	236	11	10	10
Zn	mg.kg ⁻¹	200	802	4117	1014	335	93	63	53
Ag	mg.kg ⁻¹	<0,2	<0,2	2,4	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02
B	mg.kg ⁻¹	12	<10	28	48	49	84	45	51
Ba	mg.kg ⁻¹	135	133	518	410	435	303	164	203
Be	mg.kg ⁻¹	<2	<2	3	2	3	<2	<2	<2
Bi	mg.kg ⁻¹	<10	<10	n.d.	n.d.	<10	<10	<10	<10
Ce	mg.kg ⁻¹	<10	<10	83	90	72	61	46	51
Co	mg.kg ⁻¹	5	5	18	23	25	13	10	10
Cr	mg.kg ⁻¹	18	17	62	97	103	78	45	43
Cu	mg.kg ⁻¹	30	28	92	26	85	17	12	9
La	mg.kg ⁻¹	<20	<20	39	39	41	29	22	24
Li	mg.kg ⁻¹	<10	<10	35	44	49	74	42	36
Mo	mg.kg ⁻¹	<5	<5	n.d.	n.d.	<5	<5	<5	<5
Nb	mg.kg ⁻¹	<20	<20	n.d.	n.d.	<20	<20	<20	<20
Ni	mg.kg ⁻¹	<10	<10	24	37	47	28	15	16
Sb	mg.kg ⁻¹	<10	<10	n.d.	n.d.	<10	<10	<10	<10
Sn	mg.kg ⁻¹	<10	<10	16	<10	<10	<10	<10	<10
Sr	mg.kg ⁻¹	28	28	123	124	127	427	405	316
V	mg.kg ⁻¹	18	<10	119	97	107	118	50	34
W	mg.kg ⁻¹	<10	<10	n.d.	n.d.	<10	<10	<10	<10
Y	mg.kg ⁻¹	<20	<20	38	28	36	20	<20	<20
Zr	mg.kg ⁻¹	123	158	271	228	419	111	158	213
SiO ₂	%	92,6	89,4	41,5	54,8	64,5	40	44,5	56,9
Al ₂ O ₃	%	2,1	1,9	6,9	7,3	10,1	11,9	6	6,1
CaO	%	0,2	0,2	16,4	9,7	3,6	17,5	19,5	14,1
Fe ₂ O ₃	%	0,77	0,6	4,1	4,3	4,7	4	2,5	2,2
MnO	%	0,03	<0,02	0,3	0,2	0,09	0,06	0,05	0,04
K ₂ O	%	0,72	0,6	1	1	1,6	2,2	1,1	1,3
MgO	%	<0,2	<0,2	1	<1	1,1	2,3	1,5	1,2
Na ₂ O	%	0,3	0,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TiO ₂	%	<0,05	<0,05	0,4	0,6	0,65	0,5	0,4	0,4
P ₂ O ₅	mg.kg ⁻¹	1800	1900	3216	1723	2011	1681	1521	1239
NO ₃	mg.kg ⁻¹	45,1	22,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NtKjl	%	0,06	0,15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
S(II)	%	<0,1	<0,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SO ₄	%	<0,2	<0,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
St	%	0,01	0,03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fe(II)	%	<0,1	<0,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.: Non déterminé

Annexe 2 : Analyses physico-chimiques et minéralogie des eaux du bassin de l'Isle (d'après Itard *et al.*, 2007)

Echantillons		YI009	YI011	YI016	YI019	YI020	YI025	AB001	PZR10
pH		7,4	7,2	7	6,6	7,2	7,2	7,2	7
Eh	mV	160	180	180	150	215	26	303	<131
Conductivité		109	61,9	88,8	89	145	190	135,8	277
Température	°C	14	14	13,9	14,3	13,2	13	13	13,5
O ₂	mg.l ⁻¹	9,1	9,5	6,3	8,1	9,4	8,1	10,2	1,2
C inorg	mg.l ⁻¹	8,5	3,5	7,9	6,4	8,4	23,2	9,5	28,2
Ag	µg.l ⁻¹	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
Al	µg.l ⁻¹	20	21	21	11	11	<10	<10	13
As	µg.l ⁻¹	15	75	<10	60	55	55	92	1846
AsIII	µg.l ⁻¹	n.d.	4,3	n.d.	2,3	n.d.	35,2	6,7	1567,6
AsV	µg.l ⁻¹	n.d.	52,7	n.d.	45,1	n.d.	9,9	65	252,8
B	µg.l ⁻¹	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Ba	µg.l ⁻¹	31	5	28	15	22	21	26	23
Be	µg.l ⁻¹	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
Ca	mg.l ⁻¹	7,4	2,5	4,6	5,1	10,6	17,9	9,5	19,2
Cd	µg.l ⁻¹	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
Cl	mg.l ⁻¹	10,7	8	7,7	9,1	12,9	6,8	12,9	9,7
Co	µg.l ⁻¹	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
Cr	µg.l ⁻¹	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
Cu	µg.l ⁻¹	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
F	mg.l ⁻¹	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,1	<0,1	0,2
Fe	mg.l ⁻¹	0,37	0,23	0,41	0,13	0,23	4,43	0,35	12,56
K	mg.l ⁻¹	2,6	1,3	1,4	1,6	2,9	1,6	3	4,1
Li	µg.l ⁻¹	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	19
Mg	mg.l ⁻¹	2,6	1,1	2,1	2,3	4,8	5,7	4,3	9,4
Mn	µg.l ⁻¹	45	23	19	13	20	655	27	761
NH ₄	mg.l ⁻¹	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,1	<0,1	<0,1
NO ₂	mg.l ⁻¹	0,04	<0,01	0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,01	<0,01
NO ₃	mg.l ⁻¹	4,9	2	3,6	2,9	6,1	<0,5	6,7	<0,5
Na	mg.l ⁻¹	10	7,6	10	8,1	10,7	10	10,6	14,1
Ni	µg.l ⁻¹	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
PO ₄	mg.l ⁻¹	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,4
Pb	µg.l ⁻¹	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
SO ₄	mg.l ⁻¹	3,5	3,2	2,2	1,9	16,8	0,7	6,5	13,6
SiO ₂	mg.l ⁻¹	13,9	15,2	23	14,5	17	16,5	17,7	15,3
Sr	µg.l ⁻¹	79	37	67	36	70	94	78	130
Zn	µg.l ⁻¹	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	10
HCO ₃	mg.l ⁻¹	40	16	34	31	42	99	47	117

n.d.: Non déterminé

Annexe 3 : Solutions utilisées pour la préparation des milieux d'enrichissements

Solution d'oligo-éléments

HCl (25 %)	6.5 ml
FeCl ₂ , 4H ₂ O	1,5 g
H ₃ BO ₃	60 mg
MnSO ₄ , 4H ₂ O	117 mg
CoCl ₂ , 6H ₂ O	25 mg
ZnCl ₂	70 mg
NiCl ₂ , 6H ₂ O	25 mg
CuCl ₂ , 2H ₂ O	15 mg
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	25 mg
Eau déminéralisée	1 000 ml

Solution de vitamines

Acide p-amino-benzoïque	10 mg
Biotine	10 mg
Acide folique	4 mg
Pyridoxine-HCl	2 mg
Riboflavine	10 mg
Thiamine	10 mg
Acide nicotinique	10 mg
Acide pantothénique	10 mg
Vitamine B12	0,2 mg
Eau déminéralisée	1 000 ml

Solution d'Arsenic III

Une solution aqueuse d'As₂O₃ à 13 g/l (correspondent à une solution à 10 g/l d'AsIII) est préparée en ajoutant 13 g d'As₂O₃ à 0,55 g de NaOH dans 100 ml d'eau à ébullition, puis en ajustant à 1 L avec de l'eau déminéralisée. Cette solution est stérilisée par autoclavage.

Annexe 4 : Matrices d'identités des séquences des bandes DGGE (chapitre 5)

Identités des séquences issues des bandes DGGE avec celles des clones issus du sol T12R

Bandes	T12RSOL1	T12RSOL2	T12RSOL3	T12RSOL4	T12RSOL5	T12RSOL6	T12RSOL7	T12RSOL8	T12RSOL9	T12RSOL10	T12RSOL11	T12RSOL12	T12RSOL13	T12RSOL14	T12RSOL15	T12RSOL16	T12RSOL17	T12RSOL18
A	48	44	71,3	46,6	48	48,6	71,3	67,3	46	48	48,6	74	97,3	70	47,3	50	73,3	62
B	44,6	42,6	61,3	44,6	46	46	62	54	45,3	42,6	44,6	58,6	62	60,6	42	48	60	51,3
C	70	77,3	47,3	68,6	74,6	72	46,6	46,6	70,6	69,3	82	46	47,3	44	70,6	70,6	48,6	40,6
D	69,3	94	42,6	70	80,6	70,6	42,6	41,3	76,6	74	70,6	39,3	42,6	38,6	70,6	72,6	44,6	38
E	71,3	78	47,3	69,3	75,3	73,3	46,6	46,6	71,3	70	83,3	45,3	47,3	44	71,3	70,6	48,6	40,6
F	45,3	42	72,6	45,3	46,6	46,6	67,3	70,6	45,3	45,3	46	74,6	72,6	67,3	42	46,6	71,3	61,3
G	68,6	78,6	43,3	68,6	73,3	68	42,6	42	70	70	81,3	44,6	44,6	40	67,3	70	46	39,3
H	45,3	44	86	46,6	48,6	47,3	88,6	62,6	49,3	46	45,3	72,6	70,6	86,6	44,6	46,6	70	73,3
I	42	39,3	58,6	43,3	43,3	42,6	53,3	69,3	42,6	41,3	43,3	56,6	62	56,6	40,6	40,6	60	50
J	45,3	44,6	86,6	46,6	48,6	47,3	89,3	62,6	49,3	46,6	46	73,3	72	87,3	45,3	47,3	70,6	74
K	46,6	43,3	72	48	48,6	49,3	68,6	67,3	46,6	46	46	71,3	71,3	69,3	45,3	46	71,3	62
L	72,6	98	44,6	73,3	84	74	44,6	43,3	80	76,6	74,6	42	44,6	40,6	74	76	47,3	39,3
M	46	42,6	73,3	47,3	47,3	48	69,3	70,6	46	46	46,6	74,6	72,6	69,3	44,6	45,3	71,3	63,3
N	71,3	78	46	72	77,3	71,3	44,6	44	73,3	74	86	46	46	43,3	73,3	72	49,3	40
O	45,3	42,6	83,3	46,6	47,3	47,3	88	62	48	45,3	44	70	69,3	82,6	44	46	67,3	70,6
P	49,3	43,3	84	49,3	49,3	50,6	80	68,6	48	46,6	47,3	76,6	74,6	79,3	46,6	48	75,3	70,6
Q	46	44,6	90,6	50	49,3	48	82	64,6	48,6	46	46,6	74	70	80,6	45,3	47,3	73,3	76,6
R	78,6	78,6	49,3	80,6	86,6	80,6	48	48	83,3	82	70,6	48	49,3	45,3	77,3	83,3	51,3	42,6
S	46	44	92,6	50	48,6	48	84	64,6	48	45,3	46	72	71,3	81,3	44,6	46,6	74	77,3
T	47,3	42,6	83,3	50	48,6	48,6	84	64,6	48,6	47,3	46	74	72,6	84	47,3	47,3	73,3	70,6
U	46,6	42,6	85,3	49,3	48	48	85,3	64,6	46,6	48	46,6	74,6	73,3	85,3	44,6	46	72,6	72,6
V	47,3	44	83,3	49,3	49,3	48,6	84,6	63,3	48	48	47,3	73,3	72,6	83,3	45,3	46,6	72	71,3

Identités des séquences issues des bandes DGGE avec celles issue de l'étude de Fan *et al.* (2008)

Bandes	aoxB-1	aoxB-2	aoxB-3	aoxB-4	aoxB-5	aoxB-6	aoxB-7	aoxB-8	aoxB-9	aoxB-10
A	64,2	63,1	39,2	40,3	53,3	59,7	63,6	40,2	40,3	37,3
B	32,8	34	23,8	24,4	39,8	30,9	33,7	22,6	24,1	22,9
C	38,6	38,6	61,6	64,4	36,4	37	38,1	61,7	63,8	73,4
D	39,8	39,8	68,6	71,4	37,1	39,8	39,8	69,7	69,7	70,8
E	39,7	40,3	65	67,7	37	38,1	39,7	65,1	67,2	76,7
F	72,3	69,6	42,6	43,1	63,1	68,5	69,6	40,9	44,2	40,4
G	37,5	35,3	60	63,3	35,3	35,9	35,3	58,9	62,7	71,2
H	39	44,2	24	24,3	36,4	42,7	44,5	24,3	24,6	23,6
I	57,4	55,8	39,3	39,8	51,6	53	56,3	38,2	39,8	38,7
J	70,1	78,4	42,6	43,7	64,8	76,7	79	43,7	44,2	42,6
K	66,8	67,4	42,6	42	59,3	66,8	67,4	43,7	43,1	42
L	37,5	37	66,6	68,8	34,2	37	37	69,1	67,7	68,5
M	71,8	72,9	43,1	42,6	60,9	68,5	72,9	44,2	43,7	41,5
N	23,1	24	39,1	40,6	22,8	23,4	24	38,5	40	47,4
O	67,9	76,2	42,6	42	62,6	74	76,7	43,1	42,6	42
P	72,3	93,9	44,2	43,7	62,6	77,3	93,9	45,3	44,8	43,1
Q	69	76,7	43,1	43,1	64,2	72,9	77,3	43,1	44,2	42
R	44,8	46,4	77,4	76,9	40,9	45,3	46,4	78	77,4	69,2
S	37,5	42	23,8	23,2	35	40,2	42,3	23,5	23,8	22,9
T	39,1	43,5	25,1	24,5	36	41,9	43,8	25,7	25,1	23,9
U	64	71,5	38,1	37,6	58,7	73	72	40	38,6	38,1
V	69,6	76,7	43,7	43,1	62	77,3	77,3	44,8	43,7	43,1

Identités des séquences issues des bandes DGGE avec celles issue de l'étude d'Inskeep *et al.* (2007)

Bandes	LYC14	LYC13	LYC10	LYC1	LYD6	LYC4	LYB3	LYC15	Am-1	JC3Cmx03l	JC3Bat	TSBRNAb03	VDCol29	VDCol4c01	VDb03	GDe08	WSU1b11	LYC3	LYA10	LYB1
A	61,5	62,3	70	70,9	70,9	69,2	71,7	69,2	91,4	44,4	41,8	42,7	47,8	41	40,1	38,4	44,4	44,4	41,8	41
B	56,4	53,8	61,5	62,3	57,2	59,8	62,3	56,4	60,6	41	39,3	40,1	41	40,1	37,6	36,7	42,7	41	40,1	40,1
C	39,3	39,3	41,8	41,8	39,3	41,8	41	43,5	41,8	41,8	41	39,3	39,3	70,9	70,9	69,2	71,7	67,5	72,6	79,4
D	35	34,1	33,3	33,3	31,6	37,6	36,7	40,1	36,7	38,4	36,7	35,8	37,6	71,7	75,2	70	70,9	68,3	75,2	73,5
E	39,3	39,3	41,8	41,8	38,4	41,8	41	43,5	41,8	41,8	41	39,3	39,3	71,7	72,6	70	73,5	70	75,2	81,1
F	64,9	66,6	78,6	79,4	74,3	70	76	70	70,9	44,4	41,8	41,8	47	41	38,4	36,7	41	42,7	39,3	41
G	36,7	36,7	41	41	37,6	39,3	37,6	42,7	41	40,1	39,3	37,6	36,7	70	70,9	69,2	70,9	68,3	71,7	77,7
H	60,6	62,3	70,9	71,7	67,5	88	82	70	67,5	39,3	36,7	38,4	44,4	43,5	40,1	39,3	41	42,7	41,8	41
I	70,9	70,9	58,9	58,9	56,4	58,9	56,4	57,2	63,2	41,8	38,4	39,3	46,1	38,4	35,8	35	38,4	40,1	35,8	37,6
J	60,6	63,2	70,9	71,7	68,3	88,8	82,9	70,9	69,2	41	38,4	40,1	45,2	43,5	40,1	39,3	41,8	42,7	42,7	41
K	66,6	64,9	76	76,9	73,5	70,9	72,6	70,9	69,2	47,8	45,2	46,1	46,1	42,7	41,8	40,1	41,8	44,4	41	41
L	36,7	36,7	36,7	36,7	35	40,1	39,3	43,5	39,3	40,1	38,4	37,6	40,1	76	80,3	74,3	74,3	72,6	79,4	78,6
M	66,6	67,5	75,2	76	76	71,7	77,7	69,2	71,7	44,4	41,8	42,7	47	42,7	42,7	39,3	41,8	45,2	40,1	41
N	39,3	37,6	39,3	39,3	40,1	41,8	42,7	45,2	41,8	41,8	41	39,3	38,4	72,6	74,3	73,5	73,5	72,6	74,3	79,4
O	60,6	63,2	67,5	68,3	67,5	87,1	81,1	70	69,2	41	38,4	40,1	44,4	44,4	41	41	41,8	43,5	42,7	41,8
P	66,6	69,2	74,3	75,2	70,9	82,9	99,1	70	72,6	41	38,4	39,3	43,5	44,4	41	41,8	41,8	45,2	42,7	41,8
Q	62,3	64,9	71,7	72,6	69,2	95,7	80,3	70,9	68,3	41,8	40,1	41,8	45,2	44,4	40,1	41	42,7	42,7	42,7	42,7
R	41	41,8	43,5	43,5	40,1	43,5	43,5	47	45,2	43,5	41	40,1	41,8	83,7	76,9	78,6	81,1	80,3	87,1	77,7
S	60,6	63,2	70	70,9	67,5	97,4	80,3	70,9	68,3	41	39,3	41	44,4	43,5	39,3	40,1	41,8	41,8	41,8	41,8
T	61,5	62,3	73,5	74,3	68,3	83,7	81,1	70	70,9	41	38,4	40,1	44,4	41,8	39,3	41	41,8	42,7	42,7	41
U	60,6	63,2	74,3	75,2	70	84,6	82	70,9	70	42,7	41	41,8	43,5	42,7	40,1	38,4	39,3	42,7	40,1	41
V	57,2	61,5	71,7	72,6	66,6	79,4	77,7	69,2	67,5	40,1	37,6	39,3	41,8	42,7	39,3	37,6	39,3	41	40,1	39,3

Annexe 5 : Matrices d'identités des clones issus du sol T12R (chapitre 6)

Identités des séquences issues des clones du sol T12R avec celles issue de l'étude de Fan *et al.* (2008)

	aoxB-1	aoxB-2	aoxB-3	aoxB-4	aoxB-5	aoxB-6	aoxB-7	aoxB-8	aoxB-9	aoxB-10
T12ROA1	43,9	46,9	80,1	80,1	43,9	45,1	46,9	74,6	81,9	79,5
T12ROA5	66,2	69,8	44,5	45,1	57,8	64,4	69,2	45,7	46,3	43,9
T12ROA3	45,7	47,5	77,1	79,5	41,5	45,1	48,1	84,9	77,7	69,2
T12ROA2	44,5	47,5	80,7	78,3	42,7	45,7	47,5	83,7	79,5	72,8
T12ROA4	77,7	70,4	46,3	45,1	65	68	71	45,1	45,7	43,3
T12ROH1	98,7	74,6	46,9	45,7	64,4	72,8	75,3	46,9	46,9	43,9
T12ROH2	90,3	72,8	46,9	46,3	63,8	72,2	73,4	46,9	47,5	44,5
T12ROH4	76,5	74	46,9	46,9	63,2	72,2	74,6	47,5	48,1	44,5
T12RSOL1	47,5	50	72,8	73,4	43,3	48,7	50	72,8	71,6	71
T12RSOL2	43,9	43,9	74	75,9	40,9	43,3	43,9	74,6	75,3	74,6
T12RSOL3	74,6	80,7	45,7	45,1	68	80,1	81,3	46,3	46,3	45,1
T12RSOL4	45,1	48,1	74	76,5	45,1	47,5	48,1	75,9	77,1	72,2
T12RSOL5	46,9	48,7	80,7	81,9	45,1	46,9	48,7	83,7	80,7	72,8
T12RSOL6	48,1	50	75,3	73,4	45,1	48,7	50	75,3	73,4	70,4
T12RSOL7	72,2	78,9	45,1	44,5	63,2	81,3	79,5	46,3	45,1	45,1
T12RSOL8	68,6	66,2	46,9	47,5	57,8	63,2	66,8	42,7	49,3	42,1
T12RSOL9	46,3	47,5	78,9	78,3	43,9	43,9	47,5	80,7	78,3	72,8
T12RSOL11	46,3	46,3	67,4	72,8	44,5	44,5	46,3	67,4	72,2	82,5
T12RSOL12	75,3	73,4	43,3	43,9	65	73,4	74	45,1	45,1	41,5
T12RSOL13	75,9	72,2	47,5	48,1	60,8	72,2	72,8	46,3	48,1	45,7
T12RSOL14	70,4	77,1	42,1	42,7	63,8	74	77,7	45,1	43,9	42,7
T12RSOL15	42,1	46,3	71,6	74,6	42,7	46,3	45,7	78,9	74,6	69,2
T12RSOL16	45,1	46,9	78,3	78,9	43,3	46,3	46,9	77,1	79,5	70,4
T12RSOL17	75,9	74	48,1	46,9	65	72,2	74,6	49,3	48,1	46,9
T12RSO18	65	68	39,1	39,7	53,6	67,4	68,6	39,1	40,9	37,9

Identités des séquences issues des clones du sol T12R avec celles issue de l'étude d'Inskeep *et al.* (2007)

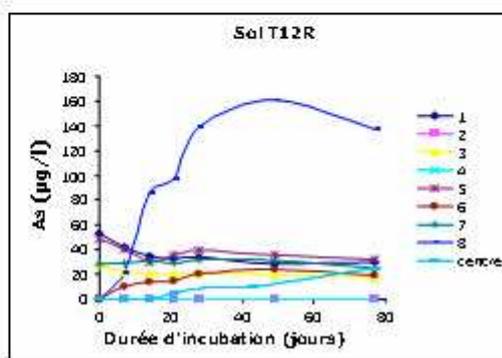
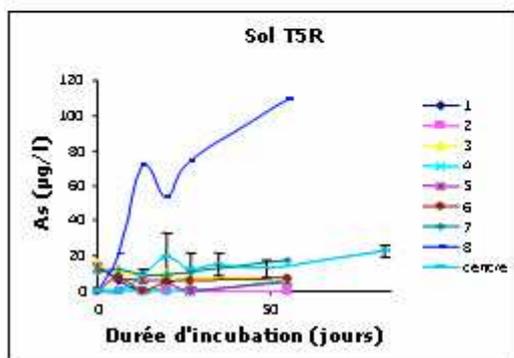
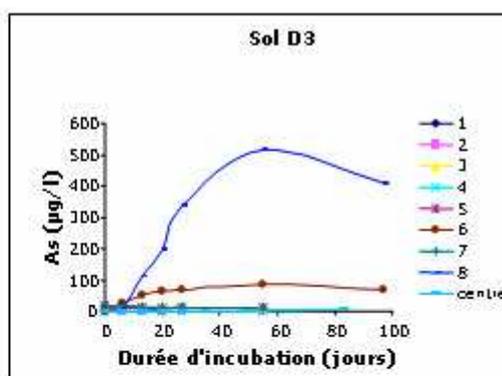
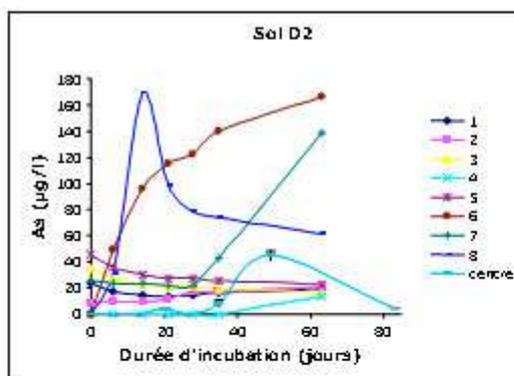
	LYC14	LYC15	LYC13	LYC10	LYC4	LYC3	LYC1	LYB1	LYC14	LYA10	LYB3	JC3Cmx031	JC3Bat	VDCol29	WSU1b11	VDCol4c01	GDe08	VDb03	Am-1
T12ROA1	36,7	40	34,8	38,7	41,9	74,1	39,3	76,7	36,7	77,4	43,8	34,8	34,8	33,5	78	74,1	85,8	77,4	41,9
T12ROA5	56,7	58	58,7	67	64,5	42,5	67,7	43,2	56,7	44,5	68,3	41,2	38,7	41,9	41,2	41,9	40,6	40,6	60,6
T12ROA3	38,7	43,2	38,7	43,8	42,5	72,9	44,5	74,1	38,7	84,5	45,1	40,6	38,7	35,4	78	81,9	68,3	74,8	45,1
T12ROA2	40	43,8	38	41,2	43,2	76,7	41,9	72,9	40	84,5	44,5	36,7	36,1	34,8	76,1	81,9	76,1	79,3	42,5
T12ROA4	58,7	78,7	60,6	72,2	70,9	43,2	72,2	41,9	58,7	43,2	70,9	42,5	40,6	43,8	40,6	42,5	40	39,3	66,4
T12ROH1	63,2	76,7	64,5	73,5	72,2	42,5	73,5	43,2	63,2	43,8	74,1	43,2	40,6	45,1	41,2	41,9	40,6	40	72,2
T12ROH2	62,5	75,4	63,2	72,9	73,5	43,2	72,9	43,2	62,5	45,1	72,9	43,2	41,9	43,2	41,9	43,2	41,2	41,2	72,2
T12ROH4	63,8	72,2	63,8	71,6	73,5	45,8	72,2	43,8	63,8	45,1	73,5	45,8	43,8	46,4	44,5	43,8	41,9	42,5	91,6
T12RSOL1	41,9	44,5	39,3	42,5	43,2	72,2	42,5	72,9	41,9	77,4	46,4	37,4	34,8	38,7	70,9	75,4	67,7	70,3	45,1
T12RSOL2	36,7	41,9	36,1	40	41,2	70,9	40	74,8	36,7	76,1	40,6	37,4	36,7	32,9	73,5	76,7	72,2	82,5	40,6
T12RSOL3	60,6	68,3	62,5	74,1	94,8	43,2	74,8	42,5	60,6	45,1	80,6	38,7	38	43,2	41,2	43,8	41,2	41,2	69,6
T12RSOL4	38,7	43,2	38	43,8	45,8	70,3	43,8	72,9	38,7	76,1	45,1	37,4	34,8	36,7	74,1	74,8	73,5	67	43,8
T12RSOL5	41,2	45,8	41,2	43,2	45,1	80	43,2	76,7	41,2	87	45,8	40,6	39,3	34,8	80	84,5	75,4	79,3	44,5
T12RSOL6	41,9	44,5	40,6	44,5	43,8	72,2	44,5	71,6	41,9	78	47	40,6	38	38	70,9	78	70,3	70,9	44,5
T12RSOL7	56,7	66,4	58,7	66,4	84,5	43,2	67	41,9	56,7	45,1	79,3	38	36,7	38,7	40,6	43,8	38,7	41,2	69
T12RSOL8	78	60,6	78,7	66,4	63,8	43,8	67	43,8	78	44,5	65,1	43,2	40,6	41,9	44,5	41,2	38,7	39,3	67,7
T12RSOL9	40,6	43,2	39,3	40,6	44,5	77,4	40,6	73,5	40,6	83,8	44,5	36,1	34,8	33,5	76,1	80,6	72,2	76,7	42,5
T12RSOL11	41,9	45,1	40,6	43,8	43,2	69	43,8	78,7	41,9	68,3	44,5	41,2	41,2	35,4	72,2	70,3	70,3	72,9	46,4
T12RSOL12	58	67	61,9	77,4	71,6	40,6	78	39,3	58	41,9	74,1	39,3	40	40	40	41,9	36,7	38	70,9
T12RSOL13	61,9	70,9	63,2	69,6	69,6	43,8	70,3	42,5	61,9	44,5	71,6	43,2	41,2	45,1	45,1	42,5	40	41,9	90,3
T12RSOL14	58	68,3	60,6	70,9	84,5	43,8	71,6	41,9	58	45,1	78,7	40	38	40	41,9	43,8	41,2	41,9	69
T12RSOL15	36,7	38,7	34,8	40	41,9	70,3	40,6	69,6	36,7	76,7	42,5	36,7	34,1	35,4	72,9	74,8	69,6	70,3	43,8
T12RSOL16	39,3	44,5	38,7	43,8	43,2	74,8	44,5	75,4	39,3	84,5	44,5	38,7	37,4	34,8	77,4	80	74,1	75,4	46,4
T12RSOL17	58,7	76,7	58	69,6	73,5	44,5	70,3	43,8	58,7	46,4	71,6	45,1	44,5	46,4	42,5	43,8	43,8	43,2	70,3
T12RSO18	50,3	60	50,9	61,9	78	37,4	62,5	34,1	50,3	36,1	67	32,2	32,2	32,9	35,4	36,7	32,2	35,4	60

Annexe 6 : Plan d'expérience et cinétiques de solubilisation de l'As dans les sols D2, D3, T5R et T12R (Joubert, 2008) (chapitre 7)

Plan d'expérience

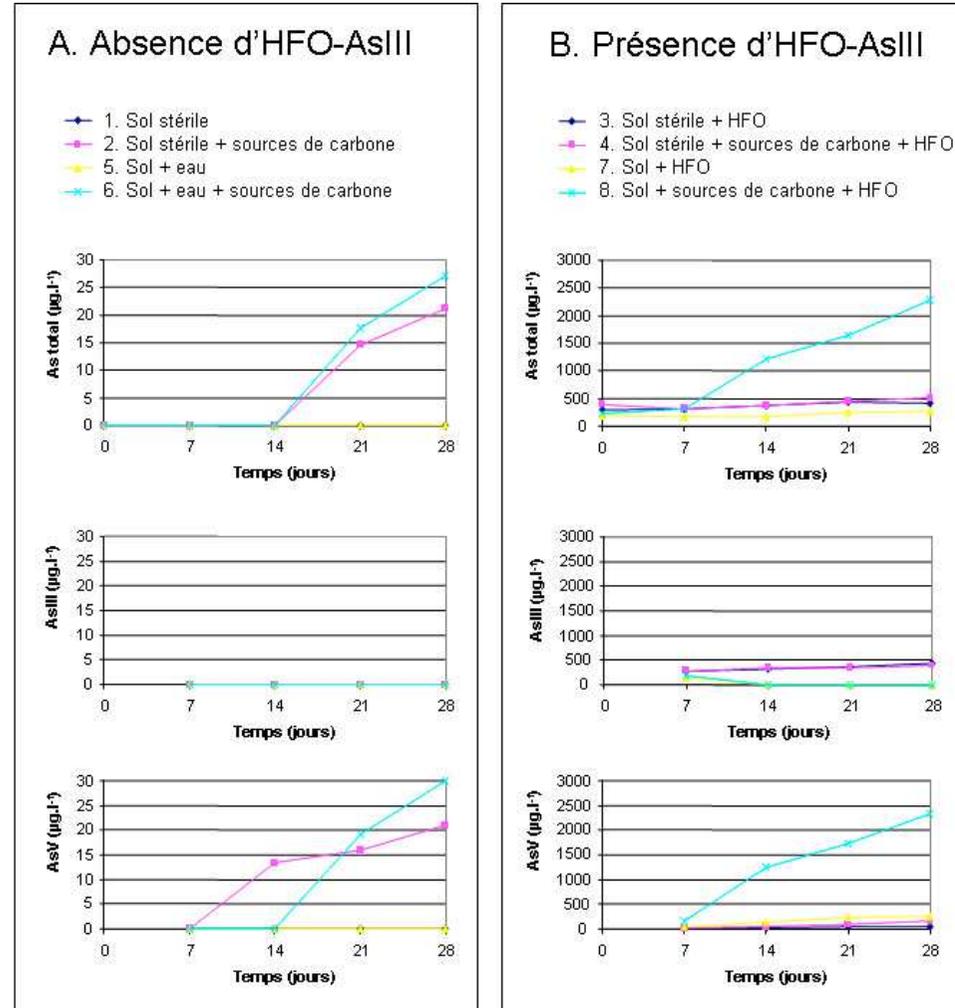
	A	B	C	D
	Température	Phase gazeuse	Activité biologique	Modification de pH
1	4°C	Air	Abiotique	0,25 meq/l NaOH
2	4°C	Air	Biotique+Acétate 0,5g/l	0,5 meq/l HCl
3	4°C	N ₂	Abiotique	0,5 meq/l HCl
4	4°C	N ₂	Biotique+Acétate 0,5g/l	0,25 meq/l NaOH
5	37°C	Air	Abiotique	0,5 meq/l HCl
6	37°C	Air	Biotique+Acétate 0,5g/l	0,25 meq/l NaOH
7	37°C	N ₂	Abiotique	0,25 meq/l NaOH
8	37°C	N ₂	Biotique+Acétate 0,5g/l	0,5 meq/l HCl
9	14°C	CO ₂ /N ₂	Biotique	pas d'ajout
10	14°C	CO ₂ /N ₂	Biotique	pas d'ajout
11	14°C	CO ₂ /N ₂	Biotique	pas d'ajout

Cinétiques de solubilisation de l'As

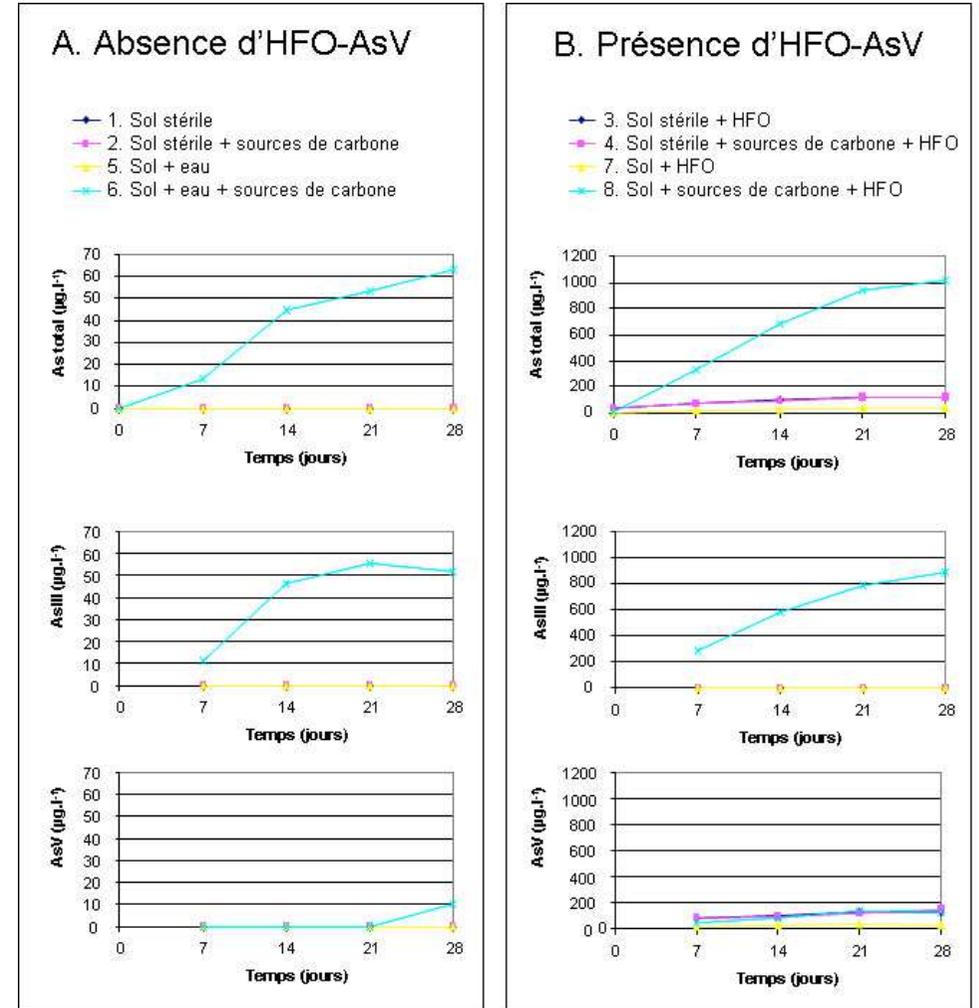


Annexe 7 : Cinétiques de solubilisation de l'As dans les incubations du sol T12R

Aérobie



Anaérobie



Annexe 8 : Matrices d'identités des clones issus de l'incubation aérobie du sol T12R en condition 8 (chapitre 7)

Identités des séquences des clones avec celles de souches AsIII-oxydantes

Souches pures AsIII-oxydantes	T12RA8-1	T12RA8-3	T12RA8-6	T12RA8-7	T12RA8-8	T12RA8-12	T12RA8-13	T12RA8-15	T12RA8-16	T12RA8-17	T12RA8-19	T12RA8-20	T12RA8-22
<i>Achromobacter</i> spp.	66,4	68,7	42,8	72,0	41,2	40,5	65,0	72,5	42,6	41,9	65,7	46,1	72,9
<i>Acidovorax</i> sp. 75	76,2	75,5	42,6	80,4	41,9	37,0	61,5	78,3	41,9	41,9	77,6	44,0	74,8
<i>Acidovorax</i> sp. GW2	76,2	75,5	43,3	80,4	42,6	37,7	61,5	78,3	42,6	43,3	77,6	44,7	74,1
<i>Alcaligenes</i> spp.	67,1	68,5	43,3	72,2	41,2	41,0	65,9	72,2	43,1	41,4	66,9	46,6	73,4
<i>Burkholderia</i> sp. YI019A	67,1	64,3	42,6	70,6	41,9	41,9	71,3	68,5	42,6	40,5	65,7	46,1	69,9
<i>Hermiimonas arsenicoxydans</i>	67,1	63,6	40,5	72,0	38,4	38,4	69,2	69,2	39,8	37,7	65,0	42,6	71,3
<i>Hydrogenophaga</i> sp. WA13	82,5	74,1	41,2	86,7	39,8	38,4	67,8	79,0	41,9	41,2	82,5	42,6	70,6
<i>Hydrogenophaga</i> sp. NT-14	74,8	76,9	44,0	80,4	43,3	38,4	61,5	77,6	43,3	43,3	77,6	45,4	74,8
<i>Hydrogenophaga</i> sp. CL3	42,6	48,2	75,5	41,9	77,6	67,8	42,6	44,0	76,9	81,1	44,0	85,3	42,6
<i>Leptothrix</i> sp. S1-1	74,1	76,9	41,2	79,7	41,2	38,4	62,9	89,5	41,2	40,5	72,7	44,7	70,6
<i>Leptothrix</i> S1.1-1	43,3	44,0	76,2	41,2	96,5	68,5	43,3	43,3	79,0	72,0	40,5	79,0	43,3
<i>Limnobacter</i> sp. 83	74,8	85,3	44,0	77,6	43,3	41,2	64,3	79,0	44,0	44,0	72,7	45,4	66,4
<i>Ralstonia</i> sp. 22	64,3	67,1	43,3	71,3	41,2	40,5	64,3	71,3	42,6	41,2	63,6	46,1	73,4
<i>Thiomonas arsenivorans</i>	63,6	63,6	41,9	67,1	40,5	41,2	63,6	67,1	40,5	38,4	62,9	44,7	74,8
<i>T. arsenivorans</i> B6-2	50,3	53,1	39,1	56,6	38,4	35,6	54,5	53,8	39,1	34,2	53,8	38,4	54,5
<i>Thiomonas delicata</i>	62,9	64,3	42,6	67,8	41,2	40,5	62,9	69,2	41,9	40,5	61,5	45,4	71,3
<i>Thiomonas cuprina</i>	62,9	60,8	43,3	68,5	40,5	39,8	64,3	67,1	42,6	38,4	62,9	44,7	74,1
<i>Thiomonas</i> sp. NO115	62,2	61,5	44,0	67,8	41,2	40,5	64,3	66,4	43,3	39,1	62,2	45,4	74,8
<i>Thiomonas</i> sp. WJ68	62,9	67,8	45,4	67,1	42,6	41,2	63,6	69,9	44,0	44,0	64,3	46,8	72,0
<i>Thiomonas</i> sp. 3As	62,2	62,2	44,7	67,8	41,9	41,2	65,0	67,1	44,0	39,8	62,2	46,1	74,1
<i>Variovorax</i> spp.	73,1	73,4	42,3	77,3	42,6	39,1	64,7	96,5	42,3	41,6	71,7	45,4	71,3
<i>Acinetobacter</i> sp. WA19	80,4	72,0	39,8	85,3	38,4	37,7	66,4	76,9	40,5	39,8	80,4	41,2	68,5
<i>Acinetobacter</i> sp. 33	67,8	69,2	44,0	71,3	41,9	40,5	62,9	73,4	44,0	43,3	65,0	44,0	71,3
<i>Pseudomonas</i> sp. 72	53,1	54,5	39,8	56,6	38,4	34,2	55,9	57,3	38,4	35,6	56,6	37,7	55,9
<i>Pseudomonas</i> sp. D2OHCJ	66,4	66,4	43,3	69,2	40,5	40,5	60,1	69,2	43,3	41,9	65,0	42,6	71,3
<i>Pseudomonas</i> sp. 1	58,7	58,7	39,1	62,2	37,7	36,3	57,3	60,8	38,4	36,3	57,3	38,4	56,6
<i>Pseudomonas</i> sp. 46	66,4	69,2	44,7	72,0	42,6	40,5	62,2	72,0	44,7	44,7	65,7	44,7	70,6
<i>Pseudomonas</i> sp. 73	58,7	58,7	39,8	61,5	37,7	35,6	57,3	60,8	39,1	37,0	57,3	39,1	55,9
<i>Pseudomonas</i> sp. 89	52,4	53,8	39,8	55,2	38,4	34,2	54,5	56,6	38,4	35,6	55,9	37,7	54,5
<i>Agrobacterium</i> spp.	40,5	45,9	79,0	41,9	77,3	71,0	42,4	43,7	79,2	73,9	41,0	82,7	44,0
<i>Aminobacter</i> sp. 86	40,5	44,7	80,4	40,5	74,1	73,4	41,9	42,6	76,9	76,9	41,9	79,0	39,8
<i>Ancylobacter</i> sp. OL1	42,6	48,2	75,5	41,9	77,6	67,1	42,6	44,0	76,2	81,1	44,0	83,9	42,6
<i>Bosea</i> sp. WAO	44,0	46,8	77,6	44,0	88,8	67,8	43,3	45,4	78,3	74,8	43,3	78,3	43,3
<i>Mesorhizobium</i> sp. DM1	40,5	43,3	81,8	41,2	76,2	75,5	41,9	39,8	80,4	74,8	40,5	79,0	41,2
<i>Rhizobium</i> sp. NT-26	41,2	46,1	79,0	41,9	79,0	69,9	42,6	44,0	79,7	73,4	41,9	81,8	44,7
<i>Sinorhizobium</i> spp.	39,8	45,8	78,0	41,6	76,2	68,5	42,6	43,0	78,3	72,4	40,2	81,8	42,6
<i>Thiobacillus</i> sp. S1	42,6	48,2	75,5	41,9	77,6	67,8	42,6	44,0	76,9	81,1	44,0	85,3	42,6
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	44,0	45,4	41,2	44,0	39,8	37,7	46,1	44,7	39,1	39,8	44,0	43,3	41,9
<i>Thermus</i> spp.	37,0	38,1	37,7	36,0	32,8	32,1	37,4	35,3	37,0	34,2	39,5	37,0	41,2

Identités des séquences des clones avec celles des clones environnementaux issus d'Inskeep *et al.* (2007)

Clones	T12RA8- 1	T12RA8- 3	T12RA8- 6	T12RA8- 7	T12RA8- 8	T12RA8- 12	T12RA8- 13	T12RA8- 15	T12RA8- 16	T12RA8- 17	T12RA8- 19	T12RA8- 20	T12RA8- 22
LYD6	67,3	62,6	40,6	68,6	38,6	36	68	69,3	39,3	36,6	66	41,3	80
LYC14	58	58,6	39,3	60	38	34,6	56,6	62	38	38,6	58	40,6	58,6
LYC15	65,3	65,3	42	68	42,6	41,3	73,3	69,3	42,6	39,3	63,3	45,3	70,6
LYC13	64,6	60,6	37,3	60	37,3	33,3	56	60,6	37,3	36,6	60,6	40,6	58,6
LYC10	65,3	67,3	42	70,6	40	40,6	68	71,3	41,3	40	66	44,6	86
LYC4	80,6	73,3	39,3	92	40,6	38	67,3	79,3	41,3	40	82,6	44,6	72
LYC3	42	46	88	43,3	76,6	66,6	42,6	44,6	90,6	70,6	42	78,6	41,3
LYC1	66	68	42	71,3	40	40,6	68	72	41,3	40	66,6	44,6	86,6
LYB1	41,3	45,3	70	42	72,6	76	41,3	43,3	72,6	72	40,6	76	40,6
LYC14	58	58,6	39,3	60	38	34,6	56,6	62	38	38,6	58	40,6	58,6
LYA10	42,6	47,3	80,6	43,3	79,3	71,3	43,3	44	81,3	80	42	86,6	42,6
LYB3	76	76,6	43,3	79,3	42,6	38	61,3	78,6	42,6	42,6	77,3	44,6	73,3
JC3Cmx031	37,3	39,3	36,6	38,6	38	36,6	41,3	38,6	37,3	35,3	36,6	41,3	40,6
JC3Bat	35,3	37,3	35,3	38	36,6	36,6	40	36,6	36	32,6	34,6	39,3	39,3
VDCol29	40	40,6	34	43,3	32,6	30,6	45,3	42,6	32	36,6	41,3	37,3	43,3
WSU1b11	39,3	45,3	80	40,6	77,3	70	40,6	43,3	79,3	74	40,6	82	43,3
VDCol4c01	42,6	47,3	78	42,6	82,6	68	43,3	46	80	76,6	40,6	88,6	42
GDe08	39,3	45,3	74,6	40	74	69,3	38,6	44	75,3	71,3	40,6	77,3	38,6
VDb03	40	44,6	76,6	41,3	76,6	70,6	40,6	44	77,3	70	40,6	79,3	39,3
Amst6Ad05	66	69,3	42,6	69,3	41,3	40	62	73,3	42,6	42,6	66	43,3	71,3
Amst6Ad02	66,6	68,6	43,3	69,3	42	40,6	62	72,6	43,3	43,3	66,6	44	72

Identités des séquences des clones avec celles issues des bandes DGGE des échantillons d'eaux de l'Isle

Bandes	T12RA8-1	T12RA8-3	T12RA8-6	T12RA8-7	T12RA8-8	T12RA8-12	T12RA8-13	T12RA8-15	T12RA8-16	T12RA8-17	T12RA8-19	T12RA8-20	T12RA8-22
A	68,4	66,9	45,1	71,4	42,1	42,8	60,1	70,6	45,1	44,3	66,9	44,3	71,4
B	55,6	55,6	41,3	59,3	40,6	36,8	57,1	59,3	40,6	38,3	59,3	40,6	57,1
C	42,1	46,6	68,4	45,1	67,6	84,2	45,8	44,3	68,4	69,9	42,8	72,9	43,6
D	37,5	42,1	72,9	40,6	72,1	72,9	40,6	40,6	72,1	68,4	37,5	79,6	37,5
E	42,1	46,6	70,6	45,1	68,4	85,7	45,8	43,6	70,6	70,6	42,8	73,6	43,6
F	65,4	63,9	43,6	72,9	39,8	39,8	68,4	71,4	42,8	40,6	63,1	45,1	75,9
G	40,6	42,8	70,6	42,1	68,4	96,9	45,1	42,1	69,1	65,4	39	72,1	43,6
H	81,9	75,1	41,3	85,7	41,3	39,8	67,6	78,1	42,1	40,6	80,4	43,6	70,6
I	52,6	52,6	39	57,1	39	35,3	51,8	54,1	39,8	36,8	54,8	39	55,6
J	83,4	76,6	42,1	87,2	42,1	40,6	69,1	79,6	42,8	41,3	81,9	44,3	71,4
K	69,1	66,9	44,3	72,1	41,3	40,6	68,4	71,4	42,8	42,8	66,9	45,8	72,1
L	39,8	44,3	76,6	42,8	75,9	77,4	43,6	42,8	75,9	71,4	39,8	83,4	40,6
M	69,1	68,4	45,1	73,6	42,1	42,1	64,6	72,1	43,6	42,8	66,1	45,1	73,6
N	43,6	47,3	73,6	43,6	73,6	84,2	46,6	44,3	72,1	70,6	45,1	73,6	44,3
O	78,9	72,9	41,3	82,7	41,3	39,8	66,9	74,4	42,1	41,3	77,4	43,6	66,9
P	77,4	77,4	44,3	83,4	43,6	39,8	63,9	78,9	43,6	44,3	78,9	45,8	75,9
Q	80,4	75,1	41,3	90,9	42,8	41,3	68,4	75,9	43,6	41,3	80,4	46,6	71,4
R	45,1	48,1	77,4	46,6	79,6	71,4	45,1	45,8	81,2	75,1	45,8	89,4	47,3
S	78,9	73,6	40,6	91,7	42,1	40,6	67,6	75,9	42,8	40,6	78,9	45,8	70,6
T	83,4	75,9	43,6	82,7	42,8	41,3	67,6	77,4	42,8	44,3	81,9	44,3	74,4
U	88,7	75,9	41,3	84,2	43,6	41,3	69,1	80,4	42,1	42,1	81,9	43,6	75,1
V	87,9	75,1	43,6	82,7	44,3	42,8	70,6	78,1	42,8	42,1	81,2	45,1	75,1

Identités des séquences des clones avec celles des clones issus du sol T12R (chapitre 6)

Clones	T12RA8-1	T12RA8-3	T12RA8-6	T12RA8-7	T12RA8-8	T12RA8-12	T12RA8-13	T12RA8-15	T12RA8-16	T12RA8-17	T12RA8-19	T12RA8-20	T12RA8-22
T12ROA1	45,2	50,3	81,1	44,6	76,1	72,9	44,6	48,4	78,6	77,3	47,1	77,9	43,3
T12ROA5	65,4	69,1	48,4	68,5	45,9	44,6	67,2	71	47,1	47,7	66,6	49,6	73,5
T12ROA3	44,6	49,6	77,3	45,2	78,6	71	45,2	46,5	78,6	79,8	45,2	86,7	46,5
T12ROA2	44,6	50,9	79,2	45,9	77,9	67,2	45,2	48,4	79,8	77,9	45,2	86,7	45,2
T12ROA4	69,1	65,4	44,6	71,6	43,3	42,7	69,8	68,5	44,6	42,7	67,2	47,7	72,3
T12ROH1	70,4	72,3	45,9	72,9	44	42,7	67,9	75,4	45,2	45,2	70,4	48,4	74,2
T12ROH2	69,1	71	46,5	73,5	45,9	43,3	69,1	74,2	46,5	45,9	72,3	50,9	74,2
T12ROH3	69,1	65,4	44,6	72,3	43,3	42,7	69,1	68,5	44,6	42,7	67,2	47,7	72,3
T12ROH4	71,6	72,9	47,1	74,2	45,9	43,3	66	74,8	47,1	46,5	71,6	47,7	72,3
T12RSOL1	46,5	49	74,8	45,2	76,1	68,5	47,7	50,3	74,8	76,1	46,5	78,6	46,5
T12RSOL2	43,3	47,7	76,7	44	76,7	76,1	46,5	45,9	76,1	74,8	43,3	83	43,3
T12RSOL3	81,7	76,1	44,6	96,2	44	42,7	70,4	79,2	45,2	44	83	47,7	72,9
T12RSOL4	45,9	50,3	72,9	47,1	76,1	70,4	46,5	48,4	74,2	77,3	45,9	79,2	45,9
T12RSOL5	47,1	51,5	81,1	47,1	83,6	72,3	47,1	49,6	82,3	78,6	47,1	91,1	47,7
T12RSOL6	46,5	51,5	75,4	45,9	75,4	67,9	49	50,9	77,3	77,9	46,5	83	46,5
T12RSOL7	82,3	72,3	44,6	83	43,3	42,1	67,9	77,3	45,2	44,6	79,8	45,2	67,2
T12RSOL8	61	63,5	44	62,8	41,5	39,6	58,4	65,4	44	43,3	60,3	45,9	64,7
T12RSOL9	45,9	50,3	78,6	46,5	79,2	69,1	47,1	47,1	81,7	75,4	45,9	86,1	45,2
T12RSOL10	46,5	50,3	79,8	45,9	77,3	70,4	47,1	48,4	79,8	75,4	45,9	84,2	45,9
T12RSOL11	47,1	49,6	71	45,9	73,5	84,2	49	49,6	71	67,2	46,5	74,2	47,1
T12RSOL12	71,6	66,6	44	72,3	42,7	42,7	66,6	71	43,3	42,1	65,4	45,9	77,9
T12RSOL13	69,1	70,4	46,5	69,8	45,2	43,3	62,2	72,9	46,5	45,2	68,5	47,7	73,5
T12RSOL14	83,6	74,8	45,9	83	44,6	43,3	68,5	77,3	45,9	45,2	82,3	46,5	71,6
T12RSOL15	44	49	74,8	44	74,8	66	44,6	46,5	72,9	91,8	46,5	78,6	44
T12RSOL16	45,2	49,6	76,7	44,6	83,6	69,8	45,9	47,7	79,2	74,8	46,5	84,9	47,1
T12RSOL17	68,5	67,9	46,5	73,5	47,1	44	68,5	73,5	47,7	47,7	67,9	50,9	75,4
T12RSO18	70,4	65,4	40,8	81,7	39,6	37,7	61	70,4	41,5	38,3	71,6	43,3	63,5

Identités des séquences des clones avec celles des clones issus de l'étude de Fan *et al.* (2008)

	T12RA8-1	T12RA8-3	T12RA8-6	T12RA8-7	T12RA8-8	T12RA8-12	T12RA8-13	T12RA8-15	T12RA8-16	T12RA8-17	T12RA8-19	T12RA8-20	T12RA8-22
aoxB-1	69,6	70,9	43,8	71,6	42,5	41,9	66,4	74,1	43,8	43,2	69	47	72,9
aoxB-2	76,7	76,7	45,1	78,7	44,5	40	61,9	79,3	44,5	45,1	78	46,4	73,5
aoxB-3	41,9	48,3	78,7	43,2	76,7	68,3	44,5	45,1	78,7	74,1	42,5	83,8	44,5
aoxB-4	41,9	47,7	81,2	42,5	79,3	72,2	43,8	45,8	81,2	76,1	43,2	83,8	45,8
aoxB-5	61,2	61,2	41,2	63,2	39,3	38	60	63,2	40,6	38,7	60	40,6	58,7
aoxB-6	76,1	74,8	43,8	78,7	43,2	40	68,3	89	43,8	43,8	74,1	46,4	70,3
aoxB-7	77,4	77,4	45,1	79,3	44,5	40	62,5	80	44,5	43,8	78,7	46,4	74,1
aoxB-8	45,1	49,6	76,7	43,8	80	67,7	44,5	46,4	78,7	80	45,1	85,8	43,8
aoxB-9	42,5	48,3	80	43,2	78,7	70,9	43,8	46,4	80,6	76,1	42,5	83,8	45,1
aoxB-10	41,9	47	70,9	43,2	70,9	80,6	45,8	44,5	70,9	70,3	43,2	70,9	40,6

Annexe 9 : Matrice d'identité des séquences ArrA des incubations du sol T12R (chapitre 7)

Souches pures respirant l'AsV	T12R-ANA8-2	T12R-ANA6-3	T12R-ANA6-5	T12R-ANA6-7
<i>Alkaliphilus metalliredigens</i>	59,7	58,9	55,9	56,7
<i>Alkaliphilus oremlandii</i> OhILAs	56,7	60,4	50,0	52,2
<i>Bacillus arseniciselenatis</i>	62,6	65,6	63,4	63,4
<i>Bacillus selenitireducens</i>	55,9	61,1	55,2	55,2
<i>Chrysiogenes arsenatis</i>	58,2	59,7	54,4	56,7
<i>Desulfotobacterium hafniense</i> DCB-2	62,6	71,6	58,2	59,7
<i>Desulfotobacterium hafniense</i> Y51	63,4	72,3	55,9	57,4
<i>Desulfosporosinus</i> sp. Y5	67,9	75,3	62,6	64,1
<i>Geobacter lovleyi</i> SZ	63,4	61,9	58,9	60,4
<i>Geobacter uraniireducens</i> Rf4	61,9	59,7	55,9	57,4
MLMS-1_delta proteobacterium	66,4	64,1	53,7	54,4
ML-SRAO	61,9	69,4	61,1	61,1
<i>Natranaerobius thermophilus</i>	64,1	67,9	63,4	63,4
<i>Shewanella</i> sp. ANA-3	55,9	57,4	57,4	56,7
<i>Shewanella</i> sp. HAR-4	55,9	56,7	56,7	55,9
<i>Shewanella</i> sp. W3-18-1	57,4	58,9	57,4	56,7
<i>Sulfurospirillum barnesii</i>	55,2	55,9	52,9	53,7
<i>Wolinella succinogenes</i> DSM 1740	61,1	64,9	60,4	59,7
	0,0	0,0	0,0	0,0
Moyenne	60,6	63,4	57,4	58,0

Annexe 10 : Principales caractéristiques de la phase aqueuse des incubations des sols du bassin du Gallego

Aérobic

Sol	Condition d'incubation	pH		As ($\mu\text{g.l}^{-1}$)		
		T0	T28	T0	T28	
G04	c1	7,8	8,1	155	157	
	c2	7,9	7,8	235	376	
	c3	7,9	7,7	244	364	
G05	Abiotique	c1	7,6	7,6	102	112
	c2	7,6	7,6	211	301	
	c3	7,7	7,6	215	343	
G07	c1	7,7	7,8	190	237	
	c2	7,7	7,7	317	577	
	c3	7,8	7,7	297	548	
G04	c1	8,1	8,8	118	558	
	c2	7,8	8,8	178	2347	
	c3	7,8	8,7	170	2204	
G05	Biotique	c1	7,6	7,9	97	133
	c2	7,7	7,8	184	162	
	c3	7,8	7,8	214	233	
G06	c1	7,8	8,1	143	452	
	c2	7,7	7,6	243	412	
	c3	7,6	7,9	265	553	

NB : les valeurs d'Eh n'ont pas été mesurées

Anaérobic

Sol	Condition d'incubation	pH		Eh (mV)		As ($\mu\text{g.l}^{-1}$)		
		T0	T28	T0	T28	T0	T28	
G04	c1	7,4	8,1	77	-48	<10*	13,2	
	c2	7,6	8	-5	9	14,4	132	
	c3	7,8	8,2	38	-50	83,7	165	
G05	Abiotique	c1	7,8	8	46	-19	<10*	<10*
	c2	7,9	8,1	35	-38	<10*	29,3	
	c3	7,8	7,9	20	-15	<10*	67,8	
G07	c1	7,9	7,6	45	0	<10*	52,8	
	c2	7,9	7,7	10	-50	12,3	135	
	c3	8,0	7,5	26	-40	12,1	120	
G04	c1	8,4	7,5	24	-176	<10*	126	
	c2	8,4	7,5	-26	-194	10,8	490	
	c3	8,4	7,2	11	-168	33,9	430	
G05	Biotique	c1	8,2	7,8	48	-206	<10*	53
	c2	8,4	7,8	44	-213	<10*	1019	
	c3	8,3	7,8	42	-264	<10*	1152	
G07	c1	7,9	7,7	22	-252	<10*	313	
	c2	7,9	7,7	19	-240	<10*	1899	
	c3	8,0	7,6	33	-214	27,2	1924	

*Limite de détection

Annexe 11 : Article rédigé à partir d'une partie de ces travaux de thèse et paru dans le journal *Applied and Environmental Microbiology*

Diversity Surveys and Evolutionary Relationships of *aoxB* Genes in Aerobic Arsenite-Oxidizing Bacteria^{∇†}

Marianne Quéméneur,¹ Audrey Heinrich-Salmeron,² Daniel Muller,^{2,3} Didier Lièvreumont,² Michel Jauzein,⁴ Philippe N. Bertin,² Francis Garrido,¹ and Catherine Joulian^{1*}

BRGM, Ecotechnology Unit, Process and Environment Division, 3 Avenue Claude Guillemin, 45060 Orléans Cedex 02, France¹; Génétique Moléculaire, Génomique et Microbiologie, UMR 7156 CNRS and Université Louis Pasteur, 28 Rue Goethe, 67000 Strasbourg, France²; Écologie Microbienne, UMR CNRS 5557 USC INRA 1193 and Université de Lyon, 69622 Villeurbanne Cedex, France³; and LIMOS, UMR 7137 CNRS and Université de Nancy, BP 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France⁴

Received 18 December 2007/Accepted 12 May 2008

A new primer set was designed to specifically amplify ca. 1,100 bp of *aoxB* genes encoding the As(III) oxidase catalytic subunit from taxonomically diverse aerobic As(III)-oxidizing bacteria. Comparative analysis of AoxB protein sequences showed variable conservation levels and highlighted the conservation of essential amino acids and structural motifs. AoxB phylogeny of pure strains showed well-discriminated taxonomic groups and was similar to 16S rRNA phylogeny. Alphaproteobacteria-, Betaproteobacteria-, and Gammaproteobacteria-related sequences were retrieved from environmental surveys, demonstrating their prevalence in mesophilic As-contaminated soils. Our study underlines the usefulness of the *aoxB* gene as a functional marker of aerobic As(III) oxidizers.

Arsenic (As) exists mainly in two toxic soluble forms, arsenite, As(III), and arsenate, As(V), with the latter tending to associate with some oxyhydroxides and clay minerals. The bacterial oxidation of As(III) can thus contribute to a natural attenuation of As contamination by decreasing As bioavailability. These properties have recently been used to develop a bioprocess for removing As from a mining effluent by using the activity of As-metabolizing bacteria indigenous to the contaminated site (4). The feasibility of such a process depends on a good knowledge of the ability of the indigenous microflora to oxidize As(III) and requires reliable methods for detecting, identifying, and monitoring As(III) oxidizers in the environment.

More than 50 phylogenetically diverse As(III)-oxidizing strains distributed among 25 genera have been isolated from various environments so far. Bacterial aerobic As(III) oxidation is performed by a dedicated enzyme, the As(III) oxidase (1, 36, 40), which belongs to the dimethyl sulfoxide (DMSO) reductase of the molybdenum family (9). In *Alcaligenes faecalis*, it is an $\alpha_1\beta_1$ heterodimer comprising a large subunit incorporating a molybdenum center and a [3Fe-4S] cluster and a small subunit incorporating a Rieske-type [2Fe-2S] cluster (9). Genes encoding these subunits are cotranscribed as an operon and have been successively characterized in *Hermiiniimonas arsenicoxydans* (26), *Rhizobium* sp. strain NT-26 (36), and *Agrobacterium tumefaciens* (21). They have also been found in the genome of *Chloroflexus aurantiacus*, on a plasmid in *Ther-*

mus thermophilus, in two aerobic thermophilic As(III) oxidizers, and in the genome of strains for which the ability to oxidize As(III) has not been experimentally proven (27).

Due to the polyphyly of As(III)-oxidizing bacteria, the *aoxB* gene encoding the catalytic subunit of the enzyme seems to be a valuable molecular marker for investigating its ecology and the potential of As(III) oxidation in the environment. To this end, a recent study described primers targeting the first quarter of the *aoxB* gene to detect its presence and expression in the environment and suggested that the gene is widely distributed among the *Bacteria* and also is widespread in soil-water systems containing As (16).

In our present study, we designed new primers to extend the genetic information to the first half of the *aoxB* gene. We then explored the genetic diversity of this gene in order (i) to identify conserved structural and functional domains, (ii) to compare AoxB and 16S rRNA phylogenies to evaluate whether phylogenetic information about As(III)-oxidizing bacteria can be inferred from the *aoxB* gene, and (iii) to assess the composition of As(III)-oxidizing communities in environmental diversity surveys.

Primer evaluation and validation. Primers *aoxBM1-2F* (5'-CCACTTCTGCATCGTGGGNTGYGGNTA-3', positions 66 to 92 in the *H. arsenicoxydans* *aoxB* open reading frame) and *aoxBM3-2R* (5'-TGTCGTTGCCCCAGATGADNCCYTTYT C-3', positions 1150 to 1177) were designed on the most distantly located conserved regions with the CODEHOP program (32) from nine AoxB protein sequences from the *Bacteria* (*Alcaligenes faecalis* [GenBank accession no. AY297781], *Hermiiniimonas arsenicoxydans* [accession no. AF509588], "*Thiomonas arsenivorans*" [accession no. EU304260], *Agrobacterium tumefaciens* [accession no. DQ151549], *Rhizobium* sp. strain NT26 [accession no. AY345225], *Chloroflexus aurantiacus* [accession no. NZ_AAAH01000321],

* Corresponding author. Mailing address: BRGM, Ecotechnology Unit, Process and Environment Division, 3 Avenue Claude Guillemin, 45060 Orléans Cedex 02, France. Phone: 33(0)2 3864 3089. Fax: 33(0)2 3864 3680. E-mail: c.joulian@brgm.fr.

† Supplemental material for this article may be found at <http://aem.asm.org/>.

∇ Published ahead of print on 23 May 2008.

and *Thermus thermophilus* [accession no. NC_000854]), and the *Archaea* (*Aeropyrum pernix* [accession no. NC_000854] and *Sulfolobus tokodaii* [accession no. NC_003106]). The primers target the first part (amino acids 22 to 32, *H. arsenicoxydans* AoxB numbering) of the CX₂CX₃CX₇₀S motif (CHFCIVGCGYH) required for binding a [3Fe-4S] cluster and the consensus motif YEKGIIWGN (amino acids 383 to 391).

Specific amplifications (35 cycles, annealing temperature of 52°C, 1 min 10 s elongation time) of ca. 1,100 bp were obtained for the following 21 chemoautotrophic and chemoheterotrophic As(III)-oxidizing strains belonging to *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, and *Chloroflexi*. *T. arsenivorans* b6^T (3), *Leptothrix* sp. strain S1.1 (4), *Variovorax* sp. strain 4.2 (4), *H. arsenicoxydans* ULPAs1^T (43), *Acidovorax* sp. strain 75, *Acinetobacter* sp. strain 33, *Alcaligenes* sp. strain YI013H, *Alcaligenes* sp. strain T12RB, *Aminobacter* sp. strain 86, *Burkholderia* sp. strain YI019A, *Limnobacter* sp. strain 83, *Pseudomonas* sp. strains 1, 46, 72, 73, 89, and D2OH CJ, and *Ralstonia* sp. strain 22 were isolated in our laboratories from As-contaminated environments (see Table S1 in the supplemental material). *Thiomonas* sp. strain WJ68 and *Thiomonas* sp. strain NO115 were isolated from mining sites (7, 15). *Chloroflexus aurantiacus* DSM635 was isolated from hot springs (30). A less-specific amplification was obtained for the archaeon *Aeropyrum pernix* DSM11879. The detection of distinct genera thus indicated the ability to detect diverse taxa of this metabolic group with the newly designed primers. No amplification was obtained from the 10 non-As(III)-oxidizing bacteria used as negative controls, of which 6 harbor a molybdenum enzyme of the DMSO reductase family (i.e., *Rhodobacter sphaeroides*, *Desulfotobacterium hafniense*, *Bacillus selenitireducens*, *Geobacter metallireducens*, *Escherichia coli*, and *Halomonas denitrificans*).

Sensitivity tests showed that as little as 8.3 pg of template DNA of *H. arsenicoxydans* was needed for *aoxB* gene amplification. Knowing that the 3.4-Mb genome of *H. arsenicoxydans* contains only one *aoxB* gene (27), this would represent approximately 2.2×10^3 copies of the *aoxB* gene. The sensitivity was lower than that of *H. arsenicoxydans* for the phylogenetically distant *C. aurantiacus* strain, with the detection limit being 1.7×10^4 *aoxB* gene copies.

Protein and nucleotide sequence analyses. Analyses were conducted on 29 sequences of As(III)-oxidizing isolates, excluding recently published short sequences (16) and sequences from whole-genome data for which there is no experimental evidence that the corresponding strains oxidize As(III).

Examination of nucleotide sequence alignments using DnaSP version 4 software (33) revealed a high proportion of variable sites (82%), of which 74% were parsimony informative. Conservation degrees ranged from 48.6% to 92.3%. The second codon positions were clearly better conserved. The third codon positions were the most variable (99%), and saturation analysis using DAMBE program version 4.0.50 (44) showed that saturation occurred at this position. The number of substitution sites was higher for phylogenetically distant strains than for closely related ones. Nucleotide substitution causing amino acid substitution was more frequent than synonymous substitution, which accounted for only 23.7% of all substitutions.

Comparative analysis of the deduced AoxB protein sequences showed variable conservation levels (38.4 to 96.8% identity), comparable to data obtained for other functional genes, e.g., those involved in sulfur oxidation, nitrous oxide reduction, and sulfite reduction (28, 37, 42). The 15 partial AoxB sequences presented in Fig. 1 showed 22% identity on 372 amino acids. Three of the four domains of the AoxB subunit described for *A. faecalis* (9) were retrieved in the aligned region (the fourth domain extends outside the sequences presented here). Domain I extends from residue 21 to residue 119 (according to *A. faecalis* protein sequence numbering) and binds the Rieske subunit and the [3Fe-4S] cluster coordinated by the motif C₂₁-X₂-C₂₄-X₃-C₂₈-X₇₀-S₉₉. Except for amino acids present in the X₇₀ region, a high conservation was observed, particularly between residues 21 and 31 and between residues 86 and 103. A highly conserved region between residues 166 and 261 encompassed domains II (residues 120 to 195) and III (residues 196 to 392) and contains several structural motifs, such as alpha-helices and residues like H195 and E203 implicated in the substrate-binding site of the enzyme. Interestingly, the HNRPAYNSE motif is exactly conserved in all bacterial As(III) oxidases. The conserved S99 and A199 residues are important in the demarcation of the catalytic subunit of As(III) oxidase with the other members of the DMSO reductase family of molybdenum enzymes (9). A lower amino acid conservation was observed in the other parts of the protein, although the presence of multiple conservative substitutions suggests that the physicochemical properties of these amino acids play a role in the structure and/or the functioning of the As(III) oxidase enzyme. Finally, regions that contain no structural element showed a low amino acid conservation. For example, the *C. aurantiacus* sequence shows six additional amino acids between residues 330 and 331. In addition, the three *Alphaproteobacteria*, namely *A. tumefaciens*, *Rhizobium* sp. strain NT26, and an *Aminobacter* sp., harbor 24 additional amino acids in this region. This further supports the low amino acid conservation observed throughout the As(III) oxidase protein sequence in these microorganisms compared to that of the *Betaproteobacteria* protein sequences. Taken together, our observations suggest that the As(III) oxidases identified here show moderate amino acid conservation but share several structural and functional domains similar to those found in *A. faecalis* AoxB (Fig. 1), supporting the important role of these domains in As(III) oxidase activity.

Deduced protein sequences of closely related species were generally better conserved than nucleotide sequences. For example, *Alcaligenes* species exhibited sequence identity values ranging from 80.2 to 96.8% for proteins and from 76.6 to 92.2% for nucleotides. AoxB sequences within the same subclass of *Proteobacteria* showed generally higher identity values (e.g., between 72.6% and 96% for *Alphaproteobacteria*). The highest divergences in protein sequences were observed between distantly related bacterial lineages, i.e., *Proteobacteria* versus the nonproteobacterial *Thermus* and *Chloroflexus* strains (identities between 38.4% and 50.7%), and *Alphaproteobacteria* (except *Hydrogenophaga* sp. strain CL3; see below) versus *Betaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria* (identities between 46.7 and 53.5%). In contrast, nucleotide sequences were better conserved than protein sequences for distantly related species. Similar events have been reported for other

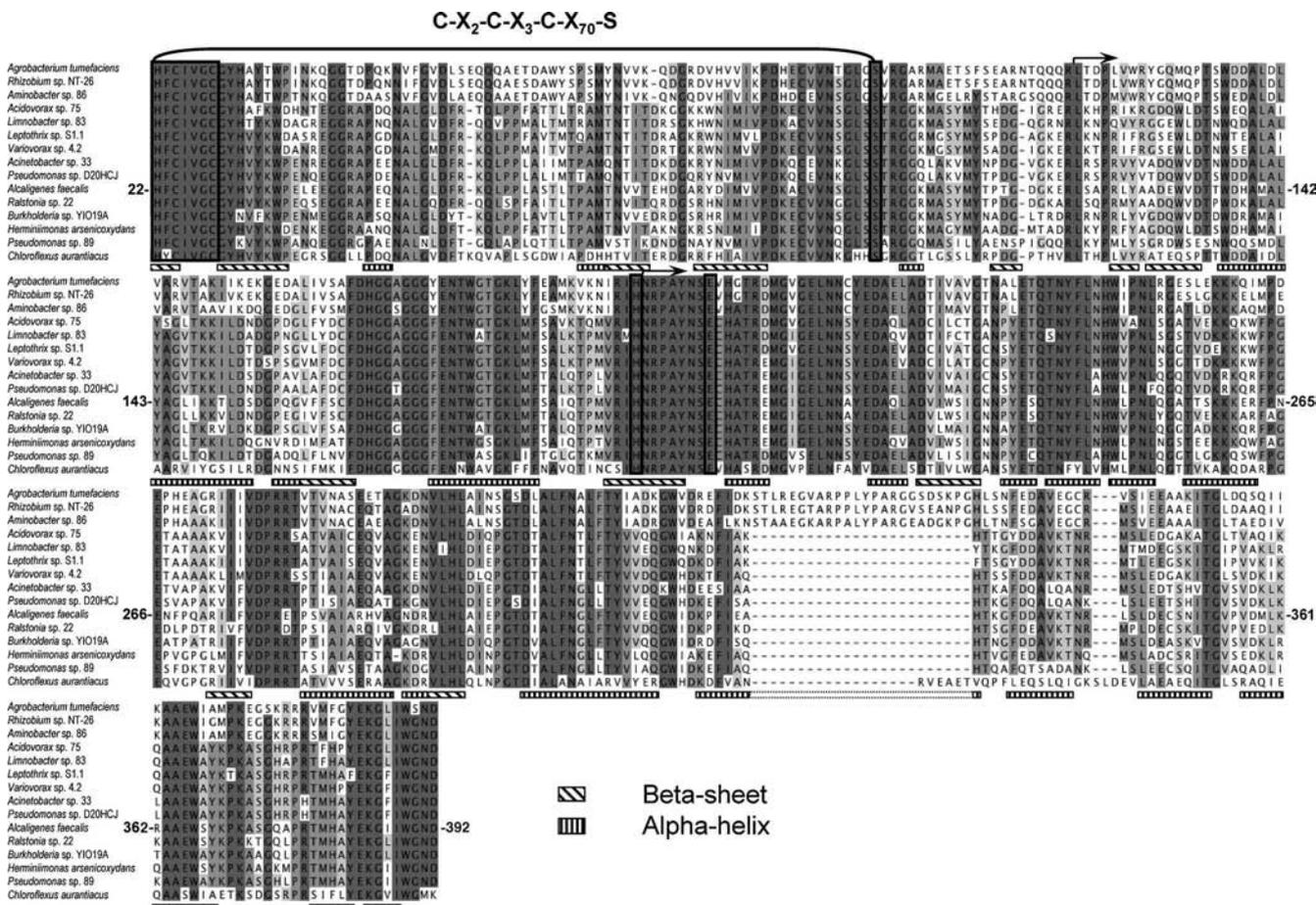


FIG. 1. Protein sequence alignment and putative secondary structure of As(III) oxidases. The *Alcaligenes faecalis* sequence and its secondary structure were retrieved from the PDB database (<http://www.rcsb.org/pdb/welcome.do>). Other As(III) oxidase protein sequences were deduced from nucleotide *aoxB* sequences. Sequence alignment was carried out by CLUSTAL W (39). Amino acid residue numbers are defined according to the *A. faecalis* protein sequence, which starts at a histidine residue at position 22. Residues identical to those of the *A. faecalis* sequence are shown in gray-scale boxes. Residues known to play a role in As(III) oxidase activity are framed in black. Black arrows at positions 120 and 196 indicate the beginning of domains 2 and 3, respectively. The beta-sheet and alpha-helix are shown according to the three-dimensional structure of *A. faecalis* protein (9).

functional genes, e.g., those involved in denitrification and sulfur oxidation (5, 28). In the case of *aoxB* genes, these observations can be explained by saturation at the third codon position for comparison of distant strains. The observed divergences suggest that the *aoxB* gene may have a long evolutionary history and support the hypothesis of an early common ancestor (24). Rhine et al. (31) recently reported that autotrophic *aoxB* genes formed a phylogenetic group distinct from heterotrophic *aoxB* genes, with the exception of *A. tumefaciens* *aoxB* genes, and suggested that the two groups evolved separately from a common ancestor. However, our study demonstrated that the *aoxB* gene of the autotrophic *T. arsenivorans* is phylogenetically affiliated with heterotrophic *aoxB* genes and not with genes of autotrophic As(III) oxidizers. Further data on *aoxB* gene sequences from pure heterotrophic and autotrophic strains will thus be needed to elucidate the evolution of this gene.

Protein sequences are usually used for reconstructing the phylogeny of protein-encoding genes (6, 37). In addition, protein sequences appeared less noisy and more resolutive than

nucleotide sequences for large-scale (phylum) analysis. Further reconstruction of As(III) oxidase phylogeny has thus been based on protein sequences.

Comparison of AoxB and 16S rRNA gene phylogenies. AoxB and 16S rRNA neighbor-joining (34) trees were constructed from unambiguous residues on distances estimated by the Kimura (22) and Jukes and Cantor (20) methods, respectively. The AoxB tree reconstructed the major taxonomic levels and was similar to the 16S rRNA tree (Fig. 2). Indeed, the *C. aurantiacus* AoxB sequence is clearly separated from the AoxB proteobacterial sequences, with a strong bootstrap support (100%). The *Alphaproteobacteria* and *Betaproteobacteria/Gammaproteobacteria* AoxB sequences form distinct phylogenetic branches, supported by 100% bootstrap values. In addition, sequences from species of the same genus, such as *Thiomonas* or *Alcaligenes*, cluster together.

However, a detailed comparison of the two trees revealed some discrepancies. For example, the pseudomonads are divided into two groups in the AoxB-based tree. Group 1 forms a distinct phylogenetic branch supported by a high bootstrap

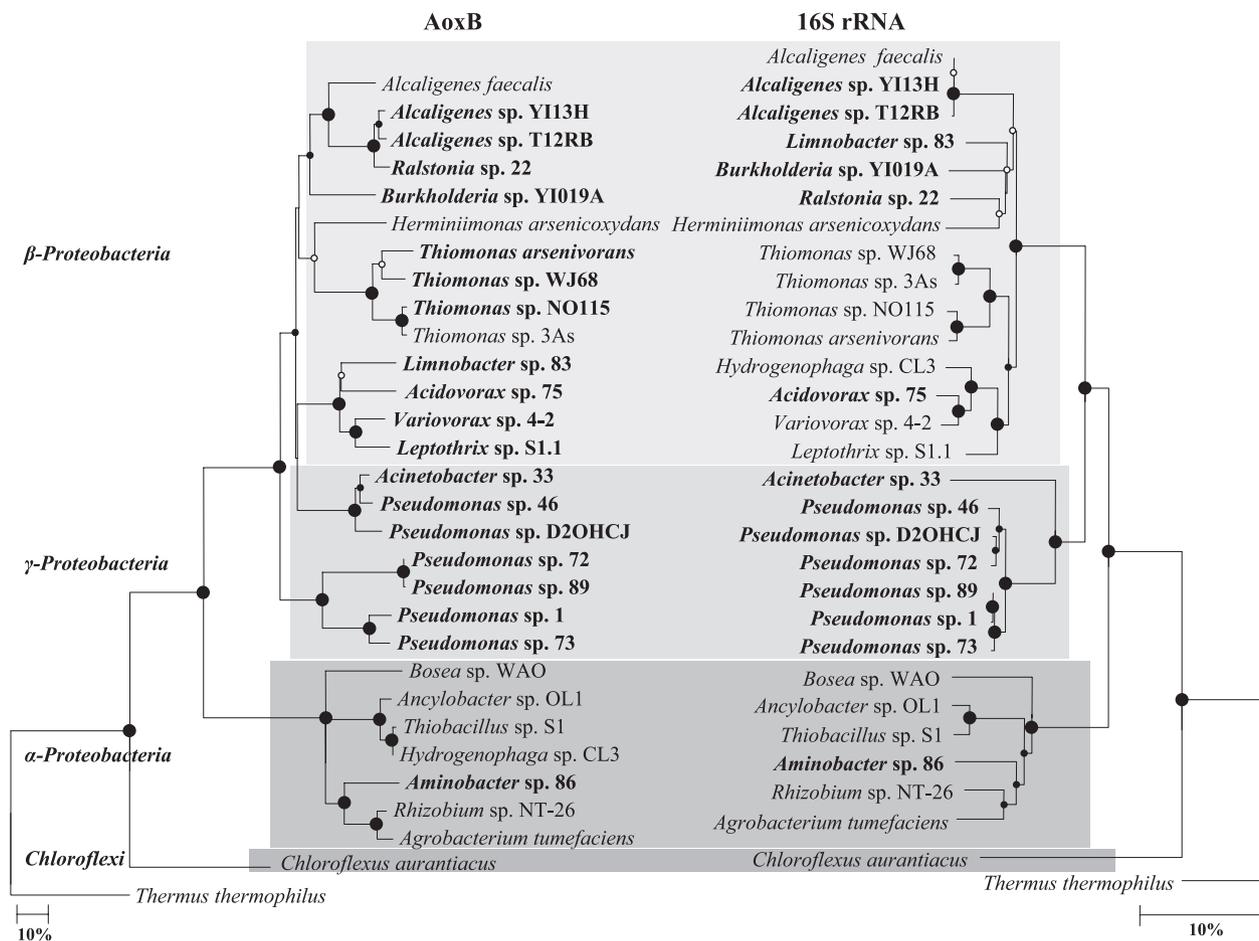


FIG. 2. Neighbor-joining phylogenetic trees showing the relationships between partial AoxB protein (351-residue) and partial 16S rRNA (1,139-nucleotide) sequences of bacterial As(III) oxidizers. Bacteria whose sequences were determined in this study are in bold. The *Thermus thermophilus* AoxB sequence was used as the outgroup. Circles at the branch nodes represent bootstrap percentages for 100 replicates (10): large filled circles, 95 to 100%; small filled circles, 75 to 95%; open circles, 50 to 75%. Scale bars correspond to 10 mutations per 100 residues. Phylogenetic programs were implemented in the TREECON package (41). Parsimony analysis (11) gave similar topologies.

value (100%), while group 2 forms a separate branch of sequences more closely related to those from the *Betaproteobacteria*. The major inconsistency is the position of the betaproteobacterium *Hydrogenophaga* sp. strain CL3 within *Alphaproteobacteria*, which suggests the possibility of lateral gene transfer. However, two *Hydrogenophaga* spp. were properly positioned among the *Betaproteobacteria* on an AoxB tree constructed from shorter sequences (16). However, strain CL3 is also branching within *Alphaproteobacteria* when a tree is built from short sequences (data not shown). Collection of *aoxB* sequences from other *Hydrogenophaga* isolates would help to determine whether or not this conspicuous event is limited to the *Hydrogenophaga* species. Interestingly, the *aoxB* gene is plasmid carried in *Thermus thermophilus* HB8 and is carried by a genomic island in *A. faecalis* (38) and *H. arsenicoxydans* (27), indicating that lateral transfer of the gene can occur. These events have also been demonstrated for other functional genes (12, 23), particularly for *arsC*, a gene involved in the As cycle and in encoding the cytoplasmic As(V) reductase (18). Consequently, AoxB sequences must be used with caution to infer phylogenetic information about environmental As(III)-oxidiz-

ing bacteria. A greater collection of *aoxB* genes will undoubtedly increase confidence in the AoxB phylogeny.

AoxB diversity in environmental samples. Diversity surveys of *aoxB* genes were conducted for evaluating the pertinence of the newly developed assay to assess the composition of As(III) oxidizers in the environment. Gene libraries were constructed (TA cloning kit; Invitrogen, Carlsbad, CA) on (i) an As-contaminated industrial soil (T12R) obtained from a former cokery (19), (ii) an enrichment of this soil under As(III)-oxidizing chemoheterotrophic conditions, and (iii) an enrichment of this soil under As(III)-oxidizing chemoautotrophic conditions. Enrichments were made from a 100-fold-diluted (wt/vol) T12R soil suspension in CasO1 selective medium (2) containing 200 mg liter⁻¹ of As(III) and supplemented with 5 mM Na lactate, 5 mM acetate, and 0.2% yeast extract under heterotrophic conditions; As(III) oxidation was measured as described by Battaglia-Brunet et al. (2). DNA was extracted from 1 g of soil and 50 ml of enrichment cultures using the MoBio UltraClean soil extraction kit (MoBio, Solana Beach, CA).

Of the 133 clones screened by RsaI/HaeIII restriction analyses, 62 inserts were sequenced and finally grouped into 28

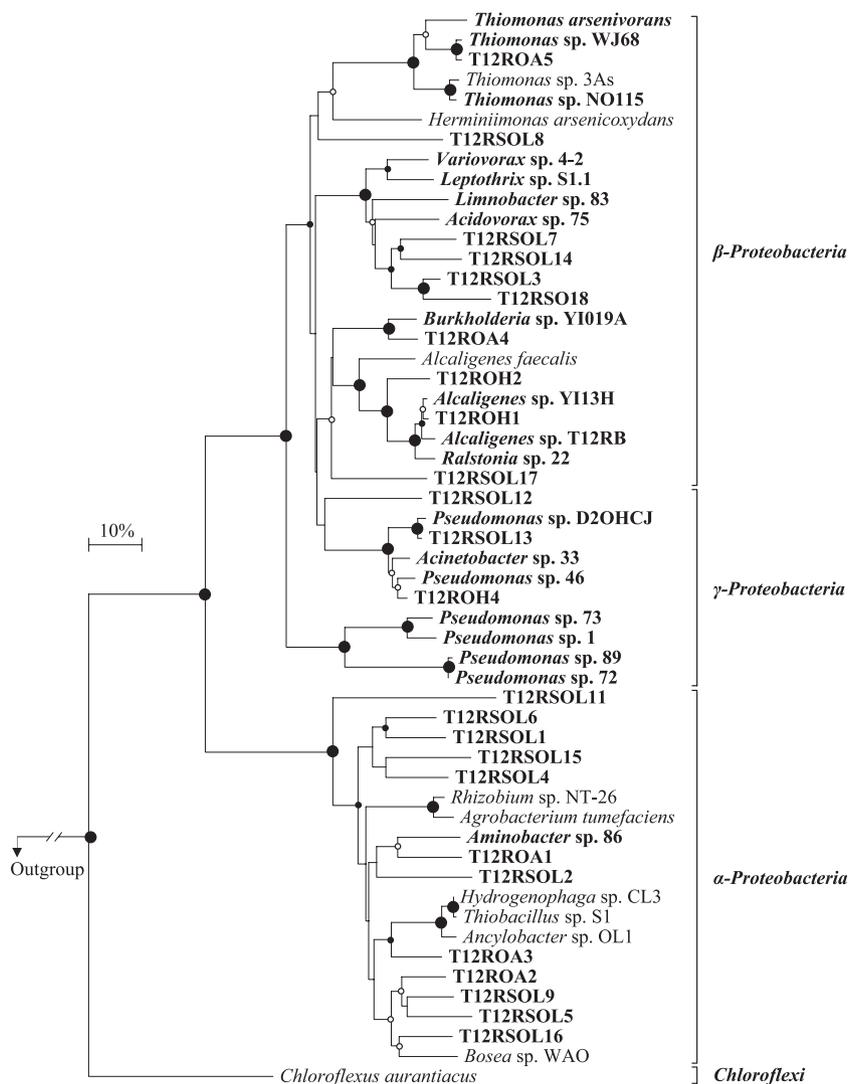


FIG. 3. Neighbor-joining phylogenetic tree of bacterial AoxB sequences retrieved from environmental surveys. T12RSOL, As-contaminated soil T12R; T12ROA, an As(III)-oxidizing chemoautotrophic enrichment of soil T12R; T12ROH, an As(III)-oxidizing chemoheterotrophic enrichment of soil T12R. Bacteria whose sequences were determined in this study are in bold. The *Thermus thermophilus* AoxB sequence was used as the outgroup. Circles at the branch nodes represent bootstrap percentages for 100 replicates (10): large filled circles, 95 to 100%; small filled circles, 75 to 95%; open circles, 50 to 75%. The scale bar corresponds to 10 mutations per 100 residues. All phylogenetic programs were implemented in the TREECON package (41).

operational taxonomic units (OTU) based on a 90% sequence identity. Only *aoxB* gene-related sequences were retrieved, and such exclusive specificity for the target gene has the advantage of reducing the stringency of annealing conditions, thus favoring greater sensitivity. All the environmental AoxB sequences contained the conserved residues predicted by Ellis et al. (9) as being essential for As(III) oxidase activity in *A. faecalis*, suggesting that these sequences produced functional enzymes. The environmental AoxB sequences were affiliated with sequences from strains belonging to the *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, and *Gammaproteobacteria*, with high bootstrap values (Fig. 3).

A large diversity (18 OTU) was detected from the soil T12R. The library was dominated (58%) by *Alphaproteobacteria*-related sequences, among which 19% were related to a *Bosea* sp. Five OTU formed separate branches of known *Alphapro-*

teobacteria sequences. *Betaproteobacteria*-related OTU (17%) were mainly affiliated with an *Acidovorax* sp. *Gammaproteobacteria*-related OTU (25%) were mainly represented by group 2 pseudomonads. Interestingly, incubation of this soil under chemoheterotrophic As(III)-oxidizing conditions led to a decrease in diversity with the selection of betaproteobacterial *Alcaligenes*-related sequences (88%). Only 1 OTU showed a close relationship to the *Gammaproteobacteria* group 2 pseudomonads. Remarkably, no alphaproteobacterium was detected, although *Alphaproteobacteria* were dominant in the soil. When this soil was incubated under chemoautotrophic As(III)-oxidizing conditions, OTU related to sequences of the autotrophic As(III)-oxidizing *Thiomonas* (55%) and *Burkholderia* (17%), genera of the *Betaproteobacteria*, dominated the library. The *Alphaproteobacteria*-related OTU represented 32% of the library (mainly an *Ancylobacter* sp.). To date, the

majority of known As(III)-oxidizing strains belonging to *Alphaproteobacteria* are autotrophs, suggesting a predominance of autotrophic metabolism among them (31). In contrast to the As(III)-oxidizing chemoheterotrophic enrichment, neither *Gammaproteobacteria*- nor *Alcaligenes* (*Betaproteobacteria*)-affiliated sequences were found. Our results underline the usefulness of functional molecular markers in diversity surveys for directly detecting the functionality of an environment without the need of cultivation.

The exclusive detection of environmental *AoxB* sequences belonging to the phylum *Proteobacteria* is probably related to the fact that we studied a mesophilic environment, which is likely to contain a large majority of As(III) oxidizers from this phylum. To date, all but two of the As(III)-oxidizing bacteria isolated from mesophilic sites belong to the phylum *Proteobacteria*, and a recent study (16) has shown that 98% of *aoxB*-like sequences retrieved from mesophilic As-contaminated soils and sediments belong to the *Proteobacteria*. The only reports on the ability of mesophilic gram-positive bacteria to perform As(III) oxidation concerned *Microbacterium lacticum* (25) and *Bacillus arsenoxydans* (14), with the general physiology of the latter organism being similar to that of the betaproteobacterium *A. faecalis* (29). As(III)-oxidizing bacteria belonging to other phyla, such as *Deinococcus-Thermus* (13), *Chloroflexi* (24), and *Aquificae* (8), have been isolated only from geothermic sites. It is also noteworthy that As(III)-oxidizing *Proteobacteria* are able to colonize geothermic sites (17, 35).

Our study has demonstrated that the *aoxB* gene has the major features of a molecular marker. (i) The *aoxB* gene has been found in all the aerobic As(III)-oxidizing bacteria tested so far. (ii) Conserved regions across this gene have enabled the design of valuable primers. (iii) The studied region is sufficiently large to obtain genetic variation, allowing the discrimination of phylogenetic groups. These data are encouraging for the further use of the *aoxB* gene as a functional marker specific to aerobic As(III) oxidizers in environmental diversity surveys. Future work will focus on evaluating the link between As speciation and concentration, and *aoxB* gene diversity and abundance, in the environment.

Nucleotide sequence accession numbers. The *aoxB* sequences have been deposited in the GenBank database under accession no. EU304260 to EU304278, EU304293 to EU304310, and EU304313 to EU304321, and the 16S rRNA gene sequences have been deposited under accession no. EU304279 to EU304292.

This is BRGM contribution no. 05252.

We thank the Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) and the French Ministry of Education and Research for financially supporting this research. The work was partly done within the framework of the Groupement de Recherche-Métabolisme de l'Arsenic chez les Prokaryotes (GDR2909-CNRS) and of the European Union FP6 Integrated Project AquaTerra (project no. GOCE 505428).

We are grateful to K. H. Hallberg for providing *Thiomonas* sp. strain WJ68 and *Thiomonas* sp. strain NO115. We also thank Marie-Claire Lett and Laurence Casalot for useful discussions.

REFERENCES

- 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.
- 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. Microbiol.* **93**:656–667.
- Battaglia-Brunet, F., C. Joulain, F. Garrido, M.-C. Dictor, D. Morin, K. Coupland, D. Barrie Johnson, K. B. Hallberg, and P. Baranger. 2006. Oxidation of arsenite by *Thiomonas* strains and characterization of *Thiomonas arsenivorans* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek* **89**:99–108.
- Battaglia-Brunet, F., Y. Itard, F. Garrido, F. Delorme, C. Crouzet, C. Greffié, and C. Joulain. 2006. A simple biogeochemical process removing arsenic from a mine drainage water. *Geomicrobiol. J.* **23**:1–11.
- Braker, G., J. Zhou, L. Wu, A. H. Devol, and J. M. Tiedje. 2000. Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific northwest marine sediment communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2096–2104.
- Case, R. J., Y. Boucher, I. Dahllöf, C. Holmström, W. F. Doolittle, and S. Kjelleberg. 2007. Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:278–288.
- Coupland, K., F. Battaglia-Brunet, K. B. Hallberg, M.-C. Dictor, F. Garrido, and D. B. Johnson. 2004. Oxidation of iron, sulfur and arsenic in mine waters and mine wastes: an important role for novel *Thiomonas* spp., p. 639–646. In M. Tsezos, A. Hatzikioseyan, and E. Remoudaki (ed.), *Biohydrometallurgy: a sustainable technology in evolution*. National Technical University of Athens, Zografou, Greece.
- Donahoe-Christiansen, J., S. D'Imperio, C. R. Jackson, W. P. Inskeep, and T. R. McDermott. 2004. Arsenite-oxidizing *Hydrogenobaculum* strain isolated from an acid-sulfate-chloride geothermal spring in Yellowstone National Park. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:1865–1868.
- 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* **9**:125–132.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**:783–791.
- Felsenstein, J. 1989. PHYLIP—phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics* **5**:164–166.
- Friedrich, M. W. 2002. Phylogenetic analysis reveals multiple lateral transfers of adenosine-5'-phosphosulfate reductase genes among sulfate-reducing microorganisms. *J. Bacteriol.* **184**:278–289.
- 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.
- 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.
- Hallberg, K. B., and D. B. Johnson. 2003. Novel acidophiles isolated from moderately acidic mine drainage waters. *Hydrometallurgy* **71**:139–148.
- Inskeep, W. P., R. E. Macur, N. Hamamura, T. P. Warelou, S. A. Ward, and J. M. Santini. 2007. Detection, diversity and expression of aerobic bacterial arsenite oxidase genes. *Environ. Microbiol.* **9**:934–943.
- Jackson, C. R., H. W. Langner, J. Donahoe-Christiansen, W. P. Inskeep, and T. R. McDermott. 2001. Molecular analysis of microbial community structure in an arsenite-oxidizing acidic thermal spring. *Environ. Microbiol.* **3**:532–542.
- 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.* **23**:3–18.
- Joubert, A. V. P., L. Lucas, F. Garrido, C. Joulain, and M. Jauzein. 2007. Effect of temperature, gas phase composition, pH and microbial activity on As, Zn, Pb and Cd mobility in selected soils in the Ebro and Meuse Basins in the context of global change. *Environ. Pollut.* **148**:749–758.
- Jukes, T. H., and C. R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules, p. 21–132. In H. N. Munro (ed.), *Mammalian protein metabolism*. Academic Press, New York, NY.
- Kashyap, D. R., L. M. Botero, W. L. Franck, D. J. Hassett, and T. R. McDermott. 2006. Complex regulation of arsenite oxidation in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **188**:1081–1088.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. *J. Mol. Biol.* **16**:111–120.
- Klein, M., M. Friedrich, A. J. Roger, P. Hugenholtz, S. Fishbain, H. Abicht, L. L. Blackall, D. A. Stahl, and M. Wagner. 2001. Multiple lateral transfers of dissimilatory sulfite reductase genes between major lineages of sulfate-reducing prokaryotes. *J. Bacteriol.* **183**:6028–6035.
- Lebrun, E., M. Brugna, F. Baymann, D. Muller, D. Lièvreumont, M.-C. Lett, and W. Nitschke. 2003. Arsenite oxidase, an ancient bioenergetic enzyme. *Mol. Biol. Evol.* **20**:686–693.
- Mokashi, S. A., and K. M. Paknikar. 2002. Arsenic (III) oxidizing *Microbacterium lacticum* and its use in the treatment of arsenic contaminated groundwater. *Lett. Appl. Microbiol.* **34**:258–262.
- Muller, D., D. Lièvreumont, D. D. Simeonova, J.-C. Hubert, and M.-C. Lett. 2003. Arsenite oxidase *aox* genes from a metal-resistant β -proteobacterium. *J. Bacteriol.* **185**:135–141.
- Muller, D., C. Médigue, S. Koechler, V. Barbe, M. Barakat, E. Talla, V.

- Bonnefoy, E. Krin, F. Arsène-Ploetze, C. Carapito, M. Chandler, B. Cournoyer, S. Cruveiller, C. Dossat, S. Duval, M. Heymann, E. Leize, A. Lieutaud, D. Lièvreumont, Y. Makita, S. Manganot, W. Nitschke, P. Ortet, N. Perdrual, B. Schoepp, P. Siguier, D. D. Simeonova, Z. Rouy, B. Segurens, E. Turlin, D. Vallenet, A. Van Dorsseleer, S. Weiss, J. Weissenbach, M.-C. Lett, A. Danchin, and P. N. Bertin. 2007. A tale of two oxidation states: bacterial colonization of arsenic-rich environments. *PLoS Genet.* **3**:e53.
28. Petri, R., L. Podgorsek, and J. F. Imhoff. 2001. Phylogeny and distribution of the *soxB* gene among thiosulfate-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **197**:171–178.
29. Phillips, S. E., and M. L. Taylor. 1976. Oxidation of arsenite to arsenate by *Alcaligenes faecalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**:392–399.
30. Pierson, B. K., and R. W. Castenholz. 1974. A phototrophic gliding filamentous bacterium of hot springs, *Chloroflexus aurantiacus*, gen. and sp. nov. *Arch. Microbiol.* **100**:5–24.
31. Rhine, E. D., S. M. Ni Chadhain, G. J. Zylstra, and L. Y. Young. 2007. The arsenite oxidase genes (*aroAB*) in novel chemoautotrophic arsenite oxidizers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **354**:662–667.
32. Rose, T. M., E. R. Schultz, J. G. Henikoff, S. Pietrokovski, C. M. McCallum, and S. Henikoff. 1998. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Res.* **26**:1628–1635.
33. Rozas, J., J. C. Sánchez-DelBarrio, X. Messeguer, and R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* **19**:2496–2497.
34. Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406–425.
35. Salmassi, T. M., J. J. Walker, D. K. Newman, J. R. Leadbetter, N. R. Pace, and J. G. Hering. 2006. Community and cultivation analysis of arsenite oxidizing biofilms at Hot Creek. *Environ. Microbiol.* **8**:50–59.
36. 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.
37. Scala, D. J., and L. J. Kerkhof. 1999. Diversity of nitrous oxide reductase (*nosZ*) genes in continental shelf sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1681–1687.
38. Silver, S., and L. T. Phung. 2005. Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:599–608.
39. 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. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673–4680.
40. 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.
41. Van de Peer, Y., and R. De Wachter. 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Appl. Biosci.* **10**:569–570.
42. Wagner, M., A. J. Roger, J. L. Flax, G. A. Brusseau, and D. A. Stahl. 1998. Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration. *J. Bacteriol.* **180**:2975–2982.
43. 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. *Biomaterials* **12**:141–149.
44. Xia, X., and Z. Xie. 2001. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *J. Hered.* **92**:371–373.

Résumé

Les bactéries jouent un rôle majeur dans la mobilité de l'arsenic (As) dans l'environnement. L'objectif de cette thèse était d'identifier les acteurs bactériens clés de la biotransformation de l'As pouvant être utilisés comme bioindicateurs du devenir de l'As dans les sites pollués. De nouveaux outils moléculaires ont été développés sur les gènes *aoxB*, codant la sous-unité catalytique de l'AsIII-oxydase, et validés pour analyser qualitativement et quantitativement les communautés AsIII-oxydantes. La pertinence de l'usage de ce gène comme marqueur fonctionnel a été démontrée par sa détection exclusive chez toutes les bactéries AsIII-oxydantes testées et une phylogénie AoxB cohérente et similaire à celle de l'ARNr 16S. Les approches de DGGE et de PCR en temps réel appliquées aux gènes *aoxB* ont permis d'évaluer rapidement et sensiblement les variations de communautés AsIII-oxydantes associées à différents teneurs et spéciations d'As dans des eaux. La coexistence de diverses bactéries AsIII-oxydantes et AsV-réductrices a également été démontrée dans des sols industriels et agricoles. La microflore indigène est ainsi capable d'influencer la spéciation/mobilité de l'As initialement présent et/ou adsorbé sur des oxy-hydroxydes de fer selon les conditions redox du milieu. L'usage des gènes fonctionnels *aoxB* et *arrA*, marqueurs des bactéries AsIII-oxydantes et respirant l'AsV, est pertinent pour évaluer les transformations potentielles de l'As. L'effet de bactéries agissant indirectement sur la mobilité de l'As a également été révélé. La détection de ces activités bactériennes à l'aide d'outils moléculaires est prometteuse pour évaluer la mobilité de l'As dans un écosystème donné.

Mots clés : gènes *aoxB*, gènes *arrA*, bactéries AsIII-oxydantes, bactéries AsV-réductrices, diversité fonctionnelle, arsenic, mobilité, bioindicateurs

Abstract

Bacteria can play a major role in the environmental mobility of arsenic (As). The aim of this study was to identify key bacterial players involved in the biotransformation of As and to use them as bioindicators or predictive tools of As behaviour in polluted sites. Novel molecular tools were developed based on the *aoxB* gene which encodes the catalytic subunit of AsIII-oxidase, and validated for use in the qualitative and quantitative analysis of the AsIII-oxidizing bacterial community. The *aoxB* gene was exclusively detected in all tested AsIII-oxidizing bacteria and AoxB and 16S rRNA gene phylogenies were broadly coherent, demonstrating the usefulness of the *aoxB* gene as a powerful functional marker. The application of DGGE and real-time PCR on *aoxB* genes allowed the rapid and sensitive evaluation of changes in the AsIII-oxidizing community as a function of As speciation and pollution level in surface and groundwaters. AsIII-oxidizers and AsV-reducers were found to coexist in tested soils. The crucial role of indirectly As-mobilizing bacteria was also revealed. Indigenous microflorae affected the speciation and mobility of As inherent within the environmental matrix and/or adsorbed on iron oxy-hydroxydes, according to redox conditions. The relevance of the use of *aoxB* and *arrA* genes, as functional markers of AsIII-oxidizers and AsV-reducers, respectively, to evaluate potential As transformation was demonstrated. The detection of these bacterial communities using molecular tools was shown to have great promise in the prediction of As mobility in the environment.

Keywords: *aoxB* genes, *arrA* genes, AsIII-oxidizing bacteria, AsV-reducing bacteria, functional diversity, arsenic, mobility, bioindicators